

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

EGIDIJUS KINDERIS

Biologinės įvairovės magistrantūros studijų programa

Baigiamasis magistro darbas

ZYLINIŲ (*PARIDAE*) IR MUSINUKINIŲ (*MUSCICAPIDAE*) PAUKŠČIŲ
HEMOSPORIDINIAI PARAZITAI IR JŲ TRANSMISIJOS TYRIMAS
KURŠIŲ NERIJOJE

Leidžiama ginti _____
(parašas)

Studentas _____
(parašas)

Studijų programos pirmininkas

(vardas, pavardė)

Darbo vadovė dr. Rasa Bernotienė

(parašas)

Konsultantas dr. Vaidas Palinauskas

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

Darbas įvertintas _____
(data, įvertinimo balas, komisijos
pirmininko parašas)

TURINYS

ĮVADAS	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	6
1.1. HEMOSPORIDINIAI PAUKŠČIŲ PARAZITAI	6
1.2. HEMOSPORIDINIŲ PARAZITŲ GYVENIMO CIKLAS	7
1.3. PAUKŠČIŲ HEMOSPORIDINIŲ PARAZITŲ VIRULENTIŠKUMAS IR KELIAMOS GRĖSMĖS	9
1.4. HEMOSPORIDINIŲ PARAZITŲ SPECIFIŠKUMAS PAUKŠČIAMS.....	11
1.5. PAUKŠČIŲ HEMOSPORIDINIŲ PARAZITŲ VEKTORIAI – KRAUJASIURBIAI VABZDŽIAI	13
1.6. PAUKŠČIŲ HEMOSPORIDINIŲ PARAZITŲ TRANSMISIJA IR PAPLITIMAS PASAULYJE.....	18
1.7. MUSINUKINIAI IR ZYLINIAI PAUKŠČIAI KURŠIŲ NERIJOJE	21
2. TYRIMO MEDŽIAGA IR NAUDOTI METODAI.....	25
2.1. TYRIMO MEDŽIAGA.....	25
2.2. TYRIMO METU NAUDOTI METODAI	26
2.2.1. DNR IŠSKYRIMAS IŠ PAUKŠČIŲ KRAUJO MĖGINIŲ.....	26
2.2.2. DAUGYBINIS GENO FRAGMENTO PADAUGINIMAS (PGR REAKCIJA).....	27
2.2.3. AGAROZĖS GELIO DNR ELEKTROFOREZĖ.....	27
2.2.4. PGR METU GAUTŲ PRODUKTŲ PARUOŠIMAS SEKOSKAITAI.....	28
2.2.5. GENO FRAGMENTŲ SEKOSKAITA.....	29
2.2.6. HEMOSPORIDINIŲ PAUKŠČIŲ PARAZITŲ IDENTIFIKAVIMAS NAUDOJANTIS BIOINFORMATINĖMIS PROGRAMOMIS	29
2.2.7. HEMOSPORIDINIŲ PAUKŠČIŲ PARAZITŲ IDENTIFIKAVIMAS TRADICINIAIS METODAIS (MIKROSKOPAVIMAS).....	29
2.2.8. PAUKŠČIŲ HEMOSPORIDINIŲ PARAZITŲ SMULKIUOSIUSE MAŠALUOSE IDENTIFIKAVIMAS MOLEKULINIAIS METODAIS	30
2.2.9. <i>CULICOIDES</i> MAŠALŲ IDENTIFIKACIJA PAGAL MORFOLOGINIUS POŽYMIUS	30
2.2.10. <i>CULICOIDES</i> MAŠALŲ IDENTIFIKACIJA MOLEKULINIAIS METODAIS	30
2.2.11. STATISTINIAI METODAI UŽSIKRĖTIMŲ PAUKŠČIŲ HEMOSPORIDINIAIS PARAZIT AIS PALYGINIMUI	31
3. REZULTATAI.....	32
3.1. KURŠIŲ NERIJOJE SUGAUTŲ PAUKŠČIŲ UŽSIKRĖTIMAS HEMOSPORIDINIAIS PARAZIT AIS	32
3.1.1. SUAUGUSIŲ PAUKŠČIŲ, SUGAUTŲ KURŠIŲ NERIJOJE, UŽSIKRĖTIMAS HEMOSPORIDINIAIS PARAZIT AIS	33
3.1.2. PAUKŠČIŲ JAUNIKLIŲ, SUGAUTŲ KURŠIŲ NERIJOJE, UŽSIKRĖTIMAS HEMOSPORIDINIAIS PARAZIT AIS	36
3.2. <i>CULICOIDES</i> MAŠALŲ RŪŠIŲ SUDĖTIS KURŠIŲ NERIJOJE IR NERIES REGIONINIAME PARKE BEI JŲ UŽSIKRĖTIMAS HEMOSPORIDINIAIS PARAZIT AIS	38
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	40

4.1. KURŠIŲ NERIJOJE IDENTIFIKUOTI PAUKŠČIŲ HEMOSPORIDINIAI PARAZITAI	40
4.2. <i>CULIDOIDES</i> MAŠALŲ UŽSIKRĖTIMAS PAUKŠČIŲ HEMOSPORIDINIAIS PARAZIT AIS	44
IŠVADOS	48
SANTRAUKA	50
SUMMARY	51
LITERATŪROS SĄRAŠAS	52
PRIEDAI	62
PRIEDAS NR. 1	62

IVADAS

Hemosporidiniai parazitai (Apicomplexa: *Haemosporida*) yra protistų, parazituojančių roplius, paukščius ir žinduolius grupė (Valkiūnas, 2005). Šių organizmų galutiniai šeimininkai ir vektoriai yra dvisparnių (*Diptera*) būrio kraujasiurbiai vabzdžiai: kraujasiurbiai uodai (*Culicidae*), smulkieji (*Ceratopogonidae*) ir upiniai mašalai (*Simuliidae*), briedmusės (*Hippoboscidae*) (Santiago-Alarcon *et al.*, 2012). Paukščių hemosporidijos jau daugiau kaip šimtą metų yra naudojamos kaip modeliniai organizmai (Perkins, 2014): siekiant iširti parazitų ir jų šeimininkų tarpusavio ryšius, koevoliucijos mechanizmus bei vienos iš pavojingiausių žmonių ligų – *Plasmodium* genties hemosporidijų sukeltos maliarijos – vystymosi ciklus, transmisijos būdus, nustatant galimą plitimą, prisitaikymą ir prevenciją. Paukščių hemosporidiniai parazitai sulaukė didelio mokslininkų susidomėjimo ir dėl to, kad daugelio mokslininkų manymu, tai yra vieni pagrindinių laukinių ir naminių paukščių populiacijų gausumą kontroliuojančių veiksnių. Šie parazitai gali būti itin pavojingi nykstančių ar nelaisvėje laikomų rūšių paukščiams.

Hemosporidijos yra aptinkamos visame pasaulyje, išskyrus Antarktidą (Valkiūnas, 2005), tad daug mokslininkų dėmesio yra skiriama siekiant nustatyti atskirų hemosporidijų rūšių paplitimą bei iširti, kokių paukščių hemosporidinių parazitų transmisija vyksta skirtingose teritorijose. Geriausiai iširta paukščių hemosporidinių parazitų gentis yra *Plasmodium* (Clark *et al.*, 2014), tačiau apie kitų dviejų hemosporidijų genčių (*Haemoproteus* ir *Leucocytozoon*) parazitų vektorius ir transmisijos ypatumus informacijos yra surinkta kur kas mažiau. Daugeliu atvejų nėra aišku, kurie parazitai yra pernešami paukščių perėjimo vietovėse, o kuriais paukščiai užsikrečia žiemosdami Afrikoje ar pietų Europoje. Be to, nustatyta atvejų, kai užsikrėtimas perėjimo vietovėse nevyksta, nors tam reikalingi veiksniai (parazitai, vektoriai) egzistuoja (Chagas *et al.*, 2019). Taip pat šiuo metu yra surinkta nepakankamai informacijos apie hemosporidijų vektorius, jų ekologinį prisitaikymą, parazitų specifiškumą jiems. Ši informacija yra itin svarbi vertinant galimus hemosporidinių parazitų sukeltų ligų protrūkius Šiaurės Europos laukinių paukščių populiacijose.

Darbo tikslas:

Nustatyti zylinių (Passeriformes: *Paridae*) ir kai kurių musinukinių (Passeriformes: *Muscipidae*) paukščių užsikrėtimą hemosporidijomis (*Haemosporida*), išaiškinti parazitus, kurių transmisija vyksta Kuršių nerijoje bei nustatyti galimus jų pernešėjus.

Darbo uždaviniai:

1. Ištirti zylinių (*Paridae*) ir musinukinių (*Muscicapidae*) šeimoms priklausančių suaugusių paukščių, sugautų Kuršių nerijoje 2016, 2018 ir 2019 metais, užsikrėtimą paukščių hemosporidiniais parazitais.
2. Ištirti zylinių ir musinukinių paukščių jauniklių, sugautų Kuršių nerijoje 2016, 2018 ir 2019 metais, užsikrėtimą hemosporidiniais parazitais.
3. Išaiškinti, kokioms smulkiųjų mašalų (Diptera: *Ceratopogonidae*) rūšims priklausančios kraujasiurbiai vabzdžiai yra aptinkami Kuršių nerijoje (Kaliningrado srityje) ir nustatyti šių vabzdžių natūralų užsikrėtimą paukščių hemosporidiniais parazitais.
4. Palyginti zylinių ir musinukinių šeimoms priklausančių paukščių jaunikliuose ir smulkiuosiuose mašaluose nustatytus parazitus.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

Šioje baigiamojo magistro darbo dalyje apžvelgiama mokslinėje literatūroje pateikiama informacija apie trijų genčių: *Plasmodium*, *Haemoproteus* ir *Leucocytozoon* paukščių hemosporidinius parazitus. Analizuojama informacija apie šių parazitų gyvenimo ciklą, vietą sistematikoje, paplitimą pasaulyje, virulentiškumą ir keliamas grėsmes. Taip pat, hemosporidijas pernešančius vabzdžius (vektorius) ir šių parazitų transmisiją. Šioje dalyje taip pat apžvelgiami ir tyrimo metu tirtų paukščių biologija, paplitimas Kuršių nerijoje, žinomas užsikrėtimas paukščių hemosporidiniais parazitais.

1.1. HEMOSPORIDINIAI PAUKŠČIŲ PARAZITAI

Sistematikai paukščių hemosporidinius parazitus yra priskyre nesuranguotai taksonominei grupei SAR (*Stramenopiles+Alveolates+Rhizaria*), kuri priklauso Eukarijų domenui (Burki *et al.*, 2007). Parazitologai visas paukščių hemosporidijas yra suskirstę į tris gentis: *Plasmodium*, *Haemoproteus* ir *Leucocytozoon* (Valkiūnas, 2005; Atkinson and van Riper III, 1991). Šios gentys mokslininkų yra išskirtos pagal morfologines parazitų savybes, sutinkamas skirtingose vystymosi stadijose bei šiek tiek skirtingus vystymosi ciklus, tarpinių bei galutinių šeiminių sistematinę padėtį (Martinsen *et al.*, 2008). Nustatyta, kad skiriasi ir skirtingų genčių hemosporidijų patogeniškumas bei paplitimas pasaulyje: pavyzdžiui, *Plasmodium* genties hemosporidijos dažniau aptinkamos šiltesnio klimato zonose, o *Leucocytozoon* ar *Haemoproteus* genčiai priskiriamos hemosporidijos – vidutinio klimato zonose (Santiago-Alarcon *et al.*, 2012).

Pirmosios hemosporidinių parazitų rūšys buvo aprašytos stebint morfologinius skirtumus skirtingose parazitų vystymosi stadijose, pirmiausiai paukščių eritrocituose (Valkiūnas, 2005). Tiriant tik paukščių eritrocituose esančių parazitų vystymosi stadijų morfologines savybes buvo išskirta daugiau kaip du šimtai skirtingų parazitų rūšių (Martinsen *et al.*, 2006). Po to, kai hemosporidinių parazitų identifikacijai buvo pasitelkti molekulinės biologijos metodai, buvo pastebėta, kad šių parazitų mitochondrijų membraninio baltymo citochromo *b* geno fragmento nukleotidų seka dažniausiai skiriasi tarp rūšių, todėl tai greitai tapo plačiai paplitusiu ir naudojamu parazitų identifikacijos būdu (angl. DNA barcoding) (Bensch *et al.*, 2009; Waldenström *et al.*, 2004). Visgi, pradėjus plačiai naudoti DNR sekų analize paremtus identifikacijos metodus tapo aišku, kad mitochondrinio citochromo *b* geno fragmentų sekos gali varijuoti ir rūšies viduje, todėl remiantis šiais atradimais parazitologai sukūrė paukščių hemosporidinių parazitų klasifikacijos sistemą, paremtą ne tik parazito

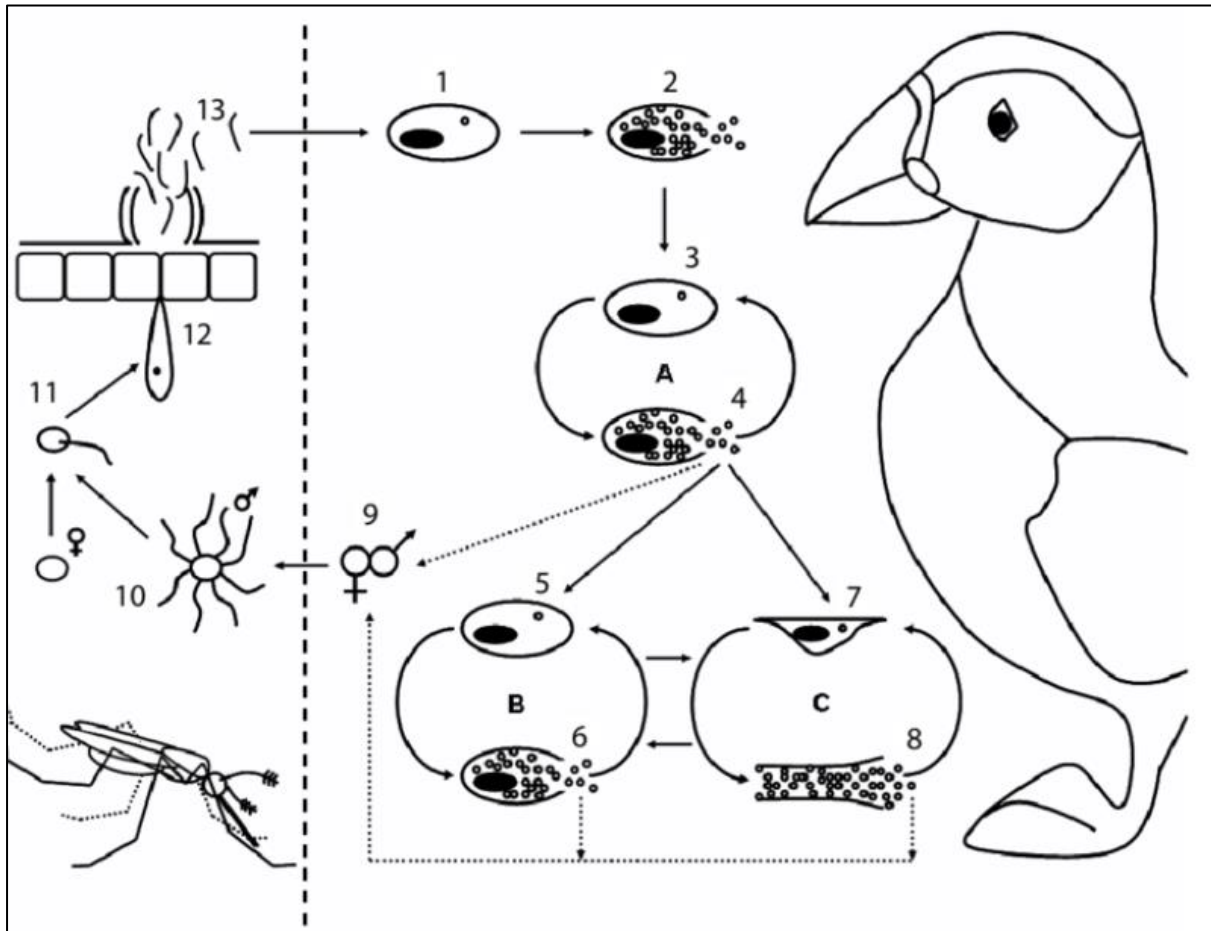
priskyrimo konkrečiai rūšiai, bet ir genetinės linijos identifikacija. 2014 metais buvo atrasta ir suskaičiuojama daugiau kaip 1300 skirtingų paukščių hemosporidinių parazitų genetinių linijų (Clark *et al.*, 2014), o MalAvi¹ duomenų bazėje (Bensch *et al.*, 2009) dabar pateikiama informacija apie 2775 unikalias paukščių hemosporidinių parazitų genetines linijas. Mokslininkų teigimu, dar daugiau nei 10 000 genetinių linijų gali būti dar neaprašytos (Bensch *et al.*, 2009; Bensch *et al.*, 2004). Visgi, svarbu atkreipti dėmesį, kad šiuo metu mokslininkai, tiriantys hemosporidinių parazitų sistematiką, susiduria su iššūkiu, jog iki genetinės linijos pagal citochromo *b* geno fragmentą identifikuoti hemosporidiniai parazitai yra priskiriami konkrečiai parazitų genčiai (*Haemoproteus*, *Plasmodium* ar *Leucocytozoon*), tačiau jų identifikacija iki rūšies dažnai nėra atliekama arba atliekama neteisingai (Valkiūnas, Atkinson, *et al.*, 2008). Tokia situacija yra susidariusi dėl to, kad pastaruoju metu hemosporidijų identifikacijai yra plačiai naudojami molekuliniai tyrimo metodai, tačiau morfologijos žinių trūkumas ir nepakankamas mokslininkų dėmesys tradiciniams identifikacijos metodams, t.y. mikroskopavimui ir morfologijos tyrimams, neleidžia susieti molekuliniais metodais gautos informacijos apie genetines linijas su konkrečia hemosporidijų rūšimi (Valkiūnas, Atkinson, *et al.*, 2008). Mokslininkai teigia, kad norint užtikrinti, kad kuo mažiau hemosporidinių paukščių parazitų genetinių linijų liktų nepriskirtos konkrečioms rūšims, būtina ne tik atlikti tradicinius morfologinius tyrimus (Bensch *et al.*, 2009; Palinauskas, 2009), bet ir duomenų bazėse prie deponuotų parazito DNR sekų priskirti atitinkamus morfologinius pavyzdžius bei išsaugoti parazitų rūšį laiduojančius preparatus (Valkiūnas, Atkinson, *et al.*, 2008).

1.2. HEMOSPORIDINIŲ PARAZITŲ GYVENIMO CIKLAS

Siekiant suprasti paukščių hemosporidinių parazitų transmisiją ir keliamą pavojų tiek paukščių, tiek kraujasiurbių vabzdžių populiacijoms svarbu suprasti šių parazitų vystymosi ciklą. Visų hemosporidinių parazitų gyvenimo ciklas skiriasi ne tik tarp skirtingų genčių hemosporidinių parazitų, bet ir tarp skirtingų rūšių individų (Valkiūnas, 2005). Ši ypatybė yra svarbi siekiant išaiškinti hemosporidijų patogeniškumą skirtingų rūšių paukščiams. Moksliniai tyrimai atskleidžia, kad paukščiai yra mažiau atsparūs hemosporidijų infekcijoms, jei jos yra paukščiui naujos, išgyvena kitokias, paukščiui neįprastas, vystymosi stadijas (Ilgūnas *et al.*, 2019). Principinis hemosporidijų gyvenimo ciklas mokslininkų yra išaiškintas (pav. 1). Šie parazitai būtinai bent kartą savo vystymosi ciklo metu privalo pakeisti šeimininką, skirtinguose

¹ <http://130.235.244.92/bcgi/malaviReport.cgi?report1=Grand+Lineage+Summary> Prieiga per internetą [2020 m. vasario 8 d.]

šeimininkuose išgyvena skirtingas vystymosi stadijas ir pakeičia reprodukcijos būdą (Valkiūnas, 2005; Huijben *et al.*, 2007).



1 pav. Paukščių maliarijos sukėlėjo *Plasmodium relictum* vystymosi ciklo schema. Dešinėje pusėje atvaizduojamas nelytinis parazito dauginimosi būdas: 1) kraujasiurbiiui vabzdžiui maitinantis į paukščio kraujotaką patenka sporozoitai; 2) susiformuoja kriptozoitai; 3) infekuojamas makrofagas; 4) susiformuoja metakriptozoitai; 5) infekuojamas eritrocitas; 6) susiformuoja eritrocitiniai merozoitai; 7) infekuojamos kapiliarų endotelio ląstelės; 8) susiformuoja fanerozoitai; 9) subręsta vyriški ir moteriški gametocitai; A raide pažymėtas pirminis egzoertirocitinis ciklas, B – eritrocitinis ciklas, C – antrinis egzoertirocitinis ciklas. Kairėje paveikslo pusėje atvaizduojamas lytinio dauginimosi ciklas galutiniame šeimininke (vektoriuje): 10) vyriškos ir moteriškos gametos patenka į vabzdį kraujo siurbimo metu; 11) įvyksta apvaisinimas ir susiformuoja zigota; 12) subrendusi ookinetė prasiskverbia per žarnos sienelę; 13) susidariusioje oocistoje subręsta sporozoitai (Huijben *et al.*, 2007).

Kaip ir buvo minėta anksčiau, skirtingų paukščių hemosporidinių parazitų vystymosi stadijos gali ženkliai skirtis, tačiau svarbiausi vystymosi etapai, svarbūs hemosporidijų transmisijai prasideda nuo nelytinio dauginimosi stadijos, vykstančios tarpiniuose šeimininkuose – paukščiuose. Iš į paukščio kraujotaką kraujo siurbimo metu

inokuliuotų sporozoitų formuojasi merozoitai, kurie paplinta visame šeimininko organizme. Vėliau paukščio eritrocituose pradeda bręsti ir formotis lytinio dauginimo ląstelės – gametocitai. Gametocitai cirkuliuoja kraujyje ir kartu su krauju gali būti įsiurbiami į parazito galutinio šeimininko – kraujasiurbio vabzdžio žarnyną. Patekę į vabzdį gametocitai pilnai subręsta ir prasideda lytinio dauginimosi stadija, kurios metu susiliejusios gametos suformuoja zigotą, pradeda bręsti ookinetė, kuriai subrendus ir prasiskverbęs per žarnos sienelę susiformuoja oocista. Šiame darinyje subręsta sporozoitai, kuriems patekus į kraujasiurbio vabzdžio seilių liaukas šeimininkas pakartotinai siurbdamas kraują gali infekuoti kitą paukštį ir ciklas prasideda iš naujo (Valkiūnas, 2005; Huijben *et al.*, 2007).

Siekiant identifikuoti hemosporidinių parazitų vektorius ir nustatyti jų paplitimą pasaulyje svarbu atkreipti dėmesį ne tik į parazitų gyvenimo ciklą, bet ir sąlygas, reikalingas šių parazitų vystymuisi. Svarbiausi faktoriai, svarbūs daugelio hemosporidijų vystymuisi, yra vidutinė temperatūra (Valkiūnas, 2005; Loiseau *et al.*, 2013) ir temperatūros svyravimai paros metu (Paaijmans *et al.*, 2010). Nors skirtingų rūšių parazitų optimali vystymosi temperatūra gali stipriai skirtis, visgi mokslininkai yra nustatę, kad klimato kaita ir vidutinės temperatūros pokyčiai bei mažėjantys paros temperatūros svyravimai gali būti pakankamai svarbiu veiksniumi, leisiančiu paukščių hemosporidiniams parazitams paplisti į teritorijas, kuriose jų iki šiol nebuvo (Loiseau *et al.*, 2012; Zamora-Vilchis *et al.*, 2012). Tai reiškia, kad mokslininkų atliekami hemosporidinių parazitų vektorių ir parazitų paplitimo tyrimai skirtinguose pasaulio regionuose yra kaip niekada svarbūs, siekiant užkirsti kelią galimiems hemosporidinių parazitų sukeltų infekcijų protrūkiams ir apsaugant laukinių ir naminių paukščių populiacijas.

