

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra parazitologie**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Klára Poloprutská

**Trypanosomy zelených skokanů (rod *Pelophylax*)**

Trypanosomes of green frogs (genus *Pelophylax*)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: doc. RNDr. Jan Votýpka, Ph.D.

Praha 2022

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 10. 8. 2022

Podpis:

## **Poděkování**

Na prvním místě bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Janu Votýpkovi, Ph.D. za veškerý čas, který mi věnoval během celého studia, za jeho cenné rady, za veškerou pomoc a za odpovědi na každou mou otázku. Bez něj by tato práce nikdy nemohla vzniknout. Moc bych chtěla poděkovat také Mgr. Káje Volfové za poskytnuté komáry a její čas věnovaný pro mé experimenty s nimi spojenými. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Peterovi Mikulíčkoví, PhD. a Mgr. Danielovi Jablonskému, PhD. za dodání velkého množství vzorků nejen z Balkánu a za možnost se účastnit odchyty a odběru krve skokanů v terénu, RNDr. Lukášovi Cholevovi, PhD za možnost se účastnit všech jejich pitev a Mgr. Vojtěchovi Balážovi, PhD. za poskytnutí vzorků ze skokanů. Bez nich by tato práce nevznikla v takovém rozsahu. Děkuji také Honzovi za jeho neustávající podporu, i přes mé časté dotazy, když mi něco nefungovalo. A za podporu mých kamarádů, a také mé rodiny, především rodičů, bez kterých bych se nedostala až sem.

## Abstrakt

Žabí trypanosomy představují první pozorované a následně popsané trypanosomy a *Trypanosoma rotatorium* ze zelených skokanů je typovým druhem celého rodu *Trypanosoma*. I přes jejich prvenství v rámci popisu mezi ostatními trypanosomami se jim věnuje v současné době jen málo pozornosti, přestože se v žabách vyskytují s překvapivě vysokou diverzitou a prevalencí. U žabích trypanosom, které jsou často nápadně větší než savčí druhy, je známá stále nevysvětlená vysoká míra polymorfismu a pleomorfismu. Díky obojživelnému způsobu života jsou za přenašeče žabích trypanosom považovány jak vodní pijavice, tak suchozemský krevsající hmyz. Tato diplomová práce, která má za cíl rozšířit znalosti o této opomíjené skupině trypanosom, je zaměřena na trypanosomy zelených skokanů (rod *Pelophylax*), a to ve střední Evropě a na Balkánském poloostrově. U 981 jedinců byla zjištěna celková prevalence dosahující 71 % a celkově bylo detekováno třináct druhů trypanosom, z toho osm je pro vědu nových. Signifikantně větší diverzita byla zjištěna u žab na Balkánském poloostrově, naopak hostitelská specifita trypanosom pro jednotlivé vyšetřované druhy skokanů se neprokázala. V této práci se mi nepodařilo jednoznačně prokázat vztah mezi morfospecies a genospecies, naopak vzhledem k velké morfologické variabilitě a častým směsným infekcím považují morfologii krevních stádií za málo vhodný nástroj pro determinaci druhů trypanosom. Protože se odchov batrachofilního komára druhu *Culex territans* nezdařil, byly experimentální infekce axenickými kmeny pěti druhů trypanosom provedeny s mamaliofilními druhy komárů *Cx. pipiens* f. *molestus*, *Cx. quinquefasciatus* a *Aedes aegypti*.

**Klíčová slova:** *Trypanosoma*, *Pelophylax*, zelení skokani, diverzita, prevalence, hostitelská a geografická specifita, morfologie, komáři, přenos

## Abstract

Anuran trypanosomes are the first ever observed and described trypanosomes and *Trypanosoma rotatorium* from frogs of the genus *Pelophylax* is a type species of the genus *Trypanosoma*. Despite the early discovery, they are being neglected in terms of current descriptive studies when compared to other trypanosomes, although their diversity and prevalence in anurans are quite high. Anuran trypanosomes, which are significantly larger than their mammal relatives, display a high rate of polymorphism and pleiomorphism; however, without any explanations. Because of the amphibious nature of frogs, the vectors of anuran trypanosomes are both aquatic leeches and terrestrial bloodsucking insects. This thesis which aims at widening the scope of knowledge about this neglected group of trypanosomes focuses on trypanosomes from frogs of the genus *Pelophylax* found in Central Europe and the Balkan Peninsula. An overall prevalence of 71% was found in 981 individuals and a total of thirteen trypanosome species were detected, eight of which are new to science. Significantly higher diversity was found in frogs originating from the Balkan Peninsula; however, no host specificity of trypanosomes was detected. It was not possible to unambiguously prove the relationship between morphospecies and genospecies. On the contrary, I do not consider the morphology of blood forms as a usable tool for determining species of trypanosomes because of large variability and often occurring mixed infections. As the rearing of the batrachophilic mosquito species *Culex territans* failed, experimental infections of axenic strains of five trypanosome species were performed with the mammaliophilic species *Cx. pipiens* f. *molestus*, *Cx. quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*.

**Keywords:** *Trypanosoma*, *Pelophylax*, green frogs, diversity, prevalence, host and geographic specificity, morphology, mosquitoes, transmission

# Obsah

<b>1 Úvod a cíle práce .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literární přehled .....</b>	<b>3</b>
2.1 Trypanosomy obojživelníků .....	3
2.2 Morfologie trypanosom obojživelníků .....	4
2.3 Přenašeči trypanosom obojživelníků .....	6
2.3.1 Pijavice .....	7
2.3.2 Krevsající hmyz .....	8
2.3.2.1 Komáři .....	8
2.3.2.2 Flebotomové .....	9
2.3.2.3 Rod <i>Corethrella</i> (koretra) .....	9
2.4 Životní cyklus trypanosom obojživelníků .....	10
2.4.1 Vývoj v obratlovcích .....	10
2.4.2 Vývoj v přenašečích .....	11
2.5 Fylogenetické postavení trypanosom obojživelníků .....	12
2.6 Zelení skokani rodu <i>Pelophylax</i> .....	15
<b>3 Materiál a metodika .....</b>	<b>16</b>
3.1 Sběr a původ vzorků .....	16
3.2 Odběr krve skokanům .....	18
3.3 Molekulární detekce trypanosom z tkání a krve .....	19
3.3.1 Izolace DNA .....	19
3.3.2 Testování PCR premixů .....	19
3.3.3 PCR detekce trypanosom .....	20
3.3.3.1 Konvenční PCR .....	20
3.3.3.2 Nested PCR .....	20
3.3.4 Elektroforéza .....	21
3.4 Sekvence pozitivních vzorků .....	21
3.5 Tvorba fylogenetického stromu .....	22
3.6 Kultivace trypanosom .....	23

3.6.1 Kultivační médium .....	24
3.6.2 Kryoprezervace.....	24
3.7 Mikroskopie .....	24
3.7.1 Světelná mikroskopie .....	24
3.7.2 Elektronová mikroskopie (TEM).....	25
3.8 Experimentální sání .....	25
3.9 Pívy komárů.....	26
3.10 Kolonizace komárů <i>Culex territans</i> .....	27
3.11 Statistické vyhodnocení .....	27
<b>4 Výsledky .....</b>	<b>28</b>
4.1 Detekce a prevalence trypanosom u zelených skokanů .....	28
4.2 Testování tkání na přítomnost trypanosom.....	31
4.3 Diverzita trypanosom u zelených skokanů .....	31
4.3.1 Fylogenetická analýza žabích trypanosom .....	32
4.3.2 Odhad druhové bohatosti.....	34
4.4 Hostitelská specifita .....	35
4.5 Geografická specifita .....	39
4.6 Morfologie trypanosom .....	40
4.6.1 Krevní formy .....	40
4.6.2 Morfologické formy trypanosom v kultuře .....	42
4.6.3 Rozlišení druhů na základě velikosti kinetoplastu.....	43
4.7 Experimentální infekce komárů .....	46
4.7.1 Intenzita infekce .....	47
4.7.2 Lokalizace trypanosom v komárech .....	49
4.7.3 Morfologické formy trypanosom v komárech.....	50
<b>5 Diskuze .....</b>	<b>53</b>
5.1 Prevalence trypanosom u zelených skokanů.....	53
5.2 Výskyt trypanosom v různých tkání .....	55
5.3 Druhová diverzita trypanosom.....	56

5.4 Hostitelská a geografická specifita .....	57
5.5 Morfologie trypanosom v hostitelích a v kultuře .....	58
5.5.1 Krevní formy .....	58
5.5.2 Stádia v kultuře .....	59
5.5.3 Rozlišení druhů na základě velikosti kinetoplastu.....	59
5.6 Experimentální infekce komárů .....	61
<b>6 Závěr.....</b>	<b>65</b>
<b>7 Seznam literatury .....</b>	<b>66</b>

# Seznam zkratek

*A.* – *Aedes*

**BLAST** – Basic Local Alignment Search Tool

*Cx.* – *Culex*

**DMSO** – dimethylsulfoxid

**DNA** – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

**DPI** – dny po sání/infekci (days post inoculation/infection)

**EDTA** – ethylendiamintetraoctová kyselina

**HG** – hindgut (proctodeum), část střeva komára

**MG** – midgut (mesenteron), část střeva komára

**NCBI** – Národní centrum pro biotechnologické informace (National Center for Biotechnology Information)

**SDS** – dodecylsírán sodný

**SSU rRNA** – gen malé ribozomální podjednotky (18S rRNA)

*P.* – *Pelophylax*

**PCR** – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

**RPM** – otáčky za minutu (revolutions per minute)

*T.* – *Trypanosoma*

**TAE** – tris acetát-EDTA

**TEM** – transmisní elektronová mikroskopie

**ÚŽFG AV ČR** – Ústav živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR

# 1 Úvod a cíle práce

Rod *Trypanosoma* patřící do třídy Kinetoplastea zahrnuje přes pět set popsáných druhů parazitujících u všech tříd obratlovců. Nejstudovanějšími jsou lidské trypanosomy a trypanosomy hospodářských zvířat způsobující závažná onemocnění jako jsou Chagasova choroba (*T. cruzi*), spavá nemoc (*T. b. gambiense* a *rhodesiense*), nagana (*T. b. brucei*, *T. congolense* a *T. vivax*) a další. Naopak trypanosomám vyskytujícím se u volně žijících zvířat se věnuje jen zlomek pozornosti, přestože právě u těchto hostitelů dosahují trypanosomy největší diverzity. Nejinak je tomu i u trypanosom obojživelníků, a to i přesto, že úplně první druhy trypanosom byly popsány právě u této skupiny obratlovců, a to už před více než 170 lety.

Celkem bylo u obojživelníků popsáno přes 66 druhů trypanosom, pojmenování těchto trypanosom však vychází především z morfologie jejich krevních stádií případně předpokládané hostitelské specifity. U této skupiny trypanosom je nicméně známá vysoká míra polymorfismu a pleomorfismu, která mohla autory vést k nesprávnému popisu nových nálezů či chybnému přiřazení k již existujícím druhům. Postupem času do taxonomie trypanosom začaly zasahovat molekulární studie, které popis nových a synonymizaci stávajících druhů začaly upřesňovat. Navíc byla prokázána blízká příbuznost trypanosom z žab a ryb, které společně tvoří takzvaný vodní klad trypanosom, tedy těch, u kterých hostitelé tráví alespoň část života ve vodě. Za vzájemnou příbuzností těchto dvou skupin trypanosom stojí částečně i jejich společný přenašeč – pijavice. Kvůli obojživelnému způsobu života však využívají žabi trypanosomy také přenašeče terestrické, do nichž lze zahrnout různé zástupce dvoukřídlého hmyzu.

Nejen polymorfismus a pleomorfismus vnáší značnou nejistotu při popisu jednotlivých zástupců této skupiny trypanosom, ale i velmi časté směsné infekce různými druhy u jednoho hostitele vedou ke značným komplikacím při výzkumu přirozeně nakažených obojživelníků. Navíc naprostá většina studií zaměřená na výskyt trypanosom u žab a využívající molekulární metody pochází z Nového světa, naopak z Evropy pochází pouze jediná studie, která naznačuje, že i u nás je značná diverzita žabích trypanosom.

Výše uvedené skutečnosti jsou důvodem vedoucím k sepsání této diplomové práce, jejíž cílem bylo zaměřit se na tuto neprávem opomíjenou skupinu trypanosom, která ještě skrývá spoustu nevyřešených otázek. Tato práce je specificky zaměřena na zelené skokany rodu *Pelophylax* ve střední Evropě a na Balkánském poloostrově, a to z důvodu vysoké prevalence trypanosom u těchto hostitelů, snadného odchytu, dostupnosti a vodního způsobu života, který je staví do role zajímavého modelu pro studium diverzity parazitů.

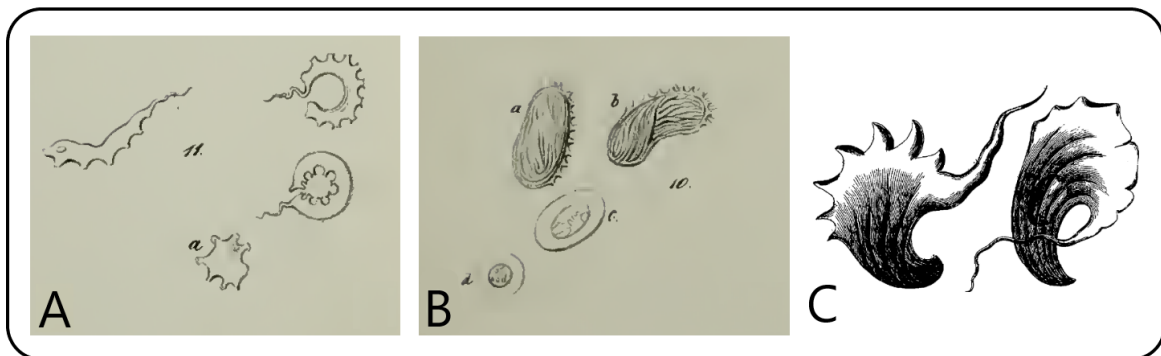
**Hlavní cíle práce:**

- Zjistit prevalenci trypanosom u zelených skokanů rodu *Pelophylax*.
- Zmapovat jejich diverzitu ve střední Evropě a na Balkánském poloostrově.
- Určit případnou hostitelskou a/nebo geografickou specifitu.
- Upřesnit vztah mezi morfologickou diverzitou a genospecies.
- Realizovat experimentální infekce komárů jako pravděpodobných vektorů.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Trypanosomy obojživelníků

Obojživelníci (bezocasí (žáby, Anura) a ocasatí (mloci a čolci, Caudata)) jsou již dlouho známí tím, že jejich krevní řečiště a některé orgány infikují trypanosomy. Úplně první trypanosomy, které kdy byly spatřeny, patřily totiž žabám. K tak časnému objevu těchto trypanosom dopomohla jejich větší velikost a tím i lepší viditelnost pod světelným mikroskopem. Mayer (1843) pozoroval dva parazity nalezené v krvi skokana zeleného (*Pelophylax esculentus*<sup>1</sup>). Popsal je jako *Paramaecium loricatum* a *Amoeba rotatoria* (viz Obrázek 1) a považoval je za nálevníka a měňavku. Později téhož roku Gruby (1843) pozoroval v krvi žáby prvoka, kterého pojmenoval jako *Trypanosoma sanguinis* a zavedl tím nový rod *Trypanosoma*. Tato trypanosoma byla později rozpoznána jako identická k *Amoeba rotatoria* a byl tak zaveden název *Trypanosoma rotatorium* (Diamond, 1965). Stejně tak byla přejmenována i *P. loricatum* na *T. loricatum*. Další krevní parazit skokana zeleného byl v roce 1871 pojmenován jako *Undulina ranarum* (viz Obrázek 1) (Lankester, 1871). I tento prvok byl zprvu zaměněn za nálevníka a teprve později přejmenován na trypanosomu. Prvotní zaměňování trypanosom za nálevníky a améby není moc překvapivé vzhledem k jejich rozmanité a pro klasické trypanosomy netypické morfologii (viz Obrázek 1 a Obrázek 2). Popis všech výše uvedených tří druhů žabích trypanosom pochází z Evropy. V současné době byly trypanosomy obojživelníků popsány z různých koutů celého světa zahrnující všechny světadíly kromě Antarktidy.

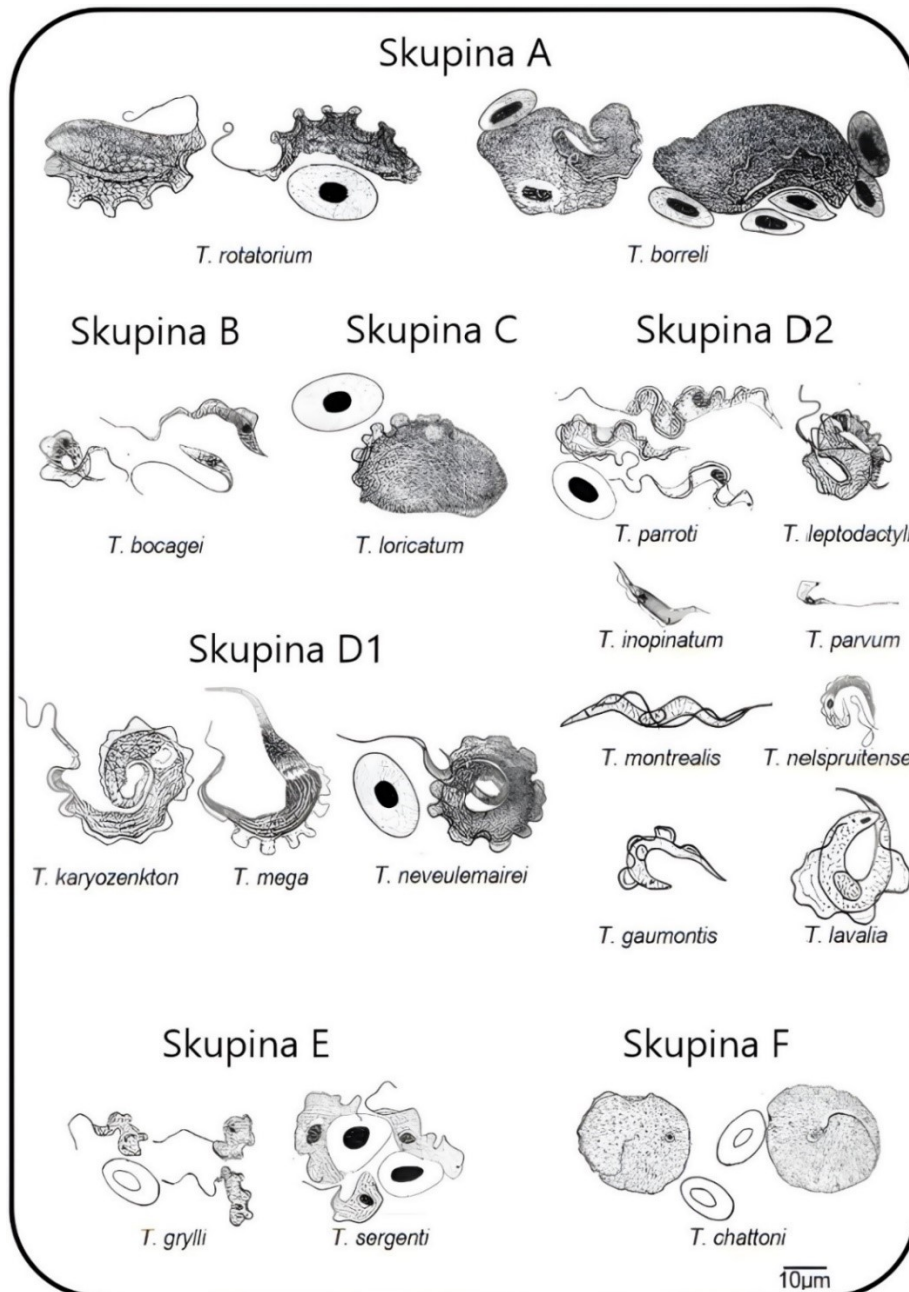


**Obrázek 1:** První popsané a zobrazené trypanosomy z žab: **A** – *Trypanosoma rotatorium* (původně popsána jako měňavka *Amoeba rotatoria*), **B** – *Trypanosoma loricatum* (původně popsána jako nálevník *Paramaecium loricatum*) (Mayer, 1843), **C** – *Trypanosoma ranarum* (původně popsána jako nálevník *Undulina ranarum*) (Lankester, 1871).

<sup>1</sup> Dříve *Rana esculenta*

## 2.2 Morfologie trypanosom obojživelníků

Trypanosomy obojživelníků vykazují vysokou rozmanitost morfologických forem. V různých studiích jsou popisovány formy štíhlé, tlusté, kulaté, oválné, nepravidelného tvaru, s volným bičíkem či bez něj (Bardsley & Harmsen, 1973). Diamond (1965) ve své rozsáhlé práci na základě morfologie rozdělil žabí trypanosomy do šesti hlavních morfologických kategorií, které ukazuje Obrázek 2. Obrázek zároveň znázorňuje velkou rozmanitost tvarů a vysokou morfologickou variabilitu, která se u žabích trypanosom vyskytuje.



**Obrázek 2:** Příklady druhů žabích trypanosom společně s jejich zařazením podle morfologických kritérií do šesti skupin podle Diamond (1965) (podle Ferreira, 2007a, upraveno).

Morfologická analýza zabývající se celkovým tvarem, velikostí, polohou a velikostí jádra, polohou kinetoplastu a délkou volného bičíku trypanosom z žab byla základem popisu mnoha nových druhů (Bardsley & Harmsen, 1973). Diamond (1965) definoval celkem 26 druhů žabích trypanosom a zařadil je do již zmíněných šesti morfologických kategorií (viz Obrázek 2), zatímco Bardsley & Harmsen (1973) do své tabulky zahrnuli celkem 54 druhů žabích parazitů rodu *Trypanosoma*. Já jsem jich ve své bakalářské práci zaznamenala celkem 66 a dalších 8 druhů vyskytujících se u ocasatých obojživelníků (Poloprutská, 2020). Nicméně nelze s jistotou říci, že se jedná o samostatné druhy. Kvůli značnému polymorfismu (jiné morfy v rámci jednoho druhu), pleomorfismu (jiné morfy v průběhu vývojového cyklu) a častých směsných infekcí (několik druhů trypanosom v jednom hostitelském jedinci) může snadno dojít k záměně a chybnému určení. V důsledku toho byly trypanosomy patřící do stejného druhu popisovány jako několik druhů nebo naopak byly nesprávně popisovány jako jeden druh kvůli identické morfologii.

Na polymorfismus poukazuje například studie zabývající se trypanosomami z čolků, kde trypanosoma *T. diemyctyli* vykazovala při změně teploty dimorfismus v experimentálně infikovaných jedincích. Při nižších teplotách (15 °C) se trypanosomy vyskytovaly v delších formách, při teplotách 20–25 °C v kratších formách. Tyto pokusy dokázaly, jak zásadní roli hraje byť jen jeden faktor v prostředí hostitele v morfologii trypanosom (Barrow, 1953). Rozdíly v morfologii v závislosti na teplotě vykazovaly také trypanosomy *T. andersoni* a *T. grylli* v rosnicičce *Dryophytes versicolor*<sup>2</sup> (Reilly & Woo, 1982c). Proto je popis druhů na základě morfologie velmi diskutabilní a v současné době samostatně spíše nepřijatelný, a proto se kombinuje s molekulárními daty.

Problematika popisování druhů žabích trypanosom je mimo jiné dobře patrná pro druh trypanosomy označované jako *T. rotatorium*. Jak již bylo řečeno, toto pojmenování žabí trypanosomy bylo poprvé použito v Evropě (Mayer, 1843). Nicméně toto označení nesou trypanosomy v různých druzích skokanů po celém světě zahrnující Severní i Jižní Ameriku, Evropu, Afriku i Asii (Mayer, 1843; Bardsley & Harmsen, 1973; Miyata, 1976; Barta & Dessler, 1984; Dessler & Yekutieli, 1986; Lemos *et al.*, 2008), a jedná se tedy o jakýsi sběrný a zástupný druh pro žabí trypanosomy. Bardsley & Harmsen (1973) *T. rotatorium* považovali za vysoce polymorfní druh a všechny jeho morfologicky podobné, vysoce polymorfní, pijavicemi přenášené trypanosomy navrhli seskupovat do *T. rotatorium* komplex. Upozorňují, že při popisu nových druhů je důležité myslet na to, že stejný druh v různých geografických místech může vypadat jinak a může se jednat jen o druh s vysokou mírou polymorfismu. Někteří autoři se kritéria popisování polymorfní *T. rotatorium* drželi (Bardsley & Harmsen, 1969; Žičkus, 2002). I přes výrazně jiné morfotypy trypanosom u různých druhů žab (skokanů zelených, hnědých i u ropuch) je autoři zařadili na základě morfologie do komplexu *T. rotatorium* (Žičkus, 2002). Ve skutečnosti existuje řada pochybností, jestli se jedná o fenotypově odlišné formy nebo o nové druhy. Například Barta *et al.* (1989) popsali několik druhů trypanosom

---

<sup>2</sup> Dříve *Hyla versicolor*

(mimo jiné i *T. rotatorium*) ze skokanů zelených (*Pelophylax esculentus*) na Korsice a usoudili, že shodná parazitofauna se vyskytuje i u severoamerických skokanů. Vysvětlují si to také tím, že se tato parazitofauna musela vyskytovat ve skokanech ještě předtím, než se oddělili a dostali na různé kontinenty (východoameričtí skokani se oddělili od evropských asi před 50 miliony let) (Hillis & Davis, 1986). Nicméně po morfologickém přezkoumání jednotlivých popisů u *T. rotatorium* došli k závěru, že v Severní Americe někteří autoři (Barta & Desser, 1984; Woo, 1969b) tuto trypanosomu jen nesprávně označili (Barta *et al.*, 1989). Aby se předešlo dalším nesprávným morfologickým popisům, Desser (2001) navrhl, aby kromě morfologických a morfometrických znaků parazita, jeho hostitele a lokality, byla popisována i stádia v přenašeči a v kultuře a podporoval myšlenku pojmenovávání nejasných druhů jako *Trypanosoma* sp.

Studii o ultrastruktuře trypanosom obojživelníků není mnoho. Většina struktur se podobá ostatním zástupcům rodu *Trypanosoma* (Reilly & Woo, 1982d; Martin & Desser, 1991a). Organely liší se hlavně velikostí představují kinetoplast a Golgiho aparát, který je oproti ostatním druhům nápadně vyvinutý (Martin & Desser, 1990; Attias *et al.*, 2016). Nicméně Desser (1976) u epimastigotů *T. rotatorium* žádný Golgiho aparát nepozoroval. Steinert & Novikoff (1960) poprvé popsali cytostom se související pinocytózou u žabí *T. mega* v přední části buňky nedaleko báze bičíku, který později pozorovalo i několik dalších autorů (Desser, 1976; Attias *et al.*, 2016, 2022). Nejen cytostom, ale i například kontraktilní vakuola se spongiem jsou důležitým znakem pro evoluční historii celé třídy Kinetoplastea. Tyto struktury jsou běžné u morfologicky velmi odlišných volně žijících příbuzných řádu Bodonida (Attias *et al.*, 2016). Attias *et al.* (2022) popsali u trypanosomy z ropuch také rezervozom, ve kterých se hromadí proteiny a lipidy prostřednictvím endocytózy. Tyto organely byly původně uváděné jako typické (jedinečné) pro *T. cruzi* a další druhy podrodu *Schizotrypanum* (Soares *et al.*, 1989).

## 2.3 Přenašeči trypanosom obojživelníků

Obojživelníci se zcela běžně vyskytují ve vodním prostředí. Některé druhy žab vodu preferují po celý svůj život (např. rod *Pelophylax* z čeledi Ranidae), jiné zase využívají vodní prostředí pouze pro své rozmnožování a po zbytek svého života se obvykle vyskytují v terestrickém prostředí (rod *Rana* z čeledi Ranidae, zástupci čeledí Bufonidae, Pelobatidae a Hylidae<sup>3</sup>) (Moravec, 2019). Jejich různorodý výskyt proto souvisí s expozicí různým krevsajícím členovcům, a tedy i přenašečům řady parazitů včetně trypanosom. Za nejčastější přenašeče, hlavně u vodních skupin obojživelníků, jsou považovány pijavice. Krevsající hmyz je zase důležitým přenašečem u zástupců vyskytujících se převážně na souši.

---

<sup>3</sup> vyjmenovaní zástupci jsou voleni s ohledem na jejich výskyt v Česku

### 2.3.1 Pijavice

Pijavice (Hirudinea) žijí v terestrickém i vodním prostředí zahrnující mořské i sladkovodní ekosystémy, kde fungují jako predátoři nebo jako ektoparazité sající krev různým druhům teplokrevných i studenkrevných obratlovců (Govedich *et al.*, 2001; Moser *et al.*, 2009). Díky tomu jsou vhodnými přenašeči parazitů. Pijavice přenášejí trypanosomy u ryb, obojživelníků, plazů (Molyneux, 1977), a pravděpodobně také u ptakopysků, u kterých byla detekována trypanosoma *T. binneyi* (Jakes *et al.*, 2001).

Trypanosomy obojživelníků byly zjištěny u vodních skupin pijavic čeledi Glossiphoniidae, Piscicolidae a Hirudinidae (Bardsley & Harmsen, 1973). Hamilton *et al.* (2005) detekovali u terestrických pijavic čeledi Haemadipsidae na základě PCR trypanosomy, které náležely do skupiny *T. cyclops* (trypanosomy z malajských primátů). Avšak do stejné skupiny náleží i izolát trypanosomy z australské žáby *Mixophyes fleayi*, na které terestrické pijavice běžně sají. Tyto nálezy naznačují, že i terestrické pijavice mohou být přenašeči žabích trypanosom.

První autor, který pozoroval vývoj žabích trypanosom v trávicím traktu pijavic, a tím poprvé diskutoval i roli těchto krevsajících bezobratlých jako vektorů, byl Billet (1904). Konkrétně se jednalo o *T. inopinatum* a pijavici *Batracobdella algira*<sup>4</sup>. Autor také poznamenal, že tato pijavice je běžným parazitem skokana zeleného (*Pelophylax esculentus*<sup>5</sup>) a předpokládal, že pijavice je přirozeným vektorem trypanosom obojživelníků. V průběhu dalších let tuto myšlenku zopakovalo několik dalších autorů. Pijavice, u kterých byl zdokumentován vývoj nebo přenos trypanosom, byly zvažovány jako pravděpodobní vektorů jak u početnější skupiny žab (Anura) zahrnující čeledi Ranidae (Diamond, 1965; Woo, 1969a; Hýsek & Žižka, 1988; Siddall & Dessler, 1992; Guseinov, 2011) a Bufonidae (Martin & Dessler, 1991a), tak i u menší skupiny ocasatých (Caudata), konkrétně mloků (Lehmann, 1952; Woo & Bogart, 1986) a čolků (Barrow, 1953). Barta & Dessler (1984) roli pijavic jako vektorů předpokládají na základě pozorování vodních skupin žab dospělých jedinců i pulců rodu *Lithobates*<sup>6</sup>. Autoři detekovali na žabách pouze jediného ektoparazitického zástupce, pijavici *Desserobdella picta*<sup>7</sup>. Zároveň tito skokani vykazovali mnohem vyšší prevalenci krevních parazitů než žáby vyskytující se hlavně v terestrickém prostředí, což naznačuje, že zmíněná pijavice je nejpravděpodobnějším vektorem. Podobnou situaci popisuje Goater (2000), který pozoroval pijavice *Oligobdella biannulata* nejčastěji na mlocích *Desmognatus quadramaculatus*, kteří vykazovali vysokou prevalenci trypanosom.

Drtivá většina studií zaměřující se na pijavice jako vektory trypanosom obojživelníků pochází ze Severní Ameriky, konkrétně z USA a Kanady (např. Diamond, 1965; Martin & Dessler, 1991a).

---

<sup>4</sup> Dříve *Helobdella algira*

<sup>5</sup> Dříve *Rana esculenta*

<sup>6</sup> Dříve rod *Rana*

<sup>7</sup> Dříve *Batracobdella picta*

V Evropě se touto problematikou zabývalo pouze pár autorů. Experimentální infekce ukázaly přenos trypanosom prostřednictvím dvou druhů pijavic *Batracobdella algira* a *Batracobdella paludosa* na skokana skřehotavého (*Pelophylax ridibundus*) a skokana zeleného (*Pelophylax esculentus*) (Hýsek & Žižka, 1988). Vývoj *T. neveulemaire*, parazitující na skokanovi skřehotavém, byl popsán v pijavici *Hemiclepsis marginata* v JZ Asii (Guseinov, 2011), nicméně zmíněný druh pijavice se vyskytuje běžně v Evropě, včetně Česka (Schenkova *et al.*, 2009; www.gbif.org).

## 2.3.2 Krevsající hmyz

Hlavním a nejznámějším přenašečem trypanosom je krevsající hmyz, a to nejenom u savců, ale i u ptáků a plazů (Molyneux, 1977). Skutečnost, že žáby vyskytující se hlavně v terestrickém prostředí vykazující silné infekce trypanosom, vedl řadu autorů k tomu, aby zvažovali krevsající hmyz jako možné přenašeče trypanosom. Za přenašeče jsou považovány samice nematocerního hmyzu řádu dvoukřídlí (Diptera), konkrétně komáři (Culicidae), flebotomové (Psychodidae: Phlebotominae) a rod *Corethrella* (Chaoboridae). Žádná studie zabývající se krevsajícími hmyzími přenašeči trypanosom obojživelníků nebyla provedena v Evropě.

### 2.3.2.1 Komáři

Druh komára, který je nejvíce spojován s přenosem trypanosom u obojživelníků, je jednoznačně *Cx. territans*. Jeho rozšíření je široké, pokrývá celou severní polokouli zahrnující Evropu, Asii a Severní Ameriku (www.gbif.org). Saje přednostně na obojživelnících (63 %), ale výjimečně pro svou potravu může využívat i plazy, ptáky a dokonce savce (Savage *et al.*, 2007). Bylo rovněž zjištěno, že samice komárů jsou lákány vokalizací samců žab (Bartlett-Healy *et al.*, 2008). Přestože byl popsán vývoj *T. rotatorium* v komárech *Cx. territans* nakažených v laboratoři a autoři poukázali na daný druh komára jako na potencionálního přenašeče žabích trypanosom (Desser *et al.*, 1973), o dva roky později to zpochybnili. Pokusili se infikovat skokana (*Lithobates pipiens*) vyvíjejícími se stádii ze střeva komárů po cca 100 hodinách od sání, ale infekce se neuchytila (Desser *et al.*, 1975). Pokud vím, tak žádná studie neprokazuje úspěšný přenos trypanosom u těchto komárů, ale Bartlett-Healy *et al.* (2009) detekovali DNA z odchycených, krví nasátých samic a zjistili, že 20 % komárů bylo nakaženo trypanosomami. Izoláty náležely do tzv. "Aquatic clade" společně s ostatními žábími trypanosomami.

Experimentální infekce ukázaly vývoj také v komárech, které přednostně nesají na obojživelnících. U komárů *Aedes aegypti* a *Cx. pipiens* se trypanosomy množily nejdéle do 96 hodin po sání na infikovaných žabách (Bailey, 1962; Ramos & Urdaneta-Morales, 1977). Autoři také úspěšně infikovali hvízdalku bolivijskou (*Leptodactylus insularum*) stádii vyskytujícími se ve střevě komára *Aedes aegypti* po dvou dnech od nákazy (Ramos & Urdaneta-Morales, 1977).

### 2.3.2.2 Flebotomové

Experimentální přenos trypanosom prostřednictvím flebotomů (*Lutzomyia vexator*<sup>8</sup>) byl potvrzen pouze u ropuch, a to konkrétně u ropuchy západoamerické (*Anaxyrus boreas*<sup>9</sup>). Infekce flebotomů trypanosomou *T. bufophlebotomi* z nakažené ropuchy a následná infekce nenakažených ropuch byla úspěšná (Anderson & Ayala, 1968; Ayala, 1970). *Lutzomyia vexator* obvykle saje na obojživelnících. Oba druhy mají noční aktivitu a sdílejí stejná místa pro svůj odpočinek. To naznačuje, že tento hmyz je pravděpodobným přenašečem trypanosom obojživelníků ve volné přírodě (Anderson & Ayala, 1968). Ferreira *et al.* (2008) molekulárně potvrdil úzký vztah mezi trypanosomami z flebotomů a z žab. Izoloval DNA z několika druhů přirozeně infikovaných samic flebotomů mikroskopicky shledaných jako pozitivní na trypanosomy. Všechny sekvence náležely do “Aquatic clade“ An03 s vysokou podobností s žabími trypanosomami.

Flebotomové jsou známí především jako významní přenašeči leishmaniózy (Roberts & Janovy, 2009). V Jižním Thajsku byla detekována DNA *Leishmania (Mundinia) martiniquensis* z flebotoma *Sergentomyia khawi* v koinfekci s trypanosomou příbuznou žabím zástupcům. Společně s dalšími 14 izoláty trypanosom z různých druhů flebotomů náleží do “Aquatic clade“ (Srisuton *et al.*, 2019) do příbuznosti trypanosomy izolované z flebotoma z Pákistánu (Kato *et al.*, 2010). Toontong *et al.* (2022) zjistili, že trypanosomy infikující gekony v Jižním Thajsku, jsou příbuzné výše zmíněným izolátům z flebotomů. Autoři spekulují, že stejné trypanosomy mohou být schopny infikovat různé druhy obratlovců zahrnující obojživelníky a plazy, a to prostřednictvím jejich vektorů.

### 2.3.2.3 Rod *Corethrella* (koretra)

V USA Johnson *et al.* (1993) detekovali u rosničky (*Dryoptes cinereus*<sup>10</sup>) trypanosomy pouze u samců a navrhli, že do přenosu trypanosom jsou zapojené samice *Corethrella wirthi*. Společně s žábami je odchyťovali při sání a detekovali u nich pozitivní infekci trypanosomami. Sice se jim nepodařilo infikovat žáby stádií trypanosom z hmyzu, ale vzhledem k noční synchronizaci parazitémie v periferní krvi a výskytu *C. wirthi*, jejich pozorovanému sání na žabách a výskytu parazitů ve střevě, se zdá rod *Corethrella* nejpravděpodobnějším přenašečem. Mnohonásobně vyšší parazitémii *T. tungarae* u samců žab než u samic zaznamenali také Bernal & Pinto (2016) u hvízdalky (*Engystomops pustulosus*) na Panamě. Vysvětlení je prosté – vokalizující samec lákající samice v období páření láká zároveň samice rodu *Corethrella* (Bernal *et al.*, 2006; Aihara *et al.*, 2016).

---

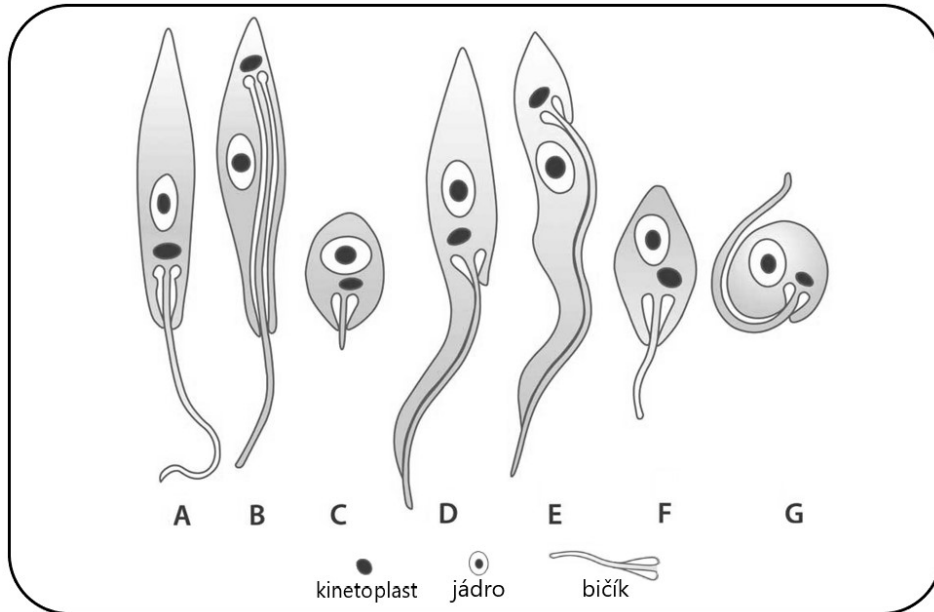
<sup>8</sup> Dříve *Phlebotomus vexator occidentis*

<sup>9</sup> Dříve *Bufo boreas halophilus*

<sup>10</sup> Dříve *Hyla cinerea*

## 2.4 Životní cyklus trypanosom obojživelníků

V obojživelnících a jejich vektorech se vyskytují různé morfologické typy trypanosom (viz Obrázek 3).



**Obrázek 3:** Nejčastější morfologická stádia trypanosomatid: **A** – promastigot, **B** – opisthomastigot, **C** – amastigot, **D** – epimastigot, **E** – trypomastigot, **F** – choanomastigot, **G** – sféromastigot (podle Lopes *et al.*, 2010, upraveno).

### 2.4.1 Vývoj v obratlovcích

V obratlovčím hostiteli se trypanosomy pravděpodobně vyskytují hlavně ve formě trypomastigotů. Po sání nakaženého přenašeče se metacyklická stádia přeměňují na široké buňky s velmi dobře vyvinutou undulující membránou. Tyto formy následně nahrazují štíhlejší trypomastigoti (Martin & Desser, 1991a), u kterých bylo u skokanů (*Pelophylax esculentus* a *P. ridibundus*) pozorováno, že se měnili zpátky do podoby široké (Hýsek & Žižka, 1988). V krvi hostitelů byli v některých případech detekováni také epimastigoti a sféromastigoti (Reilly & Woo, 1982c; Hýsek & Žižka, 1988).

Množení trypanosom se neomezuje pouze na krev. Dělicí se stádia byla nalezena také v játrech (Reilly & Woo, 1982c). Mohou se ale výjimečně vyskytovat také v srdci, ledvinách nebo rovněž ve slezině (Fantham *et al.*, 1942; Southworth *et al.*, 1968; Lemos *et al.*, 2013).

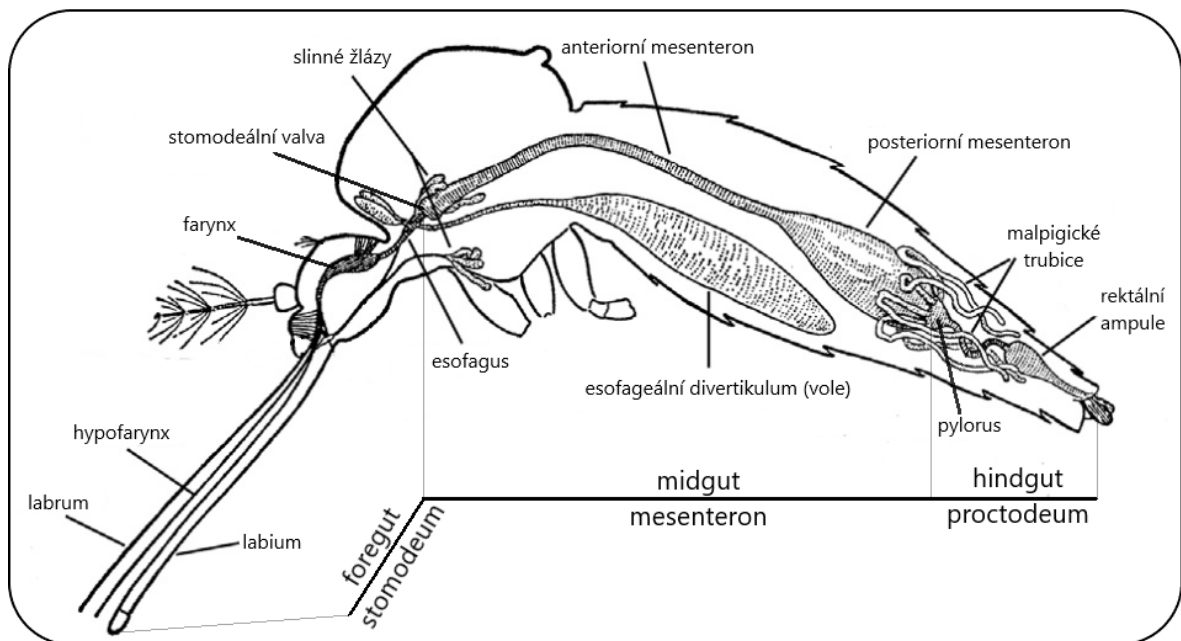
Výskyt alespoň některých trypanosom v orgánech nebo periferní krvi je ovlivňován denní fotoperiodou. Paraziti migrují ve dne do periferní krve, v noci zase do orgánů (ledvin) (Southworth *et al.*, 1968). Tento denní cyklus ovlivňuje také teplota nebo zvýšený metabolismus. Při vyšších teplotách (maximálně 26 °C) a vyšších dávkách adrenalinu byl pozorován nárůst parazitémie (Bardsley & Harmsen, 1969, 1970). Autoři zmiňují, že vyšší teplota získaná během zahřívání na souši

způsobuje efektivnější přenos trypanosom hlavně na hmyz, protože je větší pravděpodobnost kontaktu s těmito druhy přenašečů než s pijavicemi (Bardsley & Harmsen, 1969). Nicméně u rosničky (*Dryoptes cinereus*) byla parazitémie největší až po setmění. V tu stejnou dobu se začaly objevovat samice vektora žabích trypanosom, *Corethrella wirthi*, u přehrávače s nahranou žabí vokalizací (Johnson *et al.*, 1993). U trypanosom obojživelníků se vyskytuje také roční periodicita. Prevalence společně s parazitémií trypanosom v periferní krvi se na jaře postupně zvyšuje a v červnu dosahuje vrcholu (Bardsley & Harmsen, 1969; Johnson *et al.*, 1993; Bartlett-Healy *et al.*, 2009). Poté klesá (Bartlett-Healy *et al.*, 2009) nebo zůstává na vrcholu až do podzimu (Johnson *et al.*, 1993). Denní a sezónní periodicita ukazuje, že trypanosomy se v periferní krvi vyskytují v souladu s aktivitou příslušného přenašeče.

## 2.4.2 Vývoj v přenašečích

Vývoj v pijavicích probíhá u všech testovaných druhů podobně. Počáteční stádia trypomastigotů se mění na kulatější sféromastigoty, pozdější formy pak představují epimastigoty a následně metacyklické trypomastigoty, které jsou infekční pro obratlovčího hostitele (Barrow, 1953; Woo, 1969a; Reilly & Woo, 1982a; Woo & Bogart, 1986). Vytvářející se stádia se vyskytují hlavně ve střevě pijavic a jeho výběžcích, v některých případech i v proboscis (Barrow, 1953; Martin & Desser, 1991a) a výjimečně ve slinných žlázách (Lehmann, 1952). Délka celého cyklu závisí na množství potravy. Metacyklické trypanosomy se začínají tvořit až po úplném strávení potravy a rychleji při vyšší teplotě (Barrow, 1953). U velkých jedinců se proto vyskytovaly trypanosomy ve stádiu epimastigota až po dobu šesti měsíců, dokud nebyla potrava zcela strávena (Martin & Desser, 1991a). Přenos trypanosom z obojživelníka na pijavice probíhá nejen při sání (Barrow, 1953; Martin & Desser, 1991a), ale také při kanibalismu jedné pijavice druhou nebo při hromadném sání pijavic na jednom jedinci. Infikované starší pijavice společně se svými potomky sají na hostitelovi, který se nakazí, přičemž infekci následně získávají i mladé pijavice, které zůstávají přisáté po dobu několika dní i týdnů (Barrow, 1953).

Kromě výše zmíněných stádií u pijavic byli u komárů i flebotomů (*Lutzomyia vexator*, *Culex territans*) pozorováni amastigoti (Anderson & Ayala, 1968; Ayala, 1971; Desser *et al.*, 1973) i promastigoti (Anderson & Ayala, 1968). Počáteční stádia vyskytující se hlavně v midgutů migrují do hindgutů (viz Obrázek 4), kde se trypanosomy vyskytují po úplném strávení nasáté krve. Desser *et al.* (1973) ve střevě komára nepozorovali žádné metacyklické (trypomastigotní) formy a domnívají se, že infekčním stádiem by mohl být epimastigot. Není sice jisté, jak se přesně trypanosomy obojživelníků přenášejí u hmyzích vektorů, ale existuje několik možných mechanismů. Transport může být uskutečněn skrz sliny při samotném sání, prostřednictvím pozření vektora žábou nebo z trusu do rány hostitele či přes samotnou kůži (Borkent, 2008). Přenos může být také uskutečněn regurgitací, jak je předpokládáno například u ptačích druhů trypanosom (Volf *et al.*, 2004).



**Obrázek 4:** Schéma trávicího traktu komára (podle Foster & Walker, 2019, upraveno).

## 2.5 Fylogenetické postavení trypanosom obojživelníků

Taxonomie trypanosom obojživelníků byla v minulosti založená hlavně na morfologických znacích s přihlédnutím k hostitelské specifitě a geografii. Molekulárních studií bylo velmi málo (Martin *et al.*, 1992; Clark *et al.*, 1995; Maslov *et al.*, 1996). To vedlo k chaosu při popisování nových druhů, a to kvůli již zmíněné vysoké míře polymorfismu a pleomorfismu (viz kapitola: 2.2 Morfologie trypanosom obojživelníků). Od doby, co se zohledňují molekulární studie, je popis na druhové úrovni mnohem relevantnější. Nové molekulární studie totiž ukazují, že v některých případech morfologicky podobné druhy jsou fylogeneticky velmi vzdálené (Ferreira *et al.*, 2007b; Bernal & Pinto, 2016; Isaak-Delgado *et al.*, 2020).

V posledních dvaceti letech molekulární studie přibývají zvýšeným tempem a fylogenetický strom se rozrůstá o další izoláty a druhy. Trypanosomy z obojživelníků jsou řazeny společně s trypanosomami z ryb, želv a ptakopyska do tzv. “Aquatic clade“, což podporuje hypotézu koevoluce těchto trypanosom s jejich vodním přenašečem – pijavicemi (Spodareva *et al.*, 2018). Žabí trypanosomy (společně s trypanosomou izolovanou z chameleona) stojí poměrně odděleně od trypanosom ryb. Různí autoři popisují fylogenetické seskupení jednotlivých žabích trypanosom rozdílně. Ferreira *et al.* (2007b, 2008, 2015) nazývají jednotlivé klady An01 až An06, Bernal & Pinto (2016) zase Frog 1 až Frog 4. Nicméně Spodareva *et al.* (2018) ve své analýze seskupují oba předchozí typy molekulárního členění žabích trypanosom, jak ukazuje Obrázek 5. Některé studie prezentují trypanosomy z obojživelníků jako monofyletickou skupinu a seskupení jejich kladů popisují jako “Anura clade“ (Ferreira *et al.*, 2007b, 2008, 2015; Attias *et al.*, 2016), jiné zase jako

parafyletickou skupinu společně s rybími trypanosomami (Bernal & Pinto, 2016; Spodareva *et al.*, 2018).

Martin *et al.* (2002) ve své době zařadili všechny izoláty žabích trypanosom z Afriky, z Evropy a z Kanady do monofyletické skupiny, avšak sekvence *T. chattoni* (izolát ze severoamerického skokana *Lithobates pipiens*<sup>11</sup>) byla sesterská všem ostatním žabím trypanosomám a náležela mezi trypanosomy ryb. Nicméně ve fylogenetické studii využívající větší soubor rybích trypanosom již *T. chattoni* náležela do monofyla mezi ostatní žabí trypanosomy, k nim však byla sesterská (Gibson *et al.*, 2005). K *T. chattoni* jako sesterský taxon byla později přiřazena také *T. tungarae* z Panamy (Bernal & Pinto, 2016). Pozici sesterské skupiny všech nežabích trypanosom zaujala nakonec *T. loricatum* (z evropských zelených skokanů). Vzhledem k tomuto fylogenetickému postavení autoři (Spodareva *et al.*, 2018) tvrdí, že trypanosomy z obojživelníků jsou primárními hostiteli a jsou předci trypanosom z ryb (viz Obrázek 5). Tato studie je také první a jedinou studií zabývající se trypanosomami na molekulární úrovni v Evropě.

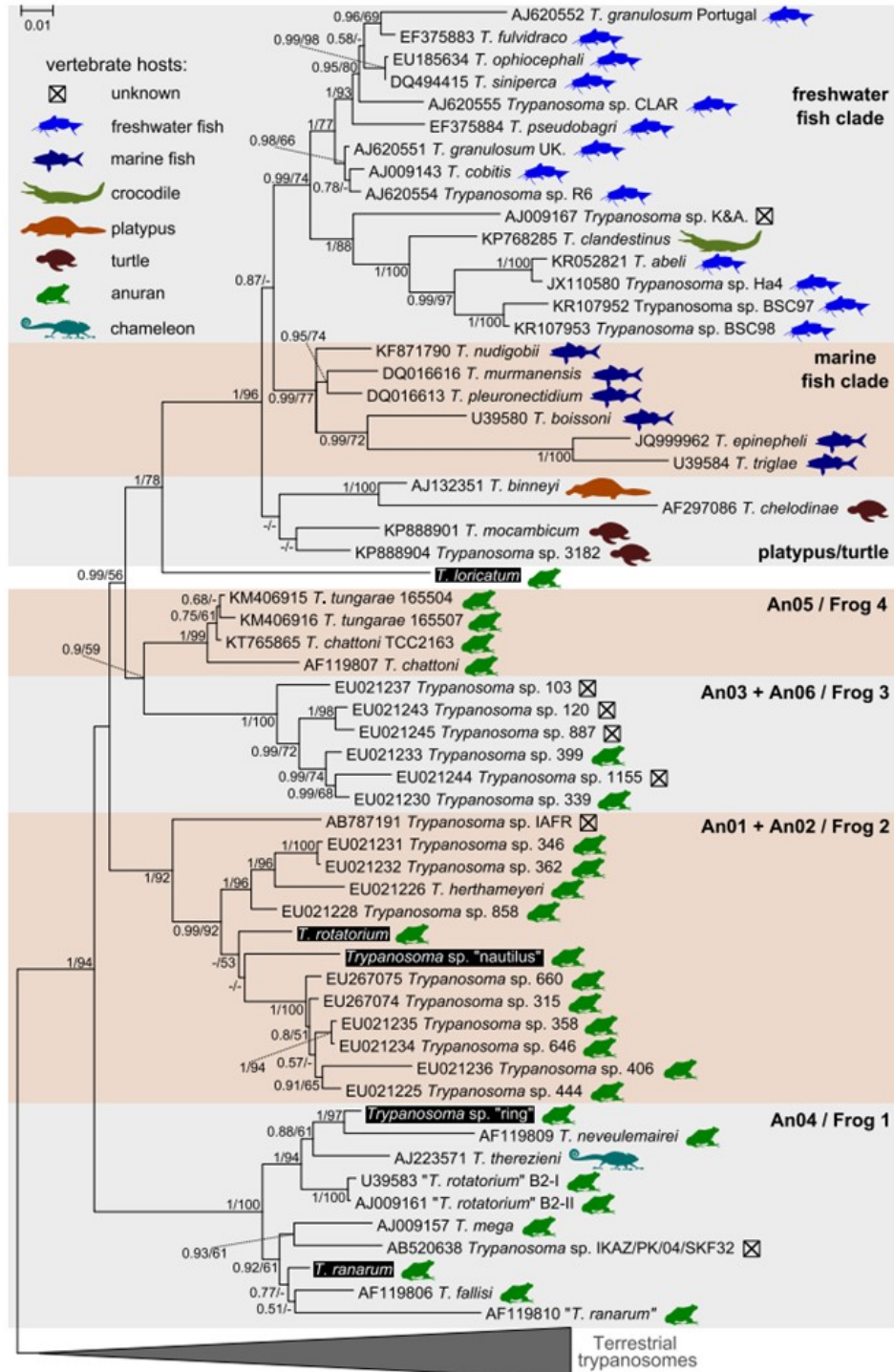
Molekulární studie také přispěly k řešení nejasností ohledně popisu *T. rotatorium*. Jak již bylo řečeno, *T. rotatorium* byla poprvé popsána v Evropě (Mayer, 1843), ale toto jméno se spojuje s žabími trypanosomami po celém světě (viz kapitola: 2.2 Morfologie trypanosom obojživelníků). První molekulárně popsaná *T. rotatorium* má původ v Kanadě a USA (Clark *et al.*, 1995; Lun & Desser, 1996). Nicméně izolát *T. rotatorium* z Evropy je molekulárně i morfologicky rozdílný od dvou výše zmíněných izolátů (B2-I a B2-II, viz Obrázek 5) ze Severní Ameriky (Barta *et al.*, 1989; Spodareva *et al.*, 2018), a vzhledem k tomu, že popis *T. rotatorium* pochází z Evropy, je zřejmé, že izoláty z Nového světa náleží novému, dosud nepopsanému druhu žabích trypanosom. K podobné situaci došlo i u *T. ranarum*, původně popsané také v Evropě (Lankester, 1871). Izoláty z USA a Evropy jsou morfologicky rozdílné, nicméně fylogeneticky příbuzné (viz Obrázek 5) (Spodareva *et al.*, 2018), avšak situace může být poněkud komplikovaná i tím, že sekvence americké *T. ranarum* (AF119810) je velmi nekvalitní.

*Trypanosoma fallisi* je hostitelsky specifická u čeledí Bufonidae a Hylidae (Martin & Desser, 1991b), nicméně je fylogeneticky příbuzná k *T. ranarum* z čeledi Ranidae (Diamond, 1965). To poukazuje na možný hostitelský přechod ze skokanů na ropuchy či naopak (Martin *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2008). K tomuto přechodu mezi hostiteli dochází pravděpodobně v důsledku opakovaného přenosu z přenašeče do nové skupiny obratlovčích hostitelů a následnému přizpůsobení se. Následně může dojít k přechodu na jiné typy přenašečů. Tento scénář naznačují např. příbuzné izoláty trypanosom z flebotomů z Jižní Ameriky tvořící jeden klad (Ferreira *et al.*, 2015). Autoři zvažují, že evoluční vzorec trypanosom z žab s vektory může souviset, tedy izoláty ze stejných přenašečů mohou být příbuzné. Fylogenetické zařazení sekvence *T. therezieni* z chameleona z Madagaskaru mezi izoláty žabích trypanosom hypotézu přechodu mezi hostiteli potvrzuje

---

<sup>11</sup> Dříve *Rana pipiens*

(viz Obrázek 5), stejně tak jako recentní nález trypanosomu u gekonů a flebotomů v jihovýchodní Asii, což naznačuje, že skrz vektora může trypanosoma infikovat jak obojživelníky, tak plazy (Kato *et al.*, 2010; Srisuton *et al.*, 2019; Toontong *et al.*, 2022).



**Obrázek 5:** *Fylogenetický strom trypanosom obojživelníků a ryb náležící do tzv. “Aquatic clade” (Spodareva et al., 2018).*

## 2.6 Zelení skokani rodu *Pelophylax*

Tato diplomová práce se zaměřuje na trypanosomy vyskytující se v zelených vodních skokanech. Tato skupina skokanů patřící do čeledi skokanovitých (Ranidae) nesla dříve označení *Rana*. Tento název zůstal platný pro suchozemské hnědé skokany, naopak vodní skokani byli přearženi do rodu *Pelophylax* (Zwach, 2009), který se vyskytuje hlavně ve Starém světě ([www.gbif.org](http://www.gbif.org)). Rod *Pelophylax* zahrnuje 22 druhů a 3 hybridy (Jablonski *et al.*, 2021). Hybridy neboli kleptoni nejsou plnohodnotnými druhy a vznikají křížením dvou rodičovských druhů. V Česku se vyskytují dva plnohodnotné druhy: skokan skřehotavý (*Pelophylax ridibundus*) a skokan krátkonohý (*Pelophylax lessonae*) a jejich hybrid, skokan zelený (*Pelophylax esculentus*) (Choleva, 2005). Mnohem větší diverzita skokanů rodu *Pelophylax*, a to včetně několika endemických druhů, se nachází na jihu Evropy, včetně Balkánského poloostrova. Pro jihozápadní část tohoto poloostrova jsou typické tři endemické druhy: skokan albánský (*P. shqipericus*), skokan balkánský (*P. kurtmuelleri*) a skokan epeiroský (*P. epeiroticus*) (Papežík *et al.*, 2021). Nicméně v různých částech Evropy je zdokumentovaná introdukce některých druhů mimo původní areál jejich výskytu. Například pro původně balkánský druh *P. kurtmuelleri* je zaznamenána introdukce a výskyt stabilních populací ve Švýcarsku, Itálii a Polsku (Dubey *et al.*, 2014; Kolenda *et al.*, 2017; Bisconti *et al.*, 2019), pro *P. shqipericus* v Itálii (Domeneghetti *et al.*, 2013) atd.

U skokanů rodu *Pelophylax* bylo popsáno mnoho parazitů od mnohobuněčných helmintů (zahrnující mj. zástupce Monogenea, Trematoda, Acanthocephala a Nematoda) až po jednobuněčné prvoky. Souhrnná práce o parazitofauně Česka a Slovenska (Vojtková, 1982) ukazuje, že ze všech našich druhů obojživelníků je konkrétně skokan zelený (*Pelophylax esculentus*) žábou s nejbohatší parazitofaunou. Vysoká prevalence různými parazity souvisí především se způsobem života těchto skokanů. A to nejen kvůli tomu, že oproti jiným druhům žab tráví většinu vegetačního období přímo ve vodě, kde je častější styk s mezipřítelci motolic, tasemnic, hlístic a vrtejšů, ale může to být důsledek jejich širokého potravního spektra bezobratlých i přítomností kanibalismu (Vojtková, 1982). Ve vodě se navíc vyskytují pijavice, přenašeči celé řady jednobuněčných prvoků (Bardsley & Harmsen, 1973; Rajabi *et al.*, 2017).

## 3 Materiál a metodika

### 3.1 Sběr a původ vzorků

Pro posouzení prevalence, diverzity, hostitelské a geografické specifity žabích trypanosom v tak rozsáhlém území jako je střední Evropa a Balkánský poloostrov byly krevní vzorky skokanů získávány z různých zdrojů. Největší část byla zasílána od Petera Mikulíčka a Daniela Jablonského z Univerzity Komenského v Bratislavě. Další vzorky byly získány při pitvách skokanů v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Liběchově pod vedením Lukáše Cholevy. Krev byla ze skokanů také odebírána na terénních exkurzích zajištěných Andrei D. Mihalca (Faculty of Veterinary Medicine, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca) v Rumunské Dunajské deltě (Chilia Veche) a Katedrou parazitologie PřF UK na terénní stanici Ruda (Veselí nad Lužnicí) v jižních Čechách. Posledním dodavatelem byl Vojtěch Baláž z Veterinární univerzity Brno. Všichni zmínění měli na odchyt a manipulaci skokanů řádná povolení v rámci svých projektů a výzkumů.

V šestnácti případech u skokanů byly místo krve získány různé tkáně, a to tehdy, kdy bylo odebrané krve málo, při pitvě dříve uhynulých skokanů nebo za účelem pro potvrzení infekce ve vnitřních orgánech. Jaterní tkáň byla vypitvána v Liběchově nebo získána z Brněnského pracoviště v podobě izolované DNA z jater. Rovněž zde byla vypitvána srdeční tkáň z několika skokanů uchovaných několik let v zamraženém stavu.

Vzorky byly zpracovávány v letech 2019–2021 v laboratoři v době, kdy byly získány. Sama jsem se účastnila celkem 51 pitev skokanů v Liběchově, na terénní stanici Ruda a v Brně. Odběru krve z živých skokanů jsem se účastnila u 32 jedinců na Slovensku a na terénní stanici Ruda.

Počet a forma získaných vzorků společně s původem žab, rokem odběru a zpracování jsou shrnuty v tabulce (viz Tabulka 1). Všechny státy, které představují původ žab, jsou znázorněny na obrázku (viz Obrázek 6).

*Tabulka 1: Seznam všech získaných vzorků zelených skokanů (rod Pelophylax).*

dodavatel/akce	ústav	počet vzorků	tkáň	forma vzorků	původ obojživelníků	rok odběru	rok zpracování
Mgr. Peter Mikulíček, PhD., Mgr. Daniel Jablonski, PhD.	Katedra zoológie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislavě	373	krev	líh	Albánie, Bulharsko, Černá hora, Kypr, Rumunsko, Řecko, Slovensko	2013- 2021	2019- 2021
		473	-	izolovaná DNA			

RNDr. Lukáš Choleva, PhD.	Laboratoř genetiky ryb, ÚŽFG AV ČR, v.v.i., Liběchov	36	krev	SDS a EDTA	Albánie, Česko, Řecko, Slovensko	2020-2021	2020-2021
		1	játra				
		3	krev + játra				
Mgr. Vojtěch Baláž, PhD.	Oddělení veterinární ekologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, VFU Brno	3	játra	izolovaná DNA	Česko	2014-2018	2021
		17	krev	líh			
		12	játra/srdce	líh			
terénní stanice Ruda	Katedra parazitologie, PřF UK	27	krev	SDS a EDTA	Česko	2018-2021	2019-2021
terénní stanice Rumunsko	Parazitologický ústav USAMV Cluj-Napoca	36	krev	SDS a EDTA	Rumunsko	2017, 2019	2019



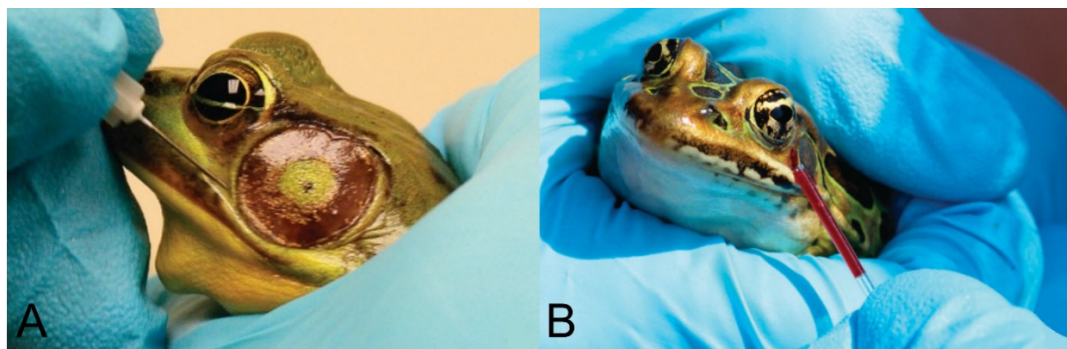
**Obrázek 6:** Mapa původu všech odebraných skokanů (© Jiří Vodáček, upraveno).

Jak již bylo uvedeno, v Liběchově probíhaly pitvy skokanů ve spolupráci s RNDr. Lukášem Cholevou, PhD. Skokani byli po dovozu z různých zemí Evropy (viz Tabulka 1) uchováni ve velkých kádích, kde se společně vyskytovali také s larvami komárů (ústní sdělení). Pro vyloučení možného přenosu trypanosom prostřednictvím komárů v tamním prostředí bylo testováno šest skokanů odchovaných přímo v Liběchovských nádržích. Všichni byli negativní. Tito skokani nejsou započítáváni do celkového počtu skokanů a sloužili jako kontrola.

### 3.2 Odběr krve skokanům

Většina vzorků mi byla dodána, ale osobně jsem měla možnost se podílet na některých krevních odběrech skokanů. V letech 2020–2021 jsem se účastnila většiny pitev v Liběchově, kde jsem krev získávala inzulinovou stříkačkou ze zátylku čerstvě zabitých skokanů. Pro možnost pozorování morfologických forem byla kapka odebrané krve ihned rozetřena na podložní sklíčko (2–3 kusy). Další kapka byla přidána do fyziologického roztoku na další podložní sklíčko, které sloužilo k pozorování živých stádií trypanosom. Část krve byla přenesena do skleněné lahvičky s gumovým uzávěrem a s kultivačním médiem a zbytek krve byl vložen do předem připravených 1,5 ml zkumavek s ethylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA) a dodecylsíránem sodným (SDS). S krví se muselo pracovat rychle, a to kvůli rychlé srážlivosti žabí krve. Stejný postup se opakoval při terénním kurzu na Rudě v roce 2021.

Odběru krve ze živých skokanů jsem se účastnila v roce 2021 na Slovensku u Veľkolélského ostrova na Dunaji s Peterem Mikulíčkem. Skokani byli odchyceni večer po setmění díky menší plachosti pomocí rukou. Přes noc byli uchováni ve velkých nádobách s vodou a až druhý den jim byla odebrána krev. Inzulinovou stříkačkou byla opatrně nabodnuta céva pod okem, vytékající krev byla následně nabírána jehlou (viz Obrázek 7). Kapka krve byla ihned rozetřena na sklíčko, část krve byla vložena do skleněných lahviček s médiem pro kultivaci a zbytek krve byl vložen do 1,5 ml zkumavky naplněné lihem. Skokani byli po několikahodinovém zotavení vypuštěni zpátky na místo odchyty. Krev z živých skokanů byla sbírána také na Rudě stejného roku s rozdílem uchování krve v SDS/EDTA.



**Obrázek 7:** Metoda odběru krve z živých žab. Inzulinovou stříkačkou je nabodnuta tkáň pod okem (A), následně je vytékající krev sbírána (v našem případě jehlou) (B) (podle Forzán et al., 2012).

## 3.3 Molekulární detekce trypanosom z tkání a krve

### 3.3.1 Izolace DNA

Izolace DNA se částečně lišila u vzorků krve uchovaných v lihu, v SDS/EDTA, z kultivací nebo z tkání. V prvním případě musel být líh důkladně odstraněn. Po centrifugaci (1 min/ 8000 RPM) byl líh nejdříve slit, po druhé centrifugaci pipetou opatrně odebrán. Otevřené zkumavky s krví se následně inkubovaly v termobloku vyhřátém na 37 °C, kde zůstaly několik minut, dokud se zbylý alkohol zcela nevypařil. Krev byla poté rozpuštěna v 200 µl fyziologického roztoku. Další postup se shodoval s protokolem pro DNeasy Blood & Tissue Kit od QIAGEN, podle kterého probíhala extrakce DNA i u vzorků krve uložených v SDS/EDTA a u buněk z kultivací. Tkáně byly zpracovávány podle protokolu (stejného kitu) na zpracování tkání, který se lišil hlavně v delší inkubaci kvůli dostatečné lyzi tkáně.

V případě velmi malého množství krve byl použit QIAamp DNA Mini Kit (rovněž od QIAGEN), pro jeho lepší citlivost.

U všech vzorků byla DNA eluována do 80 µl směsi elučního roztoku a vody v poměru 1:4 (a to proto, aby bylo možné do PCR reakce přidávat větší objem) a následně uchována při teplotě -20 °C pro další použití.

### 3.3.2 Testování PCR premixů

Pro určení nejvhodnější a nejcitlivější metody pro plošné testování krevních a tkáňových vzorků na přítomnost trypanosom byly testovány čtyři druhy PCR premixů: Top-Bio PPP Master Mix, KAPA2G Robust HotStart® PCR Kit, PrimeSTAR MAX Premix a EmeraldAmp GT PCR Master Mix.

V šesti případech po negativních výsledcích s Emerald a TOP BIO, vyšly 2 vzorky pozitivní s PrimeStar MAX, který se ukázal i v následujících experimentech jako nejcitlivější. KAPA byl testován u 5 vzorků, které byly dříve detekované jako pozitivní s Emeraldem, nicméně pozitivně vyšel pouze jeden, proto byl tento premix vyloučen. Pro ukázání rozdílů mezi TOP BIO a Emerald bylo otestováno 35 vzorků. 5 z nich bylo negativních v obou případech, nicméně ve 3 případech byly vzorky pozitivní pouze s premixem Emerald. Bylo proto rozhodnuto, že pro přípravu PCR bude použit EmeraldAmp GT PCR Master Mix a u negativních vzorků bude proces zopakován s PrimeSTAR Max Premix, který byl ověřen jako citlivější s lepší detekcí i při velmi malém množství cílové DNA (nicméně je výrazně dražší, a proto nebyl používán plošně u všech vzorků). V rámci všech testovaných vzorků bylo zjištěno, že z celkem 352 negativních vzorků s premixem Emerald bylo v následném opakování 68 (tedy přibližně jedna pětina) pozitivních s premixem PrimeStar.

### 3.3.3 PCR detekce trypanosom

Izolovaná celková DNA byla následně použita pro amplifikaci genu malé ribozomální podjednotky (SSU; 18S rRNA). U krevních a tkáňových vzorků prostřednictvím dvoukrokové (nested) PCR metody, u které se zvyšuje šance na detekci i velmi malého množství parazitární DNA. Trypanosomy obojživelníků se v krvi vyskytují v malých koncentracích a zpracovávaná krev představuje často jen malé objemy. U každého setu reakcí byla použita negativní i pozitivní kontrola, kterou představovala DNA savčí trypanosomy.

#### 3.3.3.1 Konvenční PCR

Pro 1. krok PCR byly použity primery S762 (GACTTTTGCTTCCTCTADTG) a S763 (CATATGCTTGTTTCAAGGAC) s koncentrací 10  $\mu$ M. Množství a složení amplifikační směsi jsou shrnuty v tabulce (viz Tabulka 2) a délka jednotlivých cyklů v cycleru v tabulce (viz Tabulka 3). Tato PCR byla využita i u izolací z kultur, nicméně bez následné nested PCR. Tato jednokroková PCR byla v tomto případě dostačující vzhledem k velkému množství buněk v kulturách.

*Tabulka 2: Amplifikační směs pro 1. krok PCR.*

složka	množství
master mix	6 $\mu$ l
PCR H <sub>2</sub> O	4,5 $\mu$ l
primer mix S762 + S763	0,5 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ l

*Tabulka 3: Cyklus 1. kroku PCR v termocycleru.*

teplota	doba trvání (min)	počet opakování
95 °C	3:00	1x
95 °C	0:30	35x
55 °C	0:30	
72 °C	2:00	
72 °C	3:00	1x
12 °C	$\infty$	1x

#### 3.3.3.2 Nested PCR

Produkt 1. PCR byl využit pro nested PCR, při které byly použity vnitřní primery: TRnSSU-F2 (GARTCTGCGCATGGCTCATTACATCAGA) a TRnSSU-R2 (CRCAGTTTGATGAGCT-

GCGCCT), s koncentrací 10  $\mu\text{M}$ . Poměry amplifikační směsi jsou shrnuty v tabulce (viz Tabulka 4) a délka jednotlivých cyklů v termocycleru v tabulce (viz Tabulka 5).

*Tabulka 4: Amplifikační směs pro nested PCR.*

složka	množství
master mix	10 $\mu\text{l}$
PCR H <sub>2</sub> O	8 $\mu\text{l}$
primer mix TRnSSU-F2 + TRnSSU-R2	1 $\mu\text{l}$
DNA z 1. PCR	1 $\mu\text{l}$

*Tabulka 5: Cyklus nested PCR v termocycleru.*

teplota	doba trvání (min)	počet opakování
95 °C	3:00	1x
95 °C	0:30	34x
63 °C	0:30	
72 °C	1:50	
72 °C	5:00	1x
12 °C	$\infty$	1x

### 3.3.4 Elektroforéza

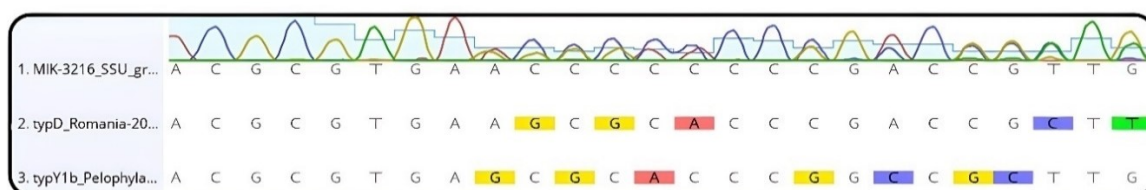
Produkt nested PCR byl dále využit na vizualizaci trypanosomové DNA metodou gelové elektroforézy. Gel byl připravován vždy 1%, tedy příslušné množství agarózy bylo rozpuštěno v TAE pufu. Po rozehrání takto připravené směsi v mikrovlnné troubě do ní bylo přidáno barvivo SYBR Green (0,1 %), které se váže na DNA a tím ji zviditelňuje pod UV světlem. Směs byla nalita do připravené vany s hřebenem tvořícím dostatečný počet jamek. Po vychladnutí gelu bylo do těchto jamek nanášeno vždy 10  $\mu\text{l}$  nested PCR, negativní i pozitivní kontrola. Stejně množství představoval i DNA Ladder (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder), který sloužil následně pro porovnání velikosti DNA fragmentů. Po ukončení elektroforézy bylo nutné zviditelnit přítomné úseky pod UV světlem. Pozitivní vzorky byly zaznamenány a uchovány pro pozdější použití. U vzorků s PrimeSTAR Max Premix bylo nutné před nanášením do jamek smíchat 10  $\mu\text{l}$  PCR produktu se 2  $\mu\text{l}$  6x DNA Loading Dye.

## 3.4 Sekvenace pozitivních vzorků

Před sekvenací pozitivních vzorků bylo nutné PCR produkt přechistit enzymem EXO-SAP. Na ledu bylo smícháno 5  $\mu\text{l}$  nested PCR s 1  $\mu\text{l}$  enzymu. Směs byla stočena a vložena do PCR termocycleru (cyklus: 37 °C 8 minut, 80 °C 2 minuty, 4 °C). Do nových zkumavek bylo k 1,5  $\mu\text{l}$  přečištěného PCR

produktu přidáno 1 µl primeru 1000R s koncentrací 10 µM a 5,5 µl vody. V případě slabšího proužku PCR produktu na gelu bylo do směsi zvýšeno jeho množství na 2,5 µl. Takto připravené vzorky byly poslány do Laboratoře sekvenace DNA v Biocevu.

Výsledné sekvence byly následně zpracovány v programu Geneious Prime® 2020.2.4. Sekvence jednotlivých vzorků byly vzájemně porovnány a unikátní sekvence byly následně porovnány prostřednictvím algoritmu BLAST s databází NCBI. Jednotlivé druhy trypanosom ve směsných (mix) infekcích byly rozlišovány manuálním odečítáním barevně rozlišených “peaků“ na chromatogramu v případě, kdy příslušná pozice obsahovala více jak jeden nukleotid (viz Obrázek 8).



**Obrázek 8:** Úsek genu SSU rRNA vzorku směsné infekce ze skokana (vzorek MIK-3216) v programu Geneious. Jednotlivé “peaky“ barevně znázorňují konkrétní nukleotidy, které se v každé pozici vyskytují. Podle těchto “peaků“ lze snadno určit konkrétní druhy. Na 2. a 3. řádce jsou znázorněny pozice nukleotidů již detekovaných druhů ve stejném úseku genu, v tomto případě typ D (*Trypanosoma sp. “nautilus“*) a typ Y1b (*Trypanosoma rotatorium*).

Vybrané vzorky s unikátními sekvencemi (ovšem pouze v případě jednodruhových infekcí) byly dále zpracovány tak, aby byla získána sekvence celé (resp. podstatné části) SSU, a to s využitím primerů 577R, 577F, 1000F, 1510R, 1510F (viz Tabulka 6).

**Tabulka 6:** Sekvence primerů malé ribozomální podjednotky (SSU rRNA).

primer	sekvence
577R	ACCGCGGGTGCTGGC
577F	GCCAGCACCCGCGGT
1000R	ATGCCTTCGCTGTAGTTCGTCT
1000F	AGACGAACTACAGCGAAGGCAT
1510R	CAGCRTCACAGACCTG
1510F	CAGGTCTGTGAYGCTG

### 3.5 Tvorba fylogenetického stromu

Pro fylogenetickou analýzu byly z databáze GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a silva (<https://www.arb-silva.de/>) staženy všechny relevantní SSU rRNA sekvence náležící do “Aquatic

clade“, které byly doplněny o reprezentativní výběr trypanosom z terestrických hostitelů tak, aby byly zastoupeny všechny skupiny a podrody, jak jsou definovány v Kostygov *et al.* (2021). Dále bylo použito celkem 13 jedinečných sekvencí žabích trypanosom získaných během této práce. Jako outgroup (který ale není zobrazen na grafickém výstupu analýz) byla zvolena sekvence *Paratrypanosoma confusum* kvůli jejímu bazálnímu postavení vůči všem zástupcům skupiny Trypanosomatida (včetně rodu *Trypanosoma*). Jednotlivé sekvence (celkem 127) byly srovnány pomocí MUSCLE 3.8.425 v programu Geneious. Výsledný alignment byl manuálně zkontrolován a zkrácen na délku 2750 nukleotidů. Pro tvorbu fylogenetického stromu vytvořeného na základě sekvencí téměř kompletní SSU rRNA byly využity tři různé výpočetní metody (ve formě modulů programu Geneious). Základní topologie stromu vychází z maximum likelihood metody (ML; PhyML 3.3.20180214; GTR), ale byly vytvořeny také další dva stromy pomocí Bayesovské (MrBayes 3.2.6; GTR, invgamma, 4 kategorie) a maximum parsimony (PAUP 4.0a) metody, které byly následně porovnány s ML stromem.

Exportovaná grafická podoba ML fylogenetického stromu byla následně zpracovávána v programu Adobe Illustrator a výsledný vzhled byl ještě upraven v programu Microsoft PowerPoint.

### 3.6 Kultivace trypanosom

Jak bylo uvedeno výše, při terénním odběru vzorků byla část krve inokulována do kultivačního média ve skleněné 5 ml lahvičce uzavřené gumovým uzávěrem (viz Obrázek 9). V laboratoři byly kultury kontrolovány po cca 2 týdny a v případě výskytu trypanosom byla část média s trypanosomami přenesena do kultivačních lahví flat-tubes, dále byly inkubovány při 23 °C a kontrolovány a přeočkovávány po 5–7 dnech do nového média a označeny o číslo větší pasáží, která byla vždy zaznamenána. Objem média v každé kultivační zkumavce byl cca 2 ml. S kulturami se pracovalo vždy ve sterilním prostředí.



**Obrázek 9:** Kultivační lahvičky používané pro kultivace v terénu. Na obrázku je kultivační lahvička pouze s tuhou složkou, tekutá složka média byla přidána před oděry (foto: autorka).

### 3.6.1 Kultivační médium

Médium pro kultivaci trypanosom, které bylo použito u všech vzorků a ve všech nádobách, obsahovalo tuhou složku ve formě krevního agaru (20 % králičí či beraní krve) a tekutou složku obsahující mix několika médií a dalších komponent, které jsou zaznamenány v tabulce (viz Tabulka 7).

*Tabulka 7: Složky tekutého média znázorněné v množství 40 ml 3 hlavních složek.*

médium/složka	RPMI-1640 Medium	Medium 199	Schneider's Insect Medium	fetální bovinní sérum	antibiotikum (amikacinum)
množství (poměr)	20 ml (2)	10 ml (1)	10 ml (1)	5 ml (0,5)	10 µl

### 3.6.2 Kryoprezervace

Všechny dostatečně narostlé kultury byly kryoprezervovány za účelem dalšího použití při experimentálních infekcích. Do kultivační láhve k připravené kultuře byl přidán dimethylsulfoxid (DMSO) do výsledné koncentrace 5–10 %. Následně bylo celé množství rozděleno do 3–4 popsanych kryozkumavek po cca 0,5 ml s příslušným označením vzorku, pasáží a datem. Takto připravené kryozkumavky byly vloženy do zamrazovací nádoby s isopropanolem do –80 °C a následující den byly přemístěny do tekutého dusíku.

Při potřebě byly kultury rozmrazeny. Ihned po vyjmutí kryozkumavek z tekutého dusíku došlo k uvolnění závitů, aby se případně přítomný dusík odpařil. Tím se předešlo nebezpečí jejich prasknutí. Poté byla zkumavka vložena do teplé vody a vyndána byla hned, jakmile kultura zkapalněla. Několik kapek rozmrazené kultury bylo přeneseno do flat-tube k 2 ml média.

## 3.7 Mikroskopie

### 3.7.1 Světelná mikroskopie

Připravený zaschlý krevní roztěr na podložním sklíčku byl nejdříve fixován 5 minut metanolem. Po důkladném zaschnutí byl obarven roztokem Giemsa-Romanowski ředěným 1:19 destilovanou vodou. Roztok byl po 20 minutách destilovanou vodou také smyt a osušen přiložením filtračního papíru. Takto připravené podložní sklíčko bylo použito pro světelný mikroskop s možností fotografování (kamera DP72). Snímky byly pořizovány pod největším zvětšením (1000x) s použitím imerzního oleje. V programu QuickPHOTO MICRO 3.0 bylo dodáno odpovídající měřítko. Roztěry kultur se

v počátku přípravy lišily. Na podložní sklíčko byl nejdříve rozetřen polylysin pro lepší adhezi buněk ke sklu, následně po jeho zaschnutí na něm byla rozetřená promytá kapka kultury ve fyziologickém roztoku (centrifugace: 1 min/ 2000 RPM). Proces barvení a focení probíhal stejnou metodou jako je uvedeno u krevního roztěru.

### 3.7.2 Elektronová mikroskopie (TEM)

Vzorky pro elektronovou mikroskopii byly připravovány z kultur a ze střev komárů nakažených trypanosomami odebraných při jejich pitvách. Dobře narostlá kultura trypanosom byla centrifugována (1 min/ 2000 RPM) a kultivační médium bylo vyměněno za fixační roztok (2,5% glutaraldehyd v 0,1 M kokadylátovém pufru/PBS). Po 24hodinové inkubaci při 4 °C byl fixační roztok nahrazen roztokem vypíracím (1,35% glutaraldehyd v 0,1 M kokadylátovém pufru/PBS). Nerozrušené střevo se silnou infekcí bylo rovnou vloženo do fixačního roztoku. Následující postup byl shodný jako u buněk z kultur. Takto připravené trypanosomy ve vypíracím roztoku byly odevzdány do Laboratoře elektronové mikroskopie PřF UK. Trypanosomy byly následně pozorovány transmisním elektronovým mikroskopem JEOL JEM-1011 a foceny CCD kamerou Veleta. U jednotlivých druhů proběhlo měření kinetoplastů, kde výsledné číslo naměřené výšky jednoho kinetoplastu udává hodnotu průměru 3–4 měření v celé jeho šířce.

## 3.8 Experimentální sání

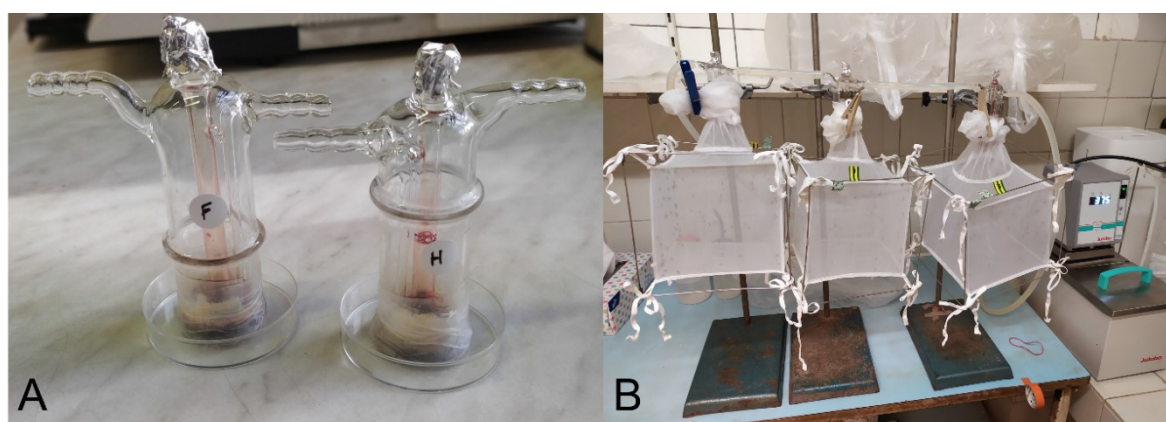
Pro experimentální sání byly využity kolonie komárů *Culex pipiens quinquefasciatus* a *Culex pipiens* f. *molestus* dlouhodobě chovaných na Katedře Parazitologie PřF UK a kolonie komárů *Aedes aegypti* poskytnuté ze Státního zdravotního ústavu v Praze.

Nejdříve byla připravena beraní krev, která byla deaktivována ve vodní lázni 35 minut při teplotě 56 °C. Pro experiment byla vždy použita dobře rostoucí kultura přeočkovaná 5–7 dní před samotným sáním z 2–3 kultivačních lahví od stejného druhu trypanosomy, které byly nejdříve zkontrolovány pod inverzním mikroskopem a následně smíchány do jedné nádoby. Kultura byla centrifugována (10 min/ 4100 RPM/ 23 °C), supernatant slit a buňky byly resuspendovány v 1 ml fyziologického roztoku. Následně bylo 10 µl takto připravené kultury naředěno 990 µl ředícího roztoku (1% formaldehyd, 0,85 % NaCl). Prostřednictvím Bürkerovy komůrky byla spočítána koncentrace trypanosom, která byla následně naředěna fyziologickým roztokem na koncentraci 10<sup>7</sup> buněk/ml. Poté byly trypanosomy naředěny připravenou deaktivovanou beraní krví v poměru 1:10 (kultura: krev) do objemu 3 ml; finální koncentrace v krvi byla tedy cca 10<sup>6</sup> buněk/ml.

Na sterilní krmítko byla sterilizovanou pinzetou natažena připravená kuřecí kůžička tak, aby vnější strana kůžičky odpovídala vnější straně krmítka. Ke krmítku byla upevněna parafilmem do

napnutí. Krev s kulturou mohla být do takto připraveného krmítka vložena plastovou pasturovou pipetou (viz Obrázek 10).

Krmítka byla následně připevněna na stojan s oběhem vody ohřáté na 37 °C. Komáři byli připraveni v sítkách na tenkých kovových konstrukcích a připevnění k oběhu minimálně na dvě hodiny (viz Obrázek 10). Po ukončení experimentu byla krev vždy mikroskopicky zkontrolována, zda se v ní stále vyskytují živé trypanosomy. Nasátí komáři byli vytříděni a následně umístěni do termostatu při 21 °C. V případě komárů rodu *Culex* jim byla do sítě připravena miska s vodou, která sloužila pro možnost nakladení vajíček nasátých samic, v případě rodu *Aedes* jim byl připraven vlhký filtrační papír. Sítě byly umístěny v plastovém obalu pro udržení vlhkosti.



**Obrázek 10:** Pomůcky pro experimentální sání: **A** – řádně popsaná, připravená krmítka s nataženou kůžičkou a krví s kulturou trypanosom, **B** – kompletní aparatura pro 3 různé druhy trypanosom nebo 3 různé druhy komárů (foto: autorka).

### 3.9 Pitvy komárů

Pitvy komárů probíhaly většinou ve třech časových bodech (DPI = days post inoculation/infection, dnů po sání/infekci): 1 DPI pro kontrolu úspěšnosti nasátí a přežití trypanosom, 3–5 DPI pro kontrolu namnožení trypanosom před defekací komárů, a po 7–22 DPI pro kontrolu přežití a namnožení trypanosom po defekaci komárů. Intenzita infekce byla rozdělena na 3 kategorie: slabá (1–100 trypanosom), střední (100–1000), silná (>1000).

Před pitvou byly samice ze sítě přeneseny pomocí exhaustoru do lihu, kde byly rychle usmrceny a neprodleně pomocí pinzety přeneseny do fyziologického roztoku. Pitvy probíhaly pod stereomikroskopem v kapce fyziologického roztoku na podložní skličku, kde byly po oddělení nohou a hlavy vypreparovány slinné žlázy a střevo. Vše bylo prohlíženo pod světelným mikroskopem s fázovým objektivem (40x), u pozitivních nálezů bylo zaznamenáno místo výskytu trypanosom, intenzita infekce a forma trypanosom (rozety/ volné buňky). U silných infekcí byl připraven roztěr

na podložní sklíčko (viz kapitola: 3.7.1 Světelná mikroskopie) a v některých případech bylo střevo připraveno na elektronovou mikroskopii (viz kapitola: 3.7.2 Elektronová mikroskopie (TEM)).

### 3.10 Kolonizace komárů *Culex territans*

Osobně jsem provedla několik neúspěšných pokusů nalézt a odlovit larvy komárů *Cx. territans*. Nakonec byly larvy těchto komárů (třetího a čtvrtého instaru; 25 jedinců) odloveny pomocí sítka na svých přirozených stanovištích RNDr. Františkem Rettichem, CSc. a převezeny do laboratoře. Zde byly přechovávány v lavorech s odstátou vodou. Larvám jako potrava sloužilo vločkové krmivo pro akvarijní ryby TetraMin®, a to až do zakuklení. Po vylíhnutí byli dospělci chováni v nylonové síti navlečené na kovovou konstrukci (20 × 20 × 20 cm) za stálých podmínek 24–26 °C a 60% vlhkosti. Třikrát týdně jim byl obměňován 30–50% roztok sacharózy vsáknutý do vaty a navlhčená vata jako zdroj potravy a tekutin. Úspěšně vylíhnutým dospělým samicím (8 jedinců) byly následně jako zdroj krve na sání nabídnuty uspané (150 mg/kg xylazinu a 15 mg/kg ketaminu) myši kmene BALB/c a bezsrsté myši kmene SKH1. Samice komárů nebyly opakovaně ochotné sát ani na jednom z myších kmenů ani na lidské ruce, proto jsme přistoupili k pokusu se dvěma druhy žab: vodní drápatkou tropickou (*Xenopus tropicalis*) a suchozemskou rosničkou zelenou (*Hyla arborea*). Žáby byly znehybněny umístěním do monofylového sáčku a v případě drápatky ponechány po celou dobu částečně ponořené ve vodě. Během opakovaných pokusů se nasály pouze dvě samice, obě na rosničce zelené. Ani jedné z nich se však nepodařilo úspěšně vyklást vajíčka do nádoby s odstátou vodou, která jim byla v chovné síťce ponechána, a uhynuly stejně jako zbytek samců a nenasátých samic. Veškerých výše zmíněných pokusů jsem se neúčastnila osobně a celou práci zajišťovala Mgr. Karolina Volfová, která mi k tomu poskytla i veškeré informace.

### 3.11 Statistické vyhodnocení

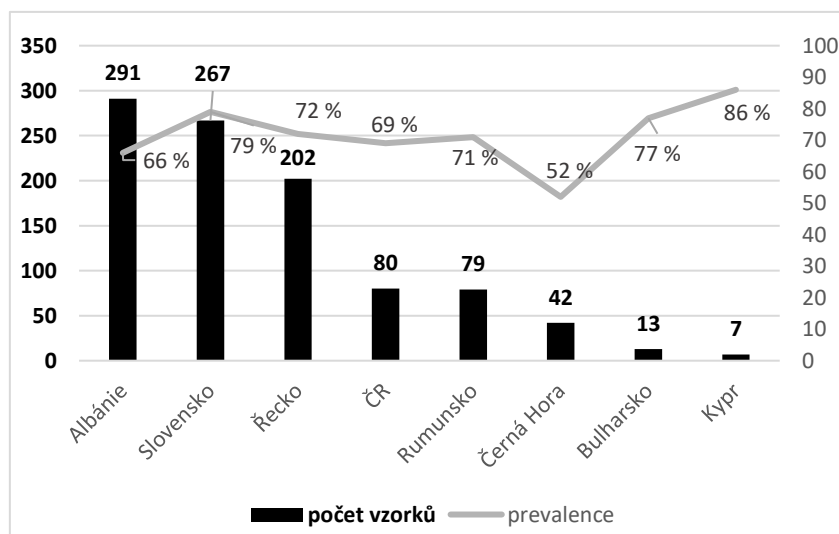
Pro výpočet statistické významnosti rozdílů v prevalenci mezi různými skupinami žabích trypanosom byl použit chí-kvadrát test ( $\chi^2$ ), kde byla signifikance nastavena na hladinu  $p < 0,05$ . Pro odhad druhové bohatosti byla vytvořena akumulací křivka na základě Chao & Chiu (2016). Pro znázornění celkového přehledu interakcí druhů trypanosom s druhy skokanů byla vytvořena kvantitativní síť podle Dormann *et al.* (2008) s balíčkem “bipartite“. Pro statistické vyhodnocení výšek kinetoplastů jednotlivých druhů trypanosom byla použita analýza variance (ANOVA) a post-hoc test mnohonásobných porovnání (Tukeyův-Kramerův test). Všechny výše zmíněné statistické operace byly provedeny v programu RStudio (verze 1.4.1106).

## 4 Výsledky

### 4.1 Detekce a prevalence trypanosom u zelených skokanů

Celkem bylo zpracováno 981 vzorků (= jedinců) náležících osmi druhům zelených skokanů rodu *Pelophylax* získaných z různých částí Evropy (viz Tabulka 8). Jak již bylo řečeno, v Česku a na Slovensku se vyskytuje komplex zelených skokanů zastupující dva základní druhy: skokana skřehotavého (*P. ridibundus*) a skokana krátkonožého (*P. lessonae*). Společně s jejich hybridem, skokanem zeleným (*P. esculentus*), představují zástupce testovaných druhů hostitelů. Na Balkánském poloostrově byli testováni na přítomnost trypanosom kromě *P. ridibundus* a *P. esculentus* také *P. epeiroticus*, *P. kurtmuelleri* a *P. shqipericus*. Další dva druhy skokanů představují endemity Kypru (*P. cypriensis*) a Kréty (*P. cretensis*). U 265 skokanů nebyl určen druh z důvodu nejasných znaků nebo nejistoty zařazení a tito jedinci jsou označeni jako *Pelophylax* sp. Já osobně jsem skokany do druhů neurčovala a spoléhala jsem se na jejich určení od spolupracujících batrachologů. Všechny druhy skokanů pocházely z osmi států střední a jižní Evropy. Tabulka 8 udává přehled o všech testovaných skokanech v jednotlivých státech zároveň s počtem pozitivních jedinců.

Ze všech vzorků jich bylo 697 pozitivních na trypanosomy, což představuje prevalenci 71 %. Graf 1 znázorňuje rozdíly v prevalenci mezi jednotlivými státy s údajem počtu zpracovaných vzorků (rozdíly v počtu testovaných jedinců v jednotlivých státech jsou až několikanásobné). Státy jsou řazeny sestupně od nejvyššího počtu odebraných vzorků, který představuje Albánie s počtem 291. Nejméně testovaných vzorků pochází z Kypru, kde bylo odebráno pouze 7 skokanů. Prevalence trypanosom u jednotlivých druhů skokanů je znázorněna v tabulce (viz Tabulka 8), kde nejmenší prevalenci (vyjma *P. cretensis*, kde všech sedm jedinců bylo negativních) zastupuje *P. shqipericus* (40 %), největší zase *P. epeiroticus* (88 %).



**Graf 1:** Prevalence trypanosom skokanů rodu *Pelophylax* v jednotlivých státech zároveň s počtem odchytených a testovaných jedinců.

Tabulka 8: Přehled všech testovaných zelených skokanů (rod *Pelophylax*) v jednotlivých státech (počet pozitivních /počet testovaných skokanů).

stát/druh skokana	<i>Pelophylax esculentus</i>	<i>Pelophylax riibundus</i>	<i>Pelophylax lessonae</i>	<i>Pelophylax shqipericus</i>	<i>Pelophylax kurmuelleri</i>	<i>Pelophylax epeiroticus</i>	<i>Pelophylax cypriensis</i>	<i>Pelophylax cretensis</i>	<i>Pelophylax</i> sp.	celkem	prevalence
Albánie	-	30/38	-	22/55	43/51	11/14	-	-	85/133	191/291	66 %
Slovensko	130/165	66/76	16/26	-	-	-	-	-	-	212/267	79 %
Řecko	-	1/5	-	-	63/85	70/78	-	0/7	11/27	145/202	72 %
Česko	3/7	10/13	2/4	-	-	-	-	-	40/56	55/80	69 %
Rumunsko	1/2	20/41	-	-	-	-	-	-	35/36	56/79	71 %
Černá hora	-	5/5	-	2/5	15/32	-	-	-	-	22/42	52 %
Bulharsko	-	-	-	-	-	-	-	-	10/13	10/13	77 %
Kypr	-	-	-	-	-	-	6/7	-	-	6/7	86 %
celkem	134/174	132/178	18/30	24/60	121/168	81/92	6/7	0/7	181/265	697/981	71 %
prevalence	77 %	74 %	60 %	40 %	72 %	88 %	86 %	0 %	68 %	71 %	

Prevalence byla zjišťována také v závislosti na věku jedinců. Porovnávání byli juvenilové (toho roku metamorfovaní jedinci), subadulti (nedospělí jedinci před dosažením pohlavní dospělosti) a adulti (dospělci). U adultů dosahovala prevalence 75 % (749 jedinců), u subadultů 45 % (95 jedinců) a juvenilů 49 % (49 jedinců); mladší jedinci byli signifikantně méně infikováni trypanosomami než dospělci ( $\chi^2 = 49,004$ ,  $p < 0,05$ ).

Pro posouzení, zda je některé pohlaví skokanů vektory upřednostňováno (a tedy má vyšší výskyt trypanosom), byla porovnána prevalence mezi samci a samicemi. Pohlaví bylo rozeznáno u dospělců i u některých juvenilů; u 171 jedinců nebylo pohlaví určeno. U samic (384 jedinců) dosahovala prevalence 74 % a u samců (423 jedinců) 72 %; rozdíl není signifikantní ( $\chi^2 = 0,572$ ,  $p = 0,449$ ).

Protože různé druhy trypanosom (viz kapitola: 4.3 Diverzita trypanosom u zelených skokanů) mohou být přenášeny odlišnými vektory, rozdíl v početnosti pozitivních jedinců mezi pohlavím skokanů byl otestovaný také s ohledem na druh zjištěných trypanosom (viz Tabulka 9). Signifikantní rozdíly byly zjištěny u typu B (*T. sp. "ring"*) a typu C (*T. ranarum*), u kterého byl zároveň zaznamenán největší rozdíl, kdy bylo nakaženo 18 % samců a 82 % samic (viz Tabulka 9).

**Tabulka 9:** Výskyt jednotlivých druhů trypanosom v závislosti na pohlaví pozitivních jedinců skokanů zelených. Trypanosoma sp. G a L byly z analýzy vyloučeny pro malý počet vzorků.

	typ Y1b	typ A	typ B	typ C	typ D	typ E	typ F	typ H	typ I	typ J	typ K
<b>samci</b>	194 (53 %)	150 (50,3 %)	9 (23 %)	6 (18 %)	162 (54 %)	20 (42 %)	17 (63 %)	8 (44 %)	15 (36 %)	2 (33 %)	14 (61 %)
<b>samice</b>	182 (48 %)	148 (49,7 %)	31 (78 %)	28 (82 %)	137 (46 %)	28 (58 %)	10 (37 %)	10 (56 %)	27 (64 %)	4 (67 %)	9 (39 %)
<b>p</b>	0,536	0,908	<b>0,0005</b>	<b>0,0002</b>	0,148	0,248	0,178	0,637	0,064	0,414	0,297

V testovaných skokanech byla zjištěna také vysoká míra směsných (mix) infekcí, kdy bylo v jednom jedinci detekováno dva a více druhů trypanosom současně. Z celkového počtu pozitivních vzorků tvořily mix infekce 71 % (single infekce 29 %). Nejvíce vzorků zastupovala infekce se dvěma druhy trypanosom (35 %), ale u jednoho jedince bylo identifikováno i šest druhů současně (viz Tabulka 10).

**Tabulka 10:** Jednodruhové a směsné infekce trypanosom u testovaných skokanů (označení >1 značí zřetelnou mix infekci, nicméně počet druhů ani o jaké druhy se jedná se nepodařilo identifikovat).

	počet druhů trypanosom v hostiteli	počet jedinců skokanů	celkové procento mix/single infekce
single infekce	1	200	29 %
mix infekce	2	243	71 %
	3	207	
	4	35	
	5	9	
	6	1	
	>1	2	

## 4.2 Testování tkání na přítomnost trypanosom

Protože se trypanosomy mohou nalézat v různých orgánech žab, a navíc v některých případech nebylo možné získat krev, byla v šestnácti případech odebrána z žab tkáň ve formě srdce nebo jater. Celkem z devíti jedinců byla získána játra, z toho čtyři byli pozitivní na trypanosomy, v jednom případě se jednalo o mix infekci. Srdcí bylo zpracováno sedm, všechna byla negativní.

U tří vzorků byly odebrány jak játra, tak krev. Po zpracování jaterní tkáně byly dva z nich pozitivní, nicméně krev ze stejných jedinců byla negativní. Poslední vzorek byl negativní v obou případech.

## 4.3 Diverzita trypanosom u zelených skokanů

Ve skokanech rodu *Pelophylax* bylo molekulárními metodami celkem detekováno 13 druhů trypanosom (molecular operational taxonomic units, MOTU) (viz Tabulka 11). Pracovní označení jednotlivých genotypů a druhů nese označení A až L a Y1b. Nicméně pro typ G se nepodařila získat dostatečně kvalitní sekvence; tento typ se vyskytoval pouze v mix infekcích, tedy tento druh není zastoupen ve fylogenetických analýzách, v ostatních analýzách zastoupen je. SSU rRNA sekvence pěti druhů (typ A až D plus Y1b) se shodovaly s již popsány a dříve identifikovanými druhy (či MOTU) na základě porovnání algoritmu BLAST v databázi NCBI a fylogenetických analýz (viz dále). V některých případech bude v následujícím textu pro již popsané (pojmenované) trypanosomy použito označení typ A, B, C, D, Y1b pro jejich praktickou zkrácenou formu. Osm druhů (typ E–L) se s žádnou sekvencí dostatečně neshoduje a jsou proto považovány za nové druhy.

Pro tři druhy bylo rozlišeno několik genotypů příslušného druhu lišící se v několika nukleotidech: typ A (*T. loricatum*) – dva genotypy, typ B (*T. sp. "ring"*) – tři genotypy, typ E –

dva genotypy. Nutno ale poznamenat, že vzhledem k použité metodice mohou být tyto odlišné sekvence (genotypy) odhaleny pouze v případě single infekcí. Typ A představoval již popsanou *T. loricatum* a jeho dva genotypy typ A2 a typ A3 se lišily od základního genotypu A každý pouze v jednom nukleotidu. Genotyp B2 se od základního typu B (= *Trypanosoma* sp. “ring“) lišil ve 4 nukleotidech. Genotyp E2 se od typu E lišil ve 2 nukleotidech.

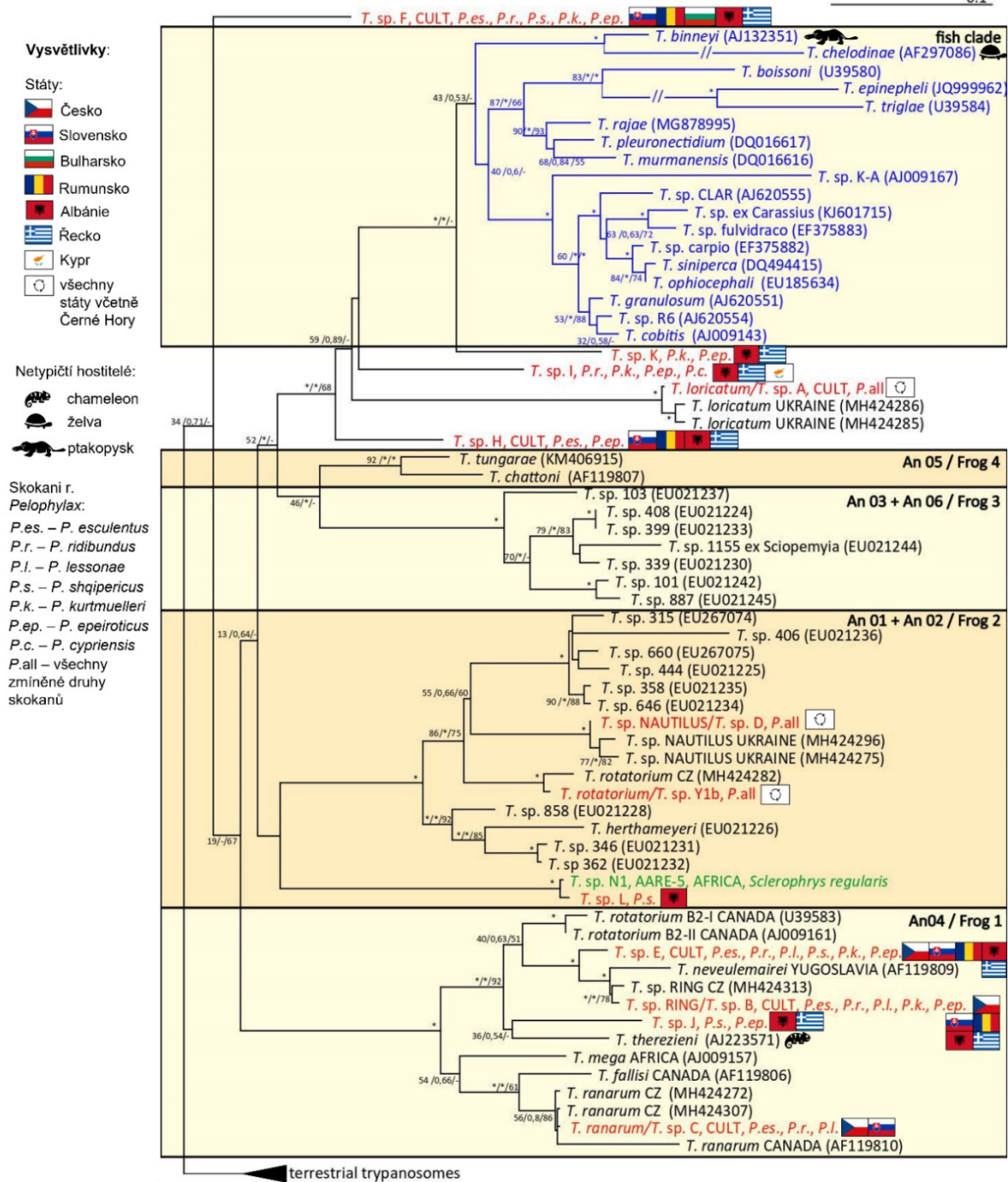
**Tabulka 11:** Přehled všech druhů (MOTU, molecular operational taxonomic units) a genotypů trypanosom vyskytujících se u testovaných skokanů.

označení genotypů trypanosom	počet skokanů s daným genotypem	druh
typ A	371	* <i>Trypanosoma loricatum</i>
typ A2	20	
typ A3	1	
typ B	46	* <i>Trypanosoma</i> sp. “ring“
typ B2	19	
typ C	36	* <i>Trypanosoma ranarum</i>
typ D	352	* <i>Trypanosoma</i> sp. “nautilus“
typ Y1b	418	* <i>Trypanosoma rotatorium</i>
typ E	58	<i>Trypanosoma</i> sp. E
typ E2	1	
typ F	37	<i>Trypanosoma</i> sp. F
typ G	2	<i>Trypanosoma</i> sp. G
typ H	24	<i>Trypanosoma</i> sp. H
typ I	46	<i>Trypanosoma</i> sp. I
typ J	6	<i>Trypanosoma</i> sp. J
typ K	24	<i>Trypanosoma</i> sp. K
typ L	1	<i>Trypanosoma</i> sp. L

\* pojmenování dle Spodareva *et al.* (2018)

### 4.3.1 Fylogenetická analýza žabích trypanosom

Pro tvorbu fylogenetického stromu byly použity SSU rRNA sekvence 12 námi detekovaných MOTU trypanosom skokanů (sekvence pro typ G nebyla získána; v případě většího počtu genotypů je zastoupen pouze dominantní typ). Pět z nich se shodovalo s již popsanými druhy/MOTU, jejichž fylogenetické postavení bylo již publikováno. Sedm nových MOTU zaujalo své postavení znázorněné na fylogenetickém stromě (viz Obrázek 11).



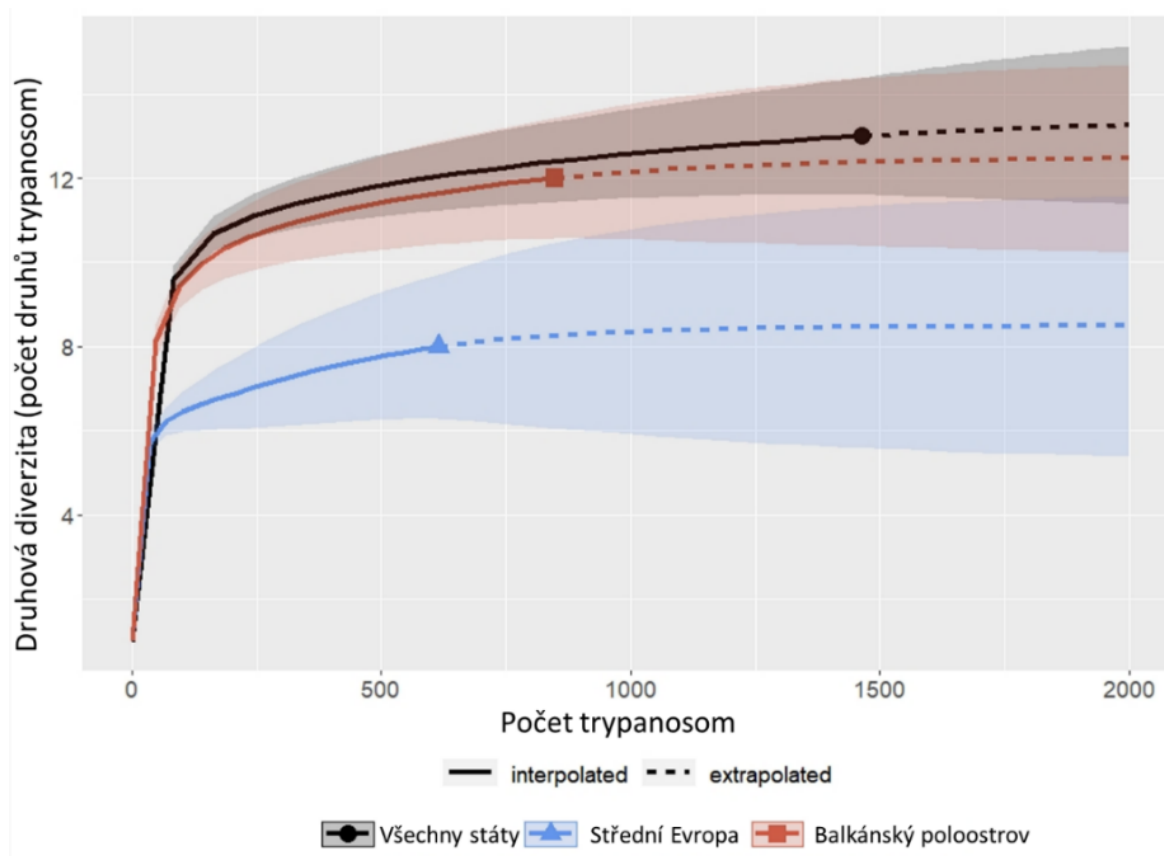
**Obrázek 11:** Fylogenetický strom SSU rRNA trypanosom tzv. "Aquatic clade" vytvořený na základě maximum likelihood metody (doplněný hodnotami z Bayesovské a maximum parsimony metody; \* značí bootstrap resp. posterior probability > 95/0.95; - značí jinou topologii či < 50/0.5; // značí zkrácení délky větví na polovinu). V této práci detekované MOTU jsou zvýrazněné červeně. Ke každému druhu trypanosom jsou vypsáni zástupci druhů skokanů a všechny státy, kde byl daný druh detekován. Označení CULT značí druhy, které se nám podařilo axenicky kultivovat a jsou k dispozici v kryobance. Pokud není vyznačeno jinak, modře psané druhy trypanosom jsou zástupci rybních hostitelů, černě značené druhy představují žabi hostitele. Zeleně zvýrazněný druh představuje námi získanou zatím nepublikovanou sekvenci z africké žáby. Klady žabích trypanosom jsou označeny dle Spodareva et al. (2018).

Nové izoláty *T. sp. E* a *T. sp. J* náleží do společného kladu An04 / Frog 1 společně s *T. sp. “ring“* a *T. ranarum*, která je fylogeneticky blízce příbuzná stejnojmennému izolátu z Kanady. *T. sp. E* je příbuzná k izolátům z evropských skokanů rodu *Pelophylax* k *T. sp. “ring“* a také *T. neveulemairei*. Do kladu An01 + An02 / Frog 2 patří již popsané druhy/MOTU *T. rotatorium* a *T. sp. “nautilus“* společně s *T. sp. L*, která je jim vzdáleněji příbuzná. Její sesterská sekvence představuje trypanosomu *T. sp. AARE-5*, která není v této práci zahrnutá, nicméně jsem ji detekovala u ropuchy

*Sclerophrys regularis* pocházející z Afriky (vzorek ve formě krve pochází od Mgr. Pavla Němce, Ph.D. z Katedry zoologie PřF UK). Ostatní čtyři MOTU (F, H, I, K) tvoří samostatné skupiny. *T. sp. H, I, a K* společně s *T. loricatum* tvoří sesterské skupiny k rybím trypanosomám. Nejzajímavější fylogenetické postavení představuje *T. sp. F*, která tvoří sesterskou skupinu celého vodního kladu, i když její pozice je značně nestabilní.

#### 4.3.2 Odhad druhové bohatosti

Z celkových 13 druhů trypanosom jich na Balkánském poloostrově (Albánie, Bulharsko, Černá Hora, Kypr, Rumunsko, Řecko) bylo zjištěno 12, tedy všechny druhy kromě *T. ranarum*. Ve střední Evropě (Česko, Slovensko) bylo detekováno pouze 8 druhů. Ve 36 případech pozitivních skokanů se nepodařilo identifikovat druhy trypanosom, a tudíž byly tyto vzorky z následných analýz vyloučeny. Odhad druhové bohatosti dokládá graf (viz Graf 2), kde extrapolace odhaduje, o kolik se může ještě zvýšit počet nezjištěných druhů s rostoucím počtem dalších trypanosomami infikovaných skokanů rodu *Pelophylax*. Všechny vypočtené indexy odhadují zvýšení počtu druhů maximálně o jeden. Je tedy pravděpodobné, že jsme odhalili téměř kompletní druhovou diverzitu trypanosom u skokanů rodu *Pelophylax* a o moc více druhů se ve sledované geografické oblasti vyskytovat nebude.

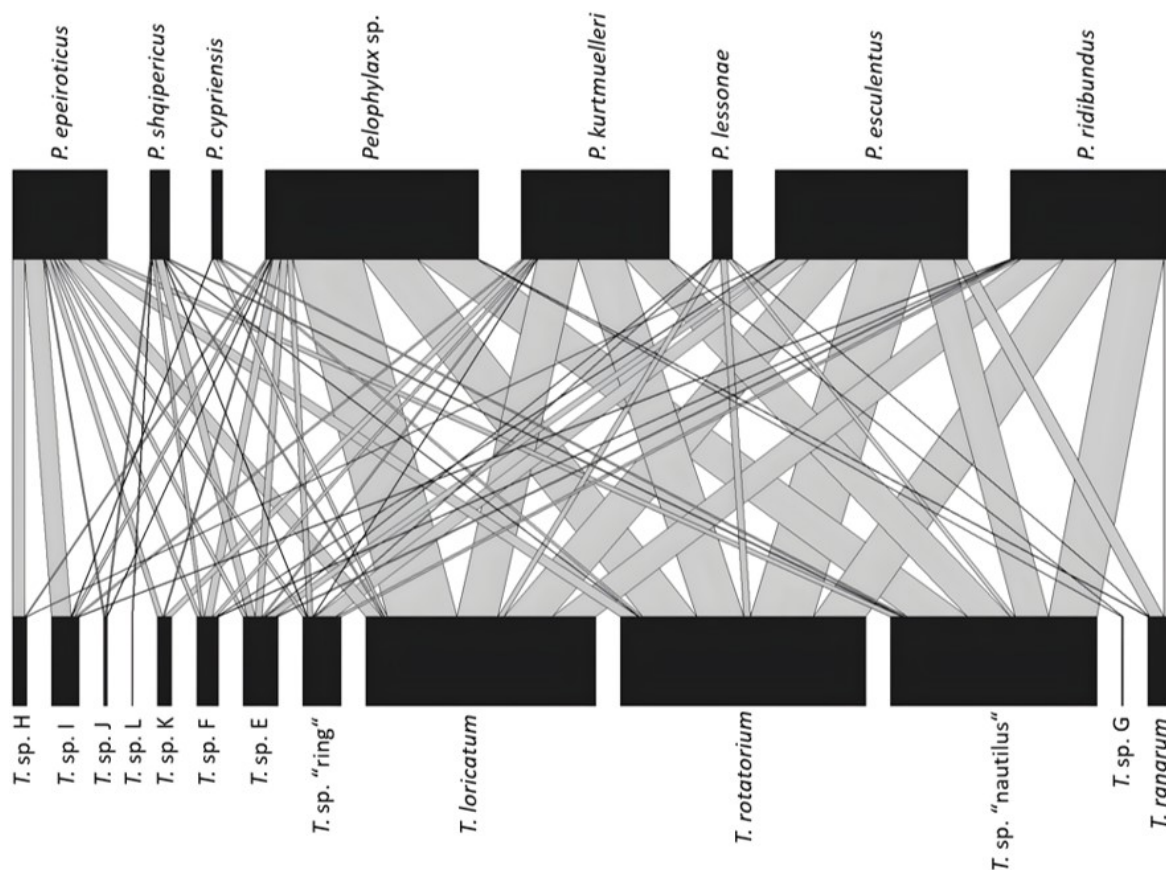


**Graf 2:** Akumulační druhová křivka, která ukazuje kumulativní počet druhů v závislosti na množství detekovaných trypanosom a počtu vyšetřených jedinců. Křivka také odhaduje druhovou diverzitu na základě extrapolace a ukazuje rozdíl detekovaných druhů a odhadu druhové diverzity ve střední Evropě (Česko, Slovensko) – modře, Balkánském poloostrově (Albánie, Bulharsko, Černá Hora, Kypr, Rumunsko, Řecko) – červeně a u všech států dohromady – černě. Extrapolace je nastavená do maximální velikosti vzorku 2000 infikovaných jedinců.

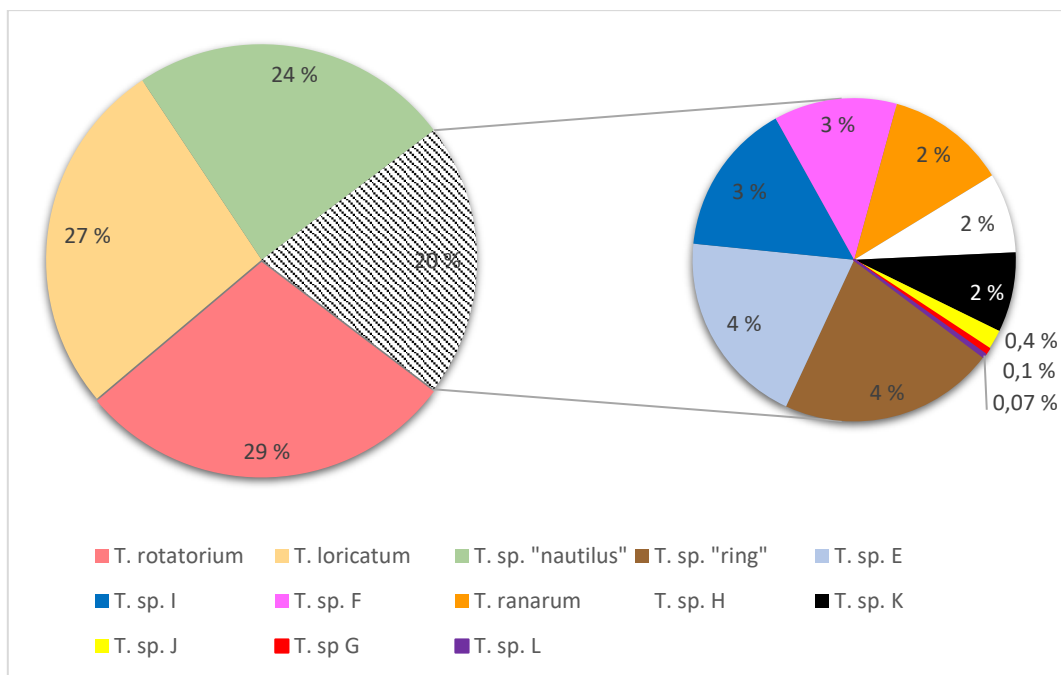
## 4.4 Hostitelská specifita

Kvantitativní interakce mezi jednotlivými druhy trypanosom a druhů skokanů zobrazuje graf (viz Graf 3). Kromě *T. sp. L*, která byla detekována pouze v jednom případě a *T. sp. G* detekovaná ve dvou případech, se všechny ostatní druhy trypanosom vyskytovaly u dvou a více různých druhů skokanů (nepočítaje neidentifikovatelné druhy skrývající se pod označením *Pelophylax sp.*). U žádného druhu trypanosomy nelze prohlásit, že by byl hostitelsky specifický k jednomu druhu skokana. Dominantními druhy trypanosom jsou *T. rotatorium* (celková prevalence 29 %), *T. loricatum* (27 %) a *T. sp. "nautilus"* (24 %); zbylých 20 % představuje ostatních 10 druhů (viz Graf 4). Graf 5 ukazuje detailnější zobrazení jednotlivých trypanosom v hostitelských druzích žab. V grafech je znázorněn celkový počet detekovaných trypanosom, tedy jeden skokan, u kterého byla detekována smíšená infekce, je započítán několikrát v závislosti na počtu detekovaných trypanosom. Zastoupení trypanosom u střeoevropských druhů skokanů (tedy

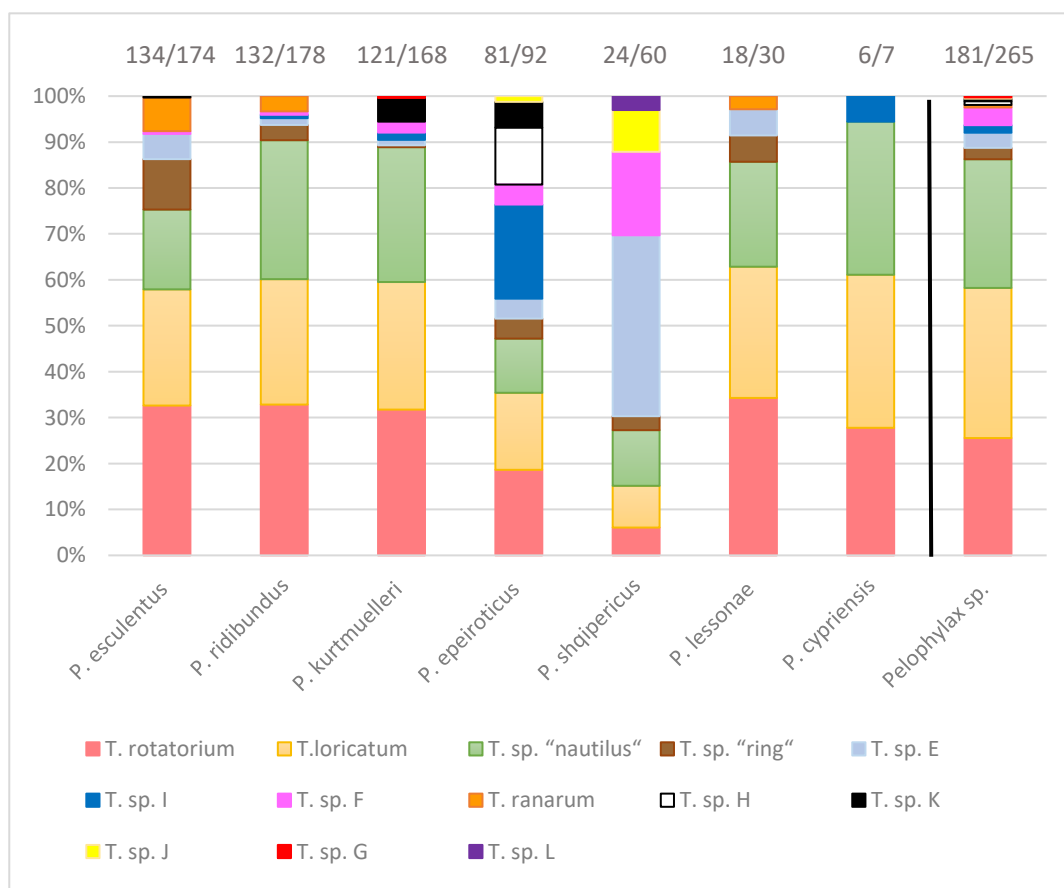
u *P. esculentus*, *P. ridibundus* a *P. lessonae*) se liší minimálně a je obdobné jako u druhu *P. kurtmuelleri* s výjimkou *T. sp. K*, které se ve střední Evropě vůbec nevyskytuje (viz kapitola: 4.5 Geografická specifita). Značné rozdíly v zastoupení jednotlivých druhů trypanosom lze pozorovat u jihoevropských druhů skokanů. U *P. shqipericus* dominuje hlavně *T. sp. E* a *F*, u *P. epeiroticus* je zastoupení trypanosom pestřejší a oproti jiným druhům skokanů jsou v něm ve velkém zastoupeny *T. sp. I* a *H*. Navíc je to druh skokana s největším počtem zastoupených druhů (deset) trypanosom (viz Tabulka 12). Šest pozitivních jedinců endemického skokana *P. cypriensis* bylo nakaženo třemi nejčastějšími a již jmenovanými druhy (*T. rotatorium*, *T. loricatum* a *T. sp. "nautilus"*) společně s *T. sp. I*.



**Graf 3:** Kvantitativní síť interakcí mezi jednotlivými druhy skokanů rodu *Pelophylax* (nahore) a jednotlivými druhy/MOTU trypanosom (dole) prostřednictvím bipartite network. Černé obdélníky znázorňují množství jedinců v rámci jednotlivých druhů, šedé vazby odpovídají interakcím druhů a jejich šířka odráží jejich četnost. Síť je uspořádána tak, aby zobrazovala minimální křížení interakcí.



**Graf 4:** Procentuální zastoupení druhů trypanosom ve všech testovaných skokanech.



**Graf 5:** Zastoupení druhů trypanosom u jednotlivých druhů skokanů (počet pozitivních/počet testovaných skokanů); řazeno dle počtu pozitivních jedinců. Pelophylax sp. je od ostatních druhů oddělen, kvůli nespecifickému zařazení skokanů do druhu. P. cretensis byl z tabulky vyloučen, jelikož všech 7 testovaných jedinců bylo negativních.

*Tabulka 12: Přesný počet trypanosom v jednotlivých druzích skokanů rodu Pelophylax (počet pozitivních/počet testovaných skokanů). P. cretensis byl z tabulky vyloučen, protože všech 7 jedinců bylo negativních.*

druh trypanosomy/ druh skokana	<i>P. esculentus</i> (134/174)	<i>P. ridibundus</i> (132/178)	<i>P. lessonae</i> (18/30)	<i>P. shqipericus</i> (24/60)	<i>P. kurtmuelleri</i> (121/168)	<i>P. epeiroticus</i> (81/92)	<i>P. cypriensis</i> (6/7)	<i>Pelophylax</i> sp. (181/265)
<i>T. rotatorium</i>	107	89	12	2	80	30	5	93
<i>T. loricatum</i>	83	74	10	3	70	27	6	119
<i>T. sp. "ring"</i>	36	9	2	1	1	7	-	9
<i>T. ranarum</i>	24	9	1	-	-	-	-	2
<i>T. sp. "nautilus"</i>	57	82	8	4	74	19	6	102
<i>T. sp. E</i>	18	4	2	13	3	7	-	12
<i>T. sp. F</i>	2	2	-	6	6	7	-	14
<i>T. sp. G</i>	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>T. sp. H</i>	1	-	-	-	-	20	-	3
<i>T. sp. I</i>	-	2	-	-	4	33	1	6
<i>T. sp. J</i>	-	-	-	3	-	2	-	1
<i>T. sp. K</i>	-	-	-	-	13	9	-	2
<i>T. sp. L</i>	-	-	-	1	-	-	-	-

## 4.5 Geografická specifita

Tabulka 13 představuje výskyt jednotlivých druhů trypanosom ve sledovaných zemích Evropy. Tři druhy trypanosom *T. rotatorium*, *T. loricatum* a *T. sp. "nautilus"*, které jsou nejčastějšími druhy, se vyskytují ve všech sledovaných státech. Určité rozdíly ve výskytu jednotlivých druhů trypanosom u zelených skokanů mezi střední Evropou a Balkánem však pozorovat lze. Například druh *T. ranarum* se vyskytoval pouze ve skokanech na Slovensku a v Česku, na Balkáně se tato trypanosoma nevyskytovala, a to ani ve státech s velkým počtem otestovaných skokanů, jako je Albánie (291) či Řecko (202). Ve střední Evropě se naopak, a to i přes velké množství testovaných skokanů (Slovensko – 267 a Česko – 80), nevyskytovaly druhy *T. sp. I*, *J* a *K* (nalezené v Albánii, Řecku a Kypru). Absence trypanosom *T. sp. F* a *H* v Česku, které byly na Slovensku detekované jen vzácně, nevylučuje, že se v Česku vyskytovat nemohou vzhledem k nižšímu počtu testovaných jedinců (80 vs. 267). U *T. sp. L*, která byla detekována pouze v jednom jedinci a u *T. sp. G* ve dvou jedincích, nelze vyvozovat jejich geografickou specifitu.

**Tabulka 13:** Počet jednotlivých druhů/MOTU trypanosom v jednotlivých státech Evropy (počet pozitivních/počet testovaných skokanů). Tučně vyobrazené obdélníky značí rozdílnost výskytu daných trypanosom ve státech s vyšší početností pozitivních jedinců skokanů střední Evropy a Balkánského poloostrova.

druh/stát	střední Evropa		Balkánský poloostrov					
	Slovensko (212/267)	Česko (55/80)	Albánie (191/291)	Řecko (145/202)	Rumunsko (56/79)	Černá Hora (22/42)	Bulharsko (10/13)	Kypr (6/7)
<i>T. rotatorium</i>	166	27	116	68	11	17	8	5
<i>T. loricatum</i>	130	45	94	69	30	8	10	6
<i>T. sp. "nautilus"</i>	104	29	109	60	29	6	9	6
<i>T. sp. "ring"</i>	45	8	1	8	3	-	-	-
<i>T. ranarum</i>	34	2	-	-	-	-	-	-
<i>T. sp. E</i>	22	1	15	11	11	-	-	-
<i>T. sp. F</i>	2	-	15	9	10	-	1	-
<i>T. sp. G</i>	-	-	-	1	1	-	-	-
<i>T. sp. H</i>	1	-	1	21	1	-	-	-
<i>T. sp. I</i>	-	-	6	39	-	-	-	1
<i>T. sp. J</i>	-	-	4	2	-	-	-	-
<i>T. sp. K</i>	-	-	6	18	-	-	-	-
<i>T. sp. L</i>	-	-	1	-	-	-	-	-

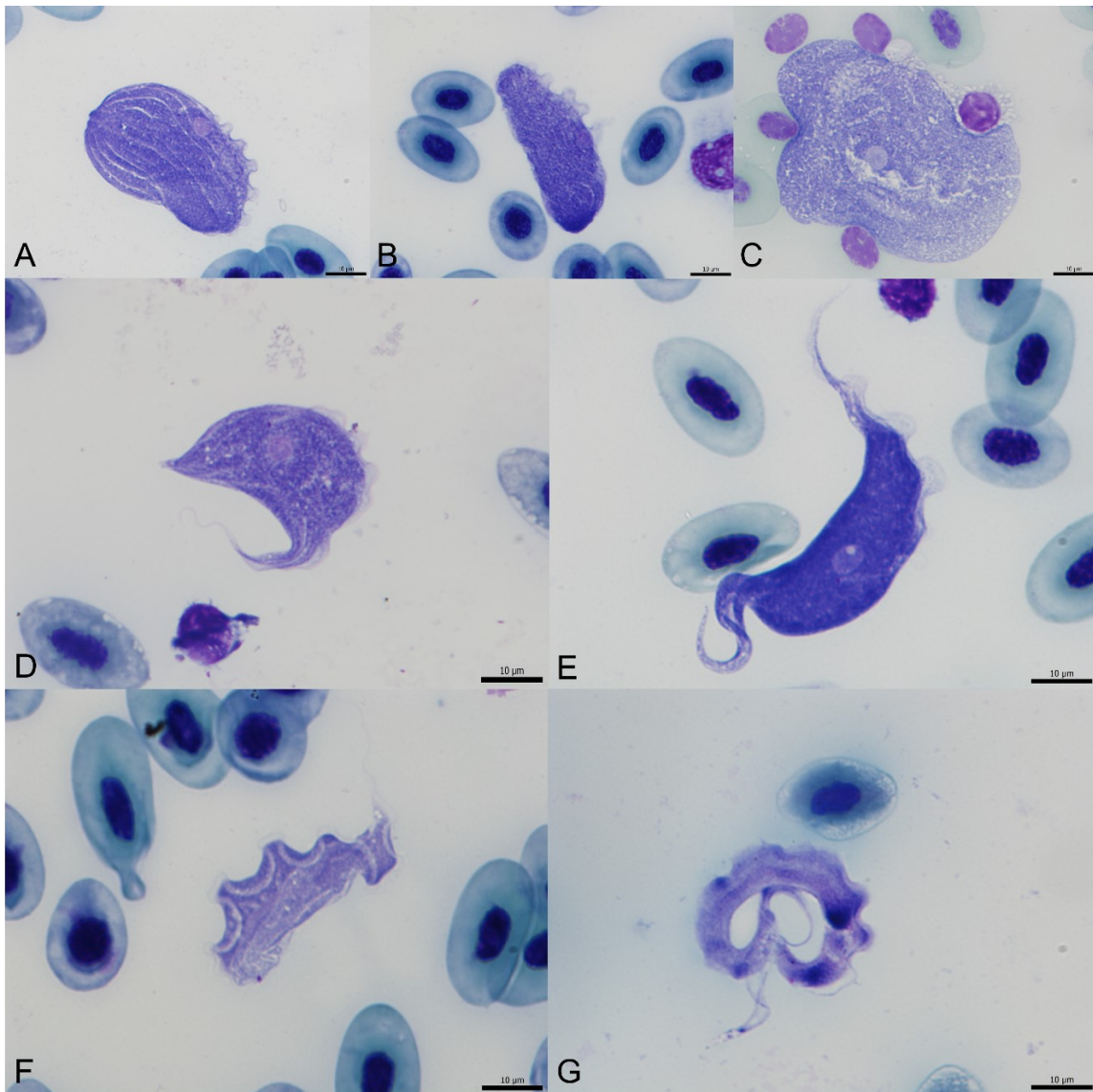
## 4.6 Morfologie trypanosom

### 4.6.1 Krevní formy

Celkem bylo pořízeno 364 snímků trypanosom na 64 krevních nátěrech z jedinců identifikovaných molekulárními metodami jako trypanosomami pozitivní. Krevní roztěry na podložních sklíčkách pocházely z pěti různých států (Rumunsko, Slovensko, Česko, Albánie a Řecko) a ze šesti druhů skokanů zahrnující všechny testované druhy kromě endemických *P. cretensis* a *P. cypriensis*. Kvůli velké morfologické diverzitě a neschopnosti „okometricky“ zařadit morfotypy ke správným genospecies/MOTU bylo původním cílem využít laserový mikrodisekční mikroskop na Hlavově ústavu. Nicméně vzhledem k časovým možnostem, technickým a logistickým obtížím a nemožnosti použít již hotové krevní roztěry muselo být od tohoto plánu upuštěno. Proto alespoň prostřednictvím fotografií byly trypanosomy zařazeny do několika morfotypů ve snaze zjistit případnou korelaci s molekulárně detekovanými genospecies. Trypanosomy byly rozřazeny na základě již popsaných morfotypů u evropských druhů *T. rotatorium*, *T. loricatum*, *T. ranarum* (viz Obrázek 1 a Obrázek 2) a *T. sp. “ring“* (Spodareva *et al.*, 2018) a byly pojmenovány jako rotatorium-like, loricatum-like, ranarum-like a ring-like. Morfotyp loricatum-like se lišil velikostí a tvarem, proto byl rozdělen na 3 skupiny. Morfotyp rotatorium-like byl rozdělen na 2 formy narrow a broad také podle Spodareva *et al.* (2018) (viz Tabulka 14 a Obrázek 12).

*Tabulka 14: Jednotlivé morfotypy žabích trypanosom rozřazené do několika kategorií podle předpokládaného druhu na základě již popsaných morfotypů. Kolonka nezařazeno určuje počet trypanosom, které byly sice vyfoceny, nicméně buňky byly poškozené natolik, že nešlo rozoznat, ke kterému morfotypu patří.*

morfotyp	předpokládaný druh na základě morfologie	počet buněk spadající do konkrétního morfotypu	morfotypy shodující se s předpokládaným genotypem	morfotypy neshodující se s předpokládaným genotypem
loricatum-like	typ A	179	174	5
loricatum-like hubená	typ A	38	31	7
loricatum-like velká	typ A	18	17	1
rotatorium-like broad form	typ Y1b	33	19	14
rotatorium-like narrow form	typ Y1b	7	0	7
ranarum-like	typ C	8	1	7
ring-like	typ B	27	2	25
nezařazeno	-	54	-	-



**Obrázek 12:** Všechny pozorované morfotypy z pěti evropských zemí a šesti druhů zelených skokanů byly rozřazeny na základě porovnání s již popsány morfotypy u jednotlivých druhů evropských trypanosom. *A* – loricatum-like, *B* – loricatum-like hubená, *C* – loricatum-like velká, *D* – ranarum-like, *E* – ring-like, *F* – rotatorium-like broad form, *G* – rotatorium-like narrow form. Měřítka – 10 µm (foto: autorka).

Bohužel nelze s jistotou říci, jaké morfotypy patří k jakému druhu (genospecies), protože z 64 pozorovaných roztěrů byla pouze pro deset krevních vzorků zjištěna infekce jedním druhem. Navíc kvůli velmi nízké parazitémii u pěti z nich nebyla nalezena ani jedna trypanosoma. U třech z nich se molekulárně jednalo o single infekce *T. loricatum* (typ A), pořízeno bylo 12 snímků, z toho v 11 případech byl morfotyp zařazen jako loricatum-like (loricatum-like hubená a loricatum-like tlustá), v jednom případě se však jednalo o morfotyp rotatorium-like (což naznačuje molekulárně nedetekovanou směsnou infekci). U další single infekce molekulárně určené jako typ D (*T. sp.* “nautilus“), byl morfologicky zjištěn typ loricatum-like (1 snímek). U poslední single infekce

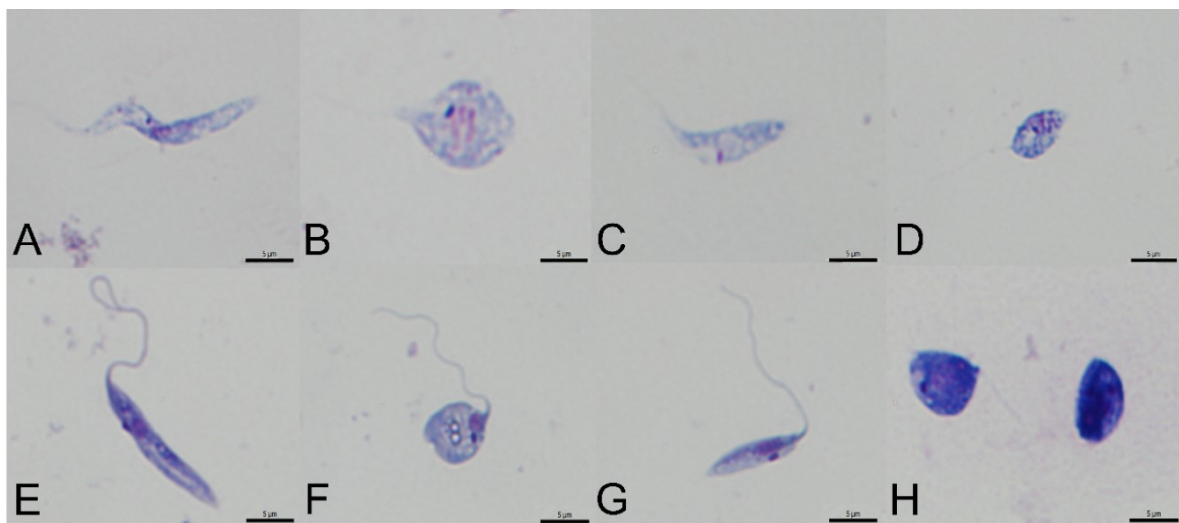
molekulárně detekované jako typ B (genotyp B2 = *T. sp.* “ring“), byly zjištěny čtyři různé morfotypy (loricatum-like – 1 snímek, ranarum-like – 3 snímky, ring-like – 1 snímek, rotatorium-like narrow form – 5 snímků).

Pro srovnání, zda se morfotypy shodují s očekávanými druhy trypanosom (na základě sekvenování), byla sestavena tabulka (viz Tabulka 14), která ukazuje konkrétní morfotypy a jejich počty. Tyto morfotypy byly porovnány s genotypy trypanosom zjištěnými u příslušného skokana a do tabulky bylo zaznamenáno kolik morfotypů se s očekávaným genotypem shodovalo (tedy mezi genospecies se předpokládaný druh vyskytoval) a kolik nikoliv. Bohužel ani v jednom případě nedošlo ke stoprocentní shodě.

Buňky nebyly měřeny, a proto toto rozřazení pouze poukazuje na vysokou morfologickou diverzitu a její nejasné postavení v hodnocení druhů.

#### 4.6.2 Morfologické formy trypanosom v kultuře

Pro porovnání morfologických odlišností trypanosom v kultuře byly testovány následující čtyři kultury – *T. loricatum* (LIB20-01, p2), *T. ranarum* (Ro17-R6, p16), *T. sp.* E (Ro19-03, p29 a Ro19-21, p27) a *T. sp.* H (LIB21-13, p6). Kultivace u všech čtyř druhů probíhala za stejných podmínek a jejich rozčerty byly provedeny ve stejné exponenciální fázi růstu. Trypanosomy se v kultuře vyskytovaly nejen volně, ale i v rozetách. Ve všech kulturách se vyskytovalo několik morfotypů současně, kultury se mezi sebou nijak významně nelišily a morfologické formy byly u všech podobné. To naznačuje, že kulturní formy jsou velmi polymorfní a jednotlivé druhy mezi sebou nevykazují zřetelné znatelné rozdíly použitelné jako případný druhový determinační znak. Obrázek 13 zobrazuje dvě rozdílné kultury a jejich podobné morfotypy; tyto morfotypy se však vyskytovaly u všech testovaných kultur.



**Obrázek 13:** Jednotlivé morfotypy dvou druhů žabiích trypanosom v kulturačním médiu. A–D morfotypy *T. loricatum* (kmen LIB20-01), E–H morfotypy *T. ranarum* (kmen Ro17-R6). Měřítko – 5µm (foto: autorka).

### 4.6.3 Rozlišení druhů na základě velikosti kinetoplastu

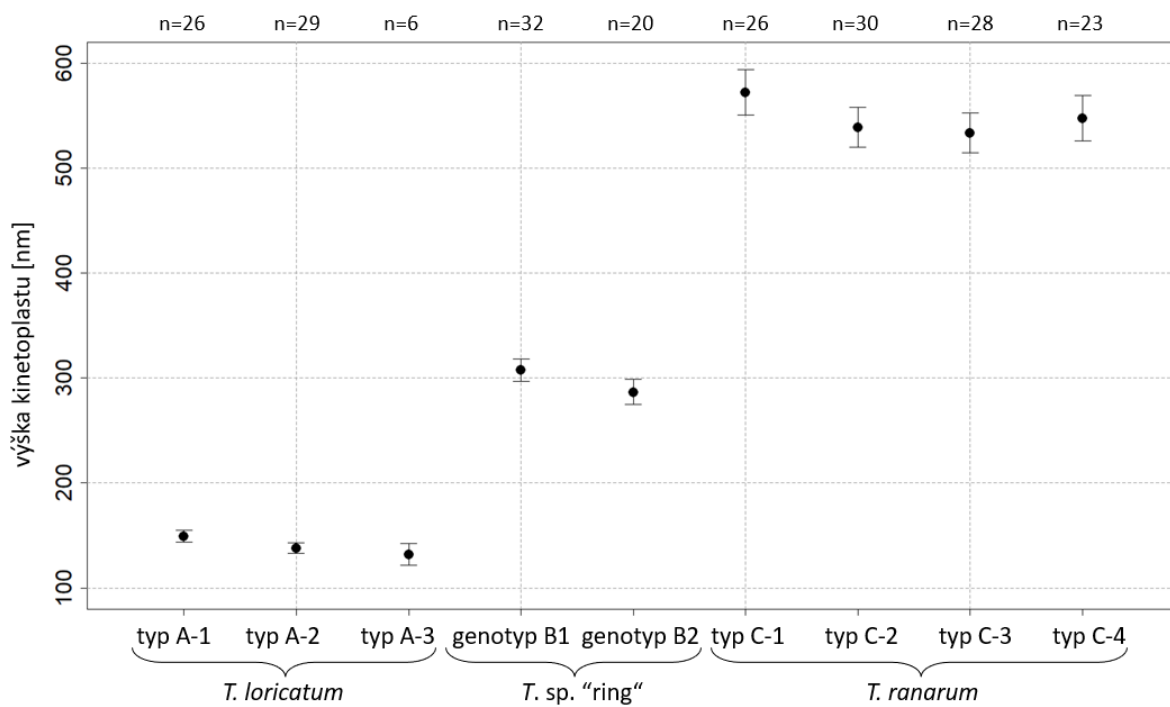
Pro měření kinetoplastu a fotografování byla použita transmisní elektronová mikroskopie. Měření kinetoplastu proběhlo u všech druhů trypanosom, které byly k dispozici v podobě kultur (tedy u typu A, genotypů B1 a B2, C, E, H). Kultura *T. sp. F*, byla sice měřena, ale ukázalo se, že je v kultuře ve směsné infekci s *T. sp. E* (v nižší pasáži tato směs detekována nebyla). Z tohoto důvodu byla tato kultura z analýzy vyloučena. U kinetoplastů byla srovnávána jejich výška (viz Tabulka 15). Délka kinetoplastu, která byla rovněž měřena, se v rámci jednotlivých buněk z téže kultury i několikanásobně lišila a byla tedy z analýzy vyloučena jako nevhodný srovnávací znak.

Pro zjištění, zda se výška kinetoplastů u stejného druhu trypanosomy neliší mezi izoláty z různých lokalit nebo se nemění s rozdílnou pasáží, bylo testováno více kultur, a to konkrétně u *T. loricatum* (typ A) a *T. ranarum* (typ C). Měření u *T. loricatum* zahrnovalo tři různé kultury lišící se lokalitou (Slovensko, Česko, Albánie), u *T. ranarum* byly porovnávány čtyři kultury ze dvou států (Rumunsko, Česko), jeden vzorek navíc představoval dvě kultury z různých kultivačních pasáží a jednu kulturu ze střeva nakažených komárů při experimentálních infekcích (viz Tabulka 15). Pro analýzu byl použit test mnohonásobného porovnání (ANOVA, Tukeyův-Kramerův test), který potvrdil, že se různě geograficky odlišné izoláty nebo rozdílné pasáže stejného druhu ve výšce kinetoplastu signifikantně neliší, stejně tak se neliší mezi buňkami z kultury a ze střeva komára (potencionálního přenašeče). Porovnány byly i dva genotypy *T. sp. "ring"*, genotyp B1 a genotyp B2. Výška kinetoplastu se ani v tomto případě signifikantně neliší (viz Graf 6).

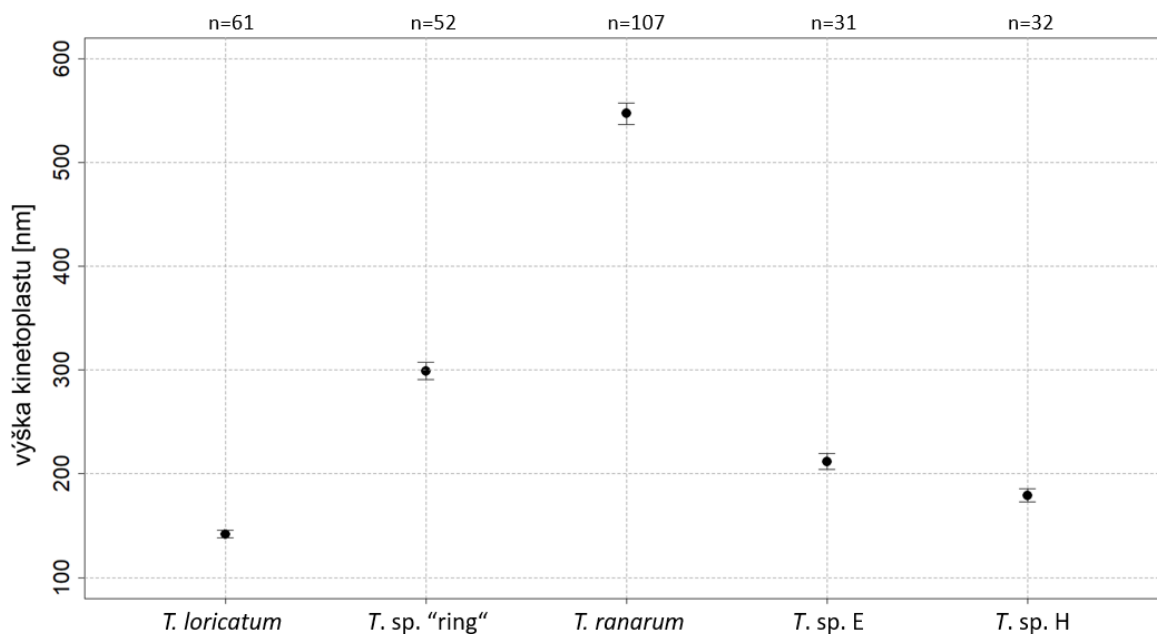
Po tomto zjištění byla následně všechna měření v rámci příslušného druhu sloučena a porovnána mezi sebou společně s *T. sp. E* a *T. sp. H*. Výška kinetoplastu mezi jednotlivými druhy se signifikantně lišila ( $p < 0,05$ ) (viz Graf 7). Kinetoplasty se liší nejenom výškou, ale také i strukturou a vzhledem (viz Obrázek 14). Zatímco *T. loricatum* a *T. sp. H* vykazují jednoduchou diskovitou strukturu kinetoplastu, kinetoplast *T. sp. E* má dvě vrstvy minikroužků a *T. sp. "ring"* dokonce tři vrstvy. U *T. ranarum* dosahuje sice největších rozměrů, nicméně nevykazuje žádné vrstvy minikroužků.

**Tabulka 15:** Přehled izolátů použitých pro měření výšky kinetoplastu. Kultura označená jako RUDAZCZ-R2 obsahovala mix infekci *T. ranarum* a *T. loricatum*. Vzhledem k velikému rozdílu výšky kinetoplastů těchto dvou druhů bylo možno použít měření každého druhu zvlášť. Označení \* značí naměřené kinetoplasty z trypanosom ze střeva komárů nakažených během experimentální infekce (KP = kinetoplast, SD = směrodatná odchylka).

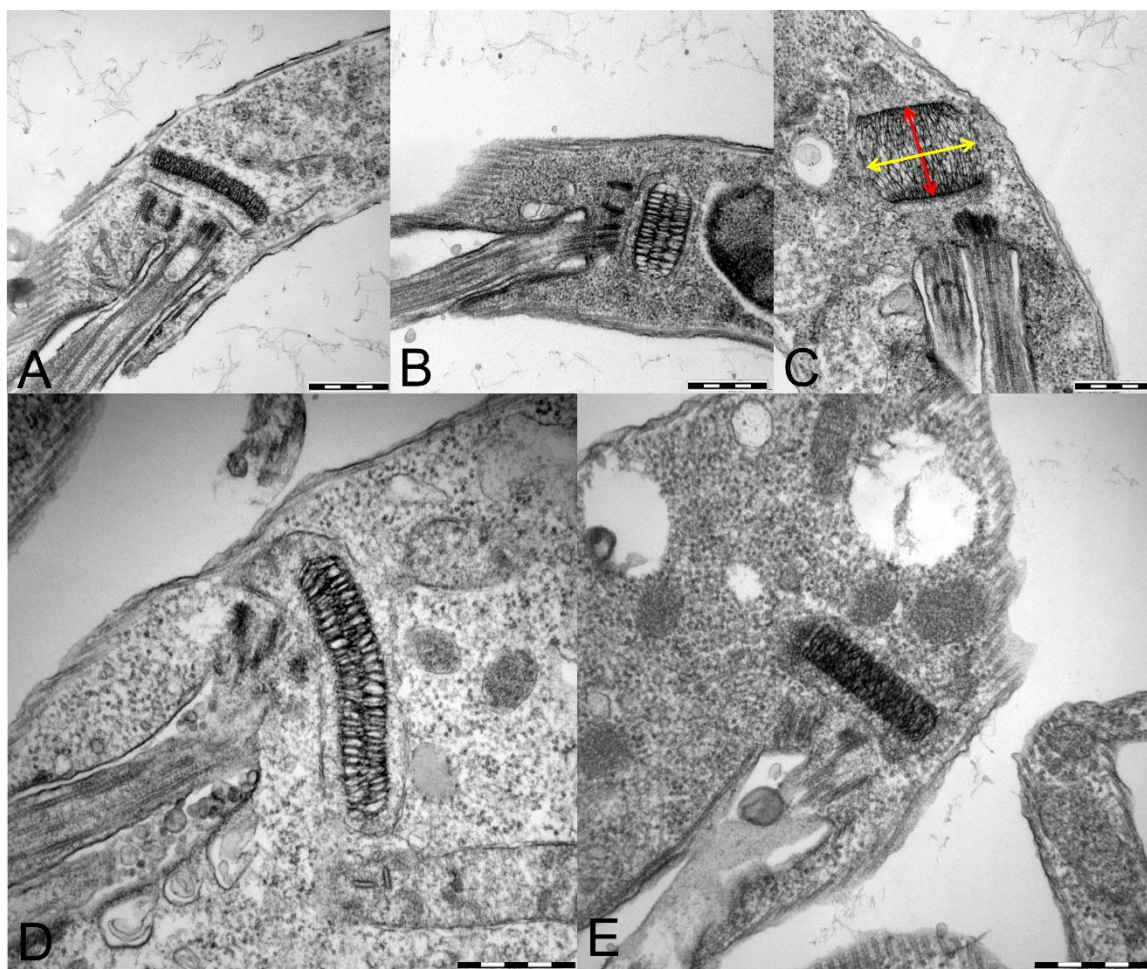
kód izolátu	druh trypanosomy	označení v grafu	lokalita	pasáž	počet změřených KP	průměr výšky KP každé kultury [nm]	celkový průměr výšky KP [nm]	SD
LIB20-14	<i>T. loricatum</i>	typ A-1	Slovensko	p4	26	149,8	142,9	16,7
LIB20-01		typ A-2	Albánie	p2	29	138,9		
RUDAZCZ-R2		typ A-3	Česko	p6	6	132,0		
RUDA21-04	<i>T. sp. "ring"</i>	genotyp B1	Česko	p10	32	308,7	301,1	33,0
Ro19-01		genotyp B2	Rumunsko	p8	20	288,9		
Ro17-R6	<i>T. ranarum</i>	typ C-1	Rumunsko	p18	26	573,7	549,2	46,9
RUDAZCZ-R2		typ C-2		p 9	30	540,8		
		typ C-4		*	23	549,3		
		typ C-3	Česko	p6	28	535,3		
Ro19-03	<i>T. sp. E</i>	typ E	Rumunsko	p19	31		212,6	19,4
LIB21-13	<i>T. sp. H</i>	typ H	Řecko	p14	30		180,0	18,3



**Graf 6:** Výška kinetoplastů v rámci různých izolátů, genotypů a pasáží tří druhů trypanosom s 95 % konfidenčním intervalem. Čísla nad každým bodem značí počet naměřených kinetoplastů. V rámci jednotlivých druhů se výšky kinetoplastů signifikantně neliší.



**Graf 7:** Rozdíly výšek kinetoplastů u pěti druhů trypanosom s 95 % konfidenčním intervalem. Čísla nad každým bodem značí počet naměřených kinetoplastů. Mezi všemi sledovanými druhy se výšky kinetoplastů signifikantně liší.



**Obrázek 14:** Kinetoplasty u různých druhů trypanosom (transmisní elektronová mikroskopie): **A** – *T. loricatum*, **B** – *T. sp. „ring“*, **C** – *T. ranarum*, **D** – *T. sp. E*, **E** – *T. sp. H*. Červená šipka znázorňuje výšku kinetoplastu, žlutá šipka znázorňuje délku kinetoplastu. Měřítko – 500 nm (foto: autorka).

## 4.7 Experimentální infekce komárů

Původním cílem mé diplomové práce bylo učinit experimentální sání s komáry *Cx. territans*, kteří se vyskytují v Česku a sají přednostně na poikilotermních obratlovcích, tedy i na žabách. Bohužel odchov těchto komárů se nepovedl (viz kapitola: 3.10 Kolonizace komárů *Culex territans*). Proto bylo rozhodnuto zkusit experimentální infekce s dostupnými druhy komárů: *Cx. pipiens* f. *molestus*, *Cx. quinquefasciatus* a *Aedes aegypti*.

Druh komára *Cx. molestus* byl použit pro infekční sání s pěti druhy kultur trypanosom (typ A = *T. loricatum*, genotyp B2 = *T. sp. „ring“*, typ C = *T. ranarum*, *T. sp. E*, *T. sp. H*). U trypanosomy *T. loricatum* proběhlo sání rovněž s druhem *Cx. quinquefasciatus*. Nejvyšší prevalenci trypanosom po defekaci komárů vykazoval druh *T. ranarum* (viz Tabulka 16), proto byla tato trypanosoma vybrána pro dva nezávislé experimenty se všemi třemi druhy komárů současně. Krev byla smíchána

s kulturou trypanosom a rozdělena mezi tři krmítka pro dosažení co největší homogenity podmínek a všechny tři druhy komárů sály současně a po stejnou dobu (viz Obrázek 10). Rozdíly mezi nákazou komárů jsou přesto významné; např. v druhém (úspěšnějším) sání s těmito třemi druhy komárů byla prevalence u *Cx. molestus* 77 %, oproti 23 % prevalenci u *Cx. quinquefasciatus* a 34 % u *A. aegypti* (viz Tabulka 16).

Společně se střevy komárů byly u každého druhu trypanosomy a každého druhu komára (v případech opakujících se experimentálních nákaz však pouze v 1. opakování) pitvány také slinné žlázy. Ve všech případech byly slinné žlázy negativní, a to i v případě nálezů infekce ve střevech komárů.

**Tabulka 16:** Tabulka zahrnuje všechny experimentální infekce se třemi druhy komárů a šesti druhy žabích trypanosom. Stejnou barvou podbarvené buňky značí experiment probíhající ve stejnou dobu a se stejnou koncentrací buněk v krvi.

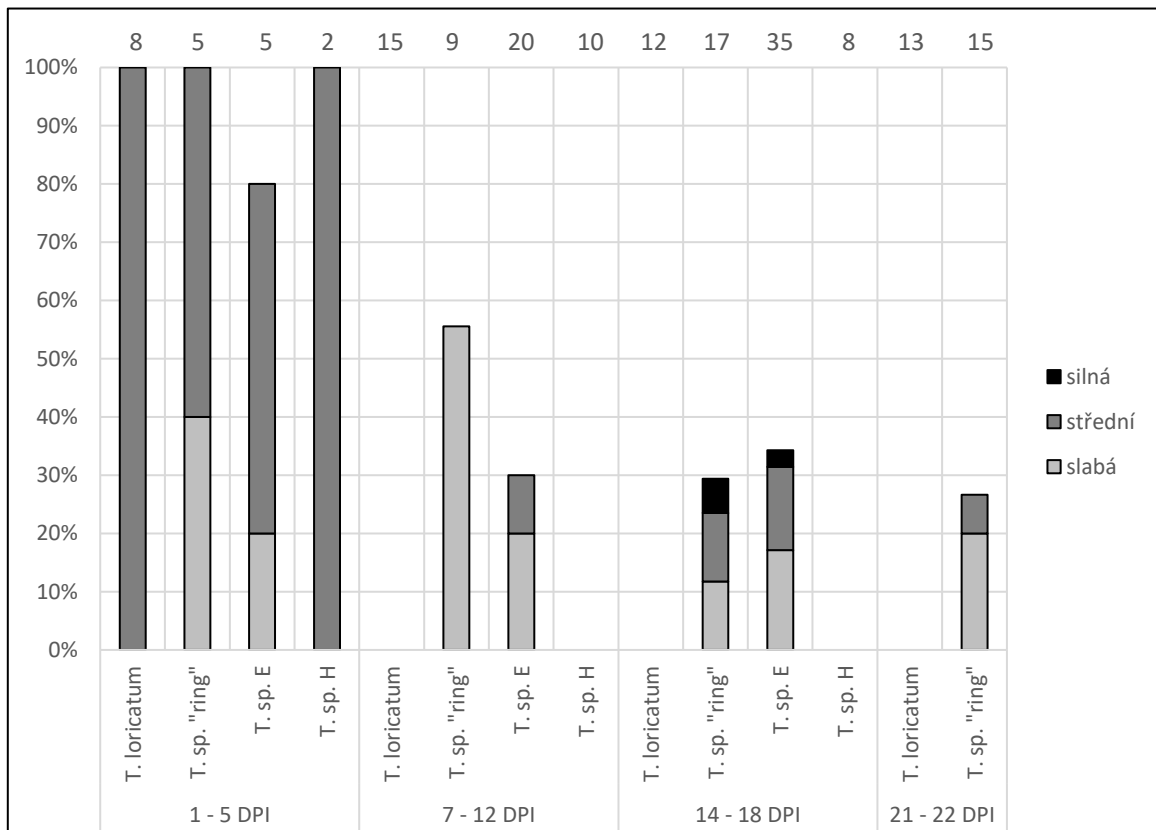
kód izolátu	druh trypanosomy	pasáž	druh komárů	výsledná koncentrace buněk ve 3 ml krve	vypitvaných komárů	prevalence trypanosom v komárech po defekaci
LIB20-05	<i>T. loricatum</i>	p8	<i>Cx. molestus</i>	cca $2 \times 10^6$	26	negativní
			<i>Cx. quinquefasciatus</i>	cca $2 \times 10^6$	22	negativní
Ro19-01	<i>T. sp. "ring"</i>	p22	<i>Cx. molestus</i>	$5 \times 10^6$	46	34 %
Ro17-R6	<i>T. ranarum</i>	p11	<i>Cx. molestus</i>	$3,5 \times 10^6$	47	76 %
		p16		$1,9 \times 10^6$	35	39 %
		p18		$5,5 \times 10^6$	40	77 %
		p16	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	$1,9 \times 10^6$	50	17 %
		p18		$5,5 \times 10^6$	46	23 %
		p16	<i>Aedes aegypti</i>	$1,9 \times 10^6$	48	29 %
p18	$5,5 \times 10^6$	40		34 %		
Ro19-03	<i>T. sp. E</i>	p29	<i>Cx. molestus</i>	$2,4 \times 10^6$	19	35 %
Ro19-21		p27		$2,5 \times 10^6$	34	39 %
LIB21-13	<i>T. sp. H</i>	p6	<i>Cx. molestus</i>	$2,4 \times 10^6$	20	negativní

#### 4.7.1 Intenzita infekce

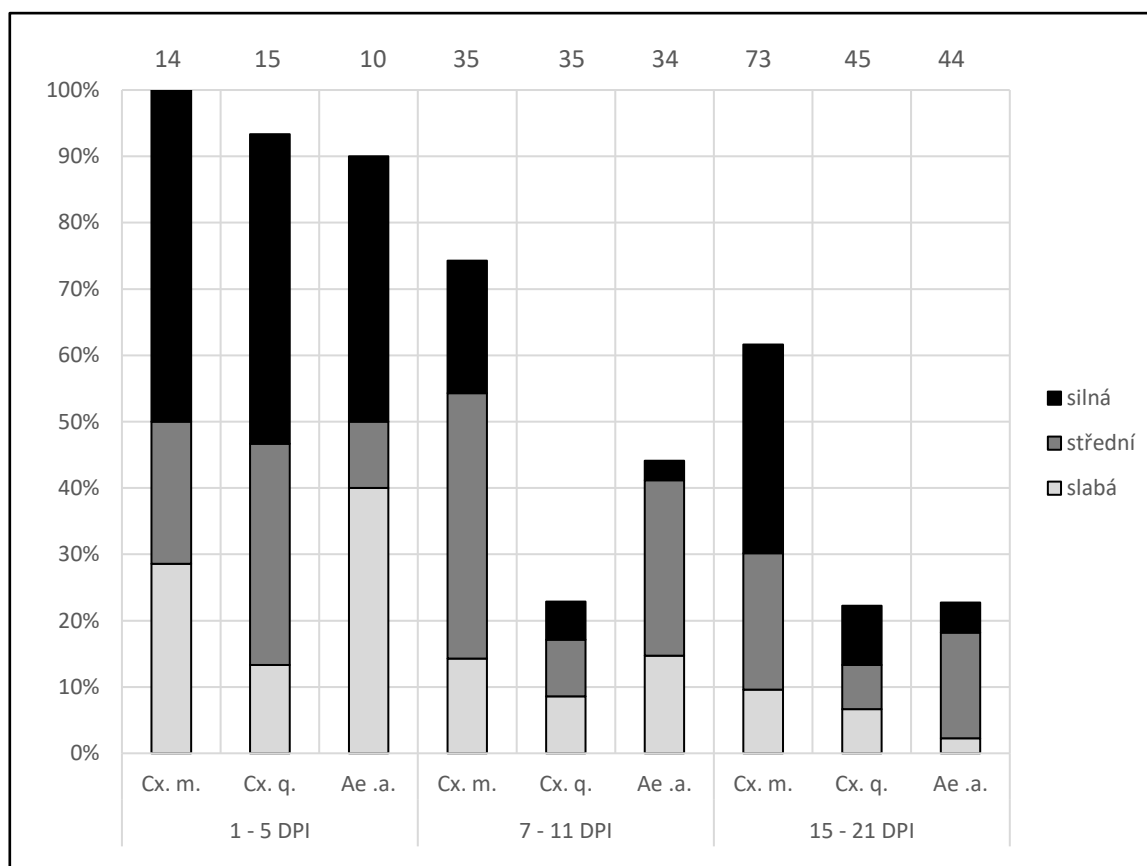
Infekční sání s komáry probíhalo, kvůli jejich lepší ochotě sát, ve večerních hodinách. Ihned po experimentální infekci byla kontrolována použitá krev z krmítka pod mikroskopem, a ve všech případech obsahovala živé trypanosomy. Pitvy komárů probíhaly 1–5 dní po sání, kvůli kontrole, zda se trypanosomy před defekací komárů rozmnožují a žijí. U všech testovaných druhů trypanosom byla prokázána přítomnost živých trypanosom před defekací. Výjimkou jsou tři komáři infikovaní *T. sp. E*

a *T. ranarum*, kteří byli již 5 DPI defekovaní a negativní. Následně probíhaly pitvy 7–12 dní po sání a 14–18 dní po sání. V případě *T. sp. "ring"* a *T. ranarum* u komára *Cx. molestus* i po 21–22 dní po sání.

Po defekaci komárů se ukázalo, že trypanosomy druhů *T. loricatum* a *T. sp. H* se ve střevě komárů neuchytily a všechny pitvané samice byly negativní. U dalších dvou druhů (*T. sp. "ring"* a *T. sp. E*) se trypanosomy vyvíjely, nicméně jen v malých procentech a v nízkých intenzitách. Míra infekce se mírně zvyšovala po 14 a více DPI (viz Graf 8). U *T. sp. "ring"* a *T. ranarum* proběhly pitvy také po 21 DPI a ukázalo se, že infekce přetrvávají dlouho po sání. Největší prevalence a největší intenzity infekce byly zaznamenány u *T. ranarum*, kterou byly následně nakaženi tři druhy komárů a jejichž rozdílná intenzita infekce, která se v průběhu experimentu mírně zvětšovala, je znázorněna v grafu (viz Graf 9).



**Graf 8:** Prevalence a intenzita infekce u čtyř druhů žabích trypanosom v průběhu experimentálních nálezů komárů *Culex pipiens f. molestus* (v případě *T. loricatum* i komárů *Cx. quinquefasciatus*). Nenažené samice představují volné místo v každém sloupečku. Čísla nad každým sloupečkem značí počet vypitvaných komárů; DPI = dny po sání.



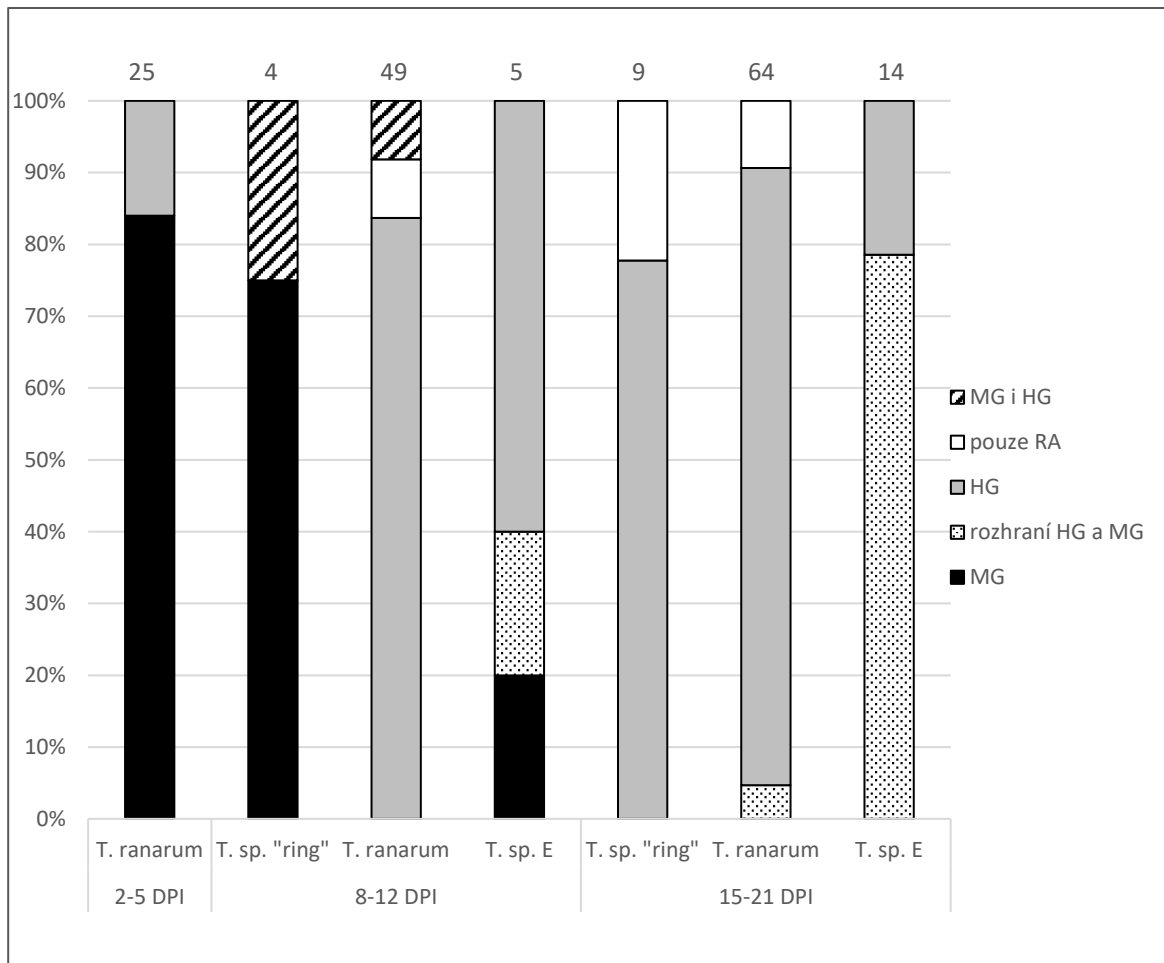
**Graf 9:** Prevalence a intenzita infekce žabí trypanosomy *T. ranarum* u třech druhů komárů: *Cx. q.* = *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. a.* = *Aedes aegypti*, *Cx. m.* = *Culex pipiens f. molestus*. Nenakažené samice představují volné místo v každém sloupečku. Čísla nad každým sloupečkem značí součet počtu všech vypitvaných komárů ze dvou nezávislých experimentů, u *Cx. molestus* ze tří experimentů; DPI = dny po sání.

## 4.7.2 Lokalizace trypanosom v komárech

V průběhu pitev byla sledována také lokalizace trypanosom v komárech a byla rozdělena do pěti kategorií: střední část střeva – midgut (MG; mesenteron), zadní část střeva – hindgut (HG; proctodeum), přítomnost v obou částech zároveň, jejich rozhraní a lokalizace pouze v rektální ampuli (viz Obrázek 4). Označení přítomnosti v hindgutu značí lokalizaci trypanosom v celé jeho délce včetně rektální ampule, označení rozmezí HG a MG značí přítomnost hlavně rozet přichycených v pruhu na začátku hindgutu, v místě připojení k midgutu. Kvůli velkému množství stále přítomné krve a obtížnému rozdělení střeva na jednotlivé úseky v rozmezí 2–5 DPI nebyla ve všech případech zjišťována lokalizace trypanosom. Graf 10 ukazuje lokalizaci trypanosom v průběhu experimentu u všech třech pozitivních druhů trypanosom v komárech. Všechny druhy komárů jsou započteny dohromady, jelikož rozdíl v lokalizaci mezi nimi byl minimální.

Lokalizace žabích trypanosom ve střevě komárů vykazuje podobný trend, tedy v průběhu trávení krve se dostávají z midgutu do hindgutu, kde zůstávají i v 21. dnu po experimentální nákaze. V midgutu byly trypanosomy zaznamenány nejpozději 12 DPI, od tohoto dne se vyskytovaly pouze

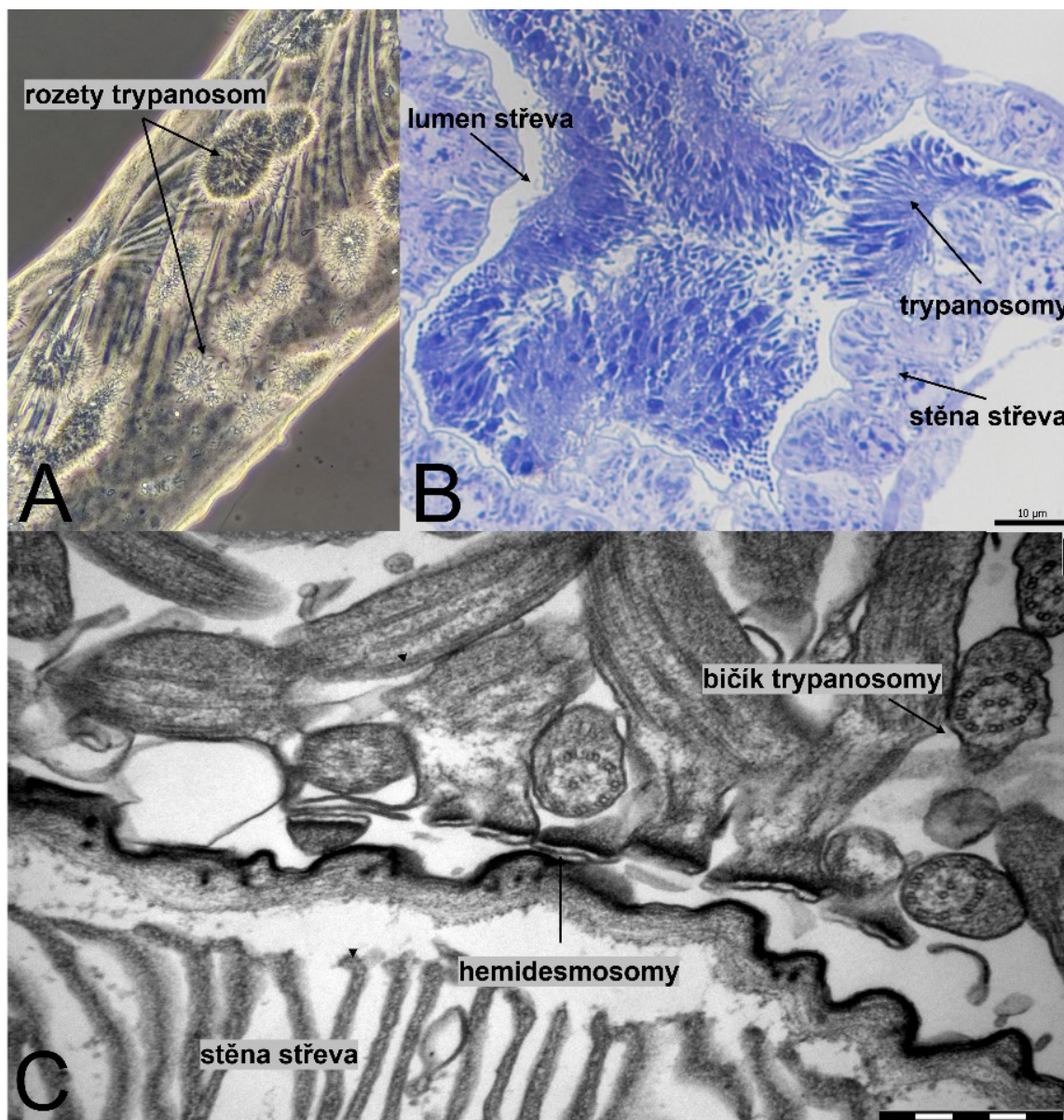
v hindgutu nebo jeho určité části. Lokalizace pouze v rektální ampuli a na rozhraní MG a HG nebyla častá, ale ani neobvyklá (viz Graf 10).



**Graf 10:** Výskyt tří druhů trypanosom v různých částech střeva experimentálně nakažených komárů. Čísla nad každým sloupečkem značí počet pozitivních vypitvaných komárů. U druhu *T. ranarum* počet znamená součet pozitivních jedinců ze všech tří druhů komárů (DPI = dny po sání, HG = hindgut, MG = midgut, RA = rektální ampule).

### 4.7.3 Morfologické formy trypanosom v komárech

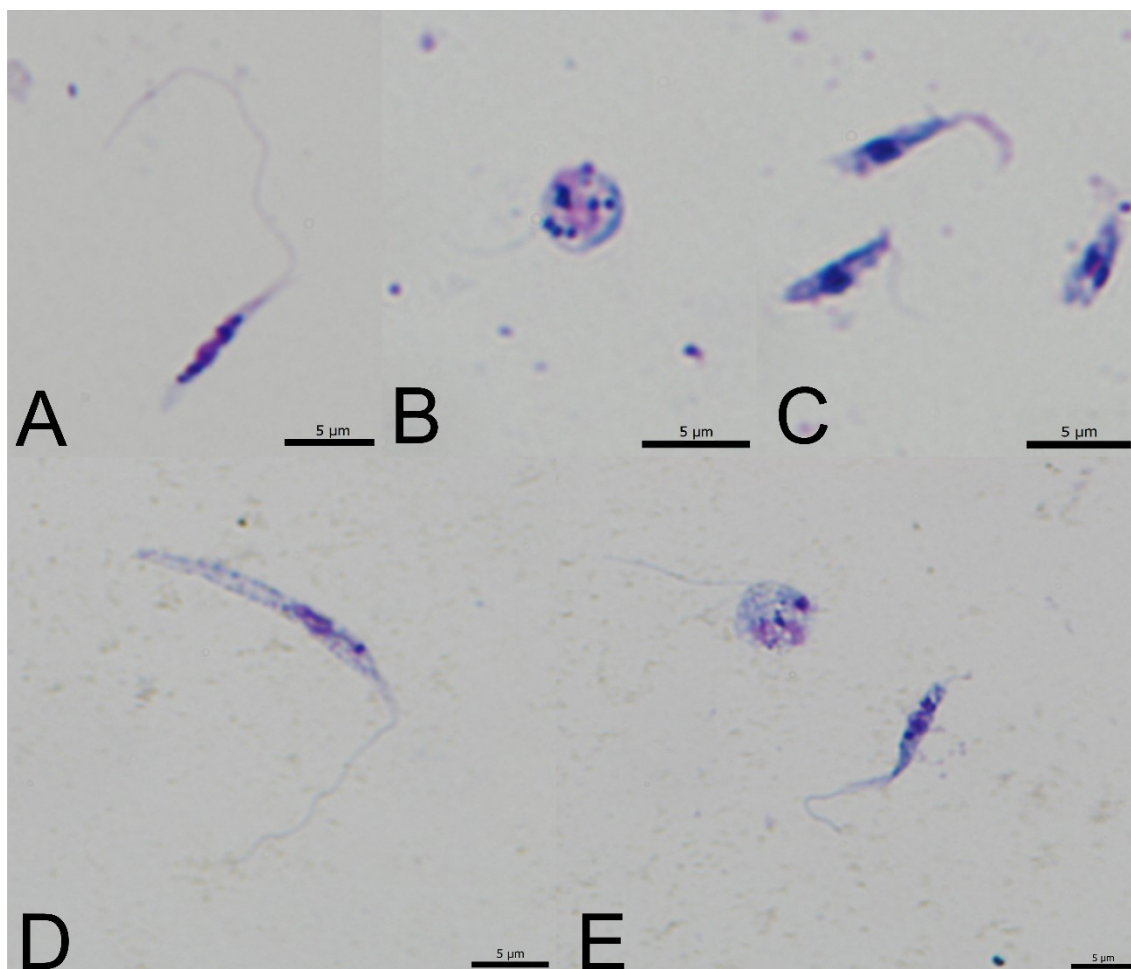
V midgutu se trypanosomy vyskytovaly pouze ve formě volně se pohybujících jednotlivých buněk. V hindgutu se kromě těchto forem vyskytovaly také rozetovité útvary připojené k chitinózní výstelce stěny zadního střeva (viz Obrázek 15). S využitím transmisního elektronového mikroskopu bylo pozorováno připojení trypanosom ke stěně střeva bičíky, a to prostřednictvím hemidesmosomů (viz Obrázek 15C).



**Obrázek 15:** Trypanosomy druhu *Trypanosoma ranarum* (izolát Ro17-R6) lokalizované v hindgutu (zadní střevo, proctodeum) experimentálně nakažených komárů druhu *Culex pipiens f. molestus*: **A** – rozety trypanosom, nativ, foceno pod světelným mikroskopem s fázovým kontrastem při celkovém zvětšení 400x, **B** – trypanosomy vyplňující lumen střeva komára, polotenký řez, barveno toluidinovou modří, foceno pod světelným mikroskopem, měřítko – 10  $\mu$ m, **C** – připojení buněk trypanosom ke stěně střeva pomocí hemidesmosomů, TEM, měřítko – 500 nm (foto: autorka).

Ve střevě komárů se vyskytovaly různé morfotypy trypanosