

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS TYRIMŲ CENTRAS

RITA ŽIEGYTĖ

**PAUKŠČIŲ MALIARINIŲ PARAZITŲ
(*PLASMODIUM*) IR HEMOPROTEIDŲ
(*HAEMOPROTEUS*) VYSTYMOŠI
PERNEŠĖJUOSE EKSPERIMENTINIAI
TYRIMAI**

Daktaro disertacijos santrauka

Biomedicinos mokslai, Zoologija (05 B)

Vilnius, 2014

Disertacija rengta 2010 – 2014 metais Gamtos tyrimų centre.

Mokslinis vadovas:

habil. dr. Gediminas Valkiūnas

(Gamtos tyrimų centras, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B)

Konsultantas:

prof. dr. Staffan Bensch

(Gyvūnų ekologijos departamentas, Lundo universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B).

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Zoologijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas

prof. habil. dr. Rimantas Rakauskas

(Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B).

Nariai:

habil. dr. Mečislovas Žalakevičius

(Gamtos tyrimų centras, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B).

prof. habil. dr. Jonas Rimantas Stonis

(Lietuvos edukologijos universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B).

dr. Ravinder Sehgal

(San Francisko universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B).

dr. Dimitar Dimitrov

(Bulgarijos mokslų akademijos Biologinės įvairovės ir ekosistemų tyrimų institutas biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B).

Disertacija bus ginama viešame Zoologijos mokslo krypties tarybos posėdyje
2014 m. gruodžio 19 d. 14 val. Gamtos tyrimų centro salėje.

Adresas: Akademijos g. 2, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2014 m. lapkričio 19 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus Universiteto, Gamtos tyrimų centro
bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius.

VILNIUS UNIVERSITY
NATURE RESEARCH CENTRE

RITA ŽIEGYTĖ

**THE EXPERIMENTAL STUDY ON
DEVELOPMENT OF AVIAN MALARIA
PARASITES (*PLASMODIUM*) AND
HAEMOPROTEIDS (*HAEMOPROTEUS*)
IN VECTORS**

Summary of doctoral dissertation

Biomedical Sciences, Zoology (05 B)

Vilnius, 2014

The research was carried out at Nature Research Centre during 2010–2014.

Research Supervisor:

dr. habil. Gediminas Valkiūnas

(Nature Research Centre, Biomedical sciences, Zoology – 05 B).

Consultant Supervisor:

prof. dr. Staffan Bensch

(Department of Animal Ecology of Lund University, Sweden, Biomedical sciences, Zoology – 05 B)

The defence of the doctoral dissertation is held at the Vilnius University Council on Zoology:

Chairman

prof. dr. habil. Rimantas Rakauskas

(Vilniaus university, Biomedical sciences, Zoology – 05 B).

Members:

dr. habil. Mečislovas Žalakevičius

(Nature Research Centre, Biomedical sciences, Zoology – 05 B).

prof. dr. habil. Jonas Rimantas Stonis

(Lithuanian University of Educational Sciences, Biomedical sciences, Zoology – 05 B).

dr. Ravinder Sehgal

(Department of Biology, San Francisco University, Biomedical sciences, Zoology – 05 B).

dr. Dimitar Dimitrov

(Institute of Biodiversity and Ecosystem Research at the Bulgarian Academy of Sciences, Biomedical sciences, Zoology – 05 B).

The defence of the doctoral dissertation will be held during an open session of the Vilnius University, Zoology Research Council at the Nature Research Centre at 14 a.m. on 19th of December, 2014.

Adress: Akademijos g. 2, Vilnius, Lithuania.

The summary of the doctoral dissertation was distributed on 19 of November, 2014. The dissertation is available at the libraries of Vilnius University, Nature Research Centre and Vilnius University website:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius.

ĮVADAS

Temos aktualumas

Hemosporidiniai parazitai priklauso (Haemosporida) protistų grupei, parazituojančiai daugelyje rūšių stuburinių - varliagyvių, roplių, paukščių bei žinduolių. Šių parazitų vystymosi ciklas labai sudėtingas, jiems būtini du šeimininkai - stuburinis ir bestuburis. Stuburiniame šeimininke parazitas dauginasi nelytiniu būdu, o bestuburyje (kraujasiurbyje vabzdyje) lytiniu ir nelytiniu dauginimosi būdais. Kraujasiurbiai dvisparniai vabzdžiai (Insecta: Diptera) yra šių parazitų galutiniai šeimininkai ir pernešėjai (Valkiūnas, 2005; Telford, 2009; Perkins, 2014).

Hemosporidijos yra gerai ištirta parazitinių protistų grupė, nes jai priklausančios *Plasmodium* genties rūšys sukelia šiltuose kraštuose paplitusią ligą - žmogaus maliariją, nuo kurios kasmet miršta milijonai žmonių. Todėl jau daugiau nei šimtmetį (Garnham, 1966; Perkins, 2014) laukinėje gamtoje aptinkami Plasmodiidae šeimos maliariniai parazitai yra naudojami šios ligos tyrimuose kaip modeliniai objektai. *Haemoproteus* genties parazitai yra tiriami mažiau, tačiau jų tyrimai taip pat reikšmingi ir svarbūs, nes šios genties rūšių įvairovė daug didesnė nei maliarinių parazitų, jie sukelia sunkias ir dažnai mirtinas paukščių ligas (Miltgen ir kt., 1981; Atkinson ir kt., 1988; Cardona ir kt., 2002; Olias ir kt., 2011; Cannell ir kt., 2013).

Hemoproteidai ir paukščių maliariniai parazitai paplitę visame pasaulyje išskyrus Antarktidą. Jie cirkuliuoja laukinėje gamtoje bei urbanizuotose vietovėse (Valkiūnas, 2005; Atkinson, 2008; Bensch ir kt., 2009; Braga ir kt., 2011; Perkins, 2014). Ypač aktyvi abiejų genčių atstovų transmisija vyksta šilto ir vidutinio klimato šalyse, kur infekuota daugiau nei 20 % sausumos paukščių populiacijų (Greiner ir kt., 1975; McClure ir kt., 1978; Peirce, 1981; Valkiūnas ir kt., 2003; Pérez-Tris ir kt., 2007; Shurulinkov ir Ilieva, 2009). Abiejų minėtų parazitų infekcijos yra žalingos daugeliui naminių ir laukinių paukščių, sukelia ūmias ir chronines ligas. Manoma, kad maliariniai parazitai ir hemoproteidai neigiamai veiksami stuburinius ir kraujasiurbius vabzdžius reguliuoja populiacijų dydžius gamtoje (Merino ir kt., 2000; Palinauskas ir kt., 2008; Knowles ir kt., 2010; Kazlauskienė ir kt., 2013; Valkiūnas ir kt., 2014).

Šiai dienai daug naujų darbų skirta paukščių *Haemoproteus* ir *Plasmodium* parazitų morfologiniams ir molekuliniais tyrimams, paplitimui, genetinei įvairovei bei evoliuciniams ryšiams, tačiau informacijos apie paukščių hemospori-

dijų vystymąsi pernešėjuose yra labai mažai (Kimura ir kt., 2009). Žinios apie skirtingų hemosporidijų rūšių ir jų genetinių linijų sporogonijos ypatumus yra nepakankamos (Ejiri ir kt., 2009; Kim ir kt., 2009; Kimura ir kt., 2010; LaPointe ir kt., 2010; Njabo ir kt., 2011). Žinomi tik keli eksperimentiniai tyrimai, nagrinėjantys pernešėjus ir hemosporidinių parazitų transmisiją gamtoje (Atkinson, 1991; Desser ir Bennet, 1993; Valkiūnas ir kt., 2002; Kim ir kt., 2009; Levin ir kt., 2013). Labai nedaug žinoma apie paukščių hemosporidijų poveikį kraujasiurbiams vabzdžiams (Valkiūnas ir Iezhova, 2004; Levin ir Parker, 2014). Minėtos informacijos spragos trukdo geriau suprasti šios didelės ir biologiškai įvairios parazitų grupės sukeltamų ligų epidemiologiją bei evoliucinę biologiją. Todėl tirti šių parazitų vystymosi ypatumus kraujasiurbiuose pernešėjuose yra labai svarbu.

Dėl didelės genetinės ir fenotipinės įvairovės, kosmopolitiškumo ir galimybės lengvai paimti bei saugoti mėginius laboratorijoje, paukščių maliariniai parazitai ir hemoproteidai yra patogus ir tinkamas tyrimų objektas, padedantis nagrinėti svarbius fundamentinius parazitų evoliucinės biologijos, ekologijos, atsiradimo bei kitus klausimus.

Informacija apie paukščių hemosporidijų genetines linijas sparčiai kaupiama MalAvi duomenų bazėje (Bensch ir kt., 2009, <http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/>), tačiau nepakankamos žinios apie parazitų pernešėjus trukdo suprasti hemoproteozijų epidemiologiją genetinių linijų lygyje.

Kadangi eksperimentiniai paukščių hemosporidijų parazitų tyrimai paskutiniuosius 20 metų buvo nepakankami (Valkiūnas ir Iezhova, 2004; Kim ir kt., 2009), šios studijos rezultatais norime papildyti esamas žinias apie hemosporidijų pernešėjus, parazito poveikį pernešėjui ir patikslinti tradicinį požiūrį į hemosporidinių parazitų vystymosi ciklą bei šių parazitų diagnostiką pernešėjuose tradiciniais ir molekuliniais tyrimo metodais.

Darbo tikslas ir pagrindiniai uždaviniai

Šio darbo tikslas – naudojant eksperimentinių tyrimų metodus nustatyti paukščių maliarinių parazitų (*Plasmodium*) ir hemoproteidų (*Haemoproteus*) vystymosi ypatumus kraujasiurbiuose dvisparniuose vabzdžiuose.

Darbo tikslui pasiekti numatyti šie uždaviniai:

1. Pagal mitochondrinės DNR citochromo *b* geno (*cyt b*) fragmentą nustatyti artimai susijusių *Plasmodium relictum* genetinių linijų SGS1 ir GRW11 ir kito

izoliato SGS1genetinės linijos vystymosi galimybes bei ypatumus kraujasiurbuose *Culex pipiens pipiens* uoduose.

2. Ištirti *Plasmodium relictum* genetinių linijų SGS1 ir GRW11 sporogoniją *Culex pipiens pipiens* formos *molestus* uoduose.

3. Nustatyti hemoproteidų *Haemoproteus minutus* ir *Haemoproteus belopolskyi* pernešėjus.

4. Išaiškinti *Haemoproteus* parazitų vystymosi ypatumus kraujasiurbuose uoduose (Culicidae).

5. Ištirti *Haemoproteus* parazitų virulentiškumą paukščių krauju mintantiems uodams ir virulentiškumo pobūdį šiuose vabzdžiuose.

6. Nustatyti *Plasmodium homocircumflexum* genetinės linijos COLL4 vystymosi galimybę *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens pipiens* formos *molestus* ir *Aedes vexans* uoduose.

Ginamieji teiginiai:

1. *Plasmodium relictum* artimai susijusios SGS1 ir GRW11 genetinės linijos bei kito izoliato SGS1genetinė linija baigia vystymąsi *Culex pipiens pipiens* uoduose.

2. *Plasmodium relictum* genetinės linijos SGS1 ir GRW11 formuoja morfologiškai panašias vystymosi stadijas *Culex pipiens pipiens* formos *molestus* uoduose bei šiuose uoduose vystosi sinchroniškai iki sporozoito stadijos.

3. Smulkieji mašalai *Culicoides impunctatus* (Ceratopogonidae) yra svarbūs *Haemoproteus minutus*, *H. belopolskyi* ir kitų paukščių hemoproteidų pernešėjai.

4. *Haemoproteus* parazitai uoduose gali vystytis iki oocistos stadijos. Sporozoito stadija nesivysto.

5. Hemosporidijų pernešėjų nustatymas remiantis tik PGR pagrįstais metodais yra nepatikimas. Nustatant hemosporidijų vektorius būtina mikroskopiją ir PGR paremtus metodus derinti tarpusavyje.

6. *Haemoproteus* spp. ookinetės migruodamos uodo kūnu žaloja infekuoto vabzdžio organus, tai sukelia didelį pasimaitinusių aukšta parazitacija infekuotų paukščių krauju uodų mirtingumą.

7. *Plasmodium homocircumflexum* (genetinė linija COLL4) sporogonijos vystymasis *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens pipiens* formos *molestus* ir *Aedes vexans* uoduose sustoja oocistos stadijoje, t. y. parazitas vystosi abortatyviai, sporozoitai nesivysto.

Mokslinis naujumas:

1. Pirmą kartą nustatyta, kad artimai susijusios *Plasmodium relictum* genetinės linijos SGS1 ir GRW11 bei kito izoliato genetinė linija SGS1 vystosi sinchroniškai ir *Culex pipiens pipiens* uoduose formuoja morfologiškai nesiskiriančias vystymosi stadijas.

2. Eksperimentų rezultatai rodo, kad *Culex pipiens pipiens* forma *molestus* yra patogūs eksperimentiniai modeliai paukščių maliarijos tyrimams.

3. Išaiškinta, kad *Haemoproteus minutus* ir *Haemoproteus belopolskyi* baigia sporogoniją smulkiuosiuose mašaluose *Culicoides impunctatus* (Ceratopogoniidae). Šio parazito vystymosi stadijos pernešėjuose aprašytos pirmą kartą.

4. Pirmą kartą ištirta, kad *Haemoproteus* parazitų lytinis procesas ir ookinečių vystymasis vyksta visame pasimaitinusio *Ochlerotatus cantans* uodo virškinamajame trakte bei kūne (galvoje, krūtinėje, pilvelyje). Šis parazitas uode vystosi abortatyviai iki oocistos stadijos. Šiuo metu naudojami diagnostikos metodai paremti PGR tyrimų rezultatais gali nustatyti šių parazitų buvimą vabzdžiuose net iki 17 parų po kraujasiurbio pasimaitinimo infekuotu paukščio krauju, bet neatskiria abortatyvaus ir sėkmingo *Haemoproteus* parazito vystymosi.

5. Nustatyta, kad hemoproteidų ookinetės, esančios *Ochlerotatus cantans* uodo žarnos turinyje, be kliūčių migruoja pro žarnos sienelę į kūną. Dėl šios priežasties parazitas randamas visame kraujasiurbio kūne, todėl sukelia didelį uodų mirtingumą.

6. Pirmą kartą išaiškinta, kad *Plasmodium homocircumflexum* genetinės linijos COLL4 vystymasis uoduose *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens pipiens* formoje *molestus* ir *Aedes vexans* yra abortatyvus.

Mokslinė ir praktinė darbo reikšmė:

1. Laukinėje gamtoje esančių pernešėjų imlumo tyrimai yra sudėtingi, todėl filogenetiniai medžiai, gauti naudojant mitochondrinės DNR citochromo *b* geno fragmentą, gali būti naudojami nustatant genetiškai artimų paukščių maliarinių parazitų pernešėjų rūšis. Tai padėtų greičiau nustatyti imlius pernešėjus gamtoje.

2. Eksperimentų rezultatai rodo, kad *Culex pipiens pipiens* formos *molestus* uodus eksperimentiniams ir epidemiologiniams paukščių maliarijos tyrimams galima sėkmingai naudoti dėl šių priežasčių: a) plataus paplitimo; b) didelio jautrumo skirtingoms *Plasmodium relictum* genetinėms linijoms bei c) galimybės lengvai įsteigti jų kolonijas laboratorijos sąlygomis.

3. Smulkieji mašalai *Culicoides impunctatus* dalyvauja Europos paukščiams pavojingo parazito *Haemoproteus minutus* transmisijoje.

4. Nustatant hemosporidijų pernešėjus PGR metodai turi būti naudojami ir rezultatai vertinami labai atsargiai. PGR tyrimo metodais hemosporidinių parazitų DNR vabzdyje galima aptikti kelias savaites po vabzdžio pasimaitinimo infekuotu paukščio krauju, bet šie metodai neatskiria abortatyvaus ir sėkmingo parazito vystymosi. Vabzdžio seilių liaukose esančių sporozoitų identifikavimas mikroskopijos metodu, sporozoitų infektyvumo įvertinimas yra būtini norint įrodyti, kad tam tikros rūšies vabzdys yra pernešėjas. Mikroskopijos ir PGR metodų derinimas tarpusavyje yra būtinas nustatant hemosporidijų pernešėjus.

5. Naujos žinios apie aukštą *Haemoproteus* parazitų virulentiškumą uodams yra svarbios dėl intensyvios *Haemoproteus* parazitų transmisijos gamtoje. Dėl šio reiškinio stipriai mažėja užsikrėtusių uodų išgyvenamumas bei dalyvavimas infekcijų transmisijoje. Besimaitinančių uodų patelių skaičiaus mažėjimas veikia visą uodų populiaciją. Mes norime atkreipti dėmesį į šio rezultato epidemiologinę svarbą.

6. Rekomenduojame naudoti hemosporidinių parazitų molekulinis marke-rius nustatant galimus ryšius tarp kraujasiurbio vabzdžio ir jo specifinio šeimi-ninko. Tai padės nustatyti kraujasiurbių vabzdžių mitybos prioritetus gamtoje.

Rezultatų pristatymas ir aprobavimas. Darbo rezultatai paskelbti 9 - iose publikacijose, iš jų 6 - iuose straipsniuose ir 3 - ose tarptautinėse konferencijose: Saareme, Estija, 2011; Kopenhagoje, Danija, 2013 ir Vilniuje, Lietuva, 2013.

Disertacijos apimtis ir struktūra. Disertacijos rankraštį sudaro šie skyriai: *Įvadas, Literatūros apžvalga, Medžiaga ir metodai, Rezultatai ir aptarimas* (6 dalių skyrius), *Išvados, Padėkos, Literatūros sąrašas, Disertacijos tema paskelbtų darbų sąrašas*. Disertacijos apimtis 90 puslapių, 4 lentelės bei 13 paveikslų. Li-teratūros sąraše 143 šaltiniai. Disertacija parašyta anglų kalba. Disertacijos san-trauka – lietuvių kalba.

Padėkos. Už vertingus patarimus, konsultacijas, pasitikėjimą ir kantrybę nuoširdžiai dėkoju darbo vadovui dr. Gediminui Valkiūnui. Konsultantui prof. habil. dr. Staffan Bensch esu dėkinga už teorinius patarimus.

Ačiū dr. Tatjanai Ježovai, dr. Vaidui Palinauskui ir dr. Astai Križanauskienei už pagalbą atliekant eksperimentinius tyrimus. Dr. Rasai Bernotienei už konsul-tacijas entomologiniais klausimais, dr. Laimai Baltrūnaitei už patarimus labo-

ratorijoje. Esu dėkinga P.B. Šivickio laboratorijos darbuotojams ir studentams, kurie padėjo dirbant laboratorijoje ir ekspedicijų metu.

Nuoširdus ačiū Rusijos mokslų akademijos Zoologijos instituto Biologinės stoties „Rybachy“ direktoriui dr. Kazimier V. Bolšakov už pagalbą organizuojant darbus bei skirtas patalpas eksperimentiniams darbams, taip pat už pagalbą ir patarimus dėkoju visiems biologinės stoties darbuotojams.

Esu labai dėkinga savo šeimai, ypač dukrai Kotrynai, už jų meilę, supratimą, kantrybę bei toleranciją doktorantūros studijų metu.

Ačiū visiems, kas man padėjote.

Taip pat dėkoju dr. Roland Kuhn (Vokietija), kuris mielai padėjo įkurti *C. p. pipiens f. molestus* uodų koloniją.

Tyrimai finansuoti iš EU socialinio fondo „Parama mokslininkų ir kitų tyrėjų mokslinei veiklai“ (VPI-3.1.-ŠMM-07-K-01-047).

LITERATŪROS APŽVALGA

Šiame disertacijos skyriuje pateikta žinomos ir naujausios literatūros apžvalga apie paukščių maliarinių parazitų ir hemoproteidų tyrimų istoriją bei gyvenimo ciklus.

Taip pat atlikta *Plasmodium relictum* sporogonijos *Culex pipiens pipiens* ir *Culex pipiens pipiens* formos *molestus* uoduose, *Haemoproteus* spp. sporogonijos smulkiuosiuose mašaluose, *Haemoproteus* parazitų vystymosi kraujasiurbiuose uoduose bei *Haemoproteus* parazitų virulentiškumo kraujasiurbiams vabzdžiams žinomos literatūros apžvalga.

MEDŽIAGA IR METODAI

Rengiant šį darbą buvo atlikti keli atskiri eksperimentiniai darbai, turintys daug metodinių skirtumų ir specifinę eksperimento eigą. Išsamus metodų aprašymas pateiktas mūsų publikuotuose straipsniuose (Kazlauskienė ir kt., 2013; Valkiūnas ir kt., 2013, Valkiūnas ir kt., 2014; Žiegytė ir kt., 2014), esminės detalės aprašytos disertacijoje. Žemiau glaustai apžvelgsime pagrindinius metodologinius aspektus.

Aprašyti eksperimentai atlikti vadovaujantis Lietuvos Respublikos ir Rusijos Federacijos įstatymais. Eksperimentinės procedūros buvo patvirtintos Tarptautine mokslinių tyrimų bendradarbiavimo sutartimi tarp Rusijos mokslų Akademijos Zoologijos instituto Biologinės stoties „Rybachy“ ir Gamtos tyrimų centro

(25 - 05 - 2010). Eksperimentinių paukščių priežiūros ir naudojimo taisyklės patvirtintos Lietuvos valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos (Nr. 2012/01/04 - 0221).

Tyrimų vieta

Eksperimentiniai darbai buvo atlikti Rusijos mokslų Akademijos Zoologijos instituto biologinėje stotyje „Rybachy” ir Gamtos tyrimų centro P. B. Šivickio parazitologijos laboratorijoje 2010 - 2014 metais.

Paukščių kraujo mėginių ėmimas ir mikroskopinė analizė

Paukščiai buvo gaudomi voratinkliniais tinklais, „Rybachy” tipo gaudyklėmis ir apibūdinami. Iš poraktinės venos heparinizuotais mikrokapiliarais buvo imama apie 30 μ l kraujo. Mėginiai konservuojami SET buferyje, vėliau -20° C temperatūroje užšaldomi. Iš kiekvieno paukščio buvo paimtas lašas kraujo ir ruošiami du arba trys tepinėliai, kurie džiovinami, fiksuojami metanolyje ir dažomi Gimzos dažais. Prieš kiekvieną eksperimentinę kraujasiurbių vabzdžių krėtimą paruošti preparatai mikroskopuojami. Eksperimentiniams krėtimams tinkama parazitacija bei jos intensyvumas vertinamas apskaičiuojant subrendusių gametocitų dalį (%) 1000 - yje eritrocitų. *Haemoproteus* ir *Plasmodium* genčių rūšys buvo identifikuojamos remiantis Valkiūnu (2005) ir Palinausku ir kt. (2007).

Eksperimentiniams smulkiųjų mašalų ir uodų krėtimams lauko sąlygomis (Žiegytė ir kt., 2014) buvo atrinkti natūraliai gamtoje viena parazito rūšimi užsikrėtę paukščiai. Eksperimentiškai užkrėstos kanarėlės *Serinus canaria domestica* buvo naudotos eksperimentiniams uodų krėtimams laboratorijoje (Palinauskas ir kt., 2008; Kazlauskienė ir kt., 2013).

Visi paukščiai laikyti patalpose, apsaugotose nuo kraujasiurbių pernešėjų ir maitinti standartiniais lesalais skirtais vabzdžialesiams paukščiams. Patalpų santykinė drėgmė 55 - 65 %, temperatūra $20 \pm 1^{\circ}$ C, natūralus dienos/nakties (D/N) fotoperiodas 17:7 hr.

Uodų rinkimas ir priežiūra

Natūraliam kraujasiurbių užsikrėtimui hemosporidijomis tyrimo vietoje nustatyti uodai buvo gaudomi entomologiniu tinkleliu ir fiksuojami 96 % etanolyje, morfologinei rūšies identifikacijai sugauti kraujasiurbiai buvo fiksuojami 70 % etanolyje, histologiniams pjūviams atlikti tiriami vabzdžiai buvo fiksuojami 10 % formalino tirpale.

Culex pipiens pipiens žiemojantys uodai buvo renkami dviejuose Vilniaus miesto rūsiose, sausio mėnesį 2012 – 2013 metais. Surinkti uodai buvo laikomi patalpoje standartinėmis sąlygomis ($22 \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūra, $60 \pm 2\%$ drėgmė bei 14:10 D/N specialiuose $65 \times 65 \times 65$ cm dydžio „narvuose“ uodams. Po dviejų savaitių adaptacijos laboratorijoje uodai buvo naudojami eksperimentiniams krėtimams hemosporidiniais parazitais.

Siekdami įkurti *Culex p. pipiens* f. *molestus* ir *A. vexans* kolonijas mes naudojome uodų lervas, gautas iš prof. Roland Kuhn (kolonijos pradėtos kurti surinkus lervas Hesse regione (Vokietija) ir kultivuojamos nuo 1990 metų).

Eksperimentiniai smulkiųjų mašalų krėtimai *Haemoproteus* rūšimis buvo atlikti šalia ežero Chaika, esančio prie „Rybachy“ kaimo. Visi eksperimentiniai mašalų krėtimai buvo atliekami nuo birželio 21 iki liepos 2 dienos, kuomet išskrenda pirmoji mašalų generacija (Liutkevičius, 2000).

Ekperimentinis dvisparnių vabzdžių krėtimas

1. Metodas naudotas lauko sąlygomis.

Tiriamų kraujasiurbių vabzdžių susitelkimo vietoje, devint lateksines pirštines, rankose laikomas infekuotas paukštis. Kraujasiurbiai noriai maitinasi nutūpę ant rankose laikomo paukščio galvos. Paukščio galva, nutūpus keliems vabzdžiams ir jiems besimaitinant, pro landą su užtrauktuku įkišama į tam tikro dydžio medžiaginį uodų „narvą“. Pasimaitinę uodai nuskrenda nuo galvos ir lieka „narve“, o paukštis ištraukiamas išorėn.

2. Metodas naudotas laboratorijoje.

Apie 30 – 50 vienetų uodų patelių suleidžiamos į eksperimentinį „narvą“. Į skirtingus „narvus“ įdedamos skirtingais parazitais infekuotos kanarėlės. Viena infekuota kanarėlė ne ilgiau nei 20 minučių laikotarpiui patupdoma į plastikinį vamzdelį (15 cm ilgio ir 5 cm pločio). Pro vamzdelyje esantį tarpą iškišamos paukščio kojos ir keliolikai narve esančių kraujasiurbių leidžiama nutūpus ant kojų pasimaitinti kanarėlių krauju. Uodų patelės pasimaitinusios infekuotu krauju perkeliamos į mažesnę „narvą“ bei papildomai iki skrodimo maitinamos 5–10 % sacharozės vandeniniu tirpalu.

PGR metodų naudojimas

DNR iš kraujo mėginių išskirti buvo naudojamas standartinis amonio acetato metodas ir „innuPREP blood DNA Mini kit“ (Analytikjena, Berlin, Germany) DNR išskyrimo iš audinių rinkinys. Parazito mitochondrinio cyt *b* fragmentas

amplifikuotas naudojant lizdinę PGR (Hellgren ir kt., 2004) ir 2 poras pradmenų – HaemNFI ir HaemNR3, kurie amplifikuoja *Haemoproteus*, *Plasmodium* ir *Leucocytozoon cyt b* geno fragmentus. Kitai PGR reakcijai buvo naudojami HA-EMF ir HAEMR2 pradmenys, kurie yra specifiški *Haemoproteus* ir *Plasmodium* spp. (Bensch ir kt., 2000). Šio protokolo metodas jautrus tiriamiems parazitams bei plačiai naudojamas hemosporidijų diagnostikoje. Amplifikuotų mėginių galutinis PGR produktas (1.5 µl) vertintas elektroforezės metodu 2 % agarozės gelyje. Kontaminacijos detekcijai kas 10 mėginių buvo naudojamos neigiama kontrolė (distiliuotas benukleazis vanduo) ir teigiama kontrolė (mikroskopijos būdu nustatytas teigiamas mėginys arba infekuoto kraujasiurbio mėginys). Reakcijų metu kontaminacijų aptikta nebuvo. Siekiant nustatyti genetines linijas teigiami mėginiai buvo sekvenuoti. Fragmentai buvo sekvenuojami nuo 5' galo naudojant HAEMF pradmenį. Sekos buvo redaguojamos ir lyginamos naudojant BioEdit programą (Versija 7.0.9.0; Hall, 1999). Nustatytos sekos deponuotos PopSet duomenų bazėje JAV Nacionaliniame Biotechnologinių informacijų centre ir yra laisvai prieinamos Genų banke.

Kraujasiurbių skrodimas ir parazito vystymosi stadijų preparatų ruošimas

Naudojant 96 % etilo alkoholio garus infekuotų kraujasiurbių vabzdžių patelės buvo anestezuojamos. Naudojantis stereoskopiniu mikroskopu prieš skrodimą kraujasiurbiams buvo pašalinamos kojos ir sparnai. Vabzdžiai skrodžiami ant objektinio stiklelio fiziologinio tirpalo laše. Ookinečių preparatui paruošti iš vabzdžio išskiriama žarna, ruošiami žarnos turinio preparatai, kurie džiovinami, fiksuojami ir dažomi Gimzos dažais. Oocistų preparatui paruošti taip pat išskiriama žarna, ir ruošiamas pastovus žarnos preparatas, kaip aprašyta Valkiūno (2005). Sporozoitų preparatui paruošti buvo išskiriamos vabzdžio seilių liaukos, jos sutrinamos, paruošti preparatai džiovinami, fiksuojami ir dažomi Gimzos dažais.

Histologiniai 4 µm kraujasiurbių vabzdžių kūno dalių pjūviai buvo fiksuojami, dažomi hematoksilino - eozino dažais ir mikroskopuojami šviesiniu mikroskopu. Infekuoti ir neinfekuoti vabzdžiai (skirti kontrolei) tiriami tais pačiais metodais.

Mikroskopinė paruoštų preparatų analizė

Paruošti preparatai buvo mikroskopuojami Olympus BX – 43 šviesiniu mikroskopu, tiriami medžiaga fotografuojama Olympus SZX2 – FOF skaitmenine vaizdo kamera. Vaizdai analizuojami vaizdo analizės programa QCapture Pro 6.0, Image – Pro Plus (Tokyo, Japan). Pirmą kartą preparatai buvo peržiūrėti

nedideliu padidiniu ($\times 200$, $\times 600$), detaliau analizuojami dideliu ($\times 1000$) didiniu. Parazitų morfometrinių analizė atliekama, kaip aprašyta Valkiūno (2005). Pavyzdiniai ookinečių, oocistų, sporozoitų ir histologinių pjūvių preparatai deponuoti Gamtos tyrimų centre, P. B. Šivickio laboratorijoje.

Statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė buvo atliekama naudojantis „Statistica 7“ programa. T - testas nepriklausomoms imtims buvo naudojamas siekiant nustatyti parazitų vystymosi stadijų požymių skirtumų statistinį patikimumą.

Eksperimento metu užsikrėtusių vabzdžių procentas buvo lyginamas naudojant χ^2 testą. Cox - Mantel testas buvo taikomas lyginant skirtingų uodų grupių išgyvenamumą.

Mann - Whitney U - testas buvo naudojamas *P. relictum* SGS1 ir GRW11 genetinių linijų oocistų kiekiui uodų žarnose palyginti. Buvo apskaičiuotos (oocistų skaičiaus uodų žarnose) mediana, pirmoji ir trečioji kvartilės bei reikšmės, nepatenkančios tarp išskirčių.

Išgyvenusių vabzdžių procentui palyginti buvo naudojamas Fisherio testas.

Patikimumo lygmuo $P < 0,05$ buvo laikomas reikšmingu visuose statistiniuose testuose.

Genetiniai atstumai tarp parazito genetinių linijų apskaičiuoti MEGA 6.0 programos versija naudojant Jukes - Cantor modelį, kuris teigia, kad tranzicijų ir transversijų dažnis evoliucijos eigoje nesikeičia (Kumar ir kt., 2004).

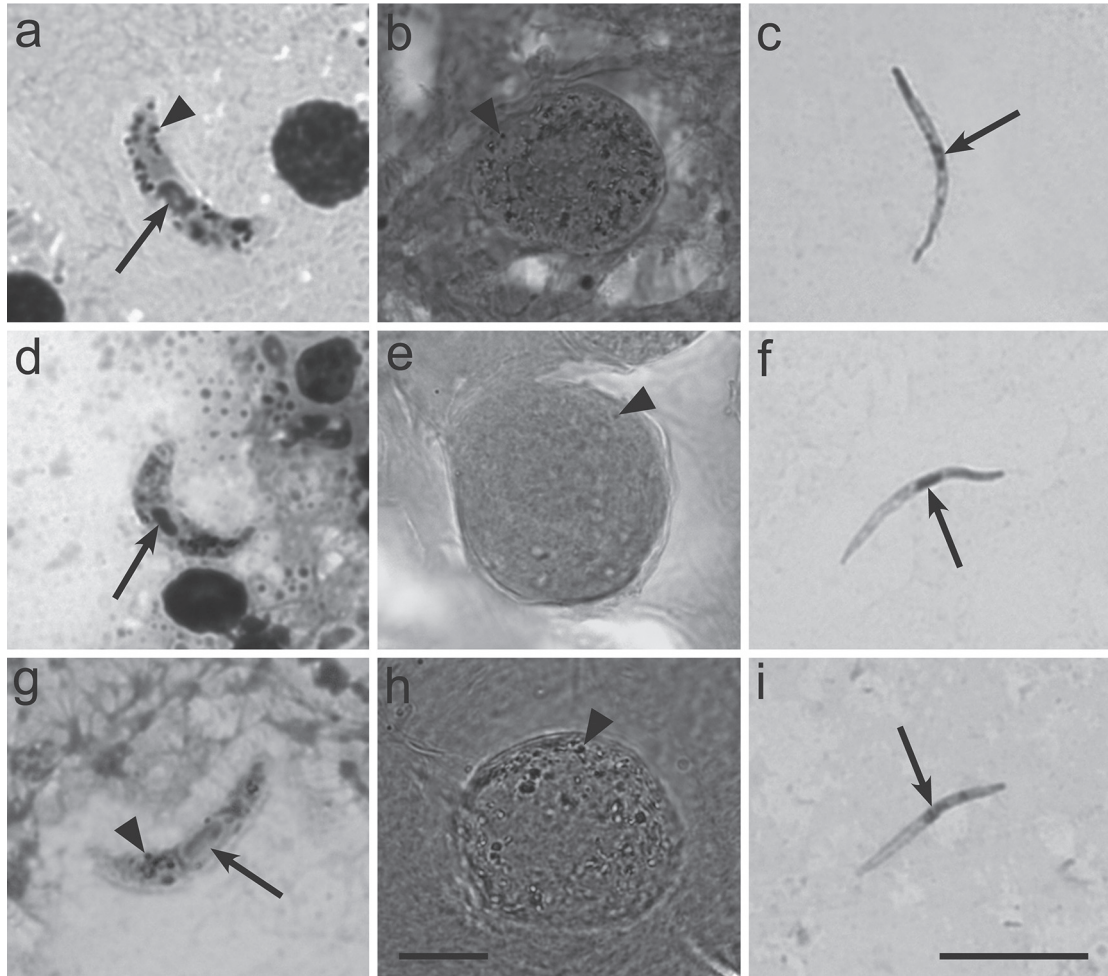
REZULTATAI IR APTARIMAS

1 Eksperimentas. Artimai susijusių *Plasmodium relictum* genetinių linijų SGS1 ir GRW11 bei kito izoliato SGS1 genetinės linijos vystymosi dėsningumai *Culex pipiens pipiens* (Culicidae) kraujasiurbiuose uoduose

Visi eksperimentiniu būdu užkrėsti *C. p. pipiens* uodai užsikrėtė *P. relictum* SGS1 ir GRW11 genetinių linijų infekcijomis. Parazito vystymasis buvo stebimas visuose užkrėstų uodų patelių organizmuose. Ookinečių, oocistų ir sporozoitų stadijų vystymasis *C. p. pipiens* uoduose buvo panašus. *P. relictum* parazito stadijos vystėsi tuo pačiu laiku (1 pav. a – i). Visų parazito genetinių linijų: 1) ookinetes galima buvo matyti nuo 1 iki 2 paros po infekcijos (ppi), po 6 – os ppi ookinečių žarnos turinyje jau nebuvo; 2) augančios oocistos žarnoje stebėtos nuo 6 – os ppi; 3) subrendusios oocistos stebėtos iki 24 ppi. Tarp 24 ir 26 parų oo-

cistos pradeda degeneruoti ir išnyksta 28 – 32 paromis po infekcijos; 4) pirmieji sporozoitai seilių liaukose buvo pastebėti 14 ppi ir matomi iki 32 ppi. Atlikti matavimai parodė, kad šių genetinių linijų parazitų morfologiniai ir morfometriniai ookinečių (1 pav. a, d, g), brandžių oocistų (1 pav. b, e, h) ir sporozoitų (1 pav. c, f, i) matavimai nesiskiria ($P > 0.05$).

Remiantis cyt *b* geno fragmentu yra atlikta keletas eksperimentinių tyrimų apie *P. relictum* genetinių linijų pasiskirstymą šeimininkuose ir geografiniuose regio-



1 pav. Ookinetės (a, d, g), oocistos (b, e, h) ir sporozoitai (c, f, i) *Culex pipiens pipiens* uode eksperimentiniu būdu infekuotame parazito SGS1 genetinė linija, izoliuota iš *Loxia curvirostra* (a – c), genetinė linija SGS1 izoliuota iš *Serinus canaria domestica* (d – f) ir genetinė linija GRW11 izoliuota iš *Passer domesticus* (g – i). Preparatai fiksuoti metanolium ir dažyti Gimzso dažais (a, c, d, f, g, i). Formaline fiksuotas ir Erlich'o hematoksilenu dažytas žarnos preparatas (b, e, h). Ilgos paprastos rodyklės – parazitų branduoliai; trikampės rodyklės – pigmento granulės. Skalė = 10 μ m; ilgesnė – ookinečių ir sporozoitų paveikslams, o trumpesnė – oocistų paveikslams.

Fig. 1. Ookinetes (a, d, g), oocysts (b, e, h) and sporozoites (c, f, i) of *Plasmodium relictum* in mosquitoes *Culex pipiens pipiens* experimentally infected with the parasite lineage pSGS1 from *Loxia curvirostra* (a – c), lineage pSGS1 from *Serinus canaria domestica* (d – f) and lineage pGRW11 from *Passer domesticus* (g – i). Methanol - fixed and Giemsa - stained thin films (a, c, d, f, g, i). Formalin - fixed whole mounts stained with Erlich's hematoxylin (b, e, h). Long simple arrows – nuclei of parasites; triangle arrowheads – pigment granules. Scale bars = 10 μ m; long bar is for ookinete and sporozoite images, and short bar is for oocyst images.

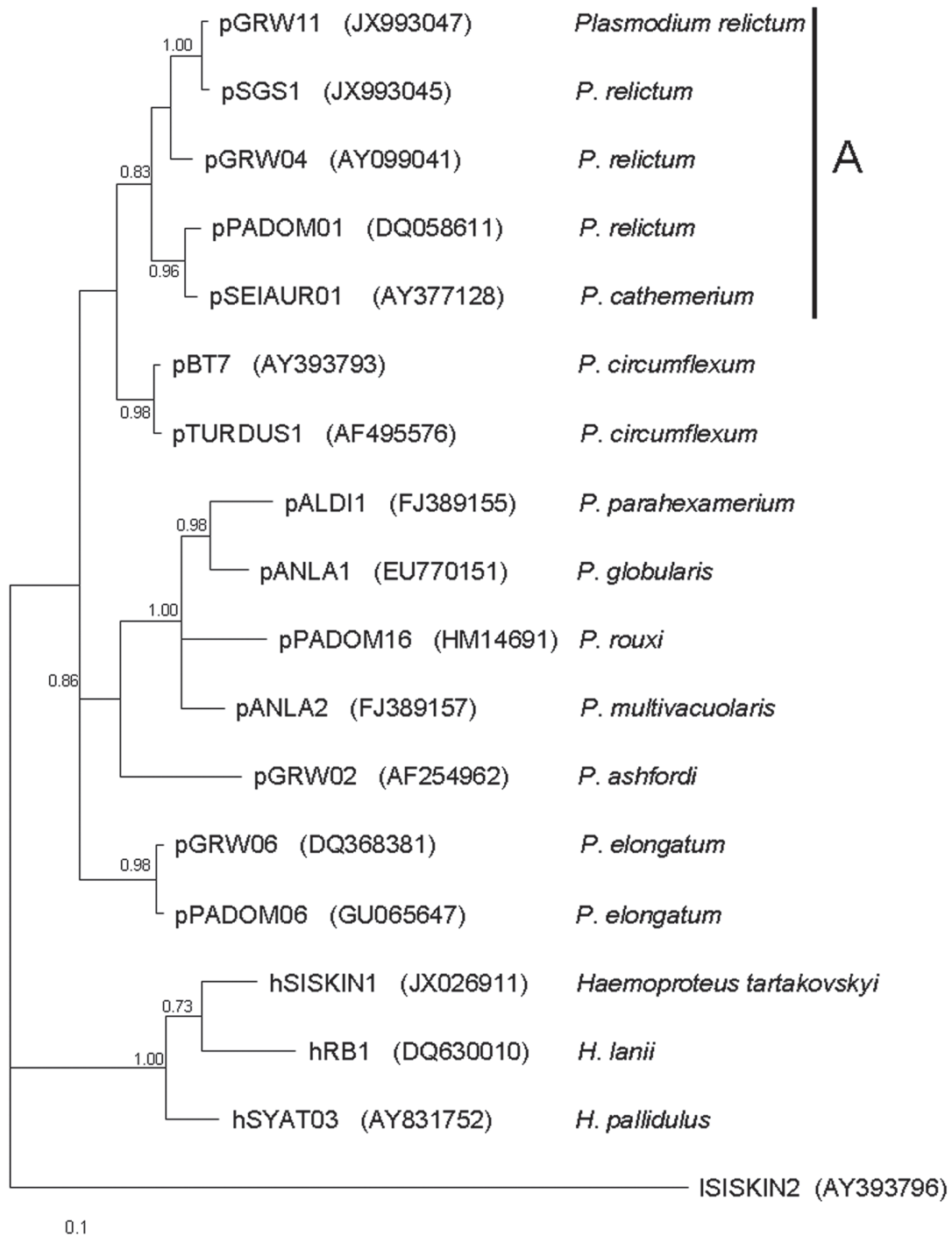
nuose (Beadell ir kt., 2006; Beadell ir kt., 2009; Dimitrov ir kt., 2010; Marzal ir kt., 2011), virulentiškumą paukščiams (Palinauskas ir kt., 2008; Cellier - Holzem ir kt., 2010), sporogoniją (Vézilier ir kt., 2010), tačiau palyginamųjų studijų apie šio ir kitų maliarinių parazitų skirtingų genetinių linijų vystymąsi toje pačioje uodų rūšyje nėra. Pagrindiniai šio tyrimo rezultatai yra tokie: 1) artimai susijusios *P. relictum* genetinės linijos bei 2) ta pati genetinė linija iš kito šeimininko (izoliato) *C. p. pipiens* uoduose vystosi sinchroniškai ir formuoja morfologiškai nesiskiriančias vystymosi stadijas bei infektyvius sporozoitus. Manome, kad remiantis filogenetinė analize (2 pav.) šios išvados galėtų būti taikomos ir kitoms maliarinių parazitų genetiškai artimoms *P. relictum*, *P. circumflexum*, *P. elongatum* linijoms, kurios yra vienoje filogenetinio medžio monofiletinėje šakoje (2 pav.).

Šis tyrimas parodė, kad filogenetiniai medžiai remiantis *cyt b* geno sekų analize gali padėti numatyti artimų genetinių linijų sporogonijos vystymosi ypatumus pernešėjuose. Šią prielaidą yra paminėjusi Martinsen ir kt. (2008) studijoje apie evoliucijos metu didelių grupių hemosporidinių parazitų prisitaikymą prie tam tikrų grupių dvisparnių pernešėjų.

Šio tyrimo duomenys padės geriau suprasti paukščių maliarinių parazitų *Plasmodium* spp. biologiją ir įvairovę prognozuojant galimus artimų *Plasmodium* spp. genetinių linijų sporogonijos modelius, kuomet apie sporogonijos vystymąsi ir pernešėją nėra informacijos.

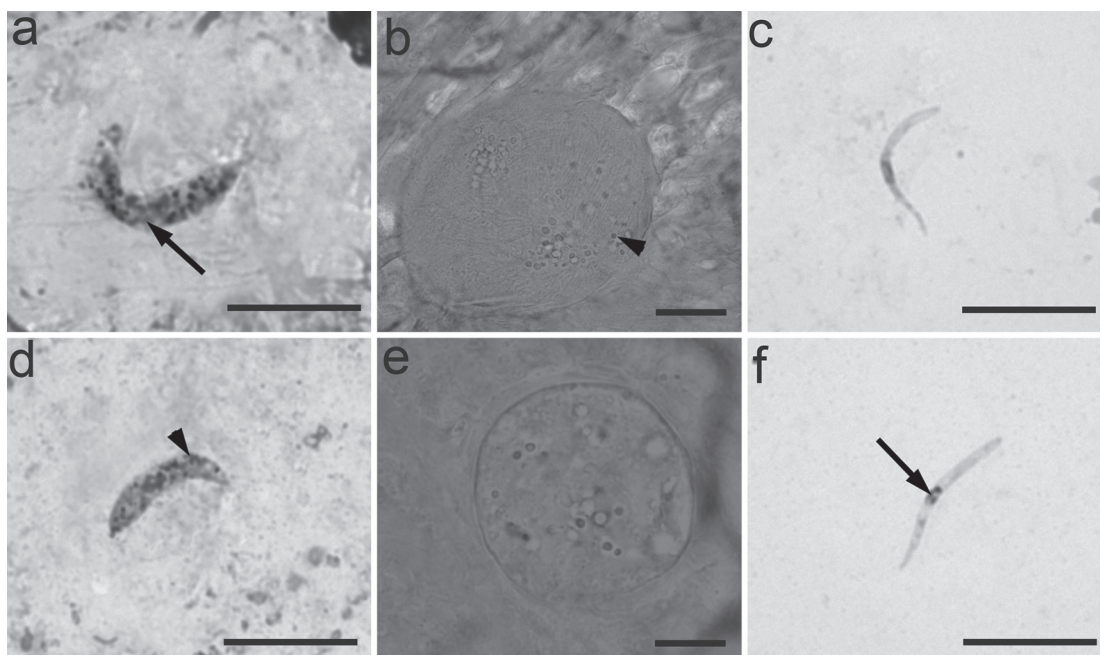
2 Eksperimentas. *Plasmodium relictum* (SGS1 ir GRW11) genetinių linijų vystymasis *Culex pipiens pipiens* formos *molestus* uoduose

P. relictum genetinių linijų SGS1 ir GRW11 ookinetės buvo stebimos visuose tirtuose *C. p. pipiens* f. *molestus* uodo žarnos preparatuose 1 – 2 ppi (3 pav. a, d). Abiejų genetinių linijų oocistos visų infekuotų uodų žarnose buvo matomos 10 – 15 ppi (3 pav. b, e). Įdomu tai, kad šiuose uoduose skyrėsi dviejų genetinių linijų išsivysčiusių oocistų skaičiai (4 pav.). GRW11 genetinės linijos oocistų išsivystė žymiai daugiau nei genetinės linijos SGS1 ($P = 0.004$). Abiejų genetinių linijų sporogonija buvo pilna ir susiformavusius sporozoitus visuose uodų seilių liaukų preparatuose galima buvo matyti 15 – 18 ppi (3pav. c, f). Tai rodo abiejų genetinių linijų sinchronišką sporogoniją vykstančią tomis pačiomis sąlygomis. Genetinių linijų SGS1 ir GRW11 ookinečių, oocistų ir sporozoitų vystymosi stadijos morfologiškai nesiskyrė (3 pav.), šių genetinių linijų sporogonijos stadijos lygiai taip pat be morfolominių skirtumų vystėsi ir *C. p. pipiens* uoduose (Kazlauskienė ir kt., 2013).



2 pav. Filogenetinis medis - remiantis mitochondrinio (*cyt b*) geno fragmentu (478 bp). *Plasmodium* spp. (14 sekų) ir *Haemoproteus* spp. (3 sekos). *Leucocytozoon* sp. genetinė linija naudojama kaip išorinė grupė. Šakų išsiskyrimo taškuose pateiktos atitikimo kriterijaus vertės. Genetinių linijų pavadinimai ir genų banko registracijos numeriai (įrašyti skliausteliuose) yra nurodyti prieš parazitų rūšių pavadinimus. Vertikali linija A nurodo SGS1, GRW11 ir kitas artimas *Plasmodium relictum* ir *P. cathemerium* genetines linijas.

Fig. 2. Bayesian phylogeny of mitochondrial *cyt b* lineages (478 bp) of avian *Plasmodium* spp. (14 sequences) ir *Haemoproteus* spp. (3 sequences). One lineage of *Leucocytozoon* sp. is used as outgroup. Posterior probabilities are indicated near the nodes. Codes of lineages and GenBank accessions (in parenthesis) are given before parasite species name. Vertical bar A indicates lineages pSGS1, pGRW11 and other closely related lineages of *Plasmodium relictum* and *P. cathemerium*.

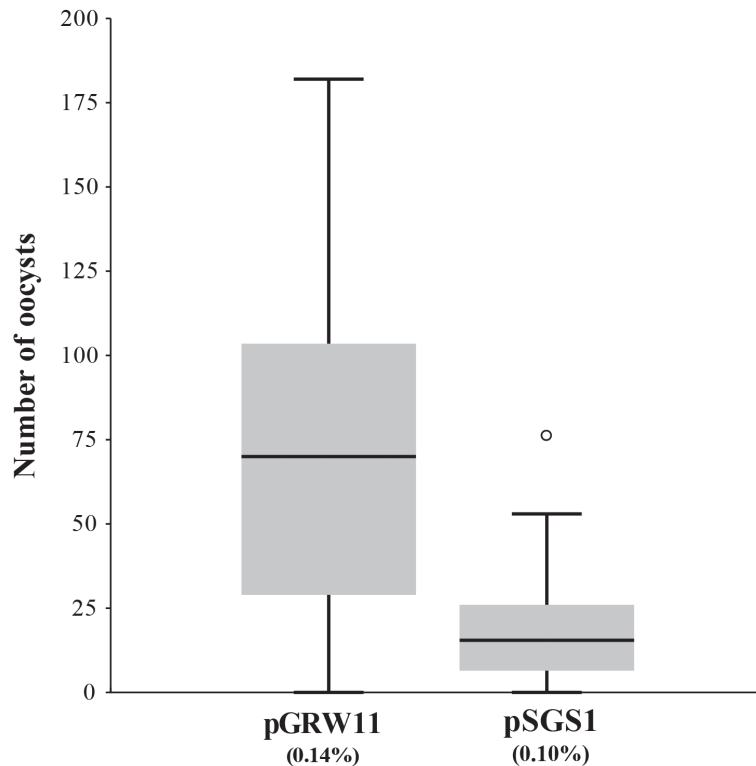


3 pav. Ookinetės (a, d), oocistos (b, e) ir sporozoitai (c, f) *Plasmodium relictum* SGS1 genetinės linijos (a - c) ir GRW11 genetinės linijos (d - f) eksperimentiškai infekuotame *Culex pipiens pipiens* formos *molestus* uode. Ilgos paprastos rodyklės – parazitų branduoliai; trikampės rodyklės – pigmento granulės. Skalė = 10 μm.

Fig. 3. Ookinetes (a, d), oocysts (b, e) and sporozoites (c, f) the lineages pSGS1 (a - c) and pGRW11 (d - f) of *Plasmodium relictum* in experimentally infected mosquitoes *Culex pipiens pipiens* form *molestus*. Long simple arrows – nuclei of parasite; triangle arrowheads – pigment granules. Scale bars = 10μm.

Šiame tyrime išskiriami trys pagrindiniai rezultatai. Pirma, *C. p. pipiens* f. *molestus* uodai, nepaisant nusistovėjusio požiūrio apie jų antropofiliškumą, noriai maitinasi paukščių krauju (Becker ir kt., 2003). Antra, dėl sėkmingos *P. relictum* genetinių linijų SGS1 ir GRW11 sporogijos *C. p. pipiens* f. *molestus* uodai yra tinkami modeliai epidemiologiniams paukščių maliarijos tyrimams. Trečia, *C. p. pipiens* f. *molestus* uodų jautrumas artimai susijusiom *P. relictum* genetinėm linijom SGS1 ir GRW11 buvo skirtingas, dėl skirtingo kiekio oocistų stadijos formavimosi vabzdžiuose (4 pav.). Šios išvados įdomios, nes genetinis skirtumas remiantis *cyt b* geno fragmentu tarp šių linijų yra labai mažas – tik viena nukleotidų pora ir tai gali lemti kiekybiškai skirtingą sporogoniją tose pačiose uodų rūšyse.

Oocistų skaičius yra tiesiogiai susijęs su gyvybingų sporozoitų išsivystymu kraujasiurbio seilių liaukose, taip pat su uodų išgyvenamumu (Sinden ir kt., 2007; Dawes ir kt., 2009). Tai turėtų turėti įtakos uodų, kaip pernešėjų, veiksniumi, bet lieka nepakankamai ištirta, ypač tos pačios rūšies maliarinių parazitų genetinių linijų lygyje. Šie tyrimai suteikia pirminę informaciją apie genetinių linijų SGS1 ir GRW11 vystymosi ypatumus *C. p. pipiens* f. *molestus* uoduose, kurie imlūs *P. relictum* infekcijai.

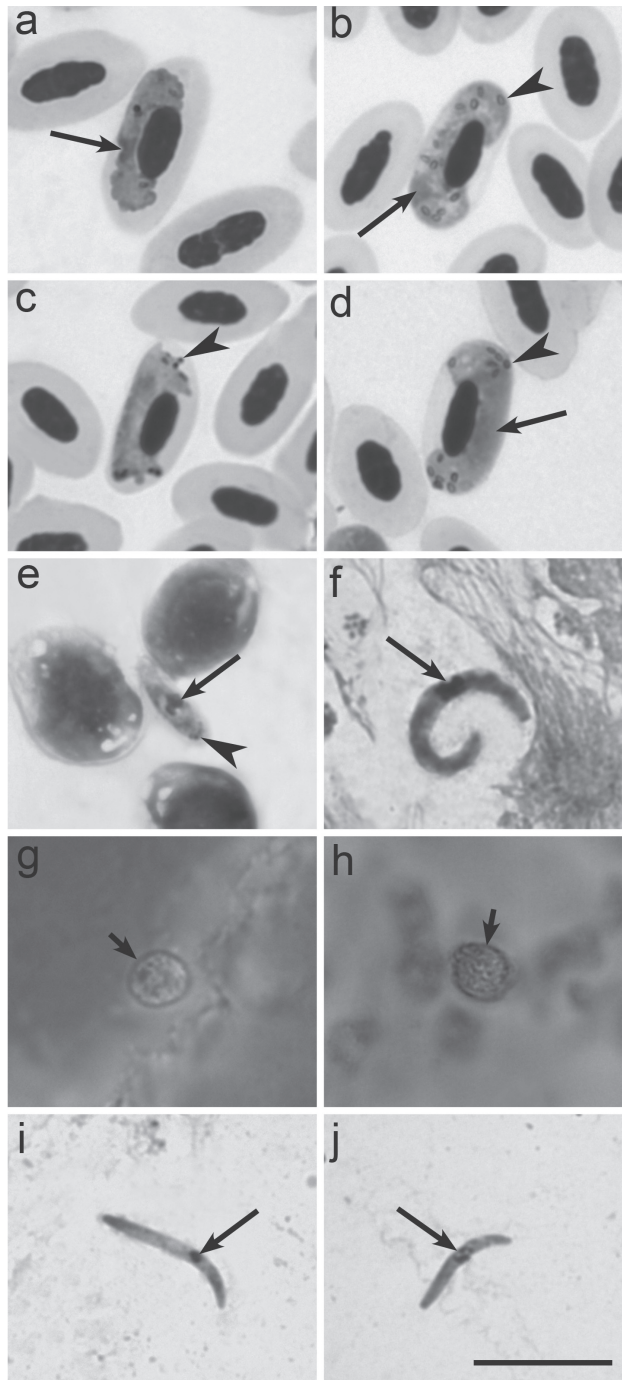


4 pav. *Plasmodium relictum* SGS1 ir GRW11 genetinių linijų oocitų kiekis eksperimentiškai infekuotose *Culex pipiens pipiens* formos *molestus* uoduose. Naminės kanarėlės buvo naudojamos gametocitų donorais (gametocitemija uodų infekavimo dieną nurodyta skliausteliuose). Kiekviena genetinė linija buvo krėsta po dvidešimt vabzdžių. Oocistų skaičiaus mediana (juodas horizontalus brūkšnylis). Pilkas kvadratas apačioje ir viršuje rodo pirmą ir trečią kvartilę. Vertikali linija rodo reikšmes nepatenkančias tarp išskirčių. Išskirtis yra pažymėta baltu apskritimu.

Fig. 4. Oocyst burden of 2 lineages of *Plasmodium relictum* (pSGS1 and pGRW11) in experimentally infected mosquitoes *Culex pipiens pipiens* form *molestus*. Domestic canaries were used as donors of gametocytes (gametocytaemia at the day of the mosquito feeding is indicated in parentheses). Twenty flies were exposed to each parasite lineage. The median number of oocysts (horizontal black bars) is shown. Gray boxes below and above the median indicate the first and third quartiles, respectively. Vertical lines delimit non-outlier ranges on both sides of the boxes. One individual count (lineage pSGS1) is considered outlier and marked as a dot.

3 Eksperimentas. *Haemoproteus minutus* ir *H. belopolskyi* pernešėjų nustatymas

Subrendusios *H. minutus* parazito ookinetės eksperimentiškai infekuoto smulkiojo mašalo *Culicoides impunctatus* žarnos preparate buvo matomos 1 ir 4 valandomis po mašalo užkrėtimo. Nuo 6 val. po mašalo infekavimo žarnos turinio preparate jų jau nebuvo, kas rodo labai greitą parazito vystymąsi ir migraciją iš žarnos. *H. belopolskyi* ookinetės vystėsi žymiai lėčiau ir buvo matomos tik nuo 1 ppi iki 3 ppi. Abiejų rūšių ookinečių išvaizda kirmėliška, pailgos formos, su branduoliu centre ir gerai išžiūrimomis vakuolėmis (5 pav. e, f). Kartais abiejų parazitų ookinečių citoplazmoje buvo matomos pigmento granulės (5 pav. e). *H. minutus* ir *H. belopolskyi* oocistos pirmą kartą žarnos sienelėje pastebėtos 3 ppi



5 pav. *Haemoproteus minutus* (a, c, e, g, i) ir *H. belopolskyi* (b, d, f, h, j) gametocitų (a - d) ir sporogonijos stadijos (e - j): subrendęs makrogametocitas (a, b) ir mikrogametocitas (c, d) donoro periferinio kraujo preparate prieš eksperimentinį smulkiųjų mašalų *Culicoides impunctatus* krėtimą. Ookinetės (e, f), oocistos (g, h), sporozoitai (i, j). Metanolyje fiksuoti ir Gimzosa dažais dažyti preparatai (a - d, e, f, i, j). Formaline fiksuota ir Erlich'o hematoksilenu dažyta žarna (g, h).

Ilgos paprastos rodyklės – parazitų branduoliai, trikampės – pigmento granulės, paprastos trumpos rodyklės – oocistos. Skalė = 10 μm.

Fig. 5. Gametocytes (a - d) and sporogonic stages (e - j) of *Haemoproteus minutus* (a, c, e, g, i) and *H. belopolskyi* (b, d, f, h, j): mature macrogametocytes (a, b) and microgametocytes (c, d) in the peripheral blood of donor birds before experimental infection of biting midges *Culicoides impunctatus*. Ookinetes (e, f), oocysts (g, h), sporozoites (i, j). Methanol - fixed and Giemsa - stained thin films (a - d, e, f, i, j). Formalin - fixed whole mounts stained with Erlich's hematoxylin (g, h).

ir matomos preparatuose iki 6 ppi. Formaline fiksuotuose preparatuose oocistos atrodė tarsi maži apvalūs kūneliai (5 pav. g, h). Kai kuriose oocistose gerai matomos pigmento granulės. *H. minutus* ir *H. belopolskyi* sporozoitai seilių liaukose buvo pastebėti 7 parą po mašalų užkrėtimo ir matomi iki 12 ppi. Sporozoitų kūnų kraštai susiaurėję, branduolys šiek tiek pasislinkęs nuo centro (5 pav. i, j).

Pagrindinis šio eksperimento rezultatas yra tas, kad *Haemoproteus* parazitai t. y. *H. minutus* (genetinė linija hTURDUS2) ir *H. belopolskyi* (hHIICT1) baigia sporogoniją *C. impunctatus* smulkiuosiuose mašaluose.

Šie smulkieji mašalai yra paplitę Europoje, jų gausu mūsų tyrimo vietovėje Rybachy apylinkėse (Glukhova ir Valkiūnas, 1993; Liutkevičius, 2000). Šiuo metu yra išaiškinta kelių *Haemoproteus* genties parazitų *H. balmorali*, *H. dolnicki*, *H. fringillae*, *H. lanii*, *H. parabelopolskyi* ir *H. tartakovskyi* sporogonija smulkiuosiuose *C. impunctatus* mašaluose (Valkiūnas, 2005). Atlikę šį eksperimentą informaciją apie pernešėjus papildėme dar dviem *Haemoproteus* genties rūšimis. Ankstesni eksperimentiniai tyrimai parodė, kad infektyvūs *H. fringillae* ir *H. parabelopolskyi* sporozoitai vystosi *C. impunctatus* mašaluose (Valkiūnas ir Iezhova, 2004; Valkiūnas, 2005), kas rodė, jog šis mašalas yra svarbus paukščių hemoproteidų pernešėjas ir paukščių hemoproteidų epidemiologinėm studijom būtina skirti daugiau dėmesio. Šis tyrimas antrina išvadoms, kad smulkiųjų mašalų vaidmuo paukščių hemoproteidų *Haemoproteus* spp. transmisijoje (Garnham, 1966; Atkinson, 2008) yra labai svarbus.

Taip pat verta paminėti, kad keletas molekuliniais metodais paremtų tyrimų aptiko *Haemoproteus* spp. DNR uoduose, kurie nėra žinomi kaip *Haemoproteus* pernešėjai, ir buvo spėliojama apie galimą uodų dalyvavimą hemoproteidų transmisijoje (Ishtiaq ir kt., 2008; Kimura ir kt., 2010; Njabo ir kt., 2011; Kim ir Tsuda, 2012; Ventim ir kt., 2012). Naujausi eksperimentiniai tyrimai rodo, kad ši nuomonė tikriausiai nėra teisinga, nes naudojant tik molekulinis metodus amplifikuojama *Haemoproteus* parazito DNR, kurio vystymasis yra abortatyvus. Tokia DNR kraujasiurbio vabzdžio organizme gali išlikti iki kelių savaičių (Valkiūnas ir kt., 2013). Dėl sudėtingo hemosporidijų gyvenimo ciklo ir abortatyvaus vystymosi galimybės labai svarbu nustatyti sporozoitų arba infektyvių sporozoitų buvimą ne tik molekuliniais, bet ir tradiciniais tyrimo metodais.

Kaip minėjome, *H. minutus* yra paplitęs Europoje ir dažnai aptinkamas juoduosiuose strazduose, kuriems nėra stipriai žalingas, bet gali būti pražūtingas kelių rūšių naminėms papūgėlėms, kurių audiniuose formuoja megalomerontus (Olias ir kt., 2011; Palinauskas ir kt., 2013).

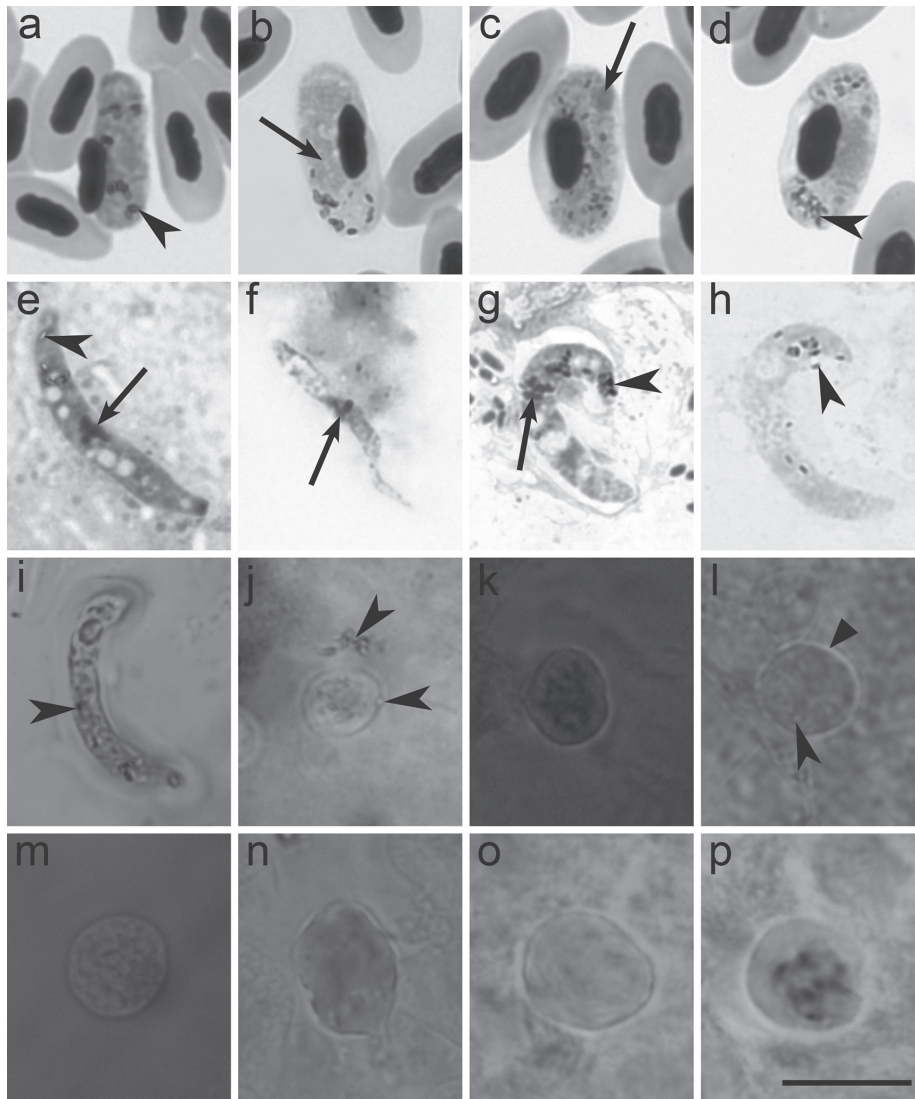
4 Eksperimentas. *Haemoproteus* parazitų vystymasis kraujasiurbiuose uoduose (Culicidae)

Daugybė subrendusių *Haemoproteus* parazito ookinečių (*H. tartakovskiyi* ir *H. balmorali*) buvo stebimos eksperimentiniu būdu užkrėstų uodų *Ochlerotatus cantans* žarnos turinio preparatuose nuo 1 iki 3 ppi (6 pav. e, g); 4 ir 5 paromis jų skaičius gerokai sumažėjo, kuomet buvo pastebėta tik keletas degraduojančių ookinečių (6 pav. f, h). Degradavusių ookinečių citoplazma nusidažė šviesiai, prastai matėsi branduoliai arba jų visai nesimatė, degeneruojančio parazito tarpai, panašūs į vakuoles, taip pat buvo matomai prastai arba nematomi (palyginimui 6 pav. e, g su 6 pav. f, h). Oocistų vystymasis buvo labai asinchroniškas: jos buvo stebimos pastoviuose preparatuose žarnos sienelės paviršiuje 5 ppi (6 pav. i). Daug apvalių *H. tartakovskiyi* (6 pav. j, k, n – p) ir *H. balmorali* (6 pav. l, m) oocistų buvo matomos pastoviuose preparatuose žarnos sienelės paviršiuje nuo 4 iki 16 ppi. Viename preparate buvo matomos įvairių dydžių oocistos. Degeneruojančios oocistos pastoviuose žarnos preparatuose buvo matomos nuo 15 iki 17 ppi.

Jokių reikšmingų skirtumų tarp *H. tartakovskiyi* ir *H. balmorali* parazito stadijų vystymosi laiko ar oocistų dydžių bei morfologijos nesimatė.

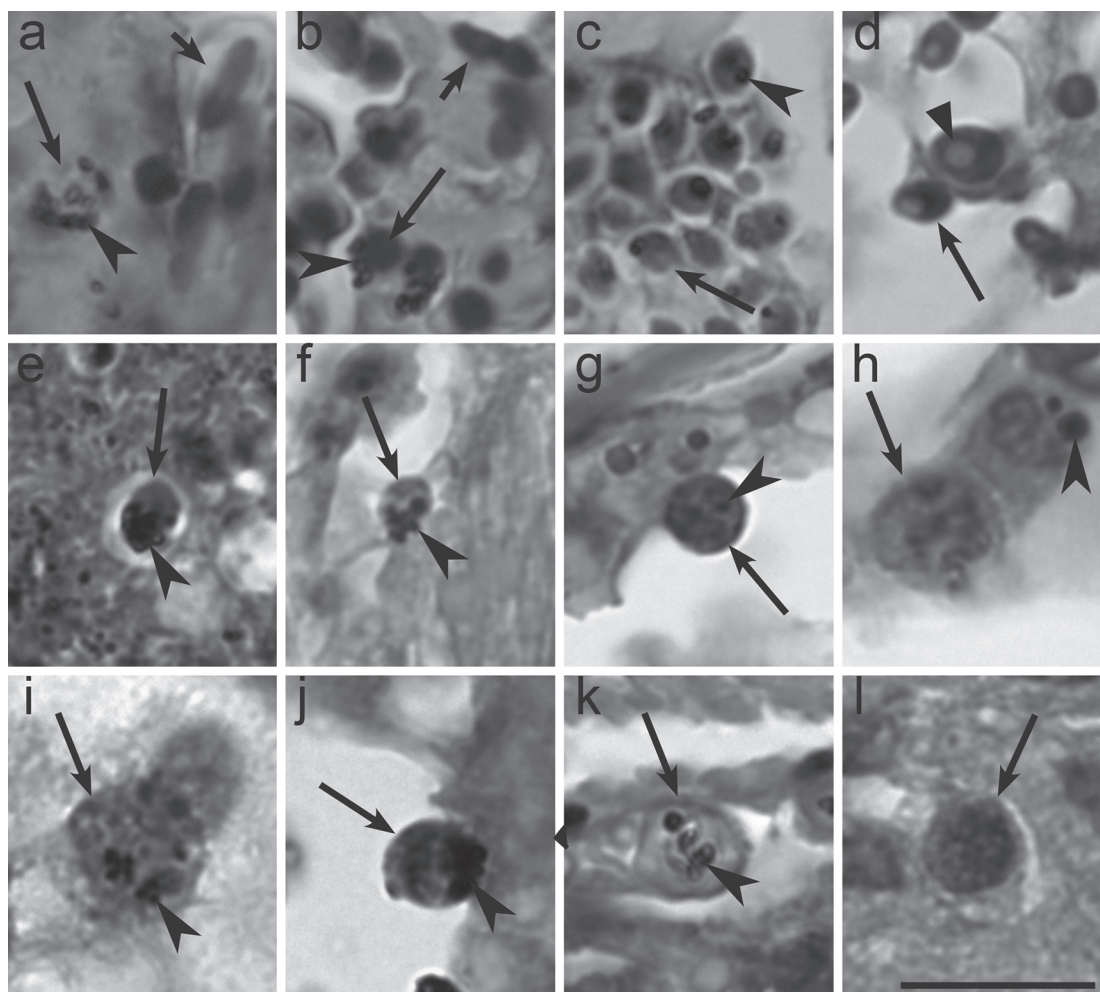
Atlikę histologinių pjūvių – galvos, krūtinėlės ir pilvelio mikroskopinę analizę nustatėme: daugybė raudonųjų kraujo kūnelių, jų tarpe užkrėstų parazitais, buvo matomi infekuoto kraujasiurbio galvos histologiniuose pjūviuose, krūtinėlės ir pilvelio histologiniuose pjūviuose 1, 2 ir 3 ppi (7 pav. a, b). Daugybė *H. tartakovskiyi* ir *H. balmorali* ookinečių buvo matomos tuose pačiuose pjūviuose (7 pav. a, b), kas rodo sėkmingą parazito vystymąsi šiose kūno dalyse po pasimaišimo infekuotu krauju. Tikriausiai ookinetėms nėra kliūčių iš virškinamojo trakto patekti į hemolimfą. Tai galėtų paaiškinti ookinečių atsiradimą vabzdžio galvoje, krūtinėlėje ir pilvelyje (7 pav. c – f). Skersai supjaustytuose histologiniuose galvos, krūtinėlės ir pilvelio pjūviuose ookinetės atrodo lyg apvalūs arba pailgi kūneliai, šalia kurių matomos pigmento granulės (7 pav. a – f). Oocistos buvo stebimos abiem parazito rūšimis infekuoto vabzdžio histologiniuose galvos, krūtinėlės ir pilvelio pjūviuose (7 pav. g – l) 4 – 15 ppi, kas rodo aktyvią parazito migraciją kūnu ir dalinę sporogoniją minėtose vabzdžio kūno vietose. Sporozoitų formavimosi oocistose nesimatė.

Paukščių DNR buvo aptikta vabzdžių galvose, krūtinėlėse ir pilveliuose 1 – 4 paromis po infekcijos, vėliau neaptikta, išskyrus vieną atvejį pilvelyje – 5 ppi. Šie



6 pav. *Haemoproteus tartakovskyi* (a, b, e, f, i – k, n – p) ir *Haemoproteus balmorali* (c, d, g, h, l, m) gametocitai bei sporogonijos stadijos experimentiškai infekuotame *Ochlerotatus cantans* uode. Subrendę makrogametocitai a – c ir mikrogametocitai (b, d) donoro kraujyje prieš uodų infekavimą. Ookinetės (e – i) žarnos turinyje (e – h) bei išoriniame žarnos sienelės paviršiuje (i): brandžios ookinetės 24 hr pi (e) ir 48 hr pi (g), (i) brandi ookinetė 5 dpi, degeneruojanti ookinetė 5 ppi (f) ir 4 ppi (h). Oocistos (j – p) išoriniame žarnos sienelės paviršiuje: j, l augančios oocistos 5 ppi; k, m užaugusios oocistos 8 ppi (k) ir 12 ppi (m); n – p degeneruojančios oocistos 11 ppi (n) ir 16 ppi (o, p). Juodos melanizacijos dėmės degeneruojančiose oocistose (n – p). Preparatai dažyti gimzos dažais a – h. Formaline fiksuota ir Erlich'o hematoksilenu dažyta žarna i – p. Ilgos rodyklės – parazitų branduoliai. Pailga trikampė rodyklė – pigmento granulės. Trikampė rodyklė – oocistos. Skalė = 10 μm.

Fig. 6. Gametocytes and sporogonic development of *Haemoproteus tartakovskyi* (a, b, e, f, i – k, n – p) and *Haemoproteus balmorali* (c, d, g, h, l, m) in experimentally infected mosquito *Ochlerotatus cantans*. Mature macrogametocytes (a, c) and microgametocytes (b, d) in the blood of donor birds before infection of mosquitoes. Ookinetes (e – i) in the midgut content (e – h) and on surface of the midgut wall (i): mature ookinetes 24 h post - infection (e) and 48 h post - infection (g), (i) mature ookinete 5 days post - infection (dpi), degenerating ookinetes 5 dpi (f) and 4 dpi (h). Oocysts (j – p) on surface of the midgut wall: j, l growing oocysts 5 dpi; k, m fully grown oocysts 8 dpi (k) and 12 dpi (m); n – p degenerating oocysts 11 dpi (n) and 16 dpi (o, p). Note presence of black (melanised) areas in degenerating oocysts (n–p). Giemsa - stained thin films a – h. Formalin fixed and Erlich's hematoxylin - stained whole mounts of midguts i – p. Long arrows nuclei of parasites, simple arrowheads pigment granules. Triangle arrowhead capsular - like wall of oocysts. Bar = 10 μm.



7 pav. *Haemoproteus tartakovskiyi* (a – c, e, f, i, j, l) ir *Haemoproteus balmorali* (d, g, h, k) sporogonijos stadijos eksperimentiškai infekuoto *Ochlerotatus cantans* uodo histologiniuose pjūviuose; parazitai atrodo kaip apvalūs skersai perpjauti kūneliai. Ookinetės galvoje (a, f), krūtinėlėje (b, d) ir žarnoje (c) 1 ppi (ppi, a – c), 2 ppi (d, e) ir 3 ppi (f); raudonieji kraujo kūneliai galvoje (a) ir krūtinėlėje (b), šviesesnės dėmės ookinetėse – vakuolės *H. balmorali* (d). Oocistos krūtinėlėje (g – i, k, l) ir žarnoje (j), 6 ppi (g – j) ir 15 ppi (k, l). Juodos dėmės degeneruojančių oocistų melanizacija (l). Histologiniai pjūviai yra fiksuoti formaline ir dažyti hematoksileno eozino dažais. Ilgos strėlės – parazitai. Trumpos strėlės – raudonieji kraujo kūneliai. Trikampės pailgos strėlės – pigmento granulės. Trikampės strėlės – vakuolės. Skalė = 10 μm.

Fig. 7. Sporogonic stages of *Haemoproteus tartakovskiyi* (a – c, e, f, i, j, l) and *Haemoproteus balmorali* (d, g, h, k) in histological sections of experimentally infected mosquito *Ochlerotatus cantans*; the parasites look like roundish bodies in the transverse sections. Ookinetes in the head (a, f), thorax (b, d) and midgut (c) on 1 day post - infection (dpi, a – c), 2 dpi (d, e) and 3 dpi (f); note presence of red blood cells in the head (a) and thorax (b), and of vacuole - like spaces in ookinetes of *H. balmorali* (d). Oocysts in the thorax (g – i, k, l) and midgut (j) on 6 dpi (g – j) and 15 dpi (k, l). Note presence of black (melanised) areas in the degenerating oocyst (l). Formalin fixed and hematoxylin - eosin stained histological sections. Long arrows parasites. Short arrows red blood cells. Simple arrowheads pigment granules. Triangle arrowhead vacuole - like space. Bar = 10 μm.

rezultatai sutampa stebint raudonusius kraujo kūnelius kraujasiurbių vabzdžių kūno dalių histologiniuose pjūviuose (7 pav. a, b).

Pagrindiniai šio eksperimento rezultatai yra šie: dviejų *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) rūšių 1) lytinis parazito dauginimasis ir vystymasis vyksta bet

kurioje kraujasiurbių vabzdžių virškinamojo trakto dalyje – pradedant galva, baigiant pilveliu; 2) ookinetėms virškinamojo trakto sienelė nėra barjeras, trukdantis patekti į hemolimfą ir nukeliauti į bet kurią kraujasiurbio kūno vietą; 3) oocistos stadija vystosi galvoje, krūtinėlėje ir pilvelyje; 4) parazito vystymasis susstoja oocistos stadijoje, sporozoito stadija nesiformuoja.

Svarbu tai, kad *Haemoproteus* spp. DNR kelias savaites po vabzdžio užsikrėtimo yra aptinkama kraujasiurbių uodų galvoje, krūtinėlėje ir pilvelyje, tai pakankamai ilgas laikas *Haemoproteus* parazito DNR išlikti netipiniame pernešėjuje (1 lentelė). Nepaisant nesėkmingos sporogonijos PGR metodu uodai buvo įvertinti kaip infekuoti, nors iš tiesų jie nėra pernešėjai. Tai yra rimta kliūtis taikyti PGR metodus nustatant pernešėjus, ypač dirbant lauko sąlygomis.

Šis tyrimas rodo, kad rezultatai, kurių išvados remiasi tik PGR metodais, nustatant pernešėjus turėtų būti interpretuojami labai atsargiai. Reakcijos, naudojamos šiuose metoduose, amplifikuoja parazito DNR nepriklausomai, kurios stadijos tuo metu jis yra, kitaip tariant, metodai negali atskirti infektyvios (sporozoito) stadijos nuo neinfektyvios (ookinetės, oocistos) stadijų. Taigi, hemosporidijų genetinės medžiagos aptikimas PGR metodais kraujasiurbuose vabz-

1 lentelė. *Haemoproteus* infekcijų *Ochlerotatus cantans* uodo (*H*) galvoje, (*T*) krūtinėlėje, (*A*) pilvelyje nustatymo laikas, remiantis PGR metodais

Table 1. Time cause of polymerase chain reaction (PCR) - based detection of *Haemoproteus* infection from mosquitoes *Ochlerotatus cantans* fed on infected blood meal (*H* head, *T* thorax, *A* abdomen).

Day post infection	<i>H. tartakovskyi</i> (lineage hSISKIN1)					<i>H. balmorali</i> (lineage hROBIN1)				
	Number of infected mosquitoes	Number of PCR positive Mosquitoes				Number of infected mosquitoes	Number of PCR positive Mosquitoes			
		H	T	A		H	T	A		
1	4	3	0	3	3	4	2	0	2	2
2	3	3	0	1	3	4	4	0	3	4
3	4	3	0	3	3	3	2	0	2	2
4	4	2	2	2	2	3	2	0	1	2
5	4	3	1	2	3	1	1	0	1	1
6	3	2	2	2	2	2	1	1	0	0
8	3	1	1	1	1	2	1	0	1	1
9	2	1	0	0	1	2	2	1	1	2
10	4	2	0	2	1	3	0	0	0	0
11	2	1	0	1	0	3	1	1	1	1
12	2	1	0	1	0	2	1	0	1	0
14	2	1	0	1	0	2	1	1	1	0
15	5	3	1	3	1	3	2	1	2	1
16	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0
17	4	0	0	0	0	5	1	0	1	0
Total	49	26	7	22	20	42	21	5	17	16
		(53.1) ^a	(14.3)	(44.9)	(40.8)		(50.0)	(11.9)	(40.5)	(38.1)

^a Percentage is given in parentheses.

^a Skliaustuose nurodytas procentas

džiuose kelias savaites po vabzdžio pasimaitinimo nereiškia, kad aptikta parazito DNR yra infektyvi (sporozoito) stadija.

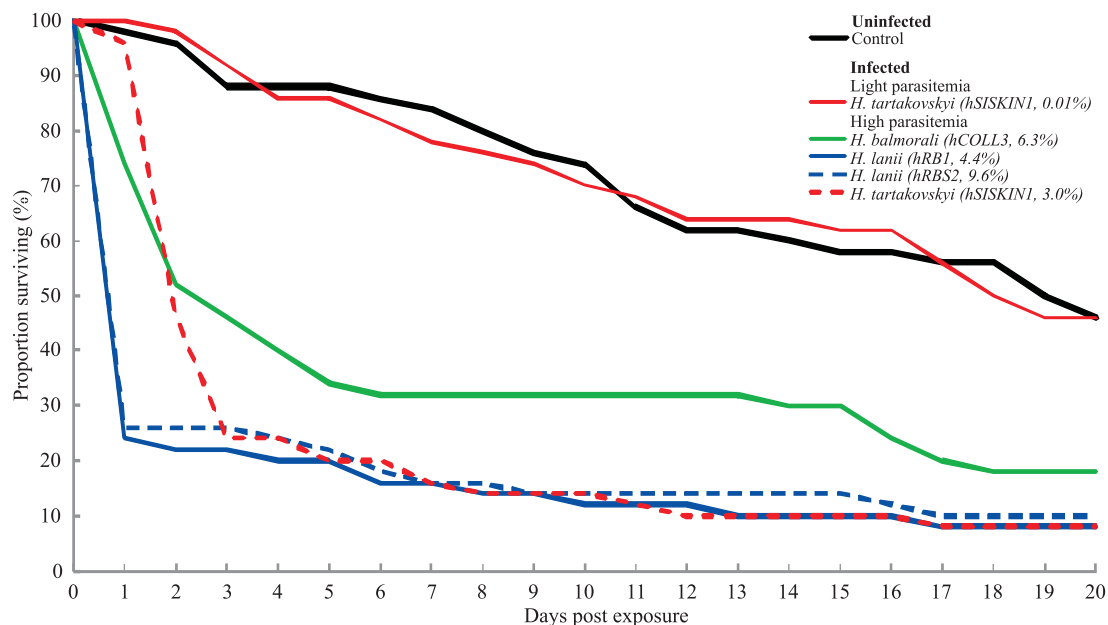
Dėl sudėtingo hemosporidijų gyvenimo ciko mikroskopiniai tyrimai šiai dienai yra nepakeičiami ir privalo būti derinami su PGR tyrimo metodais.

5 Eksperimentas. *Haemoproteus* parazitų virulentiškumo paukščių krauju miantantiems uodams nustatymas bei jų vystymosi ypatumai šiuose vabzdžiuose

Užkrėstų *H. balmorali*, *H. tartakovskiyi* ir *H. lanii* aukšto intensyvumo (3.0 – 9.6 %) parazitėmis ir kontrolinių uodų grupių išgyvenamumo skirtumas 1 – 3 ppi buvo didelis ir statistškai patikimas. Po 4 ppi, išgyveno 88 % kontrolinių uodų, tai 2.2-, 3.6- ir 4- kartus daugiau nei grupių, maitintų krauju infekuotu aukšto intensyvumo *H. balmorali*, *H. tartakovskiyi* ir *H. lanii* parazitėmis (8 pav.). Daugybė ookinečių buvo pastebėta kraujasiurbių uodų žarnos bei galvos, krūtinėlės ir pilvelio audiniuose 0.5 – 1 ppi (9 pav.). Kraujasiurbio vabzdžio hemolimfa ar audiniais migruojantis parazitas žaloja organus ir audinius, tai tikriausiai yra pagrindinė didelio uodų mirtingumo priežastis.

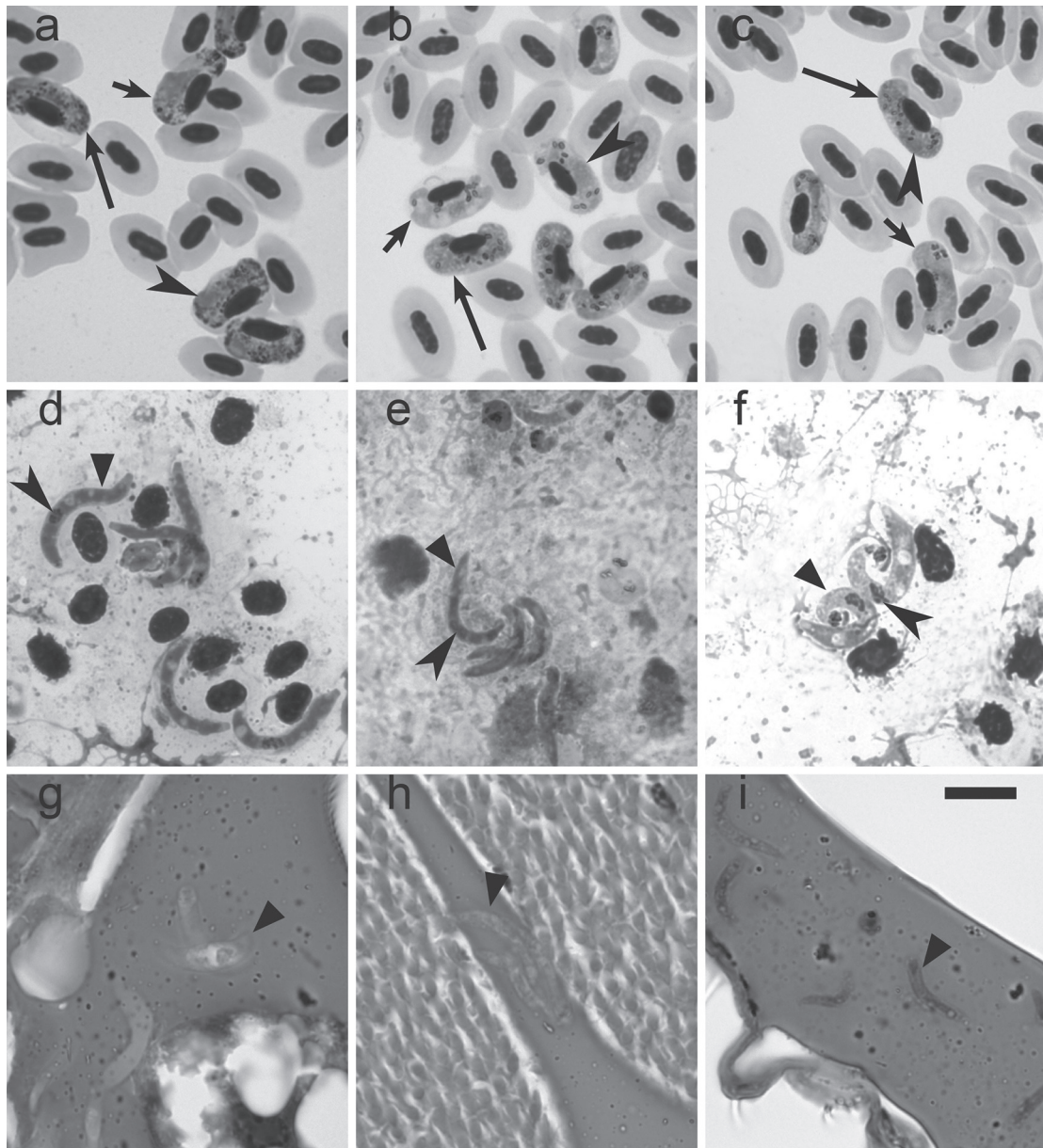
Šio tyrimo pabaigoje išgyveno 46 % kontrolinės grupės uodų, tačiau eksperimentinių, pasimaitinusių krauju infekuotu aukštomis parazitėmis uodų išgyvenamumas lyginant su kontroline grupe buvo 2.6- ir 5.8- karto mažesnis.

Šis tyrimas rodo, kad paplitusios *Haemoproteus* infekcijos yra labai virulentiš-



8 pav. Neinfekuotų uodų (kontrolė) ir *Haemoproteus* spp. - infekuotų *O. cantans* uodų grupių išgyvenamumo procentas. Kiekvienoje grupėje po 50 vnt. uodų.

Fig. 8. Cumulative percentage of survival in uninfected (control) and *Haemoproteus* spp.-infected groups of *O. cantans*. In each group, 50 mosquitoes were exposed.



9 pav. *H. balmorali* (a, d), *H. lanii* (b, e, g – i) ir *H. tartakovskiyi* (c, f) donoro kraujyje (a – c), žarnos preparate (d – f) ir histologiniame pjūvyje (g – i) eksperimentiškai infekuoto *O. cantans* uodo. a – c brandūs gametocitai periferiniame paukščio kraujyje prieš uodo infekavimą. Ookinetės žarnos turinyje (d – f) ir histologiniuose pjūviuose (g – i) galvoje (g), krūtinėlėje (h) ir pilvelyje (i) 24val. po uodo užkrėtimo. a – f preparatai dažyti Gimzos dažais. g – i formaline fiksuoti ir hematoksileno eozino dažais dažyti histologiniai pjūviai. Ilgos rodyklės – makrogametocitai, trumpos rodyklės – mikrogametocitai, trumpos pailgos – parazitų branduoliai ir trikampės rodyklės – ookinetės. Skalė =10 μm

Fig. 9. *H. balmorali* (a, d), *H. lanii* (b, e, g – i) and *H. tartakovskiyi* (c, f) in the blood of donor birds (a – c), midgut preparations (d – f) and histological sections (g – i) of experimentally infected mosquitoes *O. cantans*. a – c Mature gametocytes in the peripheral blood of birds before infection of mosquitoes. Ookinetes in the midgut content (d – f) and histological sections (g – i) in the head (g), thorax (h) and abdomen (i) 24 hr postexposure of mosquitoes. a – f Giemsa - stained thin films. g – i Formalin - fixed and haematoxylin - eosin - stained histological sections. Long arrows - macrogametocytes, short arrows microgametocytes, simple arrowheads parasite nuclei, and triangle arrowhead ookinetes. Bar =10 μm.

kos paukščių krauju mintantiems uodams, kurie pasimaitinę stipriai hemoproteidais infekuotu krauju greitai žūva.

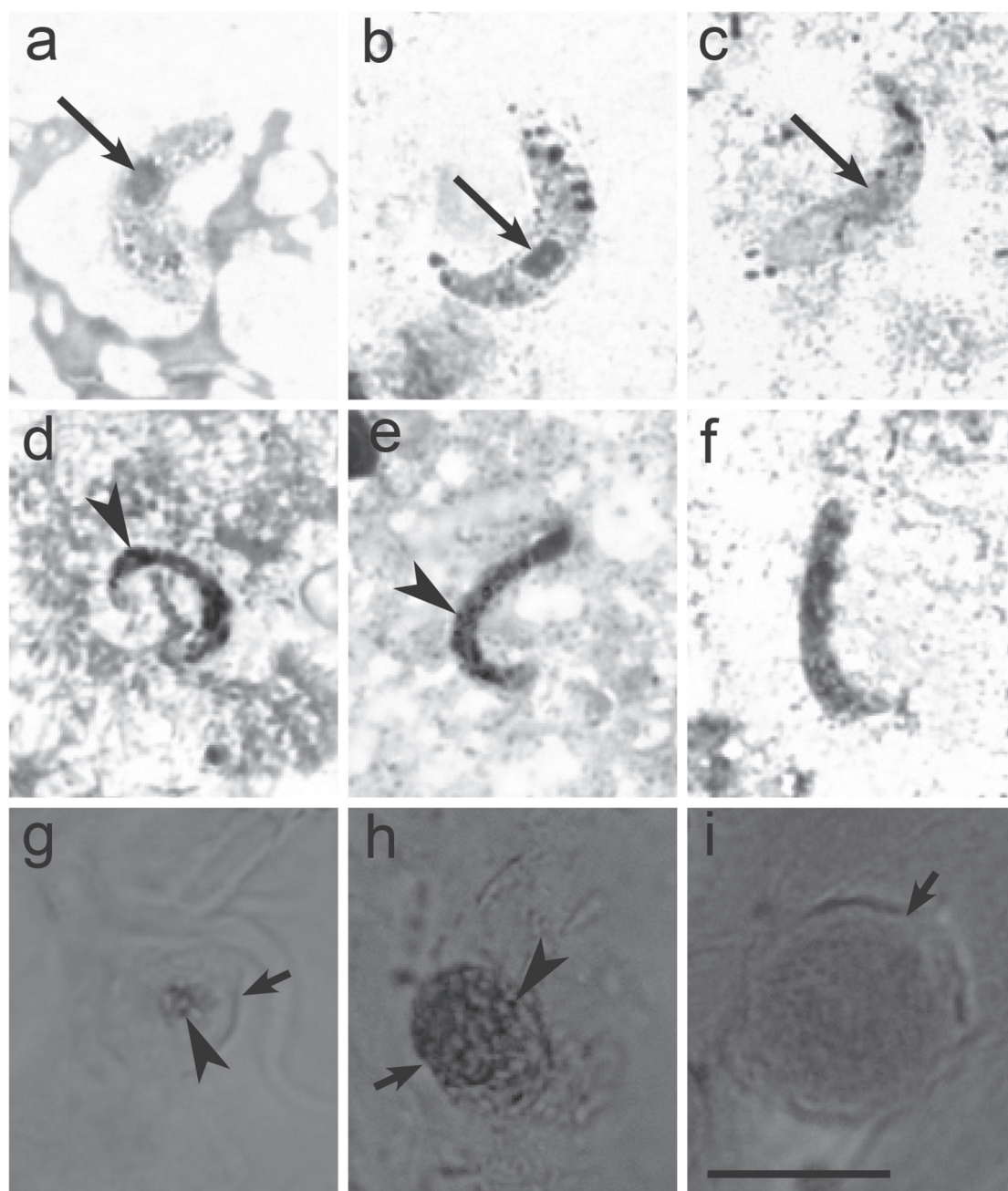
Šio eksperimento pagrindinė išvada: paplitusios *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) rūšys yra labai virulentiškos ir mirtinos *O. cantans* uodams, pasimaitinusiems stipriai šiais parazitais infekuotu krauju. *O. cantans* uodai yra paplitę mūsų tyrimo vietoje ir noriai maitinasi paukščių krauju (Bernotienė, 2012). Labai tikėtina, kad uodų organizmuose migruodamos ookinetės žaloja uodų organų audinius galvoje, krūtinėje bei pilvelyje, ir tai, turbūt, svarbi didelio uodų mirtingumo priežastis 0.5 ir 2 ppi, nes tokiu metu daugybė ookinečių (oocistos dar nesusiformavusios) vystosi ir migruoja vabzdžio kūnu (Valkiūnas ir kt., 2013). Fizinis audinių žalojimas greičiausiai yra susijęs su ookinečių skaičiumi, kuris tiesiogiai priklauso nuo gametocitemijos laipsnio paukščio kraujyje. Tai paaiškina, kodėl uodų išgyvenamumas priklauso nuo paukščių infekcijos lygio.

Gamtoje individai yra veikiami daugelio aplinkos veiksnių, o uodų mirtingumas dėl hemoproteidų infekcijų galbūt yra žymiai didesnis nei eksperimento metu. Sumažėjęs kraujasiurblių patelių išgyvenamumas reiškia mažesnę jų galiybę dalyvauti kitų infekcijų transmisijoje. Šie duomenys gali būti reikšmingi epidemiologiniu požiūriu, tačiau reikalingi papildomi tyrimai.

6 Eksperimentas. *Plasmodium homocircumflexum* genetinės linijos COLL4 vytymasis *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens pipiens* formos *molestus* ir *Aedes vexans* uoduose

Šiame eksperimente 24 valandą po pasimaitinimo paukščio krauju infekuotu *Plasmodium homocircumflexum* genetinės linijos COLL4 parazitu stebėjome ookinečių vystymąsi *C. p. pipiens* (10 pav. a, d) ir *C. p. pipiens* f. *molestus* (10 pav. b, e) uoduose. *Aedes vexans* uoduose ookinetės išsivystė po 48 val. (10 pav. c, f). Ookinetės buvo matomos visų trijų uodų rūšių ookinečių preparatuose. Ookinečių kūnai išžėsti su branduoliu šiek tiek atokiau kūno vidurio, didelėmis vakuolėmis ir pigmento granulėmis (10 pav. a – c). Oocistos buvo stebimos 6 – 20 paromis po pasimaitinimo infekuotu krauju *C. p. pipiens* uoduose, 10 – 20 ppi *C. p. pipiens* f. *molestus* ir 9 – 14 ppi *A. vexans* uodų žarnų preparatuose. Sporogonija buvo asinchroniška. Pirmą kartą oocistos *C. p. pipiens* uodų žarnose pamatytos 6 ppi, *C. p. pipiens* f. *molestus* – 10 ppi ir *A. vexans* – 9 ppi. Subrendusių oocistų nesimatė. Užkrėstų uodų seilių liaukų preparatuose sporozoitų nebuvo. Seilių liaukų preparatai ruošti ir tirti iki 23 paros po uodų pasimaitinimo in-

fekuotu krauju. Nustatyta, kad šiuose uoduose *P. homocircumflexum* genetinė linija COLL 4 vystosi abortatyviai.



10 pav. *Plasmodium homocircumflexum* (genetinė linija COLL4) sporogonijos stadijos uodų žarnose. *Culex pipiens pipiens* (a, d, g), *Culex pipiens pipiens* forma *molestus* (b, e, h) ir *Aedes vexans* (c, f, i). a - c - ookinetės; d - f - degeneruojančios ookinetės; g - i - degeneruojančios oocistos. Ilgos rodyklės - parazitų branduoliai. Trumpos rodyklės - oocistos. Trikampės - pigmento granulės. Pastovūs preparatai dažyti Gimzos dažais (a - f). Formaline fiksuotos ir Erlichio dažais dažytos žarnos preparatas (g - i). Skalė = 10 μ m.

Fig. 10. Sporogonic stages of *Plasmodium homocircumflexum* (lineage pCOLL4) from the midgut of *Culex pipiens pipiens* (a, d, g), *Culex pipiens pipiens* form *molestus* (b, e, h) and *Aedes vexans* (c, f, i). a - c - ookinetes; d - f - degraded ookinetes; g - i - degraded oocysts. Long arrows - nuclei of parasites. Short arrows - oocysts. Arrowheads - pigment granules. Giemsa - stained thin blood films (a - f). Midgut whole mounts stained with Erlich's hematoxylin (g - i). Scale bar = 10 μ m.

Valkiūnas ir kt. (2013) pateikė duomenis apie *Haemoproteus* parazitų ookinetės ir oocistos stadijos vystymąsi visame kraujasiurbio uodo *O. cantans* kūne. Šiame tyrime taip pat nustatyta, kad parazitas vystosi abortatyviai. Apie 11 parą po uodų užsikrėtimo oocistos melanizuoja ir vystymasis sustoja.

Abortatyvus *Plasmodium* spp. parazito vystymasis dažnai stebimas ne tik kraujasiurbiuose vabzdžiuose, bet ir stuburiniuose šeimininkuose (Billingsley ir Rudin, 1992). Pavyzdžiai rodo, kad teigiamas PGR signalas, ookinečių ir oocistų stadijų išsivystymas negali būti laikomas įrodymu, kad kraujasiurbis yra parazito pernešėjas. Visada reikia nustatyti infektyvią sporozoitų stadiją. Informaciją apie vabzdžių rūšis, kurios pavadintos pernešėjais remiantis ookinečių ar oocitų buvimu reikėtų peržiūrėti ir ateityje atlikti papildomus tyrimus (žiūrėti Santiago-Alarcon ir kt., 2012).

IŠVADOS

1. Pagal citochromo *b* (*cyt b*) geno fragmentą artimai susijusių *Plasmodium relictum* genetinių linijų SGS1 ir GRW11 bei kito izoliato SGS1 genetinės linijos vystymosi būdai *Culex pipiens pipiens* uoduose morfologiškai nesiskiria.

2. *Plasmodium relictum* genetinės linijos SGS1 ir GRW11 bei kito izoliato SGS1 genetinės linijos parazitai sėkmingai baigia vystymąsi *Culex pipiens pipiens* formos *molestus* uoduose. Šie paplitę ir lengvai kolonizuojami uodai yra tinkami eksperimentiniai modeliai paukščių maliarijos epidemiologijos tyrimuose.

3. Hemoproteidai *Haemoproteus minutus* ir *H. belopolskyi* smulkiuosiuose mašaluose *Culicoides impunctatus* vystosi iki sporozoito stadijos. Šie mašalai yra svarbūs hemoproteidų pernešėjai ir verti didesnio dėmesio tiriant paukščių hemoproteozijų epidemiologiją.

4. Pradinė, abortatyvi, *Haemoproteus* parazitų sporogonija vyksta visame kraujasiurbio uodo *Ochlerotatus cantans* kūne.

5. Aukštas *Haemoproteus* infekcijų parazitemių laipsnis sukelia didelį kraujasiurbių vabzdžių mirtingumą.

6. *Haemoproteus* parazitų DNR yra aptinkama *Ochlerotatus cantans* uodų galvoje, krūtinėlėje ir pilvelyje keletą savaičių po pasimaitinimo infekuotu krauju, o tai liudija ilgalaikį *Haemoproteus* parazito DNR išlikimą nespecifiniuose pernešėjuose bei sudaro kliūtis hemosporidinių parazitų pernešėjų nustatyme dirbant lauko sąlygomis ir remiantis tiksliai PGR tyrimo metodų rezultatais.

7. *Plasmodium homocircumflexum* genetinės linijos COLL4 parazito vystymasis sustoja oocistos stadijoje – vystosi abortatyviai visuose tirtuose *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens pipiens* formos *molestus* ir *Aedes vexans* uoduose.

INTRODUCTION

Relevance of the study

Haemosporidian parasites (Haemosporida) belong to the group of haematozoa inhabiting many species of land vertebrates (amphibians, reptiles, birds, and mammals) almost all over the world. They use blood - sucking dipteran insects (Insecta: Diptera) as vectors (Valkiūnas, 2005; Telford, 2009; Perkins, 2014). Haemosporidians are a relatively well studied group of parasitic protists, particularly because they include the agents of malaria, which remains one of the common human diseases in countries with warm climate. Wildlife malaria parasites of the family Plasmodiidae have been used as model objects in research of this disease for over 100 years (Garnham, 1966; Perkins, 2014). Parasites of the family Haemoproteidae have been studied less, but certainly are important because they are markedly diverse and cause severe and even lethal diseases in some bird species (Miltgen et al., 1981; Atkinson et al., 1988; Cardona et al., 2002; Olias et al., 2011; Cannell et al., 2013). Many species of *Haemoproteus* and *Plasmodium* are responsible for acute and/or chronic diseases in many species of domestic and wild birds. These parasites are widespread in Europe, and are transmitted even in parks of large cities worldwide (Valkiūnas, 2005; Atkinson, 2008).

Haemosporidians of the genus *Plasmodium* cause malaria. Avian species of *Plasmodium* are common in birds at all continents except Antarctica (Valkiūnas, 2005; Bensch et al., 2009; Braga et al., 2011; Perkins, 2014). Species of *Haemoproteus* are also widespread in birds. Transmission of the representatives of both genera is particularly active in countries with warm and temperate climates, with overall infection prevalence exceeding 20 % in many terrestrial bird populations (Greiner et al., 1975; McClure et al., 1978; Peirce, 1981; Valkiūnas et al., 2003; Pérez-Tris et al., 2007; Shurulinkov and Ilieva, 2009). Malaria parasites and other haemosporidians often negatively affect both the vectors and vertebrate hosts (Merino et al., 2000; Palinauskas et al., 2008; Knowles et al., 2010; Kazlauskienė et al., 2013; Valkiūnas et al., 2014).

Many recent studies addressed morphological and molecular characterization, distribution, genetic diversity and evolutionary relationships of avian *Haemoproteus* and *Plasmodium* spp. However, the information about relationships between bird haemosporidians and their vectors remains fragmentary and scarce (Kimura et al., 2009). Knowledge about patterns of development of different

haemosporidian species and their genetic lineages in vectors is insufficient (Ejiri et al., 2009; Kim et al., 2009; Kimura et al., 2010; LaPointe et al., 2010; Njabo et al., 2011). A few experimental studies deal with vectors and transmission of wildlife haemosporidian parasites (Atkinson, 1991; Desser and Bennet, 1993; Valkiūnas et al., 2002; Kim et al., 2009; Levin et al., 2013). Little is known about the effects of avian haemosporidian infections on blood-sucking insects (Valkiūnas and Iezhova, 2004; Levin and Parker, 2014). These are obstacles for better understanding the epidemiology of diseases caused by avian haemosporidian parasites and the evolutionary biology of this large and diverse group of parasites.

Due to remarkable both genetic and phenotypic diversity, the cosmopolitan distribution and relative easy to sample and maintain under laboratory conditions, avian malaria parasites and haemoproteids are convenient objects to address important fundamental questions about pathogen evolutionary biology, ecology, emergence and many others issues. Information about genetic lineages of avian haemosporidians has been rapidly accumulating (Bensch et al., 2009; MalAvi, <http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/>). However, insufficient knowledge about vectors prevents understanding epidemiology of the haemosporidiosis, particularly on the level of their genetic lineages. Experimental research with avian haemosporidian parasites was scarce during last 20 years (Valkiūnas and Iezhova, 2004; Kim et al., 2009).

Objective and main tasks of the study

The **objective** of this study was to identify some patterns of development of widespread avian malaria parasites (*Plasmodium*) and haemoproteids (*Haemoproteus*) in blood - sucking dipteran insects using experimental approaches.

The following main tasks were set up to achieve this objective:

1. To determine patterns of development of the closely related mitochondrial cytochrome *b* gene (*cyt b*) lineages pSGS1 and pGRW11 of *Plasmodium relictum* and different isolates of the lineage pSGS1 in the blood sucking mosquitoes *Culex pipiens pipiens* (Culicidae).
2. To determine if the lineages pSGS1 and pGRW11 of *Plasmodium relictum* complete sporogony in mosquitoes *Culex pipiens pipiens form molestus*.
3. To determine the vectors of *Haemoproteus minutus* and *Haemoproteus belopolskyi* (Haemoproteidae).
4. To determine peculiarities of the development of *Haemoproteus* parasites in blood - sucking mosquitoes (Culicidae).

5. To determine virulence of *Haemoproteus* parasites for bird - biting mosquitoes and the mechanism of the virulence in these insects.

6. To determine development of *Plasmodium homocircumflexum* (lineage COLL4) in mosquitoes *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens pipiens form molestus* and *Aedes vexans*.

Statements to be defended:

1. Sporogony of the lineages pSGS1 and pGRW11 of *Plasmodium relictum* and different isolates of the lineage pSGS1 completes in the mosquitoes *Culex pipiens pipiens*.

2. The lineages SGS1 and GRW11 of *Plasmodium relictum* produce morphologically indistinguishable sporogonic stages and develop synchronously to the sporozoite stage in the mosquitoes *Culex pipiens pipiens form molestus*.

3. The biting midge *Culicoides impunctatus* (Ceratopogonidae) is an important vector of avian *Haemoproteus* species, including *Haemoproteus minutus* and *H. belopolskyi*.

4. *Haemoproteus* parasites can develop to the oocyst stage in mosquitoes.

5. Determination of haemosporidian vectors based solely on polymerase chain reaction (PCR) - based methods is unreliable. Combination of microscopy and PCR - based methods is essential in haemosporidian vector research, particularly in wildlife.

6. The migrating *Haemoproteus* spp. ookinetes damage organs throughout the entire body of infected mosquitoes; that causes high mortality of the heavily infected insects.

7. The sporogonic development of *Plasmodium homocircumflexum* (lineage pCOLL4) occurs to the oocyst stage in three common European mosquitos, i. e. *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens pipiens form molestus* and *Aedes vexans*, but sporozoites do not develop; the sporogony is abortive in all these mosquito species.

Novelty of the study:

1. It was shown for the first time that the lineages pSGS1 and pGRW11 of *Plasmodium relictum* and different isolates of the lineage pSGS1 develop synchronously and produce morphologically indistinguishable sporogonic stages in the mosquito *Culex pipiens pipiens*.

2. This study shows that experimental results show, that *Culex pipiens pipiens form molestus* is a convenient experimental vector in avian malaria research.

3. It was proved that *Haemoproteus minutus* and *Haemoproteus belopolskyi* complete sporogony in the biting midge *Culicoides impunctatus* (Ceratopogonidae). Sporogonic stages of these parasites have been described for the first time.

4. It was shown for the first time that the sexual processes and the development of ookinetes of *Haemoproteus* parasites occur throughout the entire digestive tract of the engorged mosquitoes *Ochlerotatus cantans*, including the head, thorax and abdomen. The sporogonic development is abortive in mosquitoes at oocyst stage. The currently used PCR - based diagnostics detects these parasites in the experimentally infected insects up to 17 day post infection (dpi), but does not distinguish the abortive haemosporidian development.

5. *Haemoproteus* ookinetes find no barrier in their way from the gut contents to the gut wall of the infected mosquitoes *Ochlerotatus cantans*, resulting in the presence of the parasites throughout the body of the infected insects and their high mortality.

6. It was shown for the first time that the sporogonic development of *Plasmodium homocircumflexum* (lineage pCOLL4) is abortive in the mosquitoes *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens pipiens form molestus* and *Aedes vexans*.

Scientific and practical significance:

1. Determination of susceptible vectors is a difficult task in wildlife research. We suggest using phylogenies based on the mitochondrial *cyt b* gene for predicting vector species of genetically similar avian malaria parasites. That will speed determination of susceptible vectors in wildlife.

2. We recommend *Culex pipiens pipiens form molestus* for experimental and epidemiological studies of avian malaria parasites, particularly because of its: a) widespread distribution; b) high susceptibility to different lineages of *Plasmodium relictum*, and c) easy to establish colonies of wild - collected insects for experimental research at laboratory conditions.

3. The biting midge *Culicoides impunctatus* is involved in the transmission of deadly *Haemoproteus minutus*, which kills birds in Europe. This biting midge worth more attention in research of avian haemoproteosis.

4. Solely PCR - based diagnostics should be carefully used in vector studies of haemosporidians because it detects parasites in insects for several weeks after initial infection, but does not distinguish abortive parasite development. Demonstration of infective sporozoites in insects is essential for definitively demonstrating that certain insect species are vectors. A combination of PCR - based

and microscopic methods is a gold standard in haemosporidian vector research, particularly in wildlife.

5. New knowledge about high virulence of *Haemoproteus* parasites to mosquitoes worth attention from the point of view of transmission of haemosporidian parasites and, probably other mosquito - born infections. Markedly reduced survival of heavily infected blood - sucking insects due to haemoproteosis implies a possible reduced involvement in transmission of other infections by decreasing the number of survived biting females and the egg production in mosquito population. We point out that this might be significant epidemiologically.

6. We recommend using haemosporidian parasite molecular markers in determining possible links between blood - sucking insects and their blood - source animals. That will help to determine feeding preference of blood - sucking insects in wildlife.

Approbation of results. The results of this study have been published in 9 publications. Among them 6 full articles in international journals listed in the Web of Science database and 3 abstracts of scientific conferences. Results of the dissertation were presented at the international workshop “Disease vectors today: Changes in ecology, climate and public health risks” (Saaremaa, Estonia, 2011, May 24 - 27th), at the “5th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology” (Copenhagen, Denmark, 2013, September 10 - 13th), and at the “International conference on malaria and related haemosporidian parasites of wildlife” (Vilnius, Lithuania, 2013, August 7 - 11th).

Structure of the study. The dissertation is presented in the following chapters: *Introduction, Literature review, Material and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, and the List of the Author's Publications*. References include 143 sources. The dissertation contains 90 pages, 4 tables and 13 figures. The text of the dissertation is in English, with a summary in Lithuanian.

Acknowledgements. Many thanks are due to my scientific supervisor dr. Gediminas Valkiūnas for valuable advices, consultations, trust and patience. Prof. Staffan Bensch is gratefully acknowledged for theoretical support. I am very grateful to dr. Tatjana Ježova, dr. Vaidas Palinauskas and dr. Asta Križanauskienė for advices, which helped to design and carry out my experiments. Thanks are due to dr. Rasa Bernotienė for help and advisers on entomological issues, dr. Laima

Baltrūnaitė for valuable advices in the laboratory, and to the staff and students of P. B. Šivickis parasitology laboratory of Nature Research centre for technical assistance during my laboratory and fieldwork. I would like to thank the staff of the Biological Station “Rybachy” of Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences for support and assistance in the field. The director of the Biological Station “Rybachy” Casimir V. Bolshakov is acknowledged for generously providing facilities for the experimental research. I am grateful to my family, especially to my daughter Kotryna, for love, understanding, a patience and tolerance during my PhD studies and the process of writing this dissertation. There are many colleagues not mentioned herein, my heartfelt thanks to all of them.

Dr. Roland Kuhn (Germany) kindly provided samples for establishin a colony of *C. p. pipiens* f. *molestus* mosquitoes.

This study was funded by the European Social Fund under the Global Grant measure (VPI-3.1.-ŠMM-07-K-01-047).

LITERATURE REVIEW

This section of the dissertation presents a survey and analysis of old and recent literature about life cycles (particularly in vectors) and a history of investigation of bird *Plasmodium* and *Haemoproteus* parasites (Haemosporida). Available data about diagnostics of these parasites in blood - sucking dipteran insects using traditional and PCR - based methods have been discussed. I have also reviewed main published studies about investigation of 1) the sporogony of *Plasmodium relictum* in mosquitoes *Culex pipiens pipiens*, 2) the sporogony of *Plasmodium relictum* in mosquitoes *Culex pipiens pipiens* form *molestus*, 3) the *Haemoproteus* spp. sporogony in the biting midges, 4) the available data about development of *Haemoproteus* parasites in mosquitoes, and 5) the virulence of *Haemoproteus* parasites to blood - sucking insects.

MATERIALS AND METHODS

Each experiment of this dissertation has numerous precise methodological details and certain experimental design. Detail description of methodological issues is given in our published papers (Kazlauskienė, 2013; Valkiūnas, 2013, Valkiūnas, 2014; Žiegytė et al., 2014). Below, we review briefly the main methodological points of this study. The experiments described in this dissertation comply with the current laws of Lithuania and Russia. The experimental pro-

cedures were approved by the International Research Cooperation Agreement between the Biological Station Rybachy of the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences and Institute of Ecology of Nature Research Centre (25 - 05 - 2010). Care and handling of experimental birds was approved by the Lithuanian State Food and Veterinary Service (protocol. no. 2012/01/04 - 0221).

Study site

The field studies and field experimental work was carried out at the Biological Station “Rybachy” of the Zoological Institute of Russian Academy of Sciences on the Curonian Spit in the Baltic Sea, and the experiments with canary parasites were done in the P. B. Šivickis Laboratory of Parasitology, Nature Research Centre, Vilnius between 2010 – 2014.

Collection of birds blood samples and their microscopic examination

Wild birds were captured with mist nets and identified. About 30 µl of blood was collected in heparinized microcapillaries by puncturing the brachial vein and stored in SET buffer at ambient temperature while in the field, and then preserved at -20° C in the laboratory. A drop of blood was taken from each bird to make two or three blood films. The smears were air - dried, fixed in absolute methanol and stained with Giemsa. Blood films were prepared and examined microscopically before each exposure of flies in order to check the level of parasitaemia and to detect any other possible relapsed infections. Intensity of parasitaemia was estimated as a percentage by counting the number of mature gametocytes per 1000 erythrocytes examined. The species of *Haemoproteus* and *Plasmodium* were identified according to Valkiūnas (2005) and Palinauskas et al. (2007).

Naturally infected birds with single infections were used as donors to infect biting midges and mosquitos (see Žiegytė et al., 2014). Experimentally infected domestic canary *Serinus canaria domestica* was used as donor to infect mosquitoes (see Palinauskas et al., 2008; Kazlauskienė et al., 2013). All birds were kept indoors in a vector - free room under controlled conditions (55 - 65 % relative humidity (RH), 20 ± 1° C, the natural light - dark photoperiod (L/D) 17:7 hr); they were fed standard diets for seed eating or insectivorous bird species.

Collection and maintenance of mosquitoes

Unfed flies were collected by entomological net at the study site before ex-

periments. Some were fixed in 70 % ethanol and used for morphological species identification, and the remainder were fixed in 96 % ethanol and used for PCR - based identification and determining natural prevalence of haemosporidian infection. Part of insects were also fixed in 10 % neutral formalin to be used for histological studies.

Hibernating mosquitoes *C. p. pipiens* were collected from 2 basements in Vilnius, Lithuania in January 2012 - 2013. They were kept in mosquito cages (65 × 65 × 65 cm) in a mosquito room under standard conditions (22 ± 1° C, 60 ± 2 % relative humidity, and 14:12 hr L/D). After two weeks of laboratory adaptation, the wild-caught mosquitoes were used for experimental infection with parasites.

To establish a colony of *Culex p. pipiens* f. *molestus* and *A. vexans*, we used the mosquito larvae, which were obtained from dr. Roland Kuhn. The colony was originally started from larvae collected in Hesse Region (Germany); it has been in continuous culture since 1990. This mosquito laid the first egg batch without blood-feeding, and it readily mated in small cages. Mosquitoes were kept in cages (approximately 65 × 65 × 65 cm) under controlled conditions (relative humidity 60 ± 2 %, temperature 22 C ± 1 C, 14:10 hr L/D).

Experimental infection of biting midges *C. impunctatus* with *Haemoproteus* species was performed near Lake Chaika, located close to the village of Rybachy, where density of the flies was high. To minimize the probability of natural infection of wild - caught midges with *Haemoproteus*, the first generation of naturally occurring flies was used in this study. All experimental infections were performed between 10 and 20 June when the first generation of *C. impunctatus* predominated (Liutkevičius, 2000).

Experimental infection of dipteran insects

1. The method used in the field.

Birds were held in hands covered by ruby gloves, and blood sucking insects were allowed to feed on birds at a locality with a high density of flies. The bird's head was inserted into an insect cage when several flies had started to feed. The cages were made of fine - mesh bolting silk. A zip faster was sewn into one wall of the cage to permit entry of the bird's head and removal of engorged midges, which flew off the bird's head into the insect cage, which was then closed.

2. The method used at the laboratory. Approximately 30 - 50 female mosquitoes were haphazardly chosen for experiments and placed inside an experimen-

tal cage. Infected canaries were placed in separate mosquito cages. Each infected bird was placed in a plastic tube (length 15 cm, diameter 5 cm) containing a rip, which was used to fix the bird legs. Both tube ends were covered with bolting silk. Only legs were exposed to mosquito bites. Blood feeding was carried out for approximately 1hr by placing the tubes with birds in mosquito cages. Mosquitoes willingly took blood meal. The cages with engorged flies were supplied with 5 - 10 % saccharose solution.

PCR - based examination

We used 1) the standard ammonium-acetate method to extract genomic DNA from birds' whole blood and 2) innuPREP blood DNA Mini kit (Analytikjena, Berlin, Germany) for extraction of DNA from the thoraxes of mosquitoes. For genetic analysis of parasites, a nested PCR protocol was used according to Hellgren et al. (2004). We amplified a segment of parasite *cyt b* gene using 2 pairs of primers, HaemNFI and HaemNR3 which amplify fragments of *cyt b* gene of haemosporidians belonging to *Haemoproteus*, *Plasmodium* and *Leucocytozoon*. For the second PCR, we used primers HAEMF and HAEMR2, which are specific to *Haemoproteus* and *Plasmodium* spp. (Bensch et al., 2000). This protocol is sensitive and has been widely applied in avian haemosporidian diagnostics in many recent studies. All amplifications were evaluated by running 1.5 µl of the final PCR product on a 2 % agarose gel. One negative control (nuclease - free water) and 1 positive control (microscopy positive blood sample, in the case of blood testing, and thoraxes of 2 mosquitoes experimentally infected in the case of mosquito testing) were used per every 10 samples to control for false amplifications. No case of false amplification was found. All positive samples were sequenced in order to determine *cyt b* lineages of the detected parasites. Fragments were sequenced from the 5' end with the primer HAEMF. The sequences were edited and aligned using BioEdit (Version 7.0.9.0; Hall, 1999). Detected sequences were deposited in the PopSet database of the US National Center for Biotechnology Information; they are available in GenBank.

Dissection of blood sucking insects and making preparations of ookinetes, oocysts and sporozoites

Infected females of mosquitos and biting midges were lightly anesthetized by putting them into a tube closed with a cotton pad wetted in 96 % ethanol for several minutes. Wings and legs of the insects were removed before dissection,

which was performed under the binocular stereoscopic microscope Olympus B X 43. Preparations of ookinetes, oocysts and sporozoites were prepared according to Valkiūnas (2005).

Formalin - fixed heads, thoraxes and abdomens of infected and control mosquitoes were embedded in paraffin. Histological sections of 4 μm were obtained, stained with hematoxylin - eosin and examined under a light microscope, as described below. Infected and control mosquitoes were processed and examined using the same methods.

Microscopic examinations of preparations and parasite morphology

An Olympus BX – 43 light microscope equipped with Olympus SZX2 – FOF digital camera and imaging software QCapture Pro 6.0, Image – Pro Plus (Tokyo, Japan) was used to examine preparations, prepare illustrations and to take measurements. All preparations were first examined at low magnification ($\times 200$, $\times 600$) and then at high magnification ($\times 1000$). The morphometric features studied were those defined by Valkiūnas (2005). Voucher specimens of ookinetes, oocysts, sporozoites and histological sections were deposited at the Nature Research Centre Vilnius, Lithuania.

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using “Statistica 7” package. Student’s t-test for independent samples was used to determine statistical significance between mean linear parameters of parasites. Percentages of infected insects were compared by Yates corrected χ^2 test. The Cox - Mantel’s test was applied to estimate differences among cumulative numbers of survived mosquitoes in different groups. Median, the first and third quartiles, and the non-outlier range of oocyst numbers in mosquito midguts were calculated. Mann - Whitney U - test was used to compare oocyst numbers recorded in mosquitoes exposed to different lineages of *P. relictum*.

Percentages of survived insects on certain days were compared by Fisher’s exact test.

A P value of 0.05 or less was considered significant in all statistical tests.

Sequence divergence between parasite lineages was calculated with MEGA version 3.0, using a Jukes - Cantor model of substitution in which all substitutions were weighted equally (Kumar et al., 2004).

RESULTS AND DISCUSSION

Experiment 1. Patterns of development of the closely related lineages pSGS1 and pGRW11 of *Plasmodium relictum* and different isolate of the lineage pSGS1 in the blood sucking mosquitoes *Culex pipiens pipiens* (Culicidae)

All experimental *C. p. pipiens* mosquitoes were susceptible to infection with 3 lineages of *P. relictum*; sporogonic stages were observed in 100 % of experimentally infected and dissected females. Ookinetes, oocysts and sporozoites of all strains (Fig. 1 a – i) were reported in mosquitoes at the same dpi. In other words, the pattern of sporogonic development of these 3 strains was the same in *C. p. pipiens*. For all parasite isolates, 1) ookinetes were seen on 1 and 2 dpi, their number markedly decreases on 3 dpi, and the parasites are absent from midgut on 6 dpi; 2) growing oocysts are numerous in the midgut on 6 dpi, they develop markedly asynchronously; 3) mature oocysts were seen until 24 dpi, and they degraded between 24 and 26 dpi, and not seen on 28 and 32 dpi; 4) sporozoites were first reported in the salivary glands on 14 dpi and were seen until the end of the experiment (32 dpi). There were no morphological or morphometric differences discernable among mature ookinetes (Fig. 1 a, d, g), mature oocysts (Fig. 1 b, e, h) or sporozoites (Fig. 1 c, f, i) among 3 tested parasite isolates ($P < 0.05$ for all corresponding data).

Several studies addressed *P. relictum* *cyt b* lineages in terms of their distribution by hosts and geographical regions (Beadell et al., 2006; Beadell et al., 2009; Dimitrov et al., 2010; Marzal et al., 2011), virulence for birds (Palinauskas et al., 2008; Cellier-Holzem et al., 2010), sporogony (Vézilier et al., 2010), but comparative studies about sporogonic development of different lineages of this parasite (and other avian malaria parasites too) in the same mosquito species are lacking. The key results of this study are that 1) the closely related lineages of *P. relictum* and 2) the different isolates of same lineage develop synchronously and produce morphologically indistinguishable sporogonic stages and infective sporozoites in *C. p. pipiens*. Based on phylogenetic analysis (see Fig. 2), we predict that this is likely true for closely related lineages of other malaria parasite morphospecies, for instance the genetically similar lineages of *P. relictum*, *P. circumflexum*, *P. elongatum* and some other haemosporidians, which form monophyletic clades in the tree (Fig. 2). In other words, this study indicated that phylogenetic trees based on *cyt b* gene sequences might be helpful for predicting sporogonic development of closely related lineages in vectors. This assumption is in parallel to

the Martinsen et al.'s (2008) study suggesting that evolution of major groups of haemosporidian parasites is closely associated with adaptation to certain groups of dipteran vectors.

These data are helpful for better understanding biology and diversity of avian *Plasmodium* spp., indicating possible directions for predicting sporogony patterns of numerous genetically similar lineages of *Plasmodium* spp., which sporogonic development and vectors remain unknown.

Experiment 2. The development of *Plasmodium relictum* (pSGS1 and pGRW11) in mosquito *Culex pipiens pipiens* form *molestus*

Ookinetes of the lineages pSGS1 and pGRW11 of *P. relictum* were detected in the midgut preparations of all corresponding exposed *C. p. pipiens* form *molestus* mosquito groups 1 - 2 (Fig. 3 a, d). Oocysts of both lineages were seen in the midgut of all infected individual mosquitoes 10 - 15 dpi (Fig. 3 b, e). In both parasite lineages, there was marked variation in oocyst numbers in different individual mosquitoes (Fig. 4). However, the lineage pGRW11 developed significantly greater numbers of oocysts than the lineage pSGS1 ($P = 0.004$). Sporogony of both lineages completed and sporozoites were observed in mosquito salivary glands 15 - 18 dpi; they were seen in all salivary gland preparations (Fig. 3 c, f), indicating synchronous sporogonic development of both lineages under the same conditions. Morphology of ookinetes, oocysts and sporozoites of both lineages was similar (Fig. 3); the sporogonic stages of the same morphology developed in *C. p. pipiens* (Kazlauskienė et al., 2013).

There are 3 key results of this study. First, we show that *C. p. pipiens* f. *molestus* mosquitoes readily take blood meals on birds in spite of established opinion about high degree of anthropophily of this form (Becker et al., 2003). Second, *C. p. pipiens* f. *molestus* should be considered in epidemiology studies of avian malaria because the lineages pSGS1 and pGRW11 of *P. relictum* successfully complete sporogony in this fly. Third, the susceptibility of *C. p. pipiens* f. *molestus* to the closely related lineages pSGS1 and pGRW11 of *P. relictum* was different, with different oocyst burden in the exposed insects (Fig. 4). The latter finding is interesting because genetic difference in *cyt b* gene sequences between these 2 parasite isolates is negligible (1 base pair), indicating that sporogony success can be markedly different even in closely related lineages of the same malaria parasite in the same mosquito species.

Oocyst number is directly related to the number of transmissible sporozoites

that develop in the salivary glands, and also to the mosquito longevity (Sinden et al., 2007; Dawes et al., 2009). That should influence the mosquito vectorial capacity, but remains insufficiently investigated in avian malaria parasites, particularly on the level of different lineages of the same species. This study provides first information about patterns of sporogonic development of the lineages pSGS1 and pGRW11 in *C. p. pipiens f. molestus*, which is highly susceptible to *P. relictum* infection.

Experiment 3. Determination of the vectors of *Haemoproteus minutus* and *Haemoproteus belopolskyi*

Mature ookinetes of *H. minutus* were seen in the midgut contents of experimentally infected *Culicoides impunctatus* between 1 and 4 hr post infection (hr pi), and they were not seen 6 hr pi indicating rapid development and movement of the parasites in the midgut. Ookinetes of *H. belopolskyi* developed more slowly; they were seen 1 dpi and also reported 3 dpi. Ookinetes of both species were elongate wormlike bodies with prominent, slightly off center located nuclei and visible vacuoles (Fig. 5 e, f). Occasionally, a few pigment granules were discernable in the cytoplasm of ookinetes of both parasite species (Fig. 5 e). Oocysts both of *H. minutus* and *H. belopolskyi* were first seen in the midgut wall 3 dpi, and they were reported in the midgut preparations until 6 dpi. In formalin fixed preparations, oocysts appeared as small roundish bodies (Fig. 5 g, h). Pigment was visible in some oocysts. Sporozoites of *H. minutus* and *H. belopolskyi* were seen in the salivary glands of the biting midges 7 dpi. They were reported in salivary gland preparations of the majority of dissected insects between 8 and 12 dpi (the period of observation). Sporozoites had fusiform bodies with slightly off center placed nuclei and approximately equally pointed ends (Fig. 5 i, j).

The key result of this study is that two species of widespread *Haemoproteus* parasites, i. e. *H. minutus* (lineage hTURDUS2) and *H. belopolskyi* (hHIICT1) complete sporogony and produce sporozoites in *C. impunctatus*.

This biting midge is common in Europe and is abundant at our study site (Glukhova and Valkiūnas, 1993; Liutkevičius, 2000). Sporogony of six species of *Haemoproteus* completes in *C. impunctatus*; these are *H. balmorali*, *H. dolniki*, *H. fringillae*, *H. lanii*, *H. parabelopolskyi* and *H. tartakovskiyi* (Valkiūnas, 2005). The present study adds two species to this group of avian haemoproteids. Former experimental studies proved that infective sporozoites of *H. fringillae* and *H. parabelopolskyi* developed in *C. impunctatus* (Valkiūnas and Iezhova,

2004; Valkiūnas, 2005), indicating that this fly is an important vector of avian haemoproteids and worth more attention in epidemiological studies of avian haemoproteosis. The present study supports former conclusions about important role of biting midges of *Culicoides* in transmission of avian *Haemoproteus* spp. (Garnham, 1966; Atkinson, 2008).

It worth mentioning that several molecular studies detected DNA of *Haemoproteus* spp. in mosquitoes and speculated about possible involvement of these insects in haemoproteid transmission (Ishtiaq et al., 2008; Kimura et al., 2010; Njabo et al., 2011; Kim and Tsuda, 2012; Ventim et al., 2012). Recent experimental research shows that this speculation likely is incorrect due to DNA amplification of *Haemoproteus* parasites, which abort development and persist in resistant insects, sometimes as long as two weeks (Valkiūnas et al., 2013). Because haemosporidians have complicated life cycles and their abortive infections are common, demonstration of sporozoites in blood - sucking insects is essential for definitively demonstrating the insects are vectors.

Haemoproteus minutus is widespread, prevalent and relatively benign in common blackbirds in Europe, but it killed several species of captive parrots at the stage of tissue megalomeronts (Olias et al., 2011; Palinauskas et al., 2013).

Our study showed that *C. impunctatus* transmits *H. minutus* and seven other haemoproteid species. This biting midge is important vector of avian *Haemoproteus* parasites and worth attention during development of prevention measures against avian haemoproteosis.

Experiment 4. Development of *Haemoproteus* parasites in blood - sucking mosquitoes (Culicidae)

Numerous mature ookinetes of *Haemoproteus* parasites (both *H. tartakovskyi* and *H. balmorali*) were seen in the midgut content of experimentally infected mosquito *Ochlerotatus cantans* between 1 and 3 dpi (Fig. 6 e, g); their number decreased markedly between 4 and 5 dpi when a few degenerating ookinetes were observed (Fig. 6 f, h). The degenerating ookinetes possessed the palestained cytoplasm and poorly visible or even invisible nuclei; vacuole - like spaces were invisible or poorly visible in the degenerating parasites (compare Fig. 6 e, g with Fig. 6 f, h). Ookinetes developed markedly asynchronously: they were seen on surface of the midgut wall in the whole mounts preparations until 5 dpi (Fig. 6 i). Numerous roundish oocysts of *H. tartakovskyi* (Fig. 6 j, k, n - p) and *H. balmorali* (Fig. 6 l, m) were observed on surface of the midgut wall between 4 and

16 dpi. Oocysts developed markedly asynchronously, resulting in the presence of parasites of different sizes in all preparations. Only degenerating oocysts were seen in midgut wall between 15 and 17 dpi.

There was no significant difference discernible between *H. tartakovskyi* and *H. balmorali* in patterns of development, morphology, or size of oocysts.

Microscopic examination of histological preparations of the head, thorax and abdomen revealed the following features. Numerous red blood cells, including the infected ones, were visible in sections of gut located in the head, thorax and abdomen of infected mosquitoes on 1, 2 and 3 dpi (Fig. 7 a, b). Numerous ookinetes of *H. tartakovskyi* and *H. balmorali* were seen in the same sections (Fig. 7 a, b), indicating successful sexual process and initial sporogonic development in these parts of the body soon after the infected blood meal. Apparently, ookinetes find no barrier between the gut contents and the gut wall or haemocoel, as numerous ookinetes were present in the head, thorax and abdomen tissues (Fig. 7 c – f). In transverse sections, the ookinetes looked like roundish or oval bodies, often with adjacent pigment granules; the parasites looked the same in histological sections of the abdomen, thorax and head (Fig. 7 a – f). Oocysts of both parasite species (Fig. 7 g – l) were observed in histological sections of the head, thorax and abdomen between 4 and 15 dpi, indicating active movement of ookinetes and initial sporogony in these body parts. Development of sporozoites was not seen in oocysts. Bird DNA was detectable in the head, thorax and abdomen of mosquitoes between 1 and 4 dpi; it was not detectable later, except 1 case in an abdomen 5 dpi. These data correspond to the visual observation of red blood cells in histological sections of these parts of the mosquito body (Fig. 7 a, b).

The key results of this experimental study are that two *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) species (1) undergo sexual processes and produce ookinetes throughout the entire digestive tract of engorged mosquitoes, including the head, thorax and abdomen; (2) ookinetes find no barrier in their way from gut contents to the gut wall and haemocoel, resulting in the presence of parasites throughout the body of the mosquitoes; (3) develop oocysts in the head, thorax and midgut wall of mosquitoes; and (4) abort sporogonic development at the oocyst stage without formation of sporozoites.

Importantly, *Haemoproteus* spp. DNA is detectable in the head, thorax and abdomen of infected mosquitoes for several weeks, indicating relatively long-time persistence of *Haemoproteus* parasites in resistant insects following an infected blood meal (Table 1). In spite of abortive sporogonic development, mosquitoes

have been scored as infected by PCR when, in fact, they are not competent vectors of the parasites. This makes obstacles in direct application of PCR - based detection methods in vector research, particularly in wildlife.

Ookinetes of some *Plasmodium* parasites move actively in the body of insects, resulting in partial or ectopic sporogonic development in resistant hosts (Schneider and Shahabuddin, 2000; Fabian et al., 2004; Kim et al, 2009). The present study shows that ectopic ookinete development is also characteristic of avian *Haemoproteus* parasites during development in mosquitoes, in which ookinetes and oocysts are present in the thorax and head. This study shows that results of solely PCR-based vector studies, should be interpreted with caution because PCR will amplify haemosporidian DNA regardless of the life stages present in blood - sucking insects; it cannot distinguish between infective (sporozoite) and non - infective (ookinete, oocyst) sporogonic stages. Hence, PCR detection of haemosporidian genetic material in blood - sucking insects, even several weeks after an infected blood meal, does not necessarily mean that this material originated from parasites that are capable of producing viable sporozoites, the essential stage for haemosporidian transmission.

Because of the complicated life cycles of haemosporidians, microscopic approaches and experimental research remain essential and should be applied in parallel with PCR - based detection tool in vector studies, particularly in wildlife.

Experiment 5. Determination of virulence of *Haemoproteus* parasites for bird - biting mosquitoes and patterns of their development in these insects

There was a highly significant difference in the survival rate between the control group and all groups of mosquitoes *Ochlerotatus cantans* fed on meals with high parasitaemia of *H. balmorali*, *H. tartakovskyi* and *H. lanii*, with the greatest mortality reported in all groups infected flies 1 – 3 dpi. For 4 dpi, the percentage of survived control mosquitoes (88 %) was 2.2-, 3.6- and 4 - fold greater than that of groups fed on meals with high parasitaemia of *H. balmorali*, *H. tartakovskyi* and *H. lanii*, respectively (Fig. 8). Numerous ookinetes were observed in the gut area and adjacent tissues located in the head, thorax and abdomen (Fig. 9) of infected insects 0.5 – 1 dpi. The migrating parasites damage organs throughout the entire body of mosquitoes; that is the main reason of mortality. To the end of this study, 46 % of mosquitoes survived in control group, but the survival rates of experimental mosquitoes fed on meals with high parasitaemia were between 2.6-

and 5.8- fold lower. This study indicates that widespread *Haemoproteus* infections are markedly virulent for bird-biting mosquitoes, which rapidly die after feeding on heavily infected blood meals.

The key result of this study is that widespread *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) species are markedly virulent and rapidly kill the majority of infected *O. cantans* mosquitoes, which are abundant at our study site and willingly take blood meals on birds (Bernotienė, 2012). It is likely that the simple physical damage of mosquito tissues by ookinetes in the head, thorax and abdomen is the main reason of the sharply reduced survival rate between 0.5 and 2 dpi. During this period of time, numerous ookinetes develop and migrate throughout the body of infected insects, but oocysts are still absent (Valkiūnas et al., 2013). Physical damage due to perforation of tissues should be directly related to the ookinete numbers, which depend on the intensity of gametocytaemia in donor birds. This explains why the mosquito survival rate markedly depends on the intensity of infection.

In nature, individuals are exposed to numerous environmental factors; thus, mosquito mortality due to *Haemoproteus* parasites may be even more pronounced than was recorded in the laboratory. Reduced survival of blood-sucking insects implies a possible reduced involvement in transmission of other infections by decreasing the number of survived biting females. This might be significant epidemiologically but remains insufficiently investigated.

Experiment 6. Determination of the development of *Plasmodium homocircumflexum* (lineage pCOLL4) in the mosquitoes *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens pipiens* form *molestus* and *Aedes vexans*

We observed the development of ookinetes of *Plasmodium homocircumflexum* in the midguts of *C. p. pipiens* (Fig. 10 a, d), *C. p. pipiens* f. *molestus* (Fig. 10 b, e) 24 hr pi, and also in *Aedes vexans* 48 hr pi (Fig. 10 c, f). Ookinetes were seen in 100 % of infected mosquitoes of all species. Ookinetes were elongated worm-like bodies, which possessed slightly of centre located nuclei, large “vacuoles” and pigment granules (Fig. 10 a – c). The oocysts were observed 6 – 20 dpi in *C. p. pipiens*, 10 – 20 dpi in *C. p. f. molestus* and 9 – 14 dpi in *A. vexans*. The initial sporogony was not synchronized, the oocysts were present in 14 %, 28 % and 25 % of *C. p. pipiens* (6 dpi), *C. p. pipiens* f. *molestus* (10 dpi) and *A. vexans* (9 dpi), respectively. Mature oocysts were not seen. Sporozoites were absent from salivary glands of all exposed mosquitoes examined until 23 dpi. Thus, the sporogonic development of this parasite is abortive in all investigated mosquitoes.

Valkiūnas et al. (2013) showed that closely related haemosporidian parasites belonging to *Haemoproteus* are able to develop ookinetes and oocysts throughout entire body of mosquito *Ochlerotatus cantans*, but development aborts and melanisation of oocysts occurs approximately 11 dpi. Abortive parasites development can occur at any stage of development in vector. The abortive development of *Plasmodium* spp. is commonly observed both in dipteran and vertebrate-hosts (Billingsley and Rudin, 1992; Sinden, 2002; Sinden et al., 2004). These examples show that 1) positive PCR signals and 2) the presence of ookinetes and oocysts of haemosporidian parasites cannot be considered as the final prove for vector determination. Observation of sporozoites is essential for determination of susceptible vectors. Thus, some dipteran species, which previously considered to be susceptible vectors based solely on observation of ookinetes and oocysts, might be not true vectors and this information should be reconsidered (see review by Santiago-Alarcon et al., 2012). This needs further experimental investigations.

CONCLUSIONS

1. The patterns of sporogonic development of the genetically similar and closely related cytochrome *b* lineages of *Plasmodium relictum* (pSGS1 and pGRW11) and different isolates of the lineage pSGS1 are the same.

2. Sporogony of the lineages pSGS1 and pGRW11 of *P. relictum* completes and sporozoites develop in *Culex pipiens pipiens* form *molestus*. This widespread mosquito should be taken in consideration in studies of avian malaria epidemiology.

3. *Haemoproteus minutus* and *H. belopolskyi* complete sporogony and produce sporozoites in the biting midge *Culicoides impunctatus*, which is an important vector of avian haemoproteids and worth more attention in epidemiology research of avian haemoproteosis.

4. Initial sporogonic development of *Haemoproteus* parasites occurs throughout the entire body of infected bird - biting mosquitoes *Ochlerotatus cantans*, but the sporogony is abortive.

5. Heavy *Haemoproteus* infections are markedly virulent to blood - sucking dipteran insects and cause mortality of these insects.

6. DNA of *Haemoproteus* parasites is detectable in the head, thorax and abdomen of infected mosquitoes *Ochlerotatus cantans* for several weeks following an infected blood meal, indicating the relatively long - time persistence of these

parasites in resistant insects. That makes obstacles in application of solely PCR - based detection methods in determining vectors of haemosporidian parasite, particularly in wildlife.

7. The sporogonic development of *Plasmodium homocircumflexum* (lineage pCOLL4) occurs to the oocyst stage in the mosquitoes *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens pipiens* form *molestus* and *Aedes vexans*, but sporozoites do not develop, indicating the abortive parasite sporogony.

LIST OF PUBLICATIONS ON THE DISSERTATION TOPIC MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. **Kazlauskienė, R.**, Bernotienė, R., Palinauskas, V., Iezhova, T.A., Valkiūnas, G. 2013. *Plasmodium relictum* (lineages pSGS1 and pGRW11): complete synchronous sporogony in mosquitoes *Culex pipiens pipiens*. *Experimental Parasitology*, 133, 454 – 461.

2. Palinauskas, V., **Žiegytė, R.**, Ilgūnas, M., Iezhova, T.A., Bernotienė, R., Bolshakov, C., Valkiūnas, G. Description of first cryptic avian malaria parasite *Plasmodium homocircumflexum* n. sp., with 2 experimental data on its virulence and development in avian hosts and mosquitoes. *International Journal for Parasitology*, accepted to press.

3. Valkiūnas, G., **Kazlauskienė, R.**, Bernotienė, R., Palinauskas, V., Iezhova, T.A. 2013. Abortive long - lasting sporogony of two *Haemoproteus* species (Haemosporida, Haemoproteidae) in the mosquito *Ochlerotatus cantans*, with perspectives on haemosporidian vector research. *Parasitology Research*, 112, 2159 – 2169.

4. Valkiūnas, G., **Kazlauskienė, R.**, Bernotienė, R., Bukauskaitė, D., Palinauskas, V., Iezhova, T.A. 2014. *Haemoproteus* infections (Haemosporida, Haemoproteidae) kill bird - biting mosquitoes. *Parasitology Research*, 113, 1011 – 1018.

5. **Žiegytė, R.**, Bernotienė, R., Bukauskaitė D., Palinauskas, V., Iezhova, T., Valkiūnas, G. 2014a. Complete sporogony of *Plasmodium relictum* (lineages pSGS1 and pGRW11) in mosquito *Culex pipiens pipiens* form *molestus*, with implications to avian malaria epidemiology. *Journal of Parasitology*, accepted to PubMed PMID: 24979183.

6. **Žiegytė, R.**, Palinauskas, V., Bernotienė, R., Iezhova, T.A, Valkiūnas, G. 2014b. *Haemoproteus minutus* and *Haemoproteus belopolskyi* 1 (Haemoproteidae): Complete sporogony in the biting midge *Culicoides impunctatus* (Ceratopogonidae), with implications on epidemiology of haemoproteosis. *Experimental Parasitology*, 145, 74 – 79.

Note: The author's surname Kazlauskienė was changed to Žiegytė in 2013.

CURRICULUM VITAE

Name:

Rita Žiegytė (Kazlauskienė)

Date and place of birth:

19th of November, 1974, Zarasai, Lithuania.

Education:

2010 – 2014 PhD studies of Zoology, Biomedical sciences, Nature Research Centre.

2004 – 2006 Master's Degree in Biology, Faculty of Natural Sciences, Vilnius Pedagogical University.

1995 – 2001 Bachelor's Degree in Biology, Faculty of Natural Sciences, Vilnius Pedagogical University.

Appointments:

2011 – present: Junior researcher, Nature Research Centre (the Project *Mechanisms of speciation in malaria parasites and related haemosporidians*, VP1-3.1-ŠMM-07-K-01-047, the Global Grant), Vilnius, Lithuania.

2004 – 2011 Medical entomologist, National Public Health Surveillance Laboratory.

Work address:

Nature Research centre,
Akademijos Str. 2, LT-08412,
Vilnius, Lithuania.
Phone +370 5 2729242

Awards:

Young Scientist Award (2013). Best presentation at the 5th Conference of the Scandinavian - Baltic Society for Parasitology, Copenhagen.