1.3. PAUKŠČIŲ HEMOSPORIDINIŲ PARAZITŲ VIRULENTIŠKUMAS IR KELIAMOS GRĖSMĖS

Paukščių hemosporidiniai parazitai didelio mokslininkų susidomėjimo sulaukia ne tik dėl ypatingo gyvenimo ciklo, tačiau ir dėl pavojaus, kurį sukelia šių parazitų infekcijos, laukinių ir naminių paukščių populiacijose, o taip pat ir įtakos daromos kraujasiurbių vabzdžių populiacijoms. Nors anksčiau buvo manoma, kad laukinių paukščių populiacijoms hemosporidijų infekcijos yra sąlyginai nepavojingos ir žema (chroninė) infekcija išsivysto gana dažnai, mat parazituojamo paukščio mirtis dažnai reiškia ir pačių parazitų mirtį, o hemosporidijos parazituoti šeimininką gali beveik visą jo gyvenimą, nesukeldamos rimtesnių patologijų (Valkiūnas, 2005). Mokslininkai pastaruoju metu teigia, kad tokie duomenys gali būti netikslūs dėl paprastai tyrimų metu naudojamos metodikos: laukiniai paukščiai yra

gaudomi tinklais, į kuriuos dažniau patenka sveiki, laisvai skraidantys paukščiai, todėl tinkluose retai aptinkami paukščiai, kuriems hemosporidinių parazitų infekcija pasireiškė stipriau (Westerdahl *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2014; Niebuhr *et al.*, 2016). Tokias išvadas taip pat gali patvirtinti ir laboratorijos, kontroliuojamomis sąlygomis atliekami paukščių maliarijos tyrimai, kurie atskleidžia, kad hemosporidijų infekcijų sukeltos organų pažaidos gana dažnai itin sumažina paukščių išgyvenimo galimybes ar net sukelia mirtį (Palinauskas *et al.*, 2015). Būtent dėl šios priežasties hemosporidijų paplitimo pasaulyje, specifiškumo paukščiams ir kraujasiurbiams vabzdžiams, virulentiškumo bei transmisijos tyrimai yra itin svarbūs ir siekiant prognozuoti šių parazitų sukeltamų infekcijų protrūkius. Ypatingai svarbūs šie tyrimai yra ir vykdant biologinės įvairovės išsaugojimo programas, kadangi nykstančioms ar endeminėms paukščių rūšių populiacijoms šių parazitų sukeltos infekcijos gali būti pražūtingos (Asghar *et al.*, 2011; Lachish *et al.*, 2011).

Turbūt vienas iš ryškiausių ir geriausiai ištirtų pavyzdžių, susijusių su hemosporidinių parazitų sukeltų infekcijų įtaka endeminėms paukščių populiacijoms, yra maždaug 1990-aisiais prasidėjęs masinis paukščių nykimas Havajuose (Boyer, 2008). Ekologai yra nustatę, kad maždaug 75 procentams endeminių Havajų paukščių rūšių yra kilusi grėsmė išnykti. Šio nykimo priežastimis mokslininkai yra nustatę gyvenamųjų teritorijų mažėjimą, konkurenciją su ne vietinių paukščių rūšių atstovais, tačiau kaip pagrindinę paukščių nykimo priežastį mokslininkai įvardina hemosporidinių paukščių parazitų sukeltamų infekcijų plitimą (Atkinson *et al.*, 1995). Vėliau atlikti tyrimai atskleidė, kad šių infekcijų plitimui Havajuose itin didelį poveikį turėjo XIX amžiuje kartu su krovniais atgabenti *Culex quinquefasciatus* rūšies kraujasiurbiai uodai, kurie ir tapo pagrindiniais paukščių maliariją sukeliančių parazitų vektoriais Havajuose (Samuel *et al.*, 2011). Vieni iš labiausiai šių uodų ir jų pernešamų hemosporidinių parazitų paveikti paukščiai buvo iviai (*Vestiaria coccinea*). Nustatyta, kad masinį šios rūšies paukščių nykimą lėmė užsikrėtimas *Plasmodium relictum* rūšies parazitais. Atlikti tyrimai atskleidė, kad apie 90 procentų parazitais infekuotų paukščių žūsta, o daugiau kaip 30-yje procentų visų žuvusių paukščių eritrocitų yra aptinkami hemosporidiniai parazitai (Atkinson *et al.*, 1995). Visgi, tokie aukšti mirtingumo rodikliai ir intensyvios parazitemijos paprastai paukščių populiacijose nėra aptinkamos. Manoma, kad tokius rezultatus lėmė tai, jog Havajuose iki šios infekcijos protrūkio hemosporidiniai parazitai ir kraujasiurbiai uodai, jų vektoriai, nebuvo paplitę, tad, jiems atsiradus, paukščiuose nebuvo išsivystęs efektyvus imuninis atsakas šiems parazitams. Nustatyta, kad tokiais atvejais *Plasmodium* genties hemosporidijų infekcijos gali būti itin pavojingos (Yorinks and Atkinson, 2000). Mokslininkai teigia, kad beveik visos endeminės paukščių rūšys, gyvenančios žemiau, nei vieno dviejų

kilometrų aukštyje virš jūros lygio, Havajuose yra išnykusios dėl *Plasmodium* parazitų. Jeigu *Plasmodium* parazitų vektoriai prisitaikys prie žemesnių temperatūrų ir galės gyventi aukščiau kalnuose – likusioms paukščių rūšims Havajuose taip pat gresia išnykimas.

Hemosporidinių parazitų tyrimai yra svarbūs siekiant išsaugoti ir nelaisvėje laikomus paukščius. Nustatyta, kad hemosporidiniai paukščių parazitai gali tapti paukščių, laikomų zoologijos soduose ar paukštynuose, žūties priežastimi. Tokie, mokslininkų patvirtinti atvejai yra pasitaikę visame pasaulyje: 2010-aisiais dėl *Haemoproteus minutus* parazitų sukeltų infekcijų Vokietijos ir Šveicarijos zoologijos soduose žuvo trijų skirtingų rūšių papūgos (Olias *et al.*, 2011), Pekino zoologijos sode hemosporidinių parazitų sukeltos infekcijos padarė itin didelę žalą ten auginamoms gervėms (Jia *et al.*, 2018). Tyrimų metu nustatyta, kad *Leucocytozoon* genties hemosporidijos dažnai sukeldavo šių gervių jauniklių žūtį (Jia *et al.*, 2018). Nors šių parazitų įtaka paukščiams ir jų populiacijoms yra gerai įrodyta, pagrindiniu iššūkiu iki dabar yra išlikusi šiuos parazitus pernešančių vektorių identifikacija, mat tik ją atlikus yra galima veiksminga parazitų kontrolė ir nelaisvėje gyvenančių paukščių apsauga.

Svarbu atkreipti dėmesį, kad nuo hemosporidinių paukščių parazitų sukeltų infekcijų žūti gali ne tik paukščiai, tačiau ir šiuos parazitus pernešantys kraujasiurbiai vabzdžiai. Nustatyta, kad vabzdžiai, infekuoti hemosporidiniais parazitais sunkiau skrenda, rečiau maitinasi (Santiago-Alarcon *et al.*, 2012), organuose susiformavusios ookinetės, migruodamos per organizmą, sukelia organų pažeidimus todėl tai gali tapti ir kraujasiurbių vabzdžių žūties priežastimi (Valkiunas *et al.*, 2014; Bukauskaite *et al.*, 2016). Eksperimentiškai nustatyta, kad poveikis kraujasiurbiams vabzdžiams yra tiesiogiai susijęs su parazitemijos lygiu paukščio, nuo kurio vektorius maitinasi, kraujyje (Valkiunas *et al.*, 2014). Tai reiškia, kad didesnis parazitemijos lygis paukščių organizme taip pat yra pavojingas ir kraujasiurbių vabzdžių išgyvenimui.

1.4. HEMOSPORIDINIŲ PARAZITŲ SPECIFIŠKUMAS PAUKŠČIAMS

Pastaruoju metu atliekami paukščių hemosporidinių parazitų molekuliniai tyrimai atskleidžia, kad skirtingų hemosporidijų genčių parazitai skiriasi ir skirtingu specifiškumu savo šeimininkams. Skirtingų genčių hemosporidijose ši savybė pasireiškia skirtingai, o šie skirtumai gali būti svarbūs tiriant parazitų evoliuciją ir aiškinantis plitimo bei pernešimo mechanizmus, nustatant galimus vektorius (Reeves *et al.*, 2015).

Plasmodium genties hemosporidijos dažniau pasižymi specifiškumu savo galutiniams šeimininkams, kraujasiurbiams uodams (vektoriams), tačiau gali parazituoti labai

platų spektrą paukščių rūšių (Ramey *et al.*, 2012; Žiegytė and Valkiūnas, 2014; Reeves *et al.*, 2015). Tai reiškia, kad skirtingus *Plasmodium* genčiai priklausančių genetinių linijų parazitus gali pernešti tik specifinių rūšių kraujasiurbiai uodai, tačiau parazitai gali vystytis daugelio rūšių paukščiuose. Pavyzdžiui, MalAvi duomenų bazės duomenimis *Plasmodium relictum* rūšiai priklausančios genetinės linijos pSGS1 parazitai yra nustatyti parazituojančios 129-ųjų skirtingų rūšių paukščių. Šios 129-ios rūšys priskiriamos 33 šeimoms pasiskirsčiusioms po 11 paukščių būrių.

Kitaip nei *Plasmodium*, *Haemoproteus* genties parazitai yra specifiskesni savo tarpiniams šeimininkams – paukščiams (Zhang *et al.*, 2014). Nustatyta, kad *Haemoproteus* genties hemosporidijos, aptiktos žąsiniuose paukščiuose (*Anseriformes*) labai retai aptinkamos parazituojančios kitiems taksonams priskiriamus paukščius (Wood *et al.*, 2013). Tai reiškia, kad *Haemoproteus* genties skirtingoms genetinėms linijoms priklausančios hemosporidijos yra prisitaikiusios parazituoti tik specifinius paukščius, o patekusios į kitų rūšių paukščių organizmus paprastai žūsta dėl neprisitaikymo įveikti šeimininko imuninį atsaką. Visgi, šie parazitai yra daug adaptyvesni savo vektoriams, todėl jų pernešimas gali vykti plačiau. Palyginimui su *Plasmodium*, *Haemoproteus majoris* rūšies genetinės linijos hPARUS1 parazitai yra aptikti tik 24-ųjų skirtingų rūšių paukščiuose, priklausančiose aštuonioms paukščių šeimoms, priskiriamoms tik žvirblinių paukščių būriui (MalAvi duomenų bazės duomenys). Visgi, naujausi mokslininkų tyrimai atskleidžia, kad skirtingų būrių paukščiams gyvenant itin arti vienas kito net ir labai savo šeimininkams specifiskų *Haemoproteus* parazitų šeimininkų pakeitimas yra galimas (Reeves *et al.*, 2015).

Leucocytozoon genties hemosporidinių parazitų tyrimai, susiję su šių parazitų specifiskumu konkrečioms paukščių rūšims, atliekami retai, todėl mūsų žinios apie šių parazitų specifiskumą yra gana ribotos. Visgi, mokslininkai mano, kad panašiai kaip ir *Haemoproteus* atveju šios hemosporidijos yra stipriai specifiskos savo tarpiniams šeimininkams (paukščiams) ir dažniausiai tos pačios genetinės linijos parazitai aptinkami tik giminingų rūšių paukščiuose (Yoshimura *et al.*, 2014). Kaip ir *Haemoproteus* parazitų atveju, pavyzdžiui, žąsiniuose paukščiuose aptikti parazitai kitiems taksonams priklausančiuose paukščiuose aptinkami itin retai (Wood *et al.*, 2013).

Mokslininkai mano, kad šis specifiskumas paukščiams yra susidaręs dėl skirtingo hemosporidinių parazitų produkuojamo apikalinio membraninio baltymo (*apical membrane antigen*, toliau – AMA) koduojančio geno AMA1 variabilumo skirtinguose parazituose. Kadangi šis baltymas yra svarbus prasiskverbimui į eritrocitus parazitų vystymosi metu (Peterson *et al.*, 1989), didesnis šio geno polimorfizmas reiškia ir didesnes parazito galimybes

išvengti prasiskverbimą į eritrocitus inhibuojančių antikūnų, produkuojamų šeimininko imuninės sistemos (Lauron *et al.*, 2014). Nustatyta, kad *Plasmodium* genties parazituose skirtingų AMA1 geno variacijų galima rasti ir tai pačiai genetinei linijai priklausančiuose parazituose (Lauron *et al.*, 2014). Manoma, kad šis genų polimorfizmas *Plasmodium* genties hemosporidijose yra pagrindinė prisitaikymo parazituoti daugelio rūšių paukščius priežastis.

1.5. PAUKŠČIŲ HEMOSPORIDINIŲ PARAZITŲ VEKTORIAI – KRAUJASIURBIAI VABDŽIAI

Atliekant hemosporidinių paukščių parazitų tyrimus ir siekiant išsiaiškinti skirtingas parazitų, cirkuliuojančių tiriamose teritorijose, rūšis svarbu suprasti ir šių parazitų vektoriams reikalingas ekologines sąlygas bei jų paplitimą, kadangi parazitai gali būti pernešami tik ten, kur vystosi ir yra aptinkami jiems specifiskai tinkantys vektoriai.

Pastaruoju metu skiriant didesnę dėmesį ne tik patiems hemosporidiniams parazitams, bet ir jų vektoriams – dvisparniams vabzdžiams, buvo nustatyta, kad skirtingoms gentims priklausančios hemosporidiniai parazitai yra pernešami skirtingoms šeimoms priklausančių kraujasiurbių vabzdžių (Santiago-Alarcon *et al.*, 2012; Pacheco *et al.*, 2018). *Plasmodium* genties hemosporidijų pernešėjais yra vabzdžiai, priklausančios *Phlebotomidae* bei *Culicidae* (pošeimiai *Culicinae* ir *Anophelinae*) šeimoms (Valkiūnas, 2005; Njabo *et al.*, 2011), *Haemoproteus* genčiai priskiriamų parazitų pernešėjais yra vabzdžiai, priklausančios *Ceratopogonidae* ir *Hippoboscidae* šeimoms (Bukauskaite *et al.*, 2016), *Leucocytozoon* pernešėjais yra vabzdžiai, priklausančios *Simuliidae* šeimai (Valkiūnas, 2005), tačiau yra nustatyta, kad *Leucocytozoon caulleryi* transmisijoje dalyvauja *Culicoides* genties smulkieji mašalai (Yu and Wang, 2001). Pavyzdžiui, eksperimentiniais tyrimais nustatyta, kad paprastas uodas (*Culex pipiens*) yra *Plasmodium* genties parazitų vektorius, tačiau jis nedalyvauja *Haemoproteus* genties hemosporidijų transmisijoje (Gutiérrez-López *et al.*, 2016).

Šis parazitų specifiskumas galutiniams šeimininkams iškėlė hipotezę, jog skirtingų hemosporidijų genčių atsiradimas yra susijęs su ko-evoliuciniais parazitų bei jų tarpinių (paukščių) ir galutinių (vabzdžių) šeimininkų ryšiais. Šią hipotezę patvirtina mokslinių tyrimų duomenys, kuriais įrodyta, jog parazitų rūšių ir genčių filogenetinis išsiskyrimas priklauso nuo parazitų pernešančių vabzdžių bei galutinių šeimininkų evoliucinių pokyčių (Pacheco *et al.*, 2018). Šeimininkų imuninės sistemos raida, plitimas pasaulyje, naujų rūšių atsiradimas ir kiti faktoriai lėmė ir tokios didelės paukščių hemosporidinių parazitų įvairovės atsiradimą.

Nors paukščių migracija yra svarbus veiksnys, prisidedantis prie hemosporidinių parazitų paplitimo ir ekologinio prisitaikymo pasaulyje (Santiago-Alarcon *et al.*, 2011), visgi šių parazitų paplitimui pasaulyje daug svarbesni yra jų vektoriai. Vabzdžio ekologinė niša yra svarbus veiksnys, leidžiantis nuspėti, kokie parazitai gali būti pernešami tam tikrose teritorijose (Kimura *et al.*, 2010; Santiago-Alarcon *et al.*, 2012).

Vektoriai, kurie dažniau maitinasi žinduolių, roplių, bet ne paukščių krauju yra daug mažiau efektyvūs paukščių hemosporidijų vektoriai (Hellgren *et al.*, 2008). Be to, dalies mokslinių tyrimų rezultatai atskleidžia, kad kai kurių ornitofilinių rūšių kraujasiurbiai vabzdžiai, pavyzdžiui *Simuliidae* upiniai mašalai, maitinasi tik specifinių paukščių krauju ir taip gali būti apribotas hemosporidinių parazitų plitimas (Hellgren *et al.*, 2008). Visgi, *Simuliidae* šeimos mašalus tyrinėjantys mokslininkai teigia, kad upiniai mašalai kaip ir kiti kraujasiurbiai vabzdžiai nėra labai specifiški, pasirinkdami savo mitybos šaltinius, o specializacija vyksta klasės lygmenyje (Adler *et al.*, 2004). Tokie kraujasiurbiai vabzdžiai generalistai, kurie gali maitintis daugelio paukščių krauju gali būti svarbiu veiksniumi itin efektyviam parazitų plitimui. Ypač, jei pernešamas parazitas yra taip pat prisitaikęs parazituoti platų spektrą paukščių ir šiuose šeiminiukuose vyksta sėkmingas užkrečiamų parazitų formų vystymasis (Martínez-de la Puente *et al.*, 2011).

Kaip ir minėta ankščiau, plačiausiai tiriama hemosporidinių parazitų grupė yra *Plasmodium* genties parazitai, todėl mokslinėje literatūroje daugiausiai informacijos galima rasti ir apie šios genties parazitų vektorius. Skirtingi *Phlebotomidae* bei *Culicidae* šeimoms priklausantys vektoriai yra prisitaikę gyventi ir vystytis įvairiomis sąlygomis, todėl yra plačiai paplitę visame pasaulyje.

Phlebotomidae šeimos vabzdžiai yra vieni iš nedaugelio vabzdžių, kurie gali maitintis tiek žinduolių, tiek roplių ir paukščių krauju. Nors šie vabzdžiai dažniausiai yra aptinkami šiltesnio klimato zonose (pietinėje Europoje, Azijoje, Afrikoje, Australijoje, Centrinėje ir Pietų Amerikoje), tačiau jų paplitimo arealas siekia ir šiauriau esančias teritorijas. Jie aptinkami ir šiaurinėje vakarų Europos dalyje, Mongolijoje, Kanadoje (Lewis, 1982; Young and Perkins, 1984). Visgi, Kuršių nerijoje ir visame Baltijos jūros pietrytiniame regione šios šeimos vabzdžiai nėra aptinkami, tad *Plasmodium* genties hemosporidijų pernešimą šiose vietovėse galėtų vykdyti tik *Culicidae* šeimos uodai.

Culicidae šeimos uodai yra didžiausia ir labiausiai paplitusi kraujasiurbių vabzdžių grupė. Jų vystymuisi tinkami įvairūs vandens telkiniai ar vandens sankaupos, tad šių vabzdžių paplitimo arealas itin platus: aptinkami visame pasaulyje, išskyrus Antarktidą (Harbach and Kitching, 1998). Šiuo metu mokslininkai yra identifikavę daugiau kaip tris

tūkstančius šių uodų rūšių. Visgi, nustatyta, kad tik nedidelė šių uodų dalis gali pernešti *Plasmodium* genties parazitus. Pavyzdžiui, *Anophelinae* pošeimyje yra beveik penki šimtai aprašytų uodų rūšių. Šių uodų paplitimo arealas taip pat apima beveik visą pasaulį, tad manoma, kad jie yra itin svarbūs *Plasmodium* parazitų vektoriai, tačiau, iš jų tik apie dvidešimt rūšių visame pasaulyje šiuo metu moksliniais tyrimais yra nustatytos kaip galinčios natūraliai pernešti *Plasmodium* genties parazitus (Santiago-Alarcon *et al.*, 2012). MalAvi duomenų bazės duomenimis² Europoje tik aštuonios *Culicinae* pošeimio uodų rūšys: *Culex pipiens*, *C. theileri*, *C. modestus*, *C. pereziquus*, *Aedes vexans*, *A. albopictus*, *Culiseta annulata*, *Ochlerolatus caspius* yra žinomos kaip *Plasmodium* genties parazitų vektoriai. Svarbu atkreipti dėmesį, kad paskutiniųjų keturių rūšių uodų dalyvavimas hemosporidijų transmisijoje buvo nustatytas tik kelis kartus. Dažniausiai kaip *Plasmodium* genties hemosporidijų vektoriai yra minimi *Culex pipiens* rūšies uodai. Žinoma, kad šie uodai gali dalyvauti net 59-ių skirtingų *Plasmodium* genetinių linijų parazitų transmisijoje (MalAvi duomenų bazės duomenys).

Kuršių nerijoje atliekant kraujasiurbių vabzdžių tyrimus buvo identifikuota šešiolika uodų rūšių: *Anopheles maculipennis*, *Aedes cinereus*, *A. vexans*, *Coquillettidia richiardi*, *Culex pipiens*, *Culiseta mositans*, *C. ochroptera*, *C. alaskaensis*, *Ochlerotatus geniculatus*, *O. annulipes*, *O. beningi*, *O. centans*, *O. cataphylla*, *O. excrucians*, *O. intrudens*, *O. rusticus* (Bernotienė, 2006, 2012). Žinoma, kad aštuonių iš šių šešiolikos rūšių uodai maitinasi ir paukščių krauju: *A. cinereus*, *A. vexans*, *C. pipiens*, *O. annulipes*, *O. cantans*, *O. cataphylla*, *O. excrucians* ir *O. intrudens* (Bernotienė, 2012), tad galima manyti, kad šios rūšys galėtų būti *Plasmodium* parazitų vektoriai Kuršių nerijoje.

Plačiausiai Kuršių nerijoje paplitusių, *Haemoproteus* genties, hemosporidijų pernešimą mokslininkų teigimu vykdo dvi kraujasiurbių vabzdžių šeimos: *Ceratopogonidae* (*Culicoides*) ir *Hippoboscidae*. Šios šeimos jungia daugiau kaip penkiems tūkstančiams rūšių priklausančius kraujasiurbius vabzdžius (Mogi, 2007).

Hippoboscidae šeimos briedmusės, kurių pasaulyje suskaičiuojama apie 200 rūšių (Dick, 2006), yra labiausiai paplitusios tropinėse ar subtropinėse pasaulio zonose ir tik maža dalis jų aptinkama ir šiauriau (Maa, 2007). Didžiosios dalies šių kraujasiurbių vabzdžių išgyvenimui yra reikalinga maitintis tik paukščių krauju, tad jie gali būti pakankamai efektyvūs ir gerai prisitaikę hemosporidinių parazitų vektoriai. Šie vabzdžiai buvo vieni pirmųjų, kurie buvo identifikuoti kaip galintys vykdyti *Haemoproteus* genties hemosporidijų transmisiją,

² <http://130.235.244.92/bcgi/malaviReport.cgi?report3=Vector+Data+Table> Prieiga per internetą [2020 m. gegužės 2 d.]

tačiau mokslininkai teigia, kad dėl nedidelio vabzdžių paplitimo Europoje jie negali būti pagrindiniu parazitų plitimą Europoje reguliuojančiu veiksniu (Valkiūnas, 2005).

Mokslininkų teigimu pagrindiniai *Haemoproteus* genties hemosporidijų vektoriai Europoje ir ypač vidurio ir šiaurinėje jos dalyje yra *Culicoides* mašalai (Valkiūnas, 2005). Šiuo metu pasaulyje yra identifikuota apie 1400 skirtingų smulkiųjų mašalų rūšių (Meiswinkel *et al.*, 2004). Šie vabzdžiai yra prisitaikę vystytis labai skirtingomis sąlygomis, tad aptinkami visame pasaulyje, išskyrus teritorijas, esančias toli už poliarinio rato ir Naująją Zelandiją, Islandiją, Havajus (Mellor *et al.*, 2000). Smulkiesiems mašalams vystytis reikalingos įvairios vandens sankaupos, kuriose padedami kiaušiniai. Lervos vystosi vandens paviršiuje, prisikabinusios prie augalų ar kitų substratų, tad šie mašalai gali būti aptinkami įvairiose buveinėse, tačiau netoli nuo vietovių, kuriose galėjo vystytis šių dvisparnių lervos, kadangi suaugėliai paprastai neskrenda toli nuo išsiperėjimo vietos (Mellor *et al.*, 2000). Nustatyta, kad daugelio rūšių smulkieji mašalai vidutinio klimato juostose pasirodo pavasario pabaigoje, dalis šių vabzdžių išlieka ir per visą vasarą (Blanton and Wirth, 1979). Didžiausia smulkiųjų mašalų įvairovė Kuršių nerijoje taip pat yra fiksuojama pavasario pabaigoje – vasaros pradžioje (Trukhan *et al.*, 2003). Mokslininkai yra nustatę, kad smulkieji mašalai aktyviausiai krauju maitinasi vakarais, pradėjęs temti, bei rytais, švintant (Blanton and Wirth, 1979; Young and Perkins, 1984).

Tyrimų metu Kuršių nerijoje buvo identifikuoti trylikos rūšių *Culicoides* kraujasiurbiai mašalai: *Culicoides obsoletus*, *C. impunctatus*, *C. punctatus*, *C. albicans*, *C. festivipennis*, *C. reconditus*, *C. segnis*, *C. pallidicornis*, *C. pictipennis*, *C. impunctatus* ir *C. salinarius*, *C. fascipennis*, *C. stigma*, tačiau pastarosios trys nuo 1993 metų Kuršių nerijoje aptiktos nebuvo (Glukhova and Valkiūnas G., 1993; Liutkevicius, 2000b; Trukhan *et al.*, 2003; Bernotienė, 2006).

Nors *Culicoides* mašalai yra itin plačiai paplitę ir manoma, kad yra pagrindiniai paukščių parazitų vektoriai, šiuo metu, atliekant tyrimus Europoje, tik dvylikos *Culicoides* rūšių mašaluose yra aptiktos paukščių hemosporidijos (Bobeva *et al.*, 2013, 2014; Synek *et al.*, 2013; Bernotienė *et al.*, 2019; Bukauskaitė *et al.*, 2019). Visgi, vis dar nėra aišku, ar visų dvylikos rūšių mašalai gali dalyvauti *Haemoproteus* genties parazitų transmisijoje, nes tai duomenys gauti tyrimų, kuriuose buvo naudojamas tik PGR metodas, metu, tad gali būti, kad aptiktų parazitų sporogonija mašaluose nevyksta, o parazitai į mašalą pateko jam besimaitinant paukščių krauju (Valkiūnas *et al.*, 2013). Mokslininkams tiriant Kuršių nerijoje ir Verkių regioniniame parke vykstančią *Haemoproteus* parazitų transmisiją yra pavykę nustatyti septynias rūšis, aptinkamas šiose teritorijose ir galimai galinčias pernešti *Haemoproteus*

genties hemosporidijas: *Culicoides circumscriptus*, *C. festivipennis*, *C. kibunensis*, *C. pictipennis*, *C. segnis*, *C. scoticus* ir *C. impunctatus* (Bernotienė *et al.*, 2019). Gausiausi iš šių Kuršių nerijoje yra *Culicoides impunctatus* mašalai ir literatūroje galima rasti informacijos, jog eksperimentiškai nustatyta, kad šios rūšies mašalai gali pernešti trylikos *Haemoproteus* genties genetinių linijų parazitus (Žiegytė *et al.*, 2017). Nors iki šiol buvo manoma, kad būtent *C. impunctatus* mašalai yra svarbiausi *Haemoproteus* genties hemosporidijų vektoriai Kuršių nerijoje (Valkiūnas *et al.*, 2002; Žiegytė *et al.*, 2017), tačiau abejonių dėl šios rūšies vaidmens *Haemoproteus* parazitų pernešime jaunikliams kelia tai, jog *C. impunctatus* mašalų pasirodymo laikas (apie birželio 10 d.) gali nesutapti su laiku, kai aptinkami hemosporidijomis užsikrėtę paukščių jaunikliai, o taip pat šie mašalai Kuršių nerijoje yra paplitę gana lokaliai ir aptinkami gana trumpai (Liutkevičius, 2000a; Truchan, M. *et al.*, 2001), tad neturėtų būti laikomi svarbiausiais *Haemoproteus* hemosporidijų vektoriais šiame regione. Siekiant išaiškinti *Haemoproteus* genties hemosporidijų pernešėjus Kuršių nerijoje reiktų atkreipti dėmesį į kitus, daug mažiau ištirtus ir literatūroje aptariamus *Culicoides* genties smulkiuosius mašalus.

Leucocytozoon genčiai priklausančius parazitus pernešantys upiniai mašalai (*Simuliidae* šeima) yra didelė grupė, apjungianti daugiau kaip 1800 vabzdžių rūšių (Adler *et al.*, 2004). Šie dvisparniai vabzdžiai taip pat yra paplitę visame pasaulyje, o didžiausias aptinkamų rūšių skaičius yra registruojamas Paleartinėje zonoje. Upiniai mašalai krauju maitinasi išskirtinai tik dienos metu. Šie vabzdžiai aptinkami besimaitinantys visos dienos metu, tik itin saulėtose ir įkaitusiose vietose gali būti stebimas maitinimosi ciklo pasikeitimas į rytinį ir vakarinį (Adler *et al.*, 2004).

Upiniams mašalams vystytis yra reikalingas tekantis vanduo (Bernotienė, 2003; Adler *et al.*, 2004), todėl yra manoma, kad tam tikrose teritorijose, pavyzdžiui, Kuršių nerijoje, kur nėra upinių mašalų vystymuisi reikalingų sąlygų, šių vabzdžių pernešamų parazitų transmisija vykti neturėtų (Valkiūnas, 2005). Visgi, yra duomenų, kad upiniai mašalai gali būti aptinkami ir Kuršių nerijos šiaurinėje dalyje (aplink Juodkrantę), tačiau piečiau Juodkrantės upinių mašalų neaptinkama (duomenys nepublikuoti). Taip pat, verta atkreipti dėmesį, kad mokslininkai teigia, jog upiniams mašalams yra gana įprastas plitimas vėju, tokiu būdu šie kraujasiurbiai vabzdžiai gali įveikti didelius atstumus (Adler *et al.*, 2004) ir patekti į teritorijas, kuriose nėra lervų vystymuisi tinkamų sąlygų.

Informacijos apie tai, kurie upiniai mašalai gali vykdyti konkrečių *Leucocytozoon* genties hemosporidijų transmisiją nėra daug. Tyrimai, atlikti Šiaurės Amerikoje nustatė, kad vieni pagrindinių *Simuliidae* upinių mašalų, atsakingų už hemosporidinių parazitų transmisiją centrinėje Jungtinių Amerikos Valstijų dalyje, yra

Simulium silvestre rūšies mašalai (Murdock *et al.*, 2015). 46,2 procentų visų tirtų šios rūšies upinių mašalų buvo užkrėsti *Leucocytozoon* hemosporidijų infekcijomis. Iš viso *S. silvestre* rūšies mašaluose buvo nustatytos 24 skirtingų genetinių linijų hemosporidiniai parazitai (Murdock *et al.*, 2015). Visgi, šie šios rūšies kraujasiurbiai vabzdžiai yra aptinkami tik Šiaurės Amerikoje ir mažose teritorijose Skandinavijos šiaurinėje dalyje, tad Europoje paplitusių *Leucocytozoon* genties parazitų vektoriai yra kiti *Simuliidae* šeimos dvisparniai.

MalAvi duomenų bazės duomenimis³ Europoje yra nustatytos tik dvi *Simuliidae* šeimos mašalų rūšys, kurių atstovai gali dalyvauti hemosporidinių paukščių parazitų transmisijoje: *Simulium vernum* yra plačiai Europoje paplitusi upinių mašalų rūšis, šios rūšies mašalai taip pat aptinkami ir Lietuvoje, perneša penkių *Leucocytozoon* genetinių linijų (IBT2, IEUSE2, INEVE01, IPARUS4 ir IPARUS25) parazitus; *S. securiforme* dalyvauja IEUSE1 ir ISTUR1 genetinėms linijoms priskiriamų parazitų transmisijoje.

1.6. PAUKŠČIŲ HEMOSPORIDINIŲ PARAZITŲ TRANSMISIJA IR PAPTITIMAS PASAULYJE

Nors mokslininkai yra išaiškinę, kokioms šeimoms priklausantys vektoriai dalyvauja skirtingų genčių parazitų pernešime, tačiau vis dar yra surinkta pakankamai mažai informacijos apie konkrečių vabzdžių rūšių vaidmenį tam tikrų rūšių ar genetinių linijų parazitų transmisijoje. Iš visų pasaulyje cirkuliuojančių paukščių hemosporidinių parazitų MalAvi duomenų bazės duomenimis⁴ tik 197-ių genetinių linijų parazitai turi nustatytus ir patvirtintus vektorius. Kaip hemosporidinių parazitų vektoriai nustatyti 64-ios rūšių kraujasiurbiai vabzdžiai (1 lentelė). Taip pat nėra visiškai aiškus ir konkrečių rūšių ar genetinių linijų hemosporidinių parazitų paplitimas pasaulyje.

Dėl specifiško hemosporidinių parazitų gyvenimo ciklo paukščiai šiais parazitais užsikrėsti gali tik tose teritorijose, kuriose konkretus parazitas yra pernešamas t.y. teritorijos, kuriose gyvena ir tam parazitui pernešti reikalingi vabzdžiai. Suaugęs ir šiltuosiuose kraštuose jau žiemojęs paukštis gali užsikrėsti tose teritorijose paplitusiomis hemosporidijomis, tačiau grįžęs į perėjimo teritorijas parazitas nebūtinai bus perneštas kitiems paukščiams. Dėl šios priežasties mokslininkams tiriant tik pirmamečiuose, žiemosi dar neišskridusiuose, jaunikliuose aptinkamus hemosporidinius parazitus galima nustatyti, kokių rūšių ir genetinių

³ <http://130.235.244.92/bcgi/malaviReport.cgi?report3=Vector+Data+Table> Prieiga per internetą [2020 m. balandžio 12 d.]

⁴ <http://130.235.244.92/bcgi/malaviReport.cgi?report3=Vector+Data+Table> Prieiga per internetą [2020 m. balandžio 12 d.]

linijų parazitai yra paplitę ir pernešami atitinkamose teritorijose, taip pat nustatyti tose teritorijose gyvenančius vektorius, jų užsikrėtimą hemosporidiniaisiais parazitais bei taip identifikuoti skirtingų genetinių linijų parazitus pernešančius vabzdžius (Dunn *et al.*, 2017).

1 lentelė. Kraujasiurbių vabzdžių šeimos ir šioms šeimoms priklausančių kraujasiurbių vabzdžių, identifikuotų kaip hemosporidinių paukščių parazitų vektoriai, skaičius. Duomenys gauti remiantis MalAvi duomenų bazės duomenimis⁵.

Kraujasiurbių vabzdžių šeima	Rūšių, nustatytų kaip hemosporidinių parazitų vektoriai, skaičius
Ceratopogonidae	9
Culicidae	42
Hippoboscidae	1
Simuliidae	12

Antroje lentelėje (2 lentelė) pateikiama MalAvi duomenų bazėje registruotų Kuršių nerijoje aptiktų paukščių hemosporidinių parazitų sąrašas, tačiau mokslininkams vis dar trūksta duomenų apie tai, kurie iš parazitų šiame regione cirkuliuoja ir yra pernešami, o kuriais paukščiai užsikrėtė žiemodami pietinėje Europos dalyje ar Afrikoje ir šiuose regionuose buvo identifikuoti tik suaugusiuose paukščiuose.

MalAvi duomenų bazės duomenimis (2 lentelė) Kuršių nerijoje esančioje žiedavimo stotyse yra sugauti paukščiai, užsikrėtę *Plasmodium ashfordi* rūšiai priklausančiu (genetinės linijos pGRW02) parazitais, tačiau, mokslininkai yra nustatę, kad šiai genetinei linijai priskiriamų parazitų pernešimas vyksta tik Afrikoje, o Europoje šios genetinės linijos parazitai yra aptinkami tik suaugusiuose paukščiuose (Mendes *et al.*, 2013). Svarbu atkreipti dėmesį, kad net ir tos pačios rūšies parazitai gali būti pernešami visiškai skirtingose teritorijose. Pavyzdžiui, *Plasmodium relictum* parazitų, priskiriamų pGRW04 genetinei linijai, transmisija vyksta Afrikoje (Waldenström *et al.*, 2002), o tos pačios rūšies pSGS1 genetinės linijos parazitai yra pernešami tiek Afrikoje, tiek šiaurinėje Europos dalyje (Krizanauskiene *et al.*, 2006; Hellgren *et al.*, 2007).

Nustatyta, kad didesnis hemosporidinių parazitų sukeltų infekcijų skaičius yra fiksuojamas vietovėse, kuriose paukščiai turi nuolatinį kontaktą su kraujasiurbiais vabzdžiais. Tokie pavyzdžiai yra aprašyti su *Plasmodium* genties parazitais Šiaurės Amerikoje (Medeiros *et al.*, 2015), taip pat, *Leucocytozoon* hemosporidijomis Pietų Amerikoje, kur buvo išaiškinta,

⁵ <http://130.235.244.92/bcgi/malaviReport.cgi?report3=Vector+Data+Table> Prieiga per internetą [2020 m. balandžio 11 d.]

kad daugiau *Leucocytozoon* parazitais užsikrėtusių paukščių yra aukščiau nuo jūros lygio esančiose platumose, kuriose veisiasi daugiau šiuos parazitus pernešančių upinių mašalų (Lotta *et al.*, 2016). Remiantis šiais duomenimis, galima padaryti dvi išvadas. Pirmiausiai, atliekant hemosporidinių parazitų tyrimus paukščių jaunikliuose Kuršių nerijoje, galima tikėtis identifikuoti tų genetinių linijų parazitus, kurių vektoriai yra plačiai paplitę šiame regione. Antra, identifikavus didelį kiekį konkrečios hemosporidinių parazitų rūšies ar genetinės linijos individų, galima tikėtis, kad šių parazitų pernešime dalyvauja dažnai toje vietovėje atitinkamu laiku aptinkami kraujasiurbiai vabzdžiai.

2 lentelė. Paukščių hemosporidinių parazitų genetinių linijų, aptinkamų Kuršių nerijoje, sąrašas pagal parazitų gentis. Duomenys gauti iš MalAvi duomenų bazės⁶.

<i>Haemoproteus</i>			<i>Plasmodium</i>	<i>Leucocytozoon</i>
hACDUM1	hFALSUB01	hROFI2	pAEFUN01	IACNI1
hACDUM2	hGAGLA07	hRW1	pASOT05	IAEFUN02
hARW1	hGRW01	hRW3	pCOLL4	IASOT06
hASOT03	hHAWF1	hSFC1	pCOLL6	IASOT1
hASOT04	hHIICT1	hSFC3	pGRW02	IASOT3
hCCF1	hHIICT3	hSFC4	pGRW09	ICB1
hCCF2	hHIICT4	hSISKIN1	pGRW11	ISISKIN2
hCCF3	hHIICT5	hSW1	pLZFUS01	ISTOCC06
hCCF4	hLULU1	hSW3	pRTSR1	ISTUR1
hCCF5	hLWT2	hSYAT01	pSGS1	ITUMER09
hCCF6	hMW1	hSYAT02	pSW2	
hCIRCUM01	hPARUS1	hSYAT03	pSW5	
hCOLL2	hPARUS5	hSYAT07	pSYBOR02	
hCOLL3	hPFC1	hSYAT11	pTURDUS1	
hCUKI1	hPHSIB1	hSYAT16	pWW15	
hCULKIB01	hPHSIB2	hSYBOR01		
hCWT2	hPHYBOR04	hSYBOR03		
hCWT3	hRB1	hTURDUS2		
hCWT4	hRBS1	hWW1		
hCWT5	hROBIN1	hWW2		
hCWT7	hROFI1	hWW5		

Tačiau, mokslininkai yra nustatę ir atvejų, kai tinkamų vektorių paukščių perėjimo vietose buvimas nebūtinai reiškia, kad parazitų transmisija vyks. Vieni tokių pavyzdžių yra *Haemoproteus hirundinis* ir *H. nucleocondensus* rūšių parazitų, parazituojančių

⁶ <http://130.235.244.92/bcgi/malaviReport.cgi?report4=Hosts+And+Sites+Table> Prieiga per internetą [2020 m. balandžio 11 d.]

langines kregždes (*Delichon urbica*) ir didžiausias krakšles (*Acrocephalus arundinaceus*) pernešimas. Nustatyta, kad šiais parazitais paukščiai užsikrečia žiemodami, o Europoje šių parazitų transmisija fiksuota nebuvo (Bensch *et al.*, 2007; Križanauskiene *et al.*, 2012). Dėl šios priežasties buvo manoma, kad šių parazitų pernešimas Europoje nevyksta dėl čia nesančių tinkamų vektorių. Visgi, mokslininkams pavyko nustatyti, kad pilną vystymosi ciklą šie parazitai gali išgyventi ir būti pernešami Europoje plačiai paplitusių *Culicoides nubeculosus* mašalų (Chagas *et al.*, 2019). Tai reiškia, kad viena pagrindinių sąlygų parazitų transmisijai vykti – vektoriai – Europoje yra, tačiau pernešimas paukščių perėjimo vietose nevyksta. Manoma, kad tam įtakos gali turėti ir kiti su vektoriais susiję ekologiniai veiksniai. Viena iš mokslininkų keliamų hipotezių yra ta, kad abiejų parazituojamų rūšių paukščiai perėjimo vietose lizdus suka *Culicoides* mašalams sunkiai pasiekiamose vietose. Pavyzdžiui, langinių kregždžių lizdai yra arti žmonių gyvenamųjų vietų, angos į lizdus yra labai siauros, tad gali nepritraukti mašalų, krakšlių lizdai sukami vietose, kur dažniausiai vėjuota, tad tai taip pat sumažina mašalų maitinimosi šių paukščių jauniklių krauju galimybes (Chagas *et al.*, 2019). Tad gali būti, kad ne tik vektorių gausumas, bet ir įvairios ekologinės sąlygos gali daryti įtaką parazitų transmisijai.

1.7. MUSINUKINIAI IR ZYLINIAI PAUKŠČIAI KURŠIŲ NERIJOJE

Musinukiniai (*Muscicapidae*) ir zyliniai (*Paridae*) paukščiai, priklausantys žvirblinių (*Passeriformes*) būriui, yra vieni dažniausiai aptinkamų paukščių Europoje. Taip pat mokslininkai teigia, kad žvirbliniai paukščiai dažniau nei kitų būrių paukščiai užsikrečia hemosporidiniiais parazitais (Valkiūnas, 2005). Šiuo metu žinoma, kad Kuršių nerijoje gali būti aptinkamos keturių rūšių musinukiniai paukščiai ir septynioms rūšims priklausantys zyliniai paukščiai.

Musinukinių šeimos paukščiai yra paplitę visoje Eurazijoje ir Afrikoje (del Hoyo *et al.*, 2006). Kuršių nerijoje yra aptinkamos visų keturių Lietuvoje aptinkamų rūšių paukščiai: *Ficedula hypoleuca*, *Ficedula parva*, *Ficedula albicollis* ir *Muscicapa striata* (Kurlavičius *et al.*, 2020). Visų šių rūšių paukščiai žiemoja Afrikoje arba Azijoje, o Kuršių nerijoje ir kitose šio klimato zonos dalyse peri. Į perėjimo vietas šie paukščiai grįžta balandžio pabaigoje – gegužės pradžioje. Anksčiausiai perėjimo vietose pasirodo margasparnės musinukės (*F. hypoleuca*), visos rūšys stebimos iki rugpjūčio pabaigos – rugsėjo pradžios, tik *F. hypoleuca* kartais aptinkama ir spalio mėnesį (Kurlavičius *et al.*, 2020).

Ficedula ir *Muscicapa* gentims priklausantys paukščiai dažniausiai lizdus krauna uoksuose, drevėse, dažnai įsikuria inkiluose. Perėti pradeda gegužės mėnesį. Jaunikliai lizdus palieka po 3-4 savaitių. Šių rūšių paukščiai veda vieną vadą per perėjimo sezoną (del Hoyo *et al.*, 2006).

Zyliniai paukščiai paplitę visoje Eurazijoje, Afrikoje, Šiaurės Amerikoje (Gosler and Clement, 2007). Kitaip nei musinukiniai, šie paukščiai yra artimi migrantai ir žiemoti pasitraukia į piečiau Europoje esančias teritorijas, tačiau dažniausiai Europos zylinių paukščių populiacijos žiemoti į Afriką ar Aziją neskrenda (Gosler and Clement, 2007; Kurlavičius *et al.*, 2020). Vienintelė pietrytiniame Baltijos jūros regione aptinkama zylinių šeimos rūšis, kuriai priklausantys paukščiai kas metus žiemoja toliau pietų Europoje arba šiaurinėje Afrikos dalyje yra ūsuotoji zylė (*Panurus biarmicus*). Šios rūšies paukščiai Lietuvoje stebimi nuo balandžio iki spalio mėnesio, tačiau Kuršių nerijoje sutinkami itin retai (Kurlavičius *et al.*, 2020). Manoma, kad šaltuoju metų laiku šiame regione sutinkami zyliniai paukščiai yra čia žiemojantys, o paprastai peri šiaurinėje Europos dalyje.

Lizdus zyliniai paukščiai krauna uoksuose, įvairiuose plyšiuose, olose, plėšriųjų paukščių lizdų nišose, gali perėti ir inkiluose. Šioje klimato zonoje zyliniai paukščiai paprastai perėti pradeda balandžio pabaigoje, jaunikliai lizdus palieka po maždaug keturių – penkių savaitių. Dažnai zyliniai paukščiai gali vesti dvi vadas jauniklių per metus (Gosler and Clement, 2007; Kurlavičius *et al.*, 2020).

Literatūroje galima rasti šiek tiek informacijos apie šių rūšių paukščių užsikrėtimą hemosporidiniais parazitais (3 lentelė), tačiau šiuo, kaip ir anksčiau paminėtais atvejais, nėra visiškai aišku, ar paukščiai užsikrėtė parazitais savo perėjimo, ar žiemojimo vietose. Šio tyrimo metu bus siekiama nustatyti, kokie hemosporidiniai parazitai gali būti identifikuojami zylinių ir musinukinių paukščių jaunikliuose, patvirtinant, kad identifikuotų genetinių linijų parazitai tikrai cirkuliuoja ir yra vektorių pernešami Kuršių nerijoje.

3 lentelė. Paukščių hemosporidinių parazitų genetinių linijų, identifikuotų *Paridae* ir *Muscicapidae* šeimų paukščiuose Kuršių nerijoje, sąrašas pagal parazitų gentis. Duomenų apie *Leucocytozoon* genties hemosporidijų parazitus nėra. MalAvi duomenų bazės informacija⁷.

Paukščių šeima	Paukščio rūšis	Parazitų genetinė linija	
		<i>Haemoproteus</i>	<i>Plasmodium</i>
<i>Paridae</i>	<i>Cyanistes caeruleus</i>	hPARUS1	
		hPHSIB1	
	<i>Parus major</i>	hPARUS1	pSGS1
		hPARUS5	
		hPHSIB1	
		hWW2	
	<i>Lophophanes cristatus</i>	hCCF5	
	<i>Periparus ater</i>	hPARUS1	pTURDUS1
<i>Poecile montanus</i>	hPARUS1		
<i>Poecile palustris</i>	hPARUS1		
<i>Muscicapidae</i>	<i>Muscicapa striata</i>	hHAWF1	pSGS1
		hCOLL3	
		hSFC1	
		hSFC4	
	<i>Ficedula hypoleuca</i>	hCOLL2	pGRW09
		hCOLL3	
		hPFC1	pRTSR1
		hPHSIB1	
		hSFC3	pSGS1
		hWW1	

Tyrimų metu nustatyta, kad atskirų musinukinių ir zylinių paukščių rūšių populiacijų užsikrėtimas hemosporidiniais parazitais gali siekti net apie 90 procentų visų tirtų paukščių. Kuršių nerijoje 20-ojo amžiaus pabaigoje atlikti tyrimai atskleidė, kad atskirų paukščių rūšių užsikrėtimas hemosporidiniais parazitais gali siekti net ir 100 procentų (Glukhova and Valkiūnas G., 1993).

Pastaruosiu metu Europoje vykdomi tyrimai atskleidžia panašias tendencijas. Pavyzdžiui, Vokietijoje atliktas tyrimas parodė, kad šešių dažnai Vokietijoje aptinkamų žvirblinių paukščių (*Cyanistes caeruleus*, *Parus major*, *Periparus ater*, *Poecile montanus*, *Ficedula hypoleuca*, *Sitta europaea*) užsikrėtimas hemosporidiniais parazitais siekė 31.3 procentų *Haemoproteus* genties hemosporidijomis, 12.5 procentų – *Plasmodium* ir net 71 procentas *Leucocytozoon* parazitais (4 lentelė) (Schumm *et al.*, 2019).

⁷ <http://130.235.244.92/bcgi/malaviReport.cgi?report4=Hosts+And+Sites+Table> Prieiga per internetą [2020 m. balandžio 11 d.]

4 lentelė. Šešių paukščių rūšių užsikrėtimas skirtingų genčių hemosporidiniai paukščių parazitais (Schumm *et al.*, 2019).

Paukščių rūšis	Užsikrėtimų konkrečios genties parazitais dažnis procentais		
	<i>Haemoproteus</i>	<i>Plasmodium</i>	<i>Leucocytozoon</i>
<i>Cyanistes caeruleus</i>	32.6	10.3	94.8 (suaugę paukščiai) ir 0.0 (jaunikliai)
<i>Parus major</i>	40.6	21.9	77.5 (suaugę paukščiai) ir 3.5 (jaunikliai)
<i>Periparus ater</i>	0.0	25.0	25.0
<i>Poecile montanus</i>	10.0	20.0	0.0
<i>Ficedula hypoleuca</i>	21.4	0.0	0.0
<i>Sitta europaea</i>	20.0	0.0	30.0

Svarbu atkreipti dėmesį, kad toks aukštas užsikrėtimų *Leucocytozoon* genties parazitais lygis Vokietijoje buvo nustatytas pirmą kartą (Schumm *et al.*, 2019). Anksčiau atliktų tyrimų rezultatai parodė, kad apie 5-20 procentų paukščių gali būti užsikrėtę *Leucocytozoon* genties hemosporidijomis (Krone *et al.*, 2001; Wiersch *et al.*, 2007; Santiago-Alarcon *et al.*, 2016). Mokslininkai tai aiškina tuo, kad ankstesni tyrimai būdavo atliekami vietovėse, kuriose nėra arba yra gerokai mažiau tinkamų sąlygų *Leucocytozoon* genties vektoriams – upiniams mašalams vystytis (Schumm *et al.*, 2019). Šis teiginys dar kartą patvirtina, kad hemosporidinių parazitų tyrimams yra itin svarbi informacija apie šių parazitų vektorius, šių kraujasiurbių vabzdžių biologiją ir prisitaikymą.

2. TYRIMO MEDŽIAGA IR NAUDOTI METODAI

2.1. TYRIMO MEDŽIAGA

Zylinių (*Paridea*) ir musinukinių (*Muscicapidea*) šeimoms priklausančių paukščių kraujo mėginiai Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto P. B. Šivickio parazitologijos laboratorijos darbuotojų buvo surinkti 2016, 2018 ir 2019 metais Kuršių nerijoje (Kaliningrado srityje) esančioje Rusijos mokslų akademijos Zoologijos instituto Rybachy (Rasytės) paukščių žiedavimo stotyje (55°15'N, 20°86'E). Paukščiai buvo sugauti voratinkliniais tinklais. Dalis margasparnių musinukių jauniklių buvo sugauti dar nepalikę perėjimo vietos – lizduose. Iš sugautų individų sparno venos buvo paimamas kraujas: padaromi du tepinėliai mikroskopavimui ir apie 30µl kraujo užfiksuojama SET buferyje (0,015 M NaCl, 0,05 M Tris, 0,001 M EDTA; pH = 8,0). Paėmus kraują paukščiai buvo paleisti į laisvę. Mėginiai buvo laikomi kambario temperatūroje, vėliau pervežti į laboratoriją ir užšaldyti.

Culicoides genties mašalų patelės buvo surinktos iš paukščių užimtų inkilų (2 pav.) pagal 2008 metais aprašytą metodiką (Tomás *et al.*, 2008). Inkilai buvo įtaisyti medžiuose, neviršijant dviejų metrų aukščio.



2 pav. *Culicoides* mašalams gaudyti parengtas inkilas (Tomás *et al.*, 2008). Nuot. aut. dr. Rasa Bernotienė.

Petri lėkštelės buvo sudrėkinamos aliejumi ir pritvirtinamos prie inkilo stogo vidinės dalies. Tokiu būdu į inkilą įskridę mašalai prilimpa prie Petri lėkštelės ir taip gali būti surenkami. Petri lėkštelės į inkilus buvo įdedamos kelis kartus per savaitę nuo gegužės pabaigos iki liepos pabaigos. Petri lėkštelės inkile paliekamos per naktį, o ryte surenkamos ir iš jų surenkami *Culicoides* mašalai. Darbe tirta medžiaga surinkta Adomo Lekavičiaus Neries regioniniame parke (54°50'N, 24°58'E) 2017 metų gegužės ir birželio mėnesiais, o taip pat dr. Rasos Bernotienės ir Lenos Platonovos bei dr. Ritos Žiegytės Kuršių nerijoje (Kaliningrado srityje) 2012, 2018 ir 2019 metais gegužės, birželio ir liepos mėnesiais inkiluose surinkti *Culicoides* mašalai.

Tiek paukščių, tiek mašalų rinkimo metu kiekvienas surinktas mėginys buvo aprašomas žurnale, kuriame buvo nurodoma visa su mėginiu susijusi informacija, o taip pat ir šio mėginio surinkimo data.

2.2.TYRIMO METU NAUDOTI METODAI

2.2.1. DNR IŠSKYRIMAS IŠ PAUKŠČIŲ KRAUJO MĖGINIŲ

DNR išskyrimui iš užšaldytų suspenduotų kraujo mėginių buvo naudojamas standartinis DNR išskyrimo Amonio acetatu protokolai (Crouse and Amorese, 1987). Šis protokolai yra skirtas išsodinti visą mėginįje esančią DNR – tiek parazito, tiek paukščio, tačiau PGR reakcijos metu fragmento padauginimui naudojami pradmenys prisikabina tik prie parazito mitochondrinio citochromo *b* geno fragmento, tad visa likusi DNR reikšmingos įtakos eksperimentui nedaro.

250 µL kraujo ir SET buferio suspensijos (paimant kaip įmanoma daugiau gličios masės ar krešulių) buvo perpilta į 1,5 mL centrifuginį mėgintuvėlį ir pridėjus 7 µL 20 proc. SDS bei 5 µL 20 mg/ml Proteinazės K buvo palikta per naktį 56°C temperatūros vandens vonelėje skaidyti.

Po nakties į suspensiją buvo pridėti 250 µL 4M amonio acetato ir visa suspensija buvo palikta valandai (kas 15-20 min. gerai išmaišant). Praėjus šiam laikui mėgintuvėlis buvo centrifuguojamas 10 min 13000 aps./min. Po centrifugavimo supernatantas buvo nupilamas į naują 1,5 mL centrifuginį mėgintuvėlį, paliekant tirštą masę nepaliesią. Į supernatantą įpylus 1mL 100 proc. EtOH ir viską sumaišius purtykle mėginys buvo vėl centrifuguojamas 13000 aps./min. 15 min. Po centrifugavimo supernatantas buvo nupilamas, o į mėgintuvėlį įpilama

1mL 70 proc. EtOH, kuris iš karto išpilamas. Atidaryti mėgintuvėliai paliekami per naktį traukos spintoje nudžiūti. Po nudžiūvimo į mėgintuvėlį, kuriame yra išskirta DNR, įpilama 100µL 1x TE buferio, suspenduoti išskirtą DNR.

2.2.2. DAUGYBINIS GENO FRAGMENTO PADAUGINIMAS (PGR REAKCIJA)

Siekiant išsiaiškinti kraujo mėginius, kurie yra užkrėsti paukščių hemosporidijomis bei nustatyti jų rūšis ir genetines linijas, reikalinga padauginti šių parazitų mitochondrinio citochromo *b* geno fragmentą. Daugybiniam šio geno fragmento padauginimui buvo naudota lizdinė polimerazės grandininė reakcija (nested PCR). Į 0,2 ml mėgintuvėlį įpilta: iš kraujo mėginių išskirta 2µl DNR matrica, 12,5 µl MyTaq PGR Red Mix (Bioline) reakcijos mišinio, po 1µl pradmenų (5 lentelė) bei 8,5 µl distiliuoto vandens. PGR reakcijos buvo vykdomos pagal protokolus, numatytus mokslinėje literatūroje (5 lentelė). PGR reakcijų metu buvo naudojamas dvi teigiamos kontrolės ir neigiama kontrolė. Teigiamoms kontrolėms buvo naudojami mėginiai su žinoma hemosporidinių parazitų infekcija, viename mėginyje buvo žinoma *Haemoproteus* genties hemosporidijų infekcija, o kitame – *Leucocytozoon*. Neigiamai kontrolei buvo naudojamas distiliuotas vanduo.

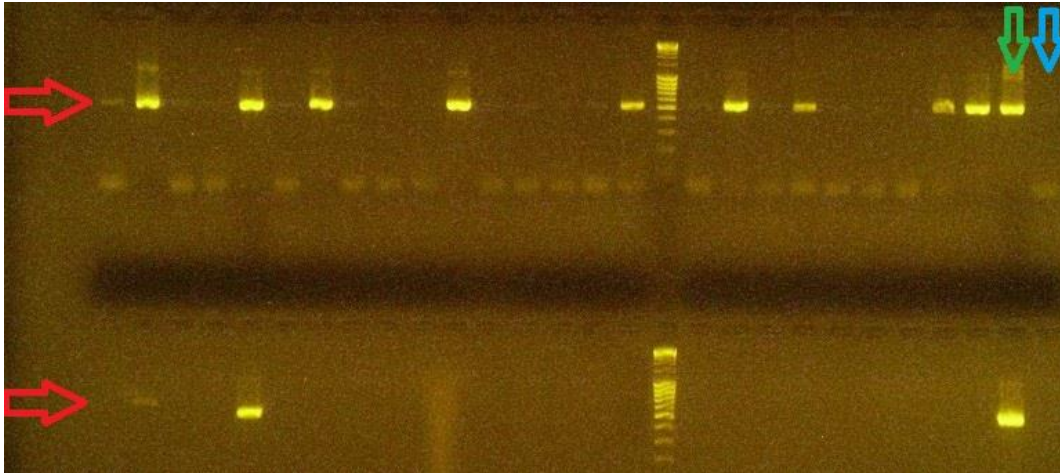
5 lentelė. Lizdinės PGR reakcijose naudotų DNR pradmenų sąrašas su amplifikacijos reakcijos protokolo literatūros šaltiniais.

	Hemosporidijų gentis, kurios atstovų mitochondrinio citochromo <i>b</i> geno fragmentai dauginami	Naudojami DNR pradmenys	Amplifikacijos reakcijos protokolo literatūros šaltinis
I PGR reakcija	<i>Haemoproteus</i> , <i>Plasmodium</i> ir <i>Leucocytozoon</i>	HaemNFI ir HaemNR3	(Hellgren <i>et al.</i> , 2004)
II PGR reakcija	<i>Haemoproteus</i> ir <i>Plasmodium</i>	HaemF ir HaemR2	(Bensch <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Leucocytozoon</i>	HaemFL ir HaemR2L	(Hellgren <i>et al.</i> , 2004)

2.2.3. AGAROS GELIO DNR ELEKTROFOREZĖ

Iš visų kraujo mėginių išskyrus DNR ir atlikus lizdinę PGR su mitochondrinio citochromo *b* geno fragmentą dauginančiais hemosporidijoms specifiniais pradmenimis (5 lentelė) buvo atlikta elektroforezė siekiant įvertinti PGR reakcijos rezultatus: paruoštas 2 procentų agaros gelis, panaudotas MidoriGreen dažas (NIPPON Genetics Europe, Germany). Į elektroforezės gelį įnešta po 3µl antrojo lizdinės PGR produkto. Elektroforezė

vyko 30 min., 100V įtampoje. Po elektroforezės gelis nufotografuotas apšvietus UV spindulių lempa. Hemosporidiniai parazitais užkrėsti yra tie mėginiai, kurių elektroforezės gelyje matomi padauginti specifiniai maždaug 500 bazių porų ilgio DNR fragmentai (3 pav.). Iš šių mėginių išsodinti PGR produktai buvo siunčiami sekoskaitai.



3 pav. Elektroforezės gelio nuotrauka. Nuotraukoje matomi dalies 2018 m. sugautų paukščių mėginių rezultatai. Viršutinėje eilutėje mėginiai tiriami su *Haemoproteus* ir *Plasmodium* genčių hemosporidijoms specifiniais pradmenimis, o apatinėje – *Leucocytozoon*. Raudonomis rodyklėmis pažymėta lokacija, kurioje matosi maždaug 500 bazių porų ilgio DNR grandinės fragmentai t.y. šie mėginiai yra užkrėsti hemosporidiniais parazitais. Žalios spalvos rodykle pažymėta teigiama kontrolė, mėlyna – neigiama.

2.2.4. PGR METU GAUTŲ PRODUKTŲ PARUOŠIMAS SEKOSKAITAI

Lizdinės PGR metu gautų produktų paruošimas sekoskaitai buvo vykdomas pagal išsodinimo amonio acetatu protokolą (Crouse and Amorese, 1987).

Į 0,5mL centrifuginį mėgintuvėlį buvo įpilta 11μL amonio acetato, 21 μL PGR produktų (antrosios PRG, jei amplifikacija vyko lizdinės PGR būdu), 37μL 99 proc. EtOH, viskas sumaišyta ir palikta kambario temperatūroje. Praėjus 15 min. mėginys centrifuguojamas 10000 aps./min. 10 min. Po centrifugavimo supernatantas nupilamas, į mėgintuvėlį įpilama 150μL šaldiklyje atšaldyto 70 proc. EtOH, mėginys dar kartą centrifuguojamas 10000 aps./min. 5 min. Supernatantas nupilamas, o mėgintuvėliai paliekami traukos spintoje per naktį išdžiūti. Po to užpilama 17μL dH₂O PGR produktams suspenduoti. Po išskyrimo mėginiai buvo perpilami į sekoskaitos mėgintuvėlį ir išsiunčiami sekoskaitai.

2.2.5. GENO FRAGMENTŲ SEKOSKAITA

Fragmentų sekoskaita buvo vykdoma nuo 5' galo su HaemF (*Haemoproteus* ir *Plasmodium* gentims priklausančių parazitų atveju) ir HaemFL (*Leucocytozoon* genčiai priklausančių parazitų atveju) pradmenimis, kaip nurodyta sekoskaitos protokole (Bensch *et al.*, 2000). Naudojamas Big Dye metodas, o mėginiai patalpinti į ABI PRISM TM 3100 kapiliarinį sekoskaitos robotą.

2.2.6. HEMOSPORIDINIŲ PAUKŠČIŲ PARAZITŲ IDENTIFIKAVIMAS NAUDOJANTIS BIOINFORMATINĖMIS PROGRAMOMIS

Po sekoskaitos gautos mitochondrinio citochromo *b* geno fragmento sekos buvo lyginamos su NCBI⁸ ir MalAvi⁹ duomenų bazėse deponuotomis sekomis. Taip buvo identifikuojama, kokiai genetinei linijai priklausantys hemosporidiniai parazitai buvo aptikti kraujo mėginyje. Šios sekos buvo suredaguotos ir lyginamos naudojantis BioEdit¹⁰ programine įranga (Hall, T., 1999). Mišrios infekcijos, kai viename kraujo mėginyje buvo daugiau nei vienai genetinei linijai priskiriamų paukščių hemosporidinių parazitų, buvo identifikuotos pagal dvigubus nukleotidų pikus gautos DNR sekos elektroferogramoje.

2.2.7. HEMOSPORIDINIŲ PAUKŠČIŲ PARAZITŲ IDENTIFIKAVIMAS TRADICINIAIS METODAIS (MIKROSKOPAVIMAS)

Visi 2016, 2018 ir 2019 metais surinkti paukščių kraujo mėginiai buvo įvertinti mikroskopuojant mėginių kraujo tepinėlius. Tepinėliai buvo išdžiovinti ore ir fiksuoti metanolyje bei nudažyti Gimsa dažais kaip tai numato jų parengimo protokolas (Valkiūnas *et al.*, 2008). Mikroskopavimas buvo atliktas Gamtos tyrimų centro P. B. Šivickio parazitologijos laboratorijos doktorantės E. Platonovos siekiant užtikrinti molekuliniais tyrimo metodais gautų duomenų patikimumą. Šio įvertinimo metu gauta informacija buvo sulyginama su PGR metodu pagrįsta identifikacija.

⁸ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> Prieiga per internetą

⁹ <http://130.235.244.92/Malavi/> Prieiga per internetą

¹⁰ versija 7.0.5.3.; <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html> Prieiga per internetą [2020 m. kovo

2.2.8. PAUKŠČIŲ HEMOSPORIDINIŲ PARAZITŲ SMULKIUSIUSE MAŠALUOSE IDENTIFIKAVIMAS MOLEKULINIAIS METODAIS

Paukščių hemosporidinių parazitų identifikacija *Culicoides* mašaluose buvo vykdoma naudojant PGR paremtus molekulinis metodus, kaip tai aprašyta anksčiau, šio darbo 3.2.1–3.2.6 skyriuose. Kitaip nei paukščių kraujo mėginių tyrime, DNR išskyrimui buvo naudojamas ne kraujo mėginys, o visas mašalas, išskyrus jo galvą ir sparnus, kurie buvo naudojami morfologinei rūšies identifikacijai.

2.2.9. *CULICOIDES* MAŠALŲ IDENTIFIKACIJA PAGAL MORFOLOGINIUS POŽYMIUS

Culicoides smulkieji mašalai buvo identifikuoti Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto Entomologijos laboratorijoje pagal morfologinius šių mašalų požymius: sparnų dėmėtumą, maksilių čiupiklių bei antenų struktūrą. Identifikacija buvo vykdoma kaip tai numatoma identifikavimo rakte (Mathieu *et al.*, 2012). Visa identifikuota medžiaga buvo patikrinta Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto Entomologijos laboratorijos specialistų.

2.2.10. *CULICOIDES* MAŠALŲ IDENTIFIKACIJA MOLEKULINIAIS METODAIS

Tais atvejais, kai *Culicoides* smulkiuosiuose mašaluose buvo identifikuoti paukščių hemosporidiniai parazitai, siekiant užtikrinti *Culicoides* mašalų identifikacijos pagal morfologinius požymius tikslumą buvo atliekama šių mašalų identifikacija molekuliniiais metodais. *Culicoides* mašalų identifikacija molekuliniiais metodais yra atliekama pagal mašalo mitochondrinės DNR citochromo oksidazės I (COI) geno fragmentą. Geno fragmentas buvo padaugintas PGR metodu, naudojant LCO1490 ir HCO2198 pradmenis ir vadovaujantis publikuotu protokolu (Folmer *et al.*, 1994). Vėliau buvo atliekami veiksmai, aprašyti šio skyriaus 2.2.3 – 2.2.5 poskyriuose. Sekoskaitos metu buvo naudojami atitinkamai LCO149 ir HCO2198 genetiniai pradmenys. Po sekoskaitos gautos COI geno fragmento sekos buvo lyginamos su NCBI¹¹ duomenų bazėje deponuotomis *Culicoides* mašalų sekomis.

¹¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> Prieiga per internetą

2.2.11. STATISTINIAI METODAI UŽSIKRĖTIMŲ PAUKŠČIŲ HEMOSPORIDINIAIS PARAZIT AIS P ALYGINIMUI

Suaugusių paukščių ir paukščių jauniklių užsikrėtimo paukščių hemosporidinia is parazitais dažniui palyginti ir statistinį reikšmingumą nustatyti buvo atliktas Fišerio tikslusis testas. Testas buvo atliekamas naudojantis R programine įranga (versija 3.6.1). Visos gautos p reikšmės yra pateikiamos šio tyrimo rezultatuose. Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp grupių buvo laikomas tada, kai nulinės hipotezės tikimybė buvo mažesnė nei 5 procentai (p reikšmė $< 0,05$).

3. REZULTATAI

3.1. KURŠIŲ NERIJOJE SUGAUTŲ PAUKŠČIŲ UŽSIKRĖTIMAS HEMOSPORIDINIAIS PARAZIT AIS

Tyrimo metu buvo išanalizuoti visi 2016, 2018 ir 2019 metais Kuršių nerijoje sugautų aštuonių skirtingų paukščių rūšių (*Ficedula hypoleuca*, *Muscicapa striata*, *F. parva*, *Parus major*, *Cyanistes caeruleus*, *Periparus ater*, *Poecile palustris* ir *P. montanus*), priklausančių *Paridae* ir *Muscicapidae* šeimoms, paukščių kraujo mėginiai. 68 paukščių kraujo mėginiai buvo surinkti 2016 metais, 165 – 2018 metais ir 130 – 2019 metais. Iš viso tyrimo metu buvo išanalizuoti 363 zylinių ir musinukinių paukščių kraujo mėginiai, iš kurių 104-iuose mėginiuose buvo nustatytas užsikrėtimas paukščių hemosporidiniaisiais parazitais (6 lentelė). 24 hemosporidiniaisiais parazitais infekuoti mėginiai iš 2016 m. sugautų paukščių (35,3 proc.), 44 – iš 2018 m. Kuršių nerijoje sugautų paukščių (26,7 proc.) ir 36 paukščiai, kurių užsikrėtimas hemosporidiniaisiais parazitais nustatytas 2019 m. (27,7 proc.). Bendras šių aštuonių rūšių paukščių užsikrėtimo hemosporidiniaisiais parazitais dažnis Kuršių nerijoje siekia 28,7 procentus.

6 lentelė. Tyrimo metu analizuotos paukščių rūšys ir jų užsikrėtimas hemosporidiniaisiais parazitais Kuršių nerijoje 2016, 2018 ir 2019 metais.

Paukščio rūšis	Tirtų individų skaičius	Tirtų suaugusių paukščių / jaunuklių skaičius	Hemosporidiniaisiais parazitais užsikrėtusių individų skaičius	Hemosporidiniaisiais parazitais užsikrėtusių individų skaičius (proc.)
<i>Ficedula hypoleuca</i>	97	57 / 40	31	32,0
<i>Muscicapa striata</i>	18	15 / 3	7	38,9
<i>Ficedula parva</i>	3	3 / 0	1	33,3
<i>Parus major</i>	107	46 / 61	30	28,0
<i>Cyanistes caeruleus</i>	115	34 / 81	32	27,8
<i>Poecile palustris</i>	16	3 / 13	2	12,5
<i>Poecile montanus</i>	1	0 / 1	0	0,0
<i>Periparus ater</i>	6	6 / 0	1	16,7

Dėl nedidelio tyrimo metu sugautų *Ficedula parva*, *Poecile montanus* ir *Periparus ater* rūšims priklausančių paukščių skaičiaus duomenys apie šių rūšių užsikrėtimą

hemosporidiniai paukščių parazitais toliau aprašomuose užsikrėtimų palyginimuose nebuvo analizuojami.

Tyrimo metu visuose 363-ijuose zylinių ir musinukinių paukščių kraujo mėginiuose buvo identifikuoti 20-čiai skirtingų paukščių hemosporidinių parazitų genetinių linijų priklausantys parazitai. Vienuolika iš jų priklauso *Haemoproteus* genčiai: keturių *Haemoproteus majoris*, trijų *H. pallidus*, dviejų *H. balmorali* ir dviejų nepriskirtų konkrečiai *Haemoproteus* parazitų rūšiai genetinių linijų parazitai. Taip pat identifikuoti septynioms *Plasmodium* genties hemosporidijų genetinėms linijoms priklausantys parazitai: dvi *Plasmodium relictum*, viena *P. ashfordi*, viena *P. circumflexum* rūšies ir trys nepriskirtos jokiai *Plasmodium* rūšiai; bei du *Leucocytozoon* genties hemosporidinių parazitų genetinės linijos, nepriskirtos jokiai šios genties parazitų rūšiai, parazitai (Priedas 1).

Iš visų 363 paukščių kraujo mėginių 164 mėginiai buvo suaugusiųjų paukščių ir 199 paukščių jauniklių mėginiai (6 lentelė). Kadangi bendras suaugusių paukščių ir paukščių jauniklių kraujo mėginių skaičius buvo panašus toliau darbe šios dvi grupės buvo analizuojamos atskirai.

3.1.1. SUAUGUSIŲ PAUKŠČIŲ, SUGAUTŲ KURŠIŲ NERIJOJE, UŽSIKRĖTIMAS HEMOSPORIDINIAIS PARAZITAIŠ

Atliekant tyrimą buvo išanalizuoti 164 suaugusių paukščių kraujo mėginiai. 64-iuose iš jų buvo identifikuoti hemosporidiniai paukščių parazitai. 56-iuose mėginiuose buvo aptikti *Haemoproteus* genties parazitai (34,1 proc.), 6-iuose – *Plasmodium* (3,7 proc.), 2 suaugę paukščiai buvo užsikrėtę *Leucocytozoon* genties hemosporidijomis (1,2 proc.). Paukščių kraujo mėginiuose, kuriuose buvo identifikuoti *Leucocytozoon* parazitai taip pat pavyko nustatyti ir užsikrėtimą *Haemoproteus* hemosporidijomis. Dar dviejuose, pilkosios musinukės ir mažosios musinukės, mėginiuose buvo nustatytos mišrios *Haemoproteus* ir *Plasmodium* infekcijos, tačiau dėl taikyto PGR metodo, kuriame naudojami tokie patys pradmenys tiek *Plasmodium*, tiek *Haemoproteus* parazitų citochromo *b* geno fragmento padauginimui, nustatyti konkrečių genetinių linijų nėra galimybės, tad šie mėginiai tolimesnėje analizėje nebuvo naudojami.

Užsikrėtimas *Plasmodium* genties hemosporidiniai parazitais buvo nustatytas trims rūšims priklausančiuose zylinių ir musinukinių šeimų paukščiuose (lentelė 7). Tyrimo metu suaugusių paukščių kraujo mėginiuose buvo identifikuotos šešių *Plasmodium* genties hemosporidijų genetinių linijų parazitai, priklausantys trimis *Plasmodium* parazitų rūšims: *P. ashfordi* – pGRW02 linija, *P. circumflexum* - pTURDUS1, *P. relictum* – pGRW11 bei trijų

genetinių linijų, nepriskiriami jokiei *Plasmodium* rūšiai, parazitai - pGRW09, pRSTR1, pSYAT24. pGRW02, pSYAT24, pTURDUS1 ir pGRW11 genetinių linijų hemosporidijos MalAvi duomenų bazės duomenimis iki šiol Kuršių nerijoje nebuvo aptiktos parazituojančios atitinkamų rūšių paukščius (Lentelė 7 ir Priedas 1).

7 lentelė. Suaugusių paukščių, sugautų Kuršių nerijoje, užsikrėtimas *Plasmodium* genties hemosporidijomis. Paryškintai pažymėtos parazitų genetinės linijos, kurių atstovai iki šiol nebuvo fiksuoti Kuršių nerijoje parazituojančiais atitinkamas paukščių rūšis. Kitų tyrimo metu analizuotų rūšių suaugusių paukščių kraujo mėginiuose *Plasmodium* genties hemosporidijos nebuvo identifikuotos.

Paukščių rūšis	Tirtų paukščių skaičius	Užsikrėtusių paukščių kiekis	Užsikrėtusių paukščių dalis (proc.)	Identifikuotos parazitų genetinės linijos (kiekis)
<i>Ficedula hypoleuca</i>	57	4	7,0	pGRW02 (1)
				pGRW09 (1)
				pRSTR1 (1)
				pSYAT24 (1)
<i>Cyanistes caeruleus</i>	34	1	2,9	pTURDUS1 (1)
<i>Parus major</i>	46	1	2,2	pGRW11 (1)

Haemoproteus genties hemosporidiniai parazitai buvo identifikuoti penkių rūšių suaugusiuose paukščiuose – *Ficedula hypoleuca*, *Muscicapa striata*, *Parus major*, *Periparus ater* ir *Cyanistes caeruleus* (8 lentelė).

Suaugusiuose paukščiuose iš viso buvo nustatyti devynių skirtingų *Haemoproteus* genties genetinių linijų, priskiriamų trimis šių parazitų rūšims, parazitai. *H. pallidus* genetinių linijų hCOLL2, hPFC1 bei hSFC3 parazitai buvo nustatytos atitinkamai *Ficedula hypoleuca* bei *Muscicapa striata* kraujo mėginiuose. Užsikrėtimas hPFC1 linijos parazitais buvo dažniausias – iš 27 *F. hypoleuca* suaugusių paukščių, kurių kraujo mėginiuose buvo nustatyti *Haemoproteus* genties parazitai, 18-os kraujo mėginiuose buvo nustatyti hPFC1 linijos parazitai (66,7 proc.). Taip pat tyrimo metu buvo identifikuotos *Haemoproteus balmorali* genetinių linijų hCOLL3 ir hSFC1 parazitai. *Haemoproteus majoris* rūšies parazitai buvo labiausiai paplitę tarp skirtingų paukščių rūšių ir identifikuoti keturių rūšių paukščiuose. Taip pat svarbu atkreipti dėmesį, kad zyliniai paukščiai buvo užsikrėtę tik *H. majoris* rūšiai priskiriamų genetinių linijų parazitais. Iš viso buvo nustatyti trijų *H. majoris* genetinių linijų parazitai: hPHSIB1, hPARUS1, hWW2. Taip pat suaugusiuose paukščiuose buvo nustatyta jokiei rūšiai nepriskiriamos hSFC10 genetinės linijos parazitai (Lentelė 8 ir Priedas 1).

8 lentelė. Suaugusių paukščių, sugautų Kuršių nerijoje, užsikrėtimas *Haemoproteus* genties hemosporidijomis. Paryškintai pažymėtos parazitų genetinės linijos, kurių atstovai iki šiol nebuvo fiksuoti Kuršių nerijoje parazituojančiais atitinkamas paukščių rūšis. Kitų tyrimo metu analizuotų rūšių suaugusių paukščių kraujo mėginiuose *Haemoproteus* genties hemosporidijos nebuvo identifikuotos.

Paukščių rūšis	Tirtų paukščių skaičius	Užsikrėtusių paukščių kiekis	Užsikrėtusių paukščių dalis (proc.)	Identifikuotos parazitų genetinės linijos (kiekis)
<i>Ficedula hypoleuca</i>	57	27	47,4	hCOLL2 (1)
				hPFC1 (18)
				hCOLL3 (1)
				hPHSIB1 (6)
				hWW2 (1)
<i>Muscicapa striata</i>	15	5	33,3	hSFC1 (2)
				hSFC10 (1)
				hSFC3 (2)
<i>Cyanistes caeruleus</i>	34	10	29,4	hPARUS1 (9)
				hWW2 (1)
<i>Parus major</i>	46	13	28,3	hPARUS1 (9)
				hPHSIB1 (2)
				hWW2 (2)
<i>Periparus ater</i>	6	1	16,7	hPARUS1 (1)

Iš visų 164-ių 2016, 2018 ir 2019 metais sugautų suaugusių paukščių užsikrėtimų *Leucocytozoon* genties hemosporidiniai parazitais atvejų buvo nustatyta tik du. Šie užsikrėtimai IPARUS4 genetinės linijos parazitais buvo nustatyti *Parus major* ir *Cyanistes caeruleus* rūšių paukščiuose (9 lentelė).

9 lentelė. Suaugusių paukščių, sugautų Kuršių nerijoje, užsikrėtimas *Leucocytozoon* genties hemosporidijomis. Kitų tyrimo metu analizuotų rūšių suaugusių paukščių kraujo mėginiuose *Leucocytozoon* genties hemosporidijos nebuvo identifikuotos.

Paukščių rūšis	Tirtų paukščių skaičius	Užsikrėtusių paukščių kiekis	Užsikrėtusių paukščių dalis (proc.)	Identifikuotos parazitų genetinės linijos (kiekis)
<i>Cyanistes caeruleus</i>	34	1	2,9	IPARUS4 (1)
<i>Parus major</i>	46	1	2,2	IPARUS4 (1)

3.1.2. PAUKŠČIŲ JAUNIKLIŲ, SUGAUTŲ KURŠIŲ NERIJOJE, UŽSIKRĖTIMAS HEMOSPORIDINIAIS PARAZITAIŠ

Atliekant tais pačiais metais surinktų paukščių jauniklių kraujo mėginių tyrimus buvo nustatyti 40 užsikrėtimų hemosporidiniais parazitais atvejų iš 199 iš viso surinktų mėginių. Bendras paukščių jauniklių užsikrėtimų dažnis siekia 20,1 procentų. Palyginus šią informaciją su suaugusiuose paukščiuose nustatytais parazitų infekcijomis buvo nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp užsikrėtimų parazitais dažnių ($p = 0,0038$). Trijuose mėginiuose (du mėlynosios ir vienas didžiosios zylės jauniklių mėginiai) buvo nustatyta mišri *Haemoproteus* ir *Plasmodium* parazitų infekcija. Nei viename margasparnių musinukių jauniklių kraujo mėginyje nebuvo identifikuoti jokie hemosporidiniai parazitai.

Iš visų 2016, 2018 ir 2019 metais sugautų paukščių jauniklių kraujo mėginių trijuose buvo identifikuotos *Plasmodium* genčiai priskiriamos hemosporidijos. Visų paukščių jauniklių užsikrėtimo dažnis *Plasmodium* hemosporidijomis siekia tik 1,5 procento. Skirtumai tarp visų suaugusių paukščių ir jų jauniklių užsikrėtimo šiomis hemosporidijomis dažnių nebuvo statistiškai reikšmingi ($p = 0.3107$). Šie parazitai buvo nustatyti tik *Parus major* rūšies paukščių jauniklių kraujo mėginiuose, kurių tyrimo metu buvo surinkta 61. Bendras šios rūšies jauniklių užsikrėtimo *Plasmodium* genties hemosporidiniais parazitais dažnis siekia 4,9 procentus. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp šios rūšies suaugusių paukščių ir jauniklių užsikrėtimo *Plasmodium* hemosporidijomis dažnio nebuvo fiksuoti ($p = 1$). Skirtingai nei suaugusių paukščių kraujo mėginiuose, jaunikliuose *Plasmodium* genties hemosporidijų genetinė įvairovė buvo nustatyta kur kas mažesnė. Kaip jau minėta anksčiau suaugusiuose paukščiuose buvo identifikuotos šešioms genetinėms linijoms priskiriamos hemosporidijos. Visuose trijuose infekuotuose didžiosios zylės jauniklių kraujo mėginiuose buvo nustatyti tos pačios *Plasmodium relictum* rūšies genetinės linijos pSGS1 parazitai (Priedas 1).

Haemoproteus genties parazitai buvo identifikuoti 34-iose paukščių jauniklių kraujo mėginiuose t.y. 17,1 procentų visų tyrimo metu tirtų paukščių jauniklių. Skirtumai tarp bendro visų rūšių suaugusių paukščių ir jauniklių užsikrėtimo šiais hemosporidiniais parazitais dažnio yra statistiškai reikšmingi ($p = 0,0063$). *Haemoproteus* parazitai buvo identifikuoti trijų rūšių zylių ir pilkosios musinukės jaunikliuose (10 lentelė).

10 lentelė. Paukščių, sugautų Kuršių nerijoje, jauniklių užsikrėtimas *Haemoproteus* genties hemosporidijomis. Paryškintai pažymėtos parazitų genetinės linijos, kurių atstovai iki šiol nebuvo fiksuoti Kuršių nerijoje parazituojančiais atitinkamas paukščių rūšis. Kitų tyrimų metu analizuotų rūšių paukščių jauniklių kraujo mėginiuose *Haemoproteus* genties hemosporidijos nebuvo identifikuotos. p reikšmė nurodo skirtumų tarp tos pačios paukščių rūšies suaugusių paukščių ir jauniklių užsikrėtimo *Haemoproteus* parazitais skirtumo patikimumą.

Paukščių rūšis	Tirtų paukščių skaičius	Užsikrėtusių paukščių kiekis	Užsikrėtusių paukščių dalis (proc.)	p reikšmė	Identifikuotos parazitų genetinės linijos (kiekis)
<i>Muscicapa striata</i>	3	1	33,3	1	hPARUS1 (1)
<i>Cyanistes caeruleus</i>	81	19	23,5	0,6543	hCWT4 (1)
					hPARUS1 (16)
					hPHSIB1 (2)
<i>Parus major</i>	61	12	19,7	0,5042	hPARUS1 (5)
					hPARUS10 (1)
					hPHSIB1 (5)
					hWW2 (1)
<i>Poecile palustris</i>	13	2	15,4	-	hPARUS1 (1)
					hPHSIB1 (1)

10-oje lentelėje galima matyti, kad tarp nei vienos rūšies suaugusių paukščių ir jauniklių užsikrėtimo *Haemoproteus* genties hemosporidijomis paukščių parazitais dažnio statistiškai reikšmingi skirtumai nebuvo fiksuoti. *Poecile palustris* atveju p reikšmė neskaičiuota, nes tyrimo metu nebuvo pagauta *Haemoproteus* genties parazitais užsikrėtusių suaugusių šios rūšies paukščių.

Taip pat kaip ir *Plasmodium* genties parazitų atveju jaunikliuose buvo registruota ir mažesnė rūšinė *Haemoproteus* genties hemosporidijų įvairovė. Paukščių jauniklių kraujo mėginiuose buvo identifikuota vienos, *Haemoproteus majoris* rūšies, keturių genetinių linijų parazitai: hPARUS1, hPHSIB1, hWW2, hCWT4. hPARUS1 linijos parazitai tyrimo metu buvo nustatyti kaip labiausiai paplitę tarp paukščių. Šios genetinės linijos parazitai buvo nustatyti didžiųjų, mėlynųjų, paprastųjų pilkųjų zylių bei viename pilkosios musinukės kraujo mėginyje (anksčiau Kuršių nerijoje šios rūšies jaunikliuose ši linija nustatyta nebuvo) (10 lentelė). Iš 19 infekuotų mėlynųjų zylių kraujo mėginių net 84,2 procentuose t.y. 16-oje mėginių buvo nustatyti hPARUS1 genetinės linijos parazitai (10 lentelė ir Priedas 1).

Viename 2016, 2018 ir 2019 metais Kuršių nerijoje sugautų paukščių jauniklių kraujo mėginyje buvo identifikuoti *Leucocytozoon* genčiai priskiriamos genetinės linijos

IPARUS15 parazitai (0,5 proc. visų paukščių jauniklių), šiame mėginyje taip pat buvo nustatytas ir užsikrėtimas *Haemoproteus* parazitais. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp suaugusių paukščių ir jauniklių užsikrėtimų nebuvo nustatyti ($p = 0,5924$).

Ši *Leucocytozoon* genties parazitų infekcija buvo nustatyta *Cyanistes caeruleus* rūšies paukščio kraujo mėginyje. Iš viso buvo pagauti 81 šios rūšies paukščių jaunikliai, šios rūšies užsikrėtimų *Leucocytozoon* parazitais dažnis – 1,2 procentų. Šio mėginio tyrimas taikant mikroskopiją patvirtino, kad kraujo mėginyje yra *Leucocytozoon* parazitų. Lyginant šios rūšies paukščių užsikrėtimo *Leucocytozoon* parazitais dažnį tarp suaugusių ir jaunų paukščių statistiškai reikšmingas skirtumas nebuvo nustatytas ($p = 0.5106$). Iki šiol duomenų apie *Leucocytozoon* parazitus Kuršių nerijoje sugautuose jaunikliuose nebuvo.

3.2.CULICOIDES MAŠALŲ RŪŠIŲ SUDĖTIS KURŠIŲ NERIJOJE IR NERIES REGIONINIAME PARKE BEI JŲ UŽSIKRĖTIMAS HEMOSPORIDINIAIS PARAZITAIŠ

Iš viso 292 *Culicoides* smulkiųjų mašalų patelės buvo analizuotos šio tyrimo metu: 126-ios buvo surinktos Neries regioniniame parke ir 166-ios Kuršių nerijoje (11 lentelė) – 64 *Culicoides* mašalai surinkti 2012 metais, 79 – 2018 metais ir 23 – 2019 metais. Iš inkilų surinktuose smulkiųjų mašalų mėginiuose buvo nustatytos dešimt *Culicoides* rūšių ir *Culicoides obsoletus* rūšių grupė. *Culicoides kibunensis* buvo dažniausia mašalų rūšis Neries regioniniame parke (52 proc.), *Culicoides segnis* (37,5 proc. 2012 metais), *C. pictipennis* (74,7 proc. 2018 metais) ir *C. kibunensis* (30,4 proc. 2019 metais) skirtingais metais dominavo Kuršių nerijoje. Svarbu atkreipti dėmesį, kad 2019 metais Kuršių nerijoje smulkiųjų mašalų kiekis buvo mažesnis, nors mašalų gaudymas vyko tuo pačiu metu, naudojant tuos pačius metodus.

Tyrimo metu *Culicoides* mašaluose, priklausančiuose keturioms smulkiųjų mašalų rūšims: *Culicoides kibunensis*, *C. pictipennis*, *C. segnis*, *C. punctatus*, buvo nustatytos penkių *Haemoproteus* genties hemosporidinių parazitų genetinių linijų parazitų infekcijos. Dviejų genetinių linijų, priklausančių *Haemoproteus minutus* parazitų rūšiai (hTUPHI01 ir hTURDUS2) bei po vieną *H. lanii* (hRB1), *H. majoris* (hCWT4) ir *H. tartakovskyi* (hSISKIN1) rūšių parazitai (11 lentelė).

11 lentelė. 2017 metais Neries regioniniame parke ir 2012, 2018 ir 2019 metais Kuršių nerijoje paukščių inkiluose surinktų *Culicoides* mašalų skaičius pagal rūšis ir jų užsikrėtimas hemosporidiniiais paukščių parazitais. Skliaustuose – nustatyta parazitų genetinė linija.

<i>Culicoides</i> mašalų rūšis	Neries regioninis parkas		Kuršių nerija	
	Mašalų skaičius	Hemosporidiniiais parazitais užsikrėtusių mašalų skaičius	Mašalų skaičius	Hemosporidiniiais parazitais užsikrėtusių mašalų skaičius
<i>C. festivipennis</i>	19		4	
<i>C. impunctatus</i>	1		6	
<i>C. kibunensis</i>	65	1 (pSGS1)	35	1 (hRB1)
<i>C. obsoletus gr.</i>	12		4	
<i>C. pictipennis</i>	7		70	5 (hTUPHI01)
<i>C. reconditus</i>	1		16	1 (pSGS1)
<i>C. segnis</i>	2	1 (hCWT4)	26	2 (hSISKIN1, hTURDUS2)
<i>C. subfascipennis</i>	2			
<i>C. sphagnumensis</i>			2	
<i>C. punctatus</i>			1	1(hTURDUS2)
<i>C. pallidicornis</i>			1	
<i>C. sp</i>	17		1	
Iš viso:	126	2	166	10

Taip pat dviejuose smulkiuosiuose mašaluose (*Culicoides kibunensis* ir *C. reconditus*) buvo identifikuotos *Plasmodium* genties *P. relictum* (pSGS1) hemosporidijos.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1. KURŠIŲ NERIJOJE IDENTIFIKUOTI PAUKŠČIŲ HEMOSPORIDINIAI PARAZITAI

Paukščių hemosporidinių parazitų paplitimas pasaulyje, vektoriai ir transmisija vis dar yra nepakankamai ištirti, todėl nėra aišku, kokie parazitai gali būti pernešami perėjimo vietose, o kokiais parazitais paukščiai užsikrečia žiemodami šiltesnio klimato zonose (Valkiūnas, 2005; Bensch *et al.*, 2007). Dėl šios priežasties šiame darbe didelis dėmesys buvo skirtas siekiant atskirai išaiškinti suaugusiuose zylinių ir musinukinių paukščiuose bei jų jaunikliuose aptinkamus hemosporidinius parazitus. Dėl specifinio šių parazitų vystymosi ciklo (Valkiūnas, 2005) analizuojant tik jaunikliuose aptiktas paukščių hemosporidijas galima daryti išvadas apie šių parazitų transmisiją konkrečiose vietovėse, šio tyrimo atveju – Kuršių nerijoje. Analizuojant suaugusių paukščių ir jauniklių užsikrėtimą visų genčių paukščių hemosporidiniais parazitais buvo pastebėta, kad lyginant su suaugusiais paukščiais statistiškai reikšmingai mažesnė dalis jauniklių buvo užsikrėtusi parazitais. Šie duomenys buvo tikėtini (Valkiūnas, 2005) dėl to, kad jaunikliai užsikrėsti paukščių hemosporidiniais parazitais turėjo mažiau laiko, tai pat jie užsikrėsti galėjo tik tomis hemosporidijomis, kurių transmisija vyksta Kuršių nerijoje, kai suaugę paukščiai užsikrėtimui galimybę turėjo ir žiemojimo vietose pietų Europoje ar šiaurinėje Afrikoje (del Hoyo *et al.*, 2006; Gosler and Clement, 2007).

Atliekant šį tyrimą paukščių kraujo mėginiuose iš viso buvo identifikuoti septynių skirtingų *Plasmodium* genties hemosporidinių parazitų genetinių linijų parazitai. Nors vertinant užsikrėtimo dažnius buvo nustatyta, kad statistiškai reikšmingų skirtumų tarp suaugusių paukščių ir jauniklių užsikrėtimo šiais parazitais dažnio nebuvo, tačiau, kaip ir buvo galima tikėtis, didžioji dalis *Plasmodium* genties hemosporidijų rūšinės įvairovės (identifikuoti šešių skirtingų genetinių linijų parazitai: pGRW02, pGRW09, pGRW11, pRTSR1, pSYAT24, pTURDUS1) buvo identifikuotos suaugusių paukščių, jau žiemojusių šiltesnio klimato zonose, kraujo mėginiuose (Santiago-Alarcon *et al.*, 2012). Paukščių jaunikliuose buvo identifikuota tik vienos *P. relictum* rūšies pSGS1 linijos parazitai, kurių transmisija vyksta tiek paukščių perėjimo, tiek žiemojimo vietose (Waldenström *et al.*, 2002; Hellgren, 2005; Hellgren *et al.*, 2007; Okanga *et al.*, 2014). Žinomi šios rūšies hemosporidinių parazitų vektoriai – *Culex pipiens* rūšies uodai (Inci *et al.*, 2012; Schoener *et al.*, 2017) yra gana dažnai aptinkami ir Kuršių nerijoje (Bernotienė, 2012), tad jie gali būti vieni pagrindinių pSGS1 genetinės linijos parazitų vektorių šioje teritorijoje.

Tyrimo metu buvo pastebėtas skirtumas tarp musinukinių ir zylinių suaugusių paukščių užsikrėtimo skirtingoms *Plasmodium* genetinėms linijoms priskiriamais parazitais. Zyliniuose paukščiuose buvo nustatyti parazitai, dažniau aptinkami pietų ar vidurio Europoje – *Plasmodium circumflexum* linija pTURDUS1 ir *P. relictum* pGRW11 (Hellgren *et al.*, 2007; Cosgrove *et al.*, 2008), tuo tarpu tyrime nustatyti margasparnes musinukes parazituojuojantys parazitai (*P. ashfordi* genetinė linija pGRW02, *Plasmodium* spp. linijos pGRW09, pRTSR1, pSYAT24) dažnai aptinkami Afrikoje (Waldenström *et al.*, 2002; Beadell *et al.*, 2006). Toks pasiskirstymas galėtų būti paaiškinamas skirtinga šių šeimų paukščių žiemojimo biologija. Zylės dažniausiai žiemoje tik truputį piečiau, nei jų perėjimo vietos, tad retai palieka Europą, tuo tarpu musinukių žiemojimo vietos dažnai siekia šiaurės ar net vidurio Afriką (del Hoyo *et al.*, 2006; Gosler and Clement, 2007).

Tyrimo metu analizuojant suaugusių paukščių kraujo mėginius buvo nustatytas užsikrėtimas šešiolikos skirtingų paukščių hemosporidinių parazitų genetinių linijų parazitais. Kaip ir teigiama kitų mokslininkų darbuose (Santiago-Alarcon *et al.*, 2012), šiose, vidutinio klimato zonose, labiausiai paplitę paukščių hemosporidiniai parazitai buvo *Haemoproteus* genčiai priskiriamos hemosporidijos. Iš visų suaugusių paukščių mėginiuose nustatytų genetinių linijų parazitų daugiau kaip pusė (devyni) buvo *Haemoproteus* genties. Palyginus šiuos duomenis su paukščių jauniklių kraujo mėginiuose identifikuotų genetinių linijų parazitais galima matyti, kad dalis jų: *Haemoproteus majoris* linijų hPARUS1, hPHSIB1, hWW2 parazitai buvo bendri tiek paukščių jaunikliams, tiek suaugusiems paukščiams. Tokie duomenys patvirtina ir anksčiau Kuršių nerijoje atliktų paukščių hemosporidinių parazitų genetinės įvairovės tyrimų rezultatus (Krizanauskiene *et al.*, 2006). Tačiau užsikrėtimų *Haemoproteus* parazitais atveju skirtumų tarp identifikuotų genetinių linijų suaugusiuose paukščiuose ir jų jaunikliuose taip pat buvo. Tyrimo metu pastebėta, kad panaši tendencija kaip ir su *Plasmodium* spp. hemosporidijomis atsispindi ir atliekant *Haemoproteus* genties genetinių linijų parazitų analizę. Zylinių šeimos suaugę paukščiai ir jaunikliai buvo užsikrėtę tu pačių *Haemoproteus majoris* rūšies genetinių linijų parazitais. Tuo tarpu tolimesni migrantai, *Ficedula* ir *Muscicapa* genčių suaugę paukščiai, buvo užsikrėtę dažniau Afrikoje identifikuojamų genetinių linijų parazitais. Pavyzdžiui, margasparnių musinių suaugę paukščiai buvo užsikrėtę ir *H. pallidus*, *H. balmorali* rūšių genetinių linijų hCOLL2, hCOLL3 parazitais. Šios hemosporidijos Europoje bei Kuršių nerijoje buvo aptiktos ir anksčiau, tačiau tik suaugusiuose paukščiuose (Krizanauskiene *et al.*, 2006; Hellgren *et al.*, 2007). Yra žinoma, kad šių parazitų transmisija vyksta šiltesnio klimato zonose pietinėje Europoje ar Afrikoje.

Idomu, kad kitos *Haemoproteus pallidus* genetinės linijos hPFC1 parazitų suaugusiuose *Ficedula hypoleuca* paukščiuose buvo identifikuota dviejuose trečdaliuose visų infekuotų šių paukščių kraujo mėginių, tačiau jaunikliai šios linijos parazitais užsikrėtę nebuvo, nors MalAvi duomenų bazės duomenimis ši linija yra gana plačiai paplitusi visoje Europoje bei ankstesnių tyrimų metu Švedijoje buvo identifikuota ir jaunikliuose (Hellgren *et al.*, 2007; Radwan *et al.*, 2012), tad galima manyti, kad šios linijos parazitų transmisija galėtų vykti ir Kuršių nerijoje. Atliekant tyrimą buvo ištirti 40 *F. hypoleuca* paukščių jauniklių. *Ficedula hypoleuca* jaunikliai buvo vieninteliai tyrimo metu, kurių kraujas buvo paimtas dviem skirtingais būdais: nuo liepos 10 d. kraujo mėginiai buvo rinkti iš lizduose aptiktų jauniklių bei rugpjūčio pradžioje surinkti mėginiai iš jau skraidančių ir į tinklus patekusių jauniklių. Žinoma, kad hPFC1 genetinės linijos parazitų transmisijoje dalyvauja *Culicoides kibunensis* smulkieji mašalai (Bernotienė *et al.*, 2019). Šie mašalai Kuršių nerijoje aptinkami birželio mėnesį (duomenys nepublikuoti). Gali būti, kad lizduose buvusių musinukių jaunikliai galimai turėjo per mažai kontaktų su kraujasiurbiais vabzdžiais, tad tuo metu dar nebuvo užsikrėtę hemosporidiniai parazitais. Be to, gali būti, kad užsikrėtimų parazitais nustatymui naudoti PGR metodais paremti ar tradiciniai identifikacijos būdai nebuvo pakankamai jautrūs, jei infekcija jauniklio organizme buvo prasidėjusi prieš kelias dienas (Valkiūnas, 2005). Rugpjūčio pradžioje sugauti jau skraidantys *F. hypoleuca* jaunikliai galimai iš lizdų išskrido po to, kai *C. kibunensis* smulkieji mašalai jau nebuvo aptinkami, tad gali būti, kad paukščių jaunikliai neturėjo kontaktų su šios linijos parazitų vektoriais ir todėl nebuvo užsikrėtę hPFC1 parazitais. Panašūs duomenys yra stebėti ir anksčiau Ispanijoje (Merino and Potti, 1995). Visais atvejais, siekiant nustatyti tokių šio tyrimo rezultatų priežastis reikėtų atlikti papildomus tyrimus ir patikrinti iškeltas hipotezes, arba nustatyti papildomus izoliacijos atvejus.

Baigiamojo darbo tyrimo metu jauniklių kraujo mėginiuose taip pat buvo identifikuoti ir keturių paukščių hemosporidinių parazitų genetinių linijų (*H. majoris* linijų hPARUS1, hCWT4, hPHSIB1 ir jokiai rūšiai nepriskiriama hPARUS10 genetinės linijos) parazitai, kurie iki šiol Kuršių nerijoje nebuvo aptikti parazituojuojantys atitinkamai pilkasis musinukes, mėlynasis, paprastasis pilkasis ir didžiasis zyles. Trijų iš šių linijų parazitai anksčiau buvo aptikti kitų paukščių jauniklių mėginiuose (Hellgren, 2005; Krizanauskiene *et al.*, 2006; Hellgren *et al.*, 2007; Marzal *et al.*, 2011), tad galima teigti, jog tinkamos sąlygos šių parazitų transmisijai Kuršių nerijoje egzistuoja ir vektorių tyrimai gali būti atliekami. Visgi, vienos, hPARUS10, genetinės linijos parazitai iki šiol Kuršių nerijoje nebuvo fiksuoti nei suaugusiuose paukščiuose, nei jų jaunikliuose. MalAvi duomenų bazės duomenimis šios linijos parazitai anksčiau yra fiksuoti Suomijoje mėlynųjų zylių kraujo mėginiuose.

Taip pat svarbu atkreipti dėmesį, kad remiantis MalAvi duomenų bazės duomenimis, šio tyrimo metu *Ficedula hypoleuca* ir *Muscicapa striata* paukščiuose atitinkamai aptikti hWW2 ir hPARUS1 genetinių linijų parazitai yra netipiški šiems paukščiams ir todėl turėtų būti atliekami papildomi šių konkrečių genetinių linijų parazitų vystymosi (sporogonijos) atitinkamuose paukščiuose tyrimai, siekiant išsiaiškinti, ar tai yra anksčiau nefiksuotas abortyvaus parazitų vystymosi paukščiuose, parazitų prisitaikymo parazituoti naujus šeimininkus ar kitokie atvejai.

Iki šiol mokslininkai, atliekantys paukščių hemosporidinių parazitų tyrimus Kuršių nerijoje, dažnai neatlikdavo *Leucocytozoon* genties hemosporidijų tyrimų (Krizanauskiene *et al.*, 2006), kadangi bendras literatūroje randamas mokslininkų konsensusas teigia, jog Kuršių nerijoje nėra tinkamų sąlygų *Simuliidae* genties upiniams mašalams, kurie yra *Leucocytozoon* parazitų vektoriai, daugintis, tad šios genties hemosporidijomis paukščių jaunikliai neturi galimybės užsikrėsti (Atkinson and van Riper III, 1991; Valkiūnas, 2005). Visgi, šio tyrimo metu buvo atliekami ir šios genties hemosporidijų įvairovės tyrimai. Kaip ir buvo galima tikėtis, IPARUS4 genetinės linijos parazitų buvo aptikta suaugusių didžiųjų ir mėlynujų zylių kraujo mėginiuose. Šios genetinės linijos parazitai yra plačiai paplitę visoje Europoje, dažniausiai aptinkami paukščiuose, gyvenančiuose miškingose vietovėse, šalia sraunių upelių, kur gausiai vystosi *Simuliidae* genties mašalai (Hellgren *et al.*, 2007; Van Rooyen *et al.*, 2013). Tačiau, labai įdomu, kad šio tyrimo metu viename mėlynosios zylės jauniklio kraujo mėginyje, surinktame 2018 metais, buvo identifikuoti IPARUS15 genetinės linijos, priskiriamos *Leucocytozoon* genties hemosporidijoms, parazitai. Tai reiškia, kad šios genties hemosporidijos yra pernešamos ir Kuršių Nerijoje. To priežastimis gali būti: dėl stipraus vėjo atsitiktinai į Kuršių Neriją iš žemyninės Kaliningrado srities dalies (Adler, 2020) ar šiauriau Kuršių nerijoje esančios Juodkrantės, kur jie gali būti aptinkami (nepublikuoti duomenys) atnešti upiniai mašalai (Adler *et al.*, 2004), anksčiau nenustatytas *Simuliidae* genties mašalų veisimasis Kuršių Nerijoje, arba dar nenustatyti *Leucocytozoon* genties hemosporidijų vektoriai, kurie veisiasi ir Kuršių Nerijos pietinėje dalyje. Siekiant šių parazitų vektorių nustatymo reiktų vykdyti tolimesnius tyrimus ir tirti dvisparnių kraujasiurbių vabzdžių užsikrėtimą *Leucocytozoon* genties hemosporidiniais parazitais paukščių perėjimo vietose Kuršių nerijoje.

4.2. *CULIDOIDES* MAŠALŲ UŽSIKRĖTIMAS PAUKŠČIŲ HEMOSPORIDINIAIS PARAZIT AIS

Siekiant nustatyti paukščių hemosporidinių parazitų vektorius svarbu tirti ne tik pačiuose paukščiuose, bet ir kraujasiurbiuose vabzdžiuose aptinkamas hemosporidijas. Šio tyrimo metu didžiausias dėmesys buvo skiriamas Kuršių nerijoje dažniausiai aptinkamiems *Haemoproteus* genties parazitams (Santiago-Alarcon *et al.*, 2012) ir jų vektoriams – *Culicoides* genties smulkiesiems mašalams (Bukauskaite *et al.*, 2016). Duomenys, surinkti apie smulkiųjų mašalų užsikrėtimus paukščių hemosporidiniais parazitais buvo surinkti ne tik Kuršių nerijoje, bet ir Neries regioniniame parke, kadangi rūšinė šių mašalų sudėtis abejose lokacijose skiriasi nežymiai.

Šiuo metu yra žinoma, kad *Haemoproteus* genties hemosporidijų vystymasis gali vykti keturioms Europoje aptinkamoms *Culicoides* rūšims priklausančiuose mašaluose: *C. impunctatus*, *C. nubeculosus*, *C. kibunensis* ir *C. sphagnumensis*. *Culicoides impunctatus* yra viena labiausiai paplitusių ir daugiausiai skirtingoms genetinės linijoms priklausančių parazitų pernešti galinčių *Culicoides* mašalų rūšių Kuršių nerijoje (Glukhova and Valkiūnas G., 1993; Žiegytė *et al.*, 2017). Šio tyrimo metu nebuvo patvirtinta literatūrinėje dalyje aptarta hipotezė, kad *C. impunctatus* mašalai nėra svarbus paukščių hemosporidijų faktorius, nes Kuršių nerijoje yra aptinkami tik sąlyginai trumpai, tad jų aptikimo laikas prasilenkia su paukščių užsikrėtimo parazitais laiku. Visgi, anksčiausiai paukščių hemosporidiniais parazitais užsikrėtę jaunikliai buvo aptikti birželio 30-ąją dieną, *C. impunctatus* mašalams jau skraidant, mat jie paprastai Kuršių nerijoje pasirodo apie birželio 10-ąją (Liutkevicius, 2000a; Truchan, M. *et al.*, 2001). Visgi, nepaisant to, jog šios rūšies mašalai yra laikomi dažniausiais Kurių nerijoje (Glukhova and Valkiūnas G., 1993), šio tyrimo metu inkiluose buvo aptikti tik septyni (2,4 proc. visų surinktų mašalų) šios rūšies mašalai, kurių nei vienas nebuvo užsikrėtęs paukščių hemosporidijomis. Tad gali būti, kad *C. impunctatus* mašalai nors ir yra tinkami šeiminkai *Haemoproteus* hemosporidijų vystymuisi (Žiegytė *et al.*, 2017), visgi nėra griežtai ornitofilinė rūšis, nedažnai aukų ieško paukščių perėjimo vietose, todėl neturėtų būti laikomi vienu svarbiausių paukščių hemosporidinių parazitų transmisijos faktorių Kuršių nerijoje. Šiems duomenims patvirtinti reiktų atlikti atskirus šios smulkiųjų mašalų rūšies vabzdžių tyrimus.

Dažniausiai tyrimo metu inkiluose aptiktuose *Culicoides* genties mašaluose *C. kibunensis* (34,6 proc. visų mašalų) ir *C. pictipennis* (26,4 proc.) buvo identifikuotos atitinkamai dviejų hemosporidinių parazitų genetinių linijų (*Haemoproteus lanii* linija hRB1 ir *H. minutus* linija hTUPHI01) parazitai. Šio tyrimo metu fiksuotas didelis šių *Culicoides* rūšims

priklausančių mašalų dažnis patvirtina jų ornitofilinį elgesį ir prisitaikymą dažniau maitintis paukščių krauju (Santiago-Alarcon *et al.*, 2012), tad šie smulkieji mašalai gali būti puikūs paukščių hemosporidijų vektoriai Kuršių Nerijoje. Šią hipotezę dar labiau sustiprina tai, kad atliekant ankstesnius smulkiųjų mašalų tyrimus *C. kibunensis* mašaluose buvo identifikuotos devynių *Haemoproteus* genties hemosporidijų genetinių linijų parazitai: *H. minutus* linijų hTURDUS2 ir hTUPHI01, *H. pallidus* genetinės linijos hPFC1, *H. tartakovskyi* - hSISKIN1, *H. parabelopolskyi* linijų hSYAT01 ir hSYAT02, *H. pallidulus* – hSYAT03 bei *Haemoproteus* spp. hCUK11 ir hSYAT35 parazitai (Santiago-Alarcon *et al.*, 2013; Synek *et al.*, 2013; Bernotienė *et al.*, 2019), o *C. pictipennis* mašaluose: *H. minutus* hTURDUS2 ir hTUPHI01, *H. majoris* hWW2, *H. pallidulus* hSYAT03 bei jokiai *Haemoproteus* rūšiai nepriskiriamos linijos hSYAT35 parazitai (Bobeva *et al.*, 2013; Santiago-Alarcon *et al.*, 2013; Bernotiene and Valkiunas, 2016; Bernotienė *et al.*, 2019). Šio tyrimo metu identifikuotos hRB1 genetinės linijos parazitai yra aptinkami nendrinėse startose (*Emberiza schoeniclus*) bei paprastosiame medšarkėse (*Lanius collurio*) (Hellgren *et al.*, 2007; Dimitrov *et al.*, 2010), o hTUPHI01 yra strazdus parazituojančių hemosporidinių parazitų genetinė linija (Dimitrov *et al.*, 2010), tad kaip ir buvo galima tikėtis šio tyrimo metu zyliniuose bei musinukiniuose paukščiuose šie parazitai identifikuoti nebuvo. Kaip ir buvo minėta, hTUPHI01 genetinės linijos parazitai anksčiau buvo identifikuoti tiek *C. kibunensis*, tiek *C. pictipennis* mašaluose, tad apibendrinant galima teigti, kad šios mašalų rūšys gali būti svarbios *H. minutus* linijos hTUPHI01 parazitų transmisijai. hRB1 genetinės linijos parazitai anksčiau gamtoje buvo identifikuoti *C. nubeculosus* mašaluose (Chagas *et al.*, 2019). Gali būti, jog šio tyrimo metu nustatytas *C. pictipennis* užsikrėtimas šiais parazitais atskleidžia galimą šių mašalų dalyvavimą ir *Haemoproteus lanii* rūšies parazitų transmisijoje, tačiau tam reiktų atlikti detalesnius tyrimus.

Atliekant šį tyrimą didžiausia parazitų genetinė įvairovė buvo aptikta *Culicoides segnis* mašaluose. Šių mašalų mėginiuose buvo identifikuoti iš viso trijų genetinių linijų parazitai: *Haemoproteus tartakovskyi* rūšies hSISKIN1 genetinė linija, *H. minutus* – hTURDUS2 parazitai, kurie buvo identifikuoti ir *Culicoides punctatus* mašaluose, bei *H. majoris* linijos hCWT4 parazitai. Pastarasis parazitas buvo aptiktas vienoje *C. segnis* mašalo patelėje ir anksčiau (Valavičiūtė, 2018). hSISKIN1 genetinės linijos parazitai dažniausiai yra aptinkami parazituojančios kikulinius, o hTURDUS2 - strazdinius paukščius (Hellgren *et al.*, 2007). Taip pat, tyrimais nustatyta, kad hSISKIN1 linijos parazitai gali vystytis *C. nubeculosus* mašaluose, tačiau jų natūralūs vektoriai kol kas nėra išaiškinti (Žiegyte *et al.*, 2016), o hTURDUS2 genetinės linijos parazitai yra bene dažniausiai smulkiuosiuose mašaluose aptinkamos hemosporidijos ir anksčiau buvo aptiktos *C. impunctatus*, *C. punctatus*, *C.*

circumscriptus, *C. scoticus*, *C. pictipennis*, *C. kibunensis*, *C. paolae* ir *C. festivipennis* mašaluose (Bobeva *et al.*, 2013, 2014; Synek *et al.*, 2013; Bernotiene and Valkiunas, 2016; Veiga *et al.*, 2018; Bernotienė *et al.*, 2019). Žinoma, kad *Culicoides segnis* smulkiuose mašaluose anksčiau buvo aptikti hCUKI1, hTUPHI1, hCCF4, hCWT4, hCIRCUM01 ir hROFI1 genetinių linijų parazitai (Synek *et al.*, 2013; Valavičiūtė, 2018). Apibendrinant šiuos duomenis būtų galima teigti, kad *C. segnis* mašalai gali būti gana plataus spektro paukščių hemosporidinių parazitų vektoriais, tačiau gali būti, kad dalis šių parazitų pateko į mašalus maitinantis paukščių krauju, tačiau tolimesnis vystymasis juose nevyksta. Tam nustatyti reiktų atlikti atskirus eksperimentinius tyrimus.

Visgi, bene svarbiausias šio tyrimo metu gautas rezultatas yra *C. segnis* mašaluose identifikuoti *Haemoproteus majoris* genetinės linijos hCWT4 parazitai, kurie buvo aptikti ir mėlynosios zylės jauniklio kraujo mėginyje. Anksčiau šios genetinės linijos parazitai tik vieną kartą buvo fiksuoti smulkiuosiuose mašaluose, taip pat kaip ir šio tyrimo metu – *C. segnis* rūšies kraujasiurbiuose vabzdžiuose (Valavičiūtė, 2018), tad atlikto tyrimo rezultatai galimai atskleidžia ir patvirtina *C. segnis* mašalų svarbą šios genetinės linijos parazitų pernešime. Šie mašalai paprastai Kuršių nerijoje yra aptinkami nuo gegužės pabaigos iki rugpjūčio (duomenys nepublikuoti), o jauniklis, kurio kraujo mėginyje buvo identifikuoti šie parazitai buvo sugautas liepos 5 dieną, tad *C. segnis* mašalai galėjo dalyvauti šių parazitų transmisijoje. Parazitais užsikrėtęs *C. segnis* mašalas šio ir anksčiau minėto tyrimo metu buvo sugautas Neries regioniniame parke (Valavičiūtė, 2018) gerokai anksčiau nei pasirodo paukščių jaunikliai – birželio 1 dieną, tačiau tyrimo metu atskleista sąsaja tarp paukščių jauniklių ir smulkiųjų mašalų užsikrėtimo tos pačios genetinės linijos parazitais gali būti svarbi indikacija atlikti daug specifiskesnius ir tikslesnius tyrimus siekiant nustatyti *H. majoris* genetinės linijos hCWT4 parazitų vektorius ir transmisijos kelią.

Taip pat, dar vienos *Haemoproteus majoris* genetinės linijos hWW2 parazitai, kurie šio tyrimo metu buvo identifikuoti didžiųjų zylių jauniklio kraujo mėginyje, literatūroje pateiktais duomenimis anksčiau yra aptikti *Culicoides punctatus* smulkiuosiuose mašaluose, pagautuose Verkių regioniniame parke birželio 2 dieną (Bernotienė *et al.*, 2019). Tad gali būti, kad šie, *C. punctatus* mašalai, dalyvauja *H. majoris* parazitų transmisijoje. Šiam teiginiui patvirtinti reiktų atlikti tolimesnius *C. punctatus* mašalų užsikrėtimo hemosporidiniai paukščių parazitais tyrimus.

Šio tyrimo metu buvo identifikuoti *Plasmodium* genties hemosporidiniai parazitai (genetinė linija pSGS1) dviem rūšims priklausančiuose mašaluose: *C. kibunensis* ir *C. reconditus* atskleidžia, kad šie mašalai tikrai maitinasi paukščių krauju (Lassen *et al.*, 2011;

Santiago-Alarcon *et al.*, 2012), nes šie parazitai į vabzdžius gali pakliūti tik tokiu būdu. Visgi, nors šie parazitai galėjo patekti į vabzdžius maitinimosi krauju metu, tačiau mokslininkai teigia, kad parazitui patekus į netinkamą jam šeimininką vyksta abortyvus hemosporidijų vystymasis (Valkiūnas *et al.*, 2013), tad *Culicoides* mašalai *Plasmodium* genties hemosporidijų transmisijoje nedalyvauja. Žinoma, kad pSGS1 parazitai yra pernešami *Culex* genčiai priklausančių uodų (Valkiūnas, 2005).

Apibendrinant šio tyrimo rezultatus galima teigti, atliktas tyrimas prisideda prie bendro supratimo apie paukščių hemosporidinių parazitų paplitimą pasaulyje ir jų transmisiją. Nustatyti Kuršių nerijai naujų ir, svarbiausia, jaunikliuose aptinkamų genetinių linijų parazitai ir jų sąsaja su smulkiuosiuose mašaluose aptiktais parazitais gali padėti atskleisti iki šiol nežinomus vidutinio klimato juostuose paplitusių paukščių hemosporidinių parazitų vektorius. Šis tyrimas atskleidžia, kad siekiant išaiškinti Kuršių nerijoje vykstančios *Haemoproteus* genties hemosporidinių paukščių parazitų transmisijos vektorius pirmiausiai reiktų atlikti *Culicoides punctatus*, *C. segnis*, *C. pictipennis* smulkiųjų mašalų tyrimus.

IŠVADOS

1. Ištyrus 164 suaugusių zylinių (*Paridae*) ir musinukinių (*Muscicapidae*) paukščių, sugautų 2016, 2018 ir 2019 metais Kuršių nerijoje, kraujo mėginius 64-ioose buvo identifikuoti paukščių hemosporidiniai parazitai. Iš jų 87,5 proc. *Haemoproteus*, 9,4 proc. *Plasmodium* ir 3,1 proc. *Leucocytozoon* genties hemosporidinės infekcijos.

2. Suaugusiuose zyliniuose ir musinukiniuose paukščiuose buvo identifikuotos šešių *Plasmodium* genties hemosporidijų genetinių linijų (*P. ashfordi* pGRW02, *P. circumflexum* pTURDUS1, *P. relictum* pGRW11 ir *Plasmodium* spp. pGRW09, pRSTR1 bei pSYAT24) parazitai, devynių *Haemoproteus* genties linijų (*H. pallidus* hCOLL2 ir hPFC1, *H. balmorali* hCOLL3 ir hSFC1, *H. majoris* hPHSIB1, hPARUS1, hWW2 bei *Haemoproteus* spp. hPFC3 ir hSFC10) parazitai bei vienos *Leucocytozoon* genties hemosporidijų genetinės linijos IPARUS4 parazitai.

3. Ištyrus 199 zylinių ir musinukinių paukščių jauniklių kraujo mėginius 40-yje buvo identifikuoti paukščių hemosporidiniai parazitai. Iš jų 85 proc. *Haemoproteus*, 7,5 proc. *Plasmodium* ir 2,5 proc. *Leucocytozoon* genties hemosporidinės infekcijos.

4. Jaunikliuose nustatyta statistiškai patikimai mažesnis nei suaugusiuose paukščiuose užsikrėtimas parazitais bei mažesnė hemosporidinių parazitų įvairovė: buvo identifikuota po vieną *Plasmodium* (*P. relictum* genetinė linija pSGS1) ir *Leucocytozoon* (IPARUS15) bei penkių *Haemoproteus* (*H. majoris* hPARUS1, hPHSIB1, hCWT4, hWW2, *Haemoproteus* sp. hPARUS10) genetinių linijų parazitai.

5. Tyrimo metu iš inkilų surinktos 292-i smulkiųjų mašalų patelės priklausančios 10 *Culicoides* genties rūšių (*C. festivipennis*, *C. impunctatus*, *C. kibunensis*, *C. pictipennis*, *C. reconditus*, *C. segnis*, *C. subfascipennis*, *C. sphagnumensis*, *C. punctatus*, *C. pallidicornis*) ir *Culicoides obsoletus* rūšių grupei.

6. *Culicoides* mašaluose buvo identifikuoti penkių *Haemoproteus* genties (*H. minutus* hTUPHI01 ir hTURDUS2, *H. lanii* hRB1, *H. majoris* hCWT4 ir *H. tartakovskyi* hSISKIN1) bei vienos *Plasmodium relictum* (pSGS1) genetinių linijų hemosporidiniai parazitai.

7. Palyginus paukščių jauniklių kraujo mėginiuose ir *Culicoides* mašaluose identifikuotus hemosporidinius parazitus nustatyta, kad *Haemoproteus majoris* genetinės linijos hCWT4 parazitų, aptiktų mėlynosios zylės jauniklio kraujo mėginyje, transmisijoje gali dalyvauti *Culicoides segnis* rūšies smulkieji mašalai, o *H. majoris* linijos hWW2 parazitų transmisijoje – *Culicoides punctatus* smulkieji mašalai.

Dalis šio tyrimo rezultatų buvo pristatyti 62-joje tarptautinėje Daugpilio universiteto mokslinėje konferencijoje (The 62nd International Scientific Conference of Daugavpils University). Pranešimas: „Some Notes on the Transmission of *Haemoproteus* Parasites in Eastern Part of Baltic Region”, pranešimo autoriai: Rita Žiegytė, Elena Platonova, **Egidijus Kinderis**, Andrey Mukhin, Vaidas Palinauskas, Rasa Bernotienė.

PADĖKA

Dėkoju Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto P. B. Šivickio parazitologijos laboratorijai už suteiktas medžiagas bei mėginius ir galimybę atlikti baigiamojo magistro darbo tyrimus, o už pagalbą atliekant tyrimus laboratorijoje bei konsultacijas ruošiant magistro darbą – darbo vadovei dr. Rasai Bernotienei ir konsultantui dr. Vaidui Palinauskui.

Taip pat dėkoju Gamtos tyrimų centro doktorantei Lenai Platonovai ir dr. Ritai Žiegytei už pagalbą atliekant kraujo mėginių mikroskopinį vertinimą, surinktus *Culicoides* mašalus ir pagalbą juos identifikuojant.

Šis tyrimas buvo finansuotas Europos socialinio fondo projekto Nr. 09.3.3-LMT-K-712-02-0047 lėšomis.

SANTRAUKA

Magistro darbas

Zylinių (*Paridae*) ir musinukinių (*Muscicapidae*) paukščių hemosporidiniai parazitai ir jų transmisijos tyrimas Kuršių nerijoje

Šio darbo metu buvo siekiama nustatyti zyliniuose ir musinukiniuose paukščiuose Kuršių nerijoje aptinkamų paukščių hemosporidinių parazitų įvairovę bei atlikti šių parazitų transmisijos tyrimą, palyginant paukščių jaunikliuose identifikuotų parazitų genetinių linijų informaciją su *Culicoides* smulkiuosiuose mašaluose identifikuotais *Haemoproteus* genties parazitais. Iš viso buvo tirti 164 suaugusių paukščių ir 199 paukščių jauniklių kraujo mėginiai, kuriuose buvo identifikuoti atitinkamai 64 ir 40 parazitais užkrėsti mėginiai. Darbo metu suaugusiuose paukščiuose buvo nustatyti šešiolikos hemosporidijų genetinių linijų parazitai: *Plasmodium ashfordi* genetinės linijos pGRW02, *P. circumflexum* pTURDUS1, *P. relictum* pGRW11, *Plasmodium* spp. pGRW09, pRSTR1 bei pSYAT24, *Haemoproteus pallidus* hCOLL2 ir hPFC1, *H. balmorali* hCOLL3 ir hSFC1, *H. majoris* hPHSIB1, hPARUS1, hWW2, *Haemoproteus* spp. hPFC3 ir hSFC10 bei *Leucocytozoon* sp. linijos IPARUS4 parazitai. Zylinių ir musinukinių paukščių jaunikliuose buvo identifikuotos septynių genetinių linijų parazitai: *Plasmodium relictum* pSGS1, *H. majoris* hPARUS1, hPHSIB1, hCWT4, hWW2, *Haemoproteus* sp. hPARUS10 bei *Leucocytozoon* sp. genetinės linijos IPARUS15 parazitai.

Tyrimo metu iš 292-ų Kuršių Nerijoje ir Neries regioniniame parke paukščių inkiluose sugautų *Culicoides* smulkiųjų mašalų dvylikoje buvo nustatyti hemosporidiniai parazitai: keturioms smulkiųjų mašalų rūšims (*Culicoides kibunensis*, *C. pictipennis*, *C. segnis*, *C. punctatus*) priklausančiuose mašaluose buvo aptikti šešių genetinių linijų parazitai: *Haemoproteus minutus* (hTUPHI01 ir hTURDUS2), *H. lanii* (hRB1), *H. majoris* (hCWT4), *H. tartakovskiyi* (hSISKIN1). Nustatyti du smulkieji mašalai, kuriuose buvo identifikuoti *Plasmodium relictum* (pSGS1) parazitai.

Tyrimo metu išaiškinta, kad *Haemoproteus majoris* genetinės linijos hCWT4 parazitų, aptiktų mėlynosios zylės jauniklio kraujo mėginyje, transmisijoje gali dalyvauti *C. segnis* rūšies smulkieji mašalai, o *H. majoris* linijos hWW2 parazitų transmisijoje – *C. punctatus* smulkieji mašalai.

SUMMARY

Master's thesis

Haemosporidian Parasites of Tits (*Paridae*) and Old World Flycatchers (*Muscicapidae*) in Curonian Spit and Research of their Transmission

In this study, we aimed to determine the diversity of avian haemosporidian parasites circulating in the populations of Tits and Old World Flycatchers in the Curonian Spit. We aimed to determine the transmission of *Haemoproteus* parasites in the study area by comparing the genetic lineages of these parasites obtained from the juvenile birds as well as *Culicoides* biting midges. A total of 164 blood samples from adult birds and 199 juvenile birds were tested. We identified 64 and 40 birds infected with avian haemosporidian parasites respectively. Sixteen different genetic lineages of parasites were identified in adult birds: parasites of *Plasmodium ashfordi* genetic lineage pGRW02, *P. circumflexum* pTURDUS1, *P. relictum* pGRW11 and *Plasmodium* spp. pGRW09, pRSTR1 and pSYAT24, also *Haemoproteus pallidus* hCOLL2 and hPFC1, *H. balmorali* hCOLL3 and hSFC1, *H. majoris* hPHSIB1, hPARUS1, hWW2, *Haemoproteus* spp. hPFC3 and hSFC10 and *Leucocytozoon* sp. parasites of lineage IPARUS4. Parasites of seven genetic lineages of avian haemosporidian parasites have been identified in juvenile birds of Tits and Old World Flycatchers: *Plasmodium relictum* pSGS1, *H. majoris* hPARUS1, hPHSIB1, hCWT4, hWW2, *Haemoproteus* sp. hPARUS10 and *Leucocytozoon* sp. IPARUS15.

Total of 292 *Culicoides* biting midges were collected and investigated from the nest boxes in Curonian spit and Neris regional park. Twelve of these biting midges were infected with avian haemosporidian parasites. Six genetic lineages of haemosporidian parasites (*Haemoproteus minutus* hTUPHI01 and hTURDUS2, *H. lanii* hRB1, *H. majoris* hCWT4, *H. tartakovskyi* hSISKIN1 and *Plasmodium relictum* pSGS1) were detected in biting midges belonging to four species: *Culicoides kibunensis*, *C. pictipennis*, *C. segnis*, *C. punctatus*.

The study revealed that *Culicoides segnis* biting midges may be involved in the transmission of *Haemoproteus majoris* (genetic lineage hCWT4) parasites. *C. punctatus* midges may be involved in the transmission of *H. majoris* (hWW2) parasites.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adler P. H., 2020. World Blackflies (Diptera: Simuliidae): a Comprehensive Revision of the Taxonomic and Geographical Inventory, p. 142.
2. Adler P. H., Currie D. C., and Wood D. M., 2004. *The Black Flies (Simuliidae) of North America*. Cornell University Press.
3. Asghar M., Hasselquist D., and Bensch S., 2011. Are chronic avian haemosporidian infections costly in wild birds?, *Journal of Avian Biology*. John Wiley & Sons, Ltd, 42(6), pp. 530–537. doi: 10.1111/j.1600-048X.2011.05281.x.
4. Atkinson C. T., Woods K. L., Dusek R. J., Sileo L. S., and Iko W. M., 1995. Wildlife Disease and Conservation in Hawaii: Pathogenicity of Avian Malaria (*Plasmodium Relictum*) in Experimentally Infected Iiwi (*Vestiaria Coccinea*), *Parasitology*. Cambridge University Press, 111(S1), pp. S59–S69. doi: 10.1017/S003118200007582X.
5. Atkinson C. T., and van Riper III C., 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: Plasmodium, Leucocytozoon, and Haemoproteus, *Bird–parasite interactions*. Oxford University Press Oxford, pp. 19–48.
6. Beadell J. S., Ishtiaq F., Covas R., Melo M., Warren B. H., Atkinson C. T., Bensch S., Graves G. R., Jhala Y. V., Peirce M. A., Rahmani A. R., Fonseca D. M., and Fleischer R. C., 2006. Global phylogeographic limits of Hawaii’s avian malaria, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society, 273(1604), pp. 2935–2944. doi: 10.1098/rspb.2006.3671.
7. Bensch S., Stjernman M., Hasselquist D., Örjan Ö., Hansson B., Westerdahl H., and Pinheiro R. T., 2000. Host specificity in avian blood parasites: a study of Plasmodium and Haemoproteus mitochondrial DNA amplified from birds, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1452), pp. 1583–1589. doi: 10.1098/rspb.2000.1181.
8. Bensch S., Pérez-Tris J., Waldenström J., and Hellgren O., 2004. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation?, *Evolution; international journal of organic evolution*, 58(7), pp. 1617–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15341164> (Accessed: 21 January 2019).
9. Bensch S., Waldenström J., Jonzén N., Westerdahl H., Hansson B., Sejberg D., and Hasselquist D., 2007. Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species, *Journal of Animal Ecology*, 76(1), pp. 112–122. doi: 10.1111/j.1365-2656.2006.01176.x.
10. Bensch S., Hellgren O., and Pérez-Tris J., 2009. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages, *Molecular Ecology Resources*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 9(5), pp. 1353–1358. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02692.x.
11. Bernotienė R., 2003. *Upiniai ir smulkieji mašalai (Diptera: Simuliidae, Ceratopoginidae), jų paplitimo ir vystomisi ypatumai Lietuvoje*. Doctoral thesis. Vilnius University.
12. Bernotienė R., 2006. Kraujasiurbiai dvisparniai vabzdžiai (Ceratopogonidae,

Culicidae) Kuršių nerijoje, in *Proceedings of the XIIth International Scientific - Practical conference "Human and Nature Safety"*. Akademija, pp. 123–125.

13. Bernotienė R., 2012. The fauna and seasonal activity of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Curonian Spit (Russia, Lithuania), *Journal of the European Mosquito Control Association*, 30, pp. 72–78.

14. Bernotienė R., Žiegytė R., Vaitkutė G., and Valkiūnas G., 2019. Identification of a new vector species of avian haemoproteids, with a description of methodology for the determination of natural vectors of haemosporidian parasites, *Parasites & Vectors*. BioMed Central, 12(1), p. 307. doi: 10.1186/s13071-019-3559-8.

15. Bernotiene R., and Valkiunas G., 2016. PCR detection of malaria parasites and related haemosporidians: The sensitive methodology in determining bird-biting insects, *Malaria Journal*, 15(1). doi: 10.1186/s12936-016-1338-y.

16. Blanton F. S., and Wirth W. W., 1979. The sand flies (Culicoides) of Florida: (Diptera: Ceratopogonidae), *Arthropods of Florida*, 10, pp. 1–204.

17. Bobeva A., Zehtindjiev P., Bensch S., and Radrova J., 2013. A survey of biting midges of the genus *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) in NE Bulgaria, with respect to transmission of avian haemosporidians, *Acta Parasitologica*, 58(4), pp. 585–591. doi: 10.2478/s11686-013-0185-z.

18. Bobeva A., Ilieva M., Dimitrov D., and Zehtindjiev P., 2014. Degree of associations among vectors of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) and host bird species with respect to haemosporidian parasites in NE Bulgaria, *Parasitology Research*. Springer Verlag, 113(12), pp. 4505–4511. doi: 10.1007/s00436-014-4140-1.

19. Boyer A. G., 2008. Extinction patterns in the avifauna of the Hawaiian islands, *Diversity and Distributions*. John Wiley & Sons, Ltd, 14(3), pp. 509–517. doi: 10.1111/j.1472-4642.2007.00459.x.

20. Bukauskaite D., Bernotiene R., Iezhova T. A., and Valkiūnas G., 2016. Mechanisms of mortality in *Culicoides* biting midges due to *Haemoproteus* infection, *Parasitology*. Cambridge University Press, 143(13), pp. 1748–1754. doi: 10.1017/S0031182016001426.

21. Bukauskaitė D., Iezhova T. A., Ilgūnas M., and Valkiūnas G., 2019. High susceptibility of the laboratory-reared biting midges *Culicoides nubeculosus* to *Haemoproteus* infections, with review on *Culicoides* species that transmit avian haemoproteids, *Parasitology*. Cambridge University Press, 146(3), pp. 333–341. doi: 10.1017/S0031182018001373.

22. Burki F., Shalchian-Tabrizi K., Minge M., Skjæveland Å., Nikolaev S. I., Jakobsen K. S., and Pawlowski J., 2007. Phylogenomics Reshuffles the Eukaryotic Supergroups, *PLoS ONE*. Edited by G. Butler. Public Library of Science, 2(8), p. e790. doi: 10.1371/journal.pone.0000790.

23. Chagas C. R. F., Bukauskaitė D., Ilgūnas M., Bernotienė R., Iezhova T., and Valkiūnas G., 2019. Sporogony of four *Haemoproteus* species (Haemosporida: Haemoproteidae), with report of in vitro ookinetes of *Haemoproteus hirundinis*: Phylogenetic inference indicates patterns of haemosporidian parasite ookinete development, *Parasites and Vectors*. BioMed Central Ltd., 12(1), p. 422. doi: 10.1186/s13071-019-3679-1.

24. Clark N. J., Clegg S. M., and Lima M. R., 2014. A review of global diversity in

avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data, *International Journal for Parasitology*, 44(5), pp. 329–338. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.01.004.

25. Cosgrove C. L., Wood M. J., Day K. P., and Sheldon B. C., 2008. Seasonal variation in *Plasmodium* prevalence in a population of blue tits *Cyanistes caeruleus*, *Journal of Animal Ecology*, 77(3), pp. 540–548. doi: 10.1111/j.1365-2656.2008.01370.x.

26. Crouse J., and Amorese D., 1987. Ethanol Precipitation: Ammonium Acetate as an Alternative to Sodium Acetate, *Focus*, 9(2), pp. 3–5.

27. Dick C. W., 2006. Checklist of world Hippoboscidae (Diptera: Hippoboscoidea), pp. 1–7.

28. Dimitrov D., Zehtindjiev P., and Bensch S., 2010. Genetic diversity of avian blood parasites in SE Europe: Cytochrome b lineages of the genera *Plasmodium* and *Haemoproteus* (Haemosporida) from Bulgaria, *Acta Parasitologica*. Springer, 55(3), pp. 201–209. doi: 10.2478/s11686-010-0029-z.

29. Dunn J. C., Stockdale J. E., Bradford E. L., McCubbin A., Morris A. J., Grice P. V., Goodman S. J., and Hamer K. C., 2017. High rates of infection by blood parasites during the nestling phase in UK Columbids with notes on ecological associations, *Parasitology*. Cambridge University Press, 144(5), pp. 622–628. doi: 10.1017/S0031182016002274.

30. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., and Vrijenhoek R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates., *Molecular marine biology and biotechnology*, 3(5), pp. 294–299. doi: 10.1071/ZO9660275.

31. Glukhova V. M., and Valkiūnas G., 1993. On the fauna and ecology of biting midges (Ceratopogonidae: Culicoides) in the Kuršių Nerija, the methods of their collection from the birds and experimental infection with *Haemoproteids* (Haemosporidia: Haemoproteidae), *Ekologija*, 2, pp. 68–73.

32. Gosler A., and Clement P., 2007. Family Paridae (Tits and Chickadees), in *Handbook of the Birds of the World. Volume 12: Picathartes to Tits and Chickadees*. Barcelona: Lynx Edicions, pp. 662–709.

33. Gutiérrez-López R., Martínez-De La Puente J., Gangoso L., Yan J., Soriguer R. C., and Figuerola J., 2016. Do mosquitoes transmit the avian malaria-like parasite *Haemoproteus*? An experimental test of vector competence using mosquito saliva, *Parasites and Vectors*. BioMed Central Ltd., 9(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s13071-016-1903-9.

34. Hall, T. A., 1999. No TitleBioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, pp. 95–98.

35. Harbach R. R., and Kitching I. J., 1998. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera), *Systematic Entomology*. Blackwell Publishing Ltd., 23(4), pp. 327–370. doi: 10.1046/j.1365-3113.1998.00072.x.

36. Hellgren O., 2005. The occurrence of haemosporidian parasites in the Fennoscandian bluethroat (*Luscinia svecica*) population, *Journal of Ornithology*. Springer, 146(1), pp. 55–60. doi: 10.1007/s10336-004-0055-4.

37. Hellgren O., Waldenström J., Peréz-Tris J., Szöll Ösi E., Hasselquist D., Krizanauskiene A., Ottosson U., and Bensch S., 2007. Detecting shifts of transmission areas

in avian blood parasites - A phylogenetic approach, *Molecular Ecology*, 16(6), pp. 1281–1290. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03227.x.

38. Hellgren O., Bensch S., and Malmqvist B., 2008. Bird hosts, blood parasites and their vectors - Associations uncovered by molecular analyses of blackfly blood meals, *Molecular Ecology*, 17(6), pp. 1605–1613. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03680.x.

39. Hellgren O., Waldenström J., and Bensch S., 2004. A new PCR assay for simultaneous studies of Leucocytozoon, Plasmodium, and Haemoproteus from avian blood, *Journal of Parasitology*, 90(4), pp. 797–802. doi: 10.1645/GE-184R1.

40. del Hoyo J., Elliot A., and Christie D., 2006. *Handbook of the Birds of the World. Volume 11: Old World Flycatchers to Old World Warblers*. Barcelona: Lynx Edicions.

41. Huijben S., Schaftenaar W., Wijsman A., Paaijmans K. P., and Takken W., 2007. Avian malaria in Europe: An emerging infectious disease?, in Takken, W. and Knols, B. G. J. (eds) *Emerging Pests and Vector-borne Diseases in Europe*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, pp. 59–74.

42. Ilgūnas M., Romeiro Fernandes Chagas C., Bukauskaitė D., Bernotienė R., Iezhova T., and Valkiūnas G., 2019. The life-cycle of the avian haemosporidian parasite *Haemoproteus majoris*, with emphasis on the exoerythrocytic and sporogonic development, *Parasites and Vectors*. BioMed Central Ltd., 12(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/s13071-019-3773-4.

43. Inci A., Yildirim A., Njabo K. Y., Duzlu O., Biskin Z., and Ciloglu A., 2012. Detection and molecular characterization of avian Plasmodium from mosquitoes in central Turkey, *Veterinary Parasitology*, 188(1–2), pp. 179–184. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.02.012.

44. Jia T., Huang X., Valkiunas G., Yang M., Zheng C., Pu T., Zhang Y., Dong L., Suo X., and Zhang C., 2018. Malaria parasites and related haemosporidians cause mortality in cranes: A study on the parasites diversity, prevalence and distribution in Beijing Zoo, *Malaria Journal*. BioMed Central Ltd., 17(1), p. 234. doi: 10.1186/s12936-018-2385-3.

45. Kimura M., Darbro J. M., and Harrington L. C., 2010. Avian Malaria Parasites Share Congeneric Mosquito Vectors, *Journal of Parasitology*. American Society of Parasitologists, 96(1), pp. 144–151. doi: 10.1645/ge-2060.1.

46. Krizanauskiene A., Hellgren O., Kosarev V., Sokolov L., Bensch S., and Valkiunas G., 2006. Variation in host specificity between species of avian hemosporidian parasites: evidence from parasite morphology and cytochrome B gene sequences., *The Journal of parasitology*, 92(6), pp. 1319–24. doi: 10.1645/GE-873R.1.

47. Križanauskiene A., Iezhova T. A., Palinauskas V., Chernetsov N., and Valkiunas G., 2012. *Haemoproteus nucleocondensus* n. sp. (Haemosporida, Haemoproteidae) from a eurasian songbird, the great reed warbler *acrocephalus arundinaceus*, *Zootaxa*, (3441), pp. 36–46. doi: 10.11646/zootaxa.3441.1.3.

48. Krone O., Priemer J., Streich J., Sömmer P., Langgemach T., and Lessow O., 2001. *Haemosporida of Birds of Prey and Owls from Germany*, *Acta Protozool*.

49. Kurlavičius P., Jusys V., and Karalius, Saulius Raudonikis L., 2020. *Lietuvos paukščių pažinimo vadovas*.

50. Lachish S., Knowles S. C. L., Alves R., Wood M. J., and Sheldon B. C., 2011. Fitness effects of endemic malaria infections in a wild bird population: the importance of

ecological structure, *Journal of Animal Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd, 80(6), pp. 1196–1206. doi: 10.1111/j.1365-2656.2011.01836.x.

51. Lassen S. B., Nielsen S. A., Skovgård H., and Kristensen M., 2011. Molecular identification of bloodmeals from biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: Culicoides Latreille) in Denmark, *Parasitology Research*, 108(4), pp. 823–829. doi: 10.1007/s00436-010-2123-4.

52. Lauron E. J., Oakgrove K. S., Tell L. A., Biskar K., Roy S. W., and Sehgal R. N. M., 2014. Transcriptome sequencing and analysis of *Plasmodium gallinaceum* reveals polymorphisms and selection on the apical membrane antigen-1, *Malaria Journal*. BioMed Central Ltd., 13(1), p. 382. doi: 10.1186/1475-2875-13-382.

53. Lewis D. J., 1982. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae), *Bulletin of the British Museum (Natural History)*., 45, pp. 121–209. Available at: <https://www.biodiversitylibrary.org/part/10409> (Accessed: 11 April 2020).

54. Liutkevicius G., 2000a. *Paukščių hemoproteidų (haemosporida, haemoproteidae) vystymasis pernešėjuose*. Doctoral thesis. Lietuvos sveikatos mokslų universitetas.

55. Liutkevicius G., 2000b. The New Data on the Epidemiology of Bird Haemoproteids (Haemosporida: Haemoproteidae) on the Curonian Spit, *Acta Zoologica Lituanica*, 10(2), pp. 72–77. doi: 10.1080/13921657.2000.10512328.

56. Loiseau C., Harrigan R. J., Cornel A. J., Guers S. L., Dodge M., Marzec T., Carlson J. S., Seppi B., and Sehgal R. N. M., 2012. First Evidence and Predictions of *Plasmodium* Transmission in Alaskan Bird Populations, *PLoS ONE*. Edited by G. Snounou. Public Library of Science, 7(9), p. e44729. doi: 10.1371/journal.pone.0044729.

57. Loiseau C., Harrigan R. J., Bichet C., Julliard R., Garnier S., Lendvai Á. Z., Chastel O., and Sorci G., 2013. Predictions of avian *Plasmodium* expansion under climate change, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 3(1), pp. 1–6. doi: 10.1038/srep01126.

58. Lotta I. A., Pacheco M. A., Escalante A. A., González A. D., Mantilla J. S., Moncada L. I., Adler P. H., and Matta N. E., 2016. Leucocytozoon Diversity and Possible Vectors in the Neotropical highlands of Colombia, *Protist*. Elsevier GmbH, 167(2), pp. 185–204. doi: 10.1016/j.protis.2016.02.002.

59. Maa T. C., 2007. Family Hippoboscidae. Catalog of the Diptera of the Australasian and Oceanian Regions, pp. 785–789.

60. Martínez-de la Puente J., Martínez J., Rivero-de Aguilar J., Herrero J., and Merino S., 2011. On the specificity of avian blood parasites: revealing specific and generalist relationships between haemosporidians and biting midges, *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd, 20(15), pp. 3275–3287. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05136.x.

61. Martinsen E. S., Paperna I., and Schall J. J., 2006. Morphological versus molecular identification of avian Haemosporidia: an exploration of three species concepts, *Parasitology*, 133(03), p. 279. doi: 10.1017/S0031182006000424.

62. Martinsen E. S., Perkins S. L., and Schall J. J., 2008. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches, *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Academic Press, 47(1), pp. 261–273. doi: 10.1016/J.YMPEV.2007.11.012.

63. Marzal A., Ricklefs R. E., Valkiūnas G., Albayrak T., Arriero E., Bonneaud C.,

Czirják G. A., Ewen J., Hellgren O., Hořáková D., Iezhova T. A., Jensen H., Križanauskienė A., Lima M. R., de Lope F., Magnussen E., Martin L. B., Møller A. P., Palinauskas V., Pap P. L., Pérez-Tris J., Sehgal R. N. M., Soler M., Szöllösi E., Westerdahl H., Zetindjiev P., and Bensch S., 2011. Diversity, Loss, and Gain of Malaria Parasites in a Globally Invasive Bird, *PLoS ONE*. Edited by R. C. Fleischer. Public Library of Science, 6(7), p. e21905. doi: 10.1371/journal.pone.0021905.

64. Mathieu B., Cêtre-Sossah C., Garros C., Chavernac D., Balenghien T., Carpenter S., Setier-Rio M. L., Vignes-Lebbe R., Ung V., Candolfi E., and Delécolle J. C., 2012. Development and validation of IIKC: An interactive identification key for Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) females from the Western Palaearctic region, *Parasites and Vectors*. BioMed Central, 5(1), p. 137. doi: 10.1186/1756-3305-5-137.

65. Medeiros M. C. I., Ricklefs R. E., Brawn J. D., and Hamer G. L., 2015. Plasmodium prevalence across avian host species is positively associated with exposure to mosquito vectors, *Parasitology*. Cambridge University Press, 142(13), pp. 1612–1620. doi: 10.1017/S0031182015001183.

66. Meiswinkel R., Gomulski L. M., Delécolle J.-C., Goffredo M., and Gasperi G., 2004. The taxonomy of Culicoides vector complexes - unfinished business., *Veterinaria italiana*, 40(3), pp. 151–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20419654>.

67. Mellor P. S., Boorman J., and Baylis M., 2000. *Culicoides* Biting Midges: Their Role as Arbovirus Vectors, *Annual Review of Entomology*. Annual Reviews, 45(1), pp. 307–340. doi: 10.1146/annurev.ento.45.1.307.

68. Mendes L., Pardal S., Morais J., Antunes S., Ramos J. A., Perez-Tris J., and Piersma T., 2013. Hidden haemosporidian infections in Ruffs (*Philomachus pugnax*) staging in Northwest Europe en route from Africa to Arctic Europe, *Parasitology Research*, 112(5), pp. 2037–2043. doi: 10.1007/s00436-013-3362-y.

69. Merino S., and Potti J., 1995. High Prevalence of Hematozoa in Nestlings of a Passerine Species, the Pied Flycatcher (*Ficedula hypoleuca*), *The Auk*. Oxford University Press (OUP), 112(4), pp. 1041–1043. doi: 10.2307/4089037.

70. Mogi M., 2007. Insects and other invertebrate predators., *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(2 Suppl), pp. 93–109. doi: 10.2987/8756-971X(2007)23[93:IAOIP]2.0.CO;2.

71. Murdock C. C., Adler P. H., Frank J., and Perkins S. L., 2015. Molecular analyses on host-seeking black flies (Diptera: Simuliidae) reveal a diverse assemblage of Leucocytozoon (Apicomplexa: Haemospororida) parasites in an alpine ecosystem, *Parasites and Vectors*. BioMed Central Ltd., 8(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s13071-015-0952-9.

72. Niebuhr C. N., Poulin R., and Tompkins D. M., 2016. Is Avian Malaria Playing a Role in Native Bird Declines in New Zealand? Testing Hypotheses along an Elevational Gradient, *PLOS ONE*. Edited by A. Pain. Public Library of Science, 11(11), p. e0165918. doi: 10.1371/journal.pone.0165918.

73. Njabo K. Y., Cornel A. J., Bonneaud C., Toffelmier E., Sehgal R. N. M., Valkiūnas G., Russell A. F., and Smith T. B., 2011. Nonspecific patterns of vector, host and avian malaria parasite associations in a central African rainforest, *Molecular Ecology*, 20(5), pp. 1049–1061. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04904.x.

74. Okanga S., Cumming G. S., Hockey P. A. R., Nupen L., and Peters J. L., 2014.

Host Specificity And Co-Speciation In Avian Haemosporidia In The Western Cape, South Africa, *PLoS ONE*. Edited by D. Chakravorty. Public Library of Science, 9(2), p. e86382. doi: 10.1371/journal.pone.0086382.

75. Olias P., Wegelin M., Zenker W., Freter S., Gruber A. D., and Klopflisch R., 2011. Avian malaria deaths in parrots, Europe, *Emerging Infectious Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention, pp. 950–952. doi: 10.3201/eid1705.101618.

76. Paaijmans K. P., Blanford S., Bell A. S., Blanford J. I., Read A. F., and Thomas M. B., 2010. Influence of climate on malaria transmission depends on daily temperature variation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), pp. 15135–15139. doi: 10.1073/pnas.1006422107.

77. Pacheco M. A., Matta N. E., Valkiunas G., Parker P. G., Mello B., Stanley C. E., Lentino M., Garcia-Amado M. A., Cranfield M., Kosakovsky Pond S. L., Escalante A. A., and Escalante A. A., 2018. Mode and Rate of Evolution of Haemosporidian Mitochondrial Genomes: Timing the Radiation of Avian Parasites., *Molecular biology and evolution*. Oxford University Press, 35(2), pp. 383–403. doi: 10.1093/molbev/msx285.

78. Palinauskas V., 2009. *Experimental investigation of avian malaria parasites (Plasmodium, Haemosporida): linkage of traditional and molecular data*. Doctoral thesis. Vilnius University. Available at: https://oatd.org/oatd/record?record=oai%5C%3Aelaba.lt%5C%3ALT-eLABa-0001%5C%3AE.02%5C~2009%5C~D_20091228_152544-10430 (Accessed: 22 January 2019).

79. Palinauskas V., Žiegyte R., Ilgunas M., Iezhova T. A., Bernotiene R., Bolshakov C., and Valkiunas G., 2015. Description of the first cryptic avian malaria parasite, *Plasmodium homocircumflexum* n. sp., with experimental data on its virulence and development in avian hosts and mosquitoes, *International Journal for Parasitology*. Elsevier Ltd, 45(1), pp. 51–62. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.08.012.

80. Peterson M. G., Marshall V. M., Smythe J. A., Crewther P. E., Lew A., Silva A., Anders R. F., and Kemp D. J., 1989. Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*., *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology, 9(7), pp. 3151–3154. doi: 10.1128/mcb.9.7.3151.

81. Radwan J., Zagalska-Neubauer M., Cichoń M., Sendek J., Kulma K., Gustafsson L., and Babik W., 2012. MHC diversity, malaria and lifetime reproductive success in collared flycatchers, *Molecular Ecology*, 21(10), pp. 2469–2479. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05547.x.

82. Ramey A. M., Ely C. R., Schmutz J. A., Pearce J. M., and Heard D. J., 2012. Molecular Detection of Hematozoa Infections in Tundra Swans Relative to Migration Patterns and Ecological Conditions at Breeding Grounds, *PLoS ONE*. Edited by R. A. Veitia. Public Library of Science, 7(9), p. e45789. doi: 10.1371/journal.pone.0045789.

83. Reeves A. B., Smith M. M., Meixell B. W., Fleskes J. P., and Ramey A. M., 2015. Genetic Diversity and Host Specificity Varies across Three Genera of Blood Parasites in Ducks of the Pacific Americas Flyway, *PLOS ONE*. Edited by J. Waldenström. Public Library of Science, 10(2), p. e0116661. doi: 10.1371/journal.pone.0116661.

84. Van Rooyen J., Lalubin F., Glaizot O., and Christe P., 2013. Avian haemosporidian persistence and co-infection in great tits at the individual level, *Malaria*

Journal, 12(1). doi: 10.1186/1475-2875-12-40.

85. Samuel M. D., Hobbelen P. H. F., DeCastro F., Ahumada J. A., LaPointe D. A., Atkinson C. T., Woodworth B. L., Hart P. J., and Duffy D. C., 2011. The dynamics, transmission, and population impacts of avian malaria in native Hawaiian birds: a modeling approach, *Ecological Applications*. John Wiley & Sons, Ltd, 21(8), pp. 2960–2973. doi: 10.1890/10-1311.1.

86. Santiago-Alarcon D., Bloch R., Rolshausen G., Schaefer H. M., and Segelbacher G., 2011. Prevalence, diversity, and interaction patterns of avian haemosporidians in a four-year study of blackcaps in a migratory divide, *Parasitology*, 138(7), pp. 824–835. doi: 10.1017/S0031182011000515.

87. Santiago-Alarcon D., Havelka P., Pineda E., Segelbacher G., and Schaefer H. M., 2013. Urban forests as hubs for novel zoonosis: Blood meal analysis, seasonal variation in *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vectors, and avian haemosporidians, *Parasitology*. Cambridge University Press, 140(14), pp. 1799–1810. doi: 10.1017/S0031182013001285.

88. Santiago-Alarcon D., MacGregor-Fors I., Kühnert K., Segelbacher G., and Schaefer H. M., 2016. Avian haemosporidian parasites in an urban forest and their relationship to bird size and abundance, *Urban Ecosystems*. Springer New York LLC, 19(1), pp. 331–346. doi: 10.1007/s11252-015-0494-0.

89. Santiago-Alarcon D., Palinauskas V., and Schaefer H. M., 2012. Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy, *Biological Reviews*, 87(4), pp. 928–964. doi: 10.1111/j.1469-185X.2012.00234.x.

90. Schoener E., Uebleis S. S., Butter J., Nawratil M., Cuk C., Flechl E., Kothmayer M., Obwaller A. G., Zechmeister T., Rubel F., Lebl K., Zittra C., and Fuehrer H. P., 2017. Avian Plasmodium in Eastern Austrian mosquitoes, *Malaria Journal*. BioMed Central Ltd., 16(1), p. 389. doi: 10.1186/s12936-017-2035-1.

91. Schumm Y. R., Wecker C., Marek C., Wassmuth M., Bentele A., Willems H., Reiner G., and Quillfeldt P., 2019. Blood parasites in Passeriformes in central Germany: Prevalence and lineage diversity of Haemosporida (*Haemoproteus*, *Plasmodium* and *Leucocytozoon*) in six common songbirds, *PeerJ*. PeerJ Inc., 2019(1). doi: 10.7717/peerj.6259.

92. Synek P., Munclinger P., Albrecht T., and Votýpka J., 2013. Avian haemosporidians in haematophagous insects in the Czech Republic, *Parasitology Research*, 112(2), pp. 839–845. doi: 10.1007/s00436-012-3204-3.

93. Tomás G., Merino S., Martínez-De La Puente J., Moreno J., Morales J., and Lobato E., 2008. A simple trapping method to estimate abundances of blood-sucking flying insects in avian nests, *Animal Behaviour*. Academic Press, pp. 723–729. doi: 10.1016/j.anbehav.2007.08.018.

94. Truchan, M., Tereshkina N. V., and Liutkevicius G., 2001. Some notes on the fauna and ecology of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in the Curonian spit, *Vesti Nacionalnaj AN Belarusii*.

95. Trukhan M. N., Tereshkina N. V., and Liutkevicius G., 2003. Peculiarities of the range of species and the ecology of midges (Diptera, Ceratopogonidae) on the Curonian spit, *Vesci nacyanalnaj akademii navuk Belarusi*, 2, pp. 88–91.

96. Valavičiūtė K., 2018. *Paukščių kraujo parazitų (Haemosporida,*

Trypanosomatida) tyrimas kraujasiurbiuose smulkiuosiuose mašaluose. Magistro darbas. Vilniaus universitetas.

97. Valkiūnas G., Kazlauskienė R., Bernotienė R., Bukauskaitė D., Palinauskas V., and Iezhova T. A., 2014. Haemoproteus infections (Haemosporida, Haemoproteidae) kill bird-biting mosquitoes, *Parasitology Research*. Springer Verlag, 113(3), pp. 1011–1018. doi: 10.1007/s00436-013-3733-4.

98. Valkiūnas G., 2005. *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. CRC Press.

99. Valkiūnas G., Iezhova T. A., Križanauskienė A., Palinauskas V., Sehgal R. N. M., and Bensch S., 2008. A Comparative Analysis of Microscopy and PCR-Based Detection Methods for Blood Parasites, *Journal of Parasitology*. American Society of Parasitologists, 94(6), pp. 1395–1401. doi: 10.1645/ge-1570.1.

100. Valkiūnas G., Atkinson C. T., Bensch S., Sehgal R. N. M., and Ricklefs R. E., 2008. Parasite misidentifications in GenBank: how to minimize their number?, *Trends in parasitology*. Elsevier, 24(6), pp. 247–8. doi: 10.1016/j.pt.2008.03.004.

101. Valkiūnas G., Kazlauskienė R., Bernotienė R., Palinauskas V., and 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*. Springer Verlag, 112(6), pp. 2159–2169. doi: 10.1007/s00436-013-3375-6.

102. Valkiūnas G., Liutkevičius G., and Iezhova T. A., 2002. Complete development of three species of Haemoproteus (Haemosporida, Haemoproteidae) in the biting midge *Culicoides impunctatus* (Diptera, Ceratopogonidae)., *The Journal of parasitology*, 88(5), pp. 864–8. doi: 10.1645/0022-3395(2002)088[0864:CDOTSO]2.0.CO;2.

103. Veiga J., Martínez-De La Puente J., Václav R., Figuerola J., and Valera F., 2018. *Culicoides paolae* and *C. circumscriptus* as potential vectors of avian haemosporidians in an arid ecosystem, *Parasites and Vectors*. BioMed Central Ltd., 11(1), p. 524. doi: 10.1186/s13071-018-3098-8.

104. Waldenström J., Bensch S., Kiboi S., Hasselquist D., and Ottosson U., 2002. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa., *Molecular ecology*, 11(8), pp. 1545–54. doi: 10.1046/j.1365-294x.2002.01523.x.

105. Waldenström J., Bensch S., Hasselquist D., and Östman Ö., 2004. A New Nested Polymerase Chain Reaction Method Very Efficient in Detecting Plasmodium and Haemoproteus Infections From Avian Blood, *Journal of Parasitology*, 90(1), pp. 191–194. doi: 10.1645/GE-3221RN.

106. Westerdahl H., Waldenström J., Hansson B., Hasselquist D., von Schantz T., and Bensch S., 2005. Associations between malaria and MHC genes in a migratory songbird, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society, 272(1571), pp. 1511–1518. doi: 10.1098/rspb.2005.3113.

107. Wiersch S. C., Lubjuhn T., Maier W. A., and Kampen H., 2007. Haemosporidian infection in passerine birds from Lower Saxony, *Journal of Ornithology*. Springer, 148(1), pp. 17–24. doi: 10.1007/s10336-006-0094-0.

108. Wood M. J., Childs D. Z., Davies A. S., Hellgren O., Cornwallis C. K., Perrins C. M., and Sheldon B. C., 2013. The epidemiology underlying age-related avian malaria

infection in a long-lived host: The mute swan *Cygnus olor*, *Journal of Avian Biology*, 44(4), pp. 347–358. doi: 10.1111/j.1600-048X.2013.00091.x.

109. Yorinks N., and Atkinson C. T., 2000. Effects of malaria on activity budgets of experimentally infected juvenile apapane (*Himatione sanguinea*), *The Auk*. American Ornithological Society, 117(3), pp. 731–738. doi: 10.1642/0004-8038(2000)117[0731:EOMOAB]2.0.CO;2.

110. Yoshimura A., Koketsu M., Bando H., Saiki E., Suzuki M., Watanabe Y., Kanuka H., and Fukumoto S., 2014. Phylogenetic comparison of avian Haemosporidian parasites from resident and migratory birds in Northern Japan, *Journal of Wildlife Diseases*. Wildlife Disease Association, Inc., 50(2), pp. 235–242. doi: 10.7589/2013-03-071.

111. Young D. G., and Perkins P. V., 1984. Phlebotomine sand flies of North America (Diptera: Psychodidae), *Mosquito News*, 44(2), pp. 263–304. Available at: <https://www.biodiversitylibrary.org/part/131901> (Accessed: 11 April 2020).

112. Yu C. Y., and Wang J. S., 2001. Role of chicken serum in inhibiting *Leucocytozoon caulleryi* development in *Culicoides arakawae* infected by membrane-feeding of infective blood meals, *Parasitology Research*. Springer, 87(9), pp. 698–701. doi: 10.1007/s004360100398.

113. Zamora-Vilchis I., Williams S. E., and Johnson C. N., 2012. Environmental Temperature Affects Prevalence of Blood Parasites of Birds on an Elevation Gradient: Implications for Disease in a Warming Climate, *PLoS ONE*. Edited by J. D. Brown. Public Library of Science, 7(6), p. e39208. doi: 10.1371/journal.pone.0039208.

114. Zhang Y., Wu Y., Zhang Q., Su D., and Zou F., 2014. Prevalence patterns of avian Plasmodium and Haemoproteus parasites and the influence of host relative abundance in Southern China, *PLoS ONE*. Public Library of Science, 9(6). doi: 10.1371/journal.pone.0099501.

115. Žiegytė R., Bernotienė R., Palinauskas V., and Valkiūnas G., 2016. *Haemoproteus tartakovskiyi* (Haemoproteidae): Complete sporogony in *Culicoides nubeculosus* (Ceratopogonidae), with implications for avian haemoproteid experimental research, *Experimental Parasitology*. Academic Press Inc., 160, pp. 17–22. doi: 10.1016/j.exppara.2015.11.003.

116. Žiegytė R., Markovets M. Y., Bernotienė R., Mukhin A., Iezhova T. A., Valkiūnas G., and Palinauskas V., 2017. The widespread biting midge *Culicoides impunctatus* (Ceratopogonidae) is susceptible to infection with numerous *Haemoproteus* (Haemoproteidae) species, *Parasites & Vectors*. BioMed Central Ltd., 10(1), p. 397. doi: 10.1186/s13071-017-2317-z.

117. Žiegytė R., and Valkiūnas G., 2014. Recent advances in vector studies of avian haemosporidian parasites, *Ekologija*, 60(4), pp. 73–83.

PRIEDAI

PRIEDAS NR. 1

Tyrimo metu skirtingų rūšių suaugusių paukščių ir jauniklių kraujo mėginiuose nustatytos paukščių hemosporidinių parazitų genetinės linijos pagal gentis. Šalia genetinės linijos kodo yra parašyta rūšis, kuriai ši linija priskiriama. Paryškintai pažymėtos linijos, kurios MalAvi duomenų bazės duomenimis nėra aptiktos Kuršių nerijoje parazituojančios konkrečių paukščių rūšių. Lentelėje pateikti duomenys apie tas paukščių rūšis, kurių mėginiuose buvo nustatyti užsikrėtimai hemosporidijomis. Skliausteliuose nurodytas tyrimo metu nustatytas konkrečia linija užkrėstų mėginių skaičius.

Paukščio rūšis	<i>Haemoproteus</i> genties hemosporidijų genetinės linijos		<i>Plasmodium</i> genties hemosporidijų genetinės linijos		<i>Leucocytozoon</i> genties hemosporidijų genetinės linijos	
	Suaugę paukščiai	Jaunikliai	Suaugę paukščiai	Jaunikliai	Suaugę paukščiai	Jaunikliai
<i>Ficedula hypoleuca</i>	COLL2 - <i>H. pallidus</i> (1)		GRW02 - <i>P. ashfordi</i> (1)			
	PFC1 - <i>H. pallidus</i> (18)		GRW09 - <i>Plasmodium</i> sp. (1)			
	COLL3 <i>H. balmorali</i> (1)		RTSR1 - <i>Plasmodium</i> sp. (1)			
	PHSIB1 - <i>H. majoris</i> (6)		SYAT24 - <i>Plasmodium</i> sp. (1)			
	WW2 - <i>H. majoris</i> (1)					
<i>Muscicapa striata</i>	SFC1 - <i>H. balmorali</i> (2)					

	SFC10 - <i>Haemoproteus sp.</i> (1)	PARUS1 - <i>H. majoris</i> (1)				
	SFC3 - <i>H. pallidus</i> (2)					
<i>Parus major</i>	PARUS1 - <i>H. majoris</i> (9)	PARUS1 - <i>H. majoris</i> (5)	TURDUS1 - <i>P. circumflexum</i> (1)	SGS1 - <i>P. relictum</i> (3)	PARUS4 - <i>Leucocytozoon sp.</i> (1)	
	PHSIB1 - <i>H. majoris</i> (2)	PARUS10 - <i>Haemoproteus sp.</i> (1)				
	WW2 - <i>H. majoris</i> (2)	PHSIB1 - <i>H. majoris</i> (5)				
		WW2 - <i>H. majoris</i> (1)				
<i>Cyanistes caeruleus</i>	PARUS1 - <i>H. majoris</i> (9)	CWT4 - <i>H. majoris</i> (1)	GRW11 - <i>P. relictum</i> (1)		PARUS4 - <i>Leucocytozoon sp.</i> (1)	PARUS15 - <i>Leucocytozoon sp.</i> (1)
	WW2 - <i>H. majoris</i> (1)	PARUS1 - <i>H. majoris</i> (16)				
		PHSIB1 - <i>H. majoris</i> (2)				
<i>Periparus ater</i>	PARUS1 - <i>H. majoris</i> (1)					
<i>Poecile palustris</i>		PARUS1 - <i>H. majoris</i> (1)				
		PHSIB1 - <i>H. majoris</i> (1)				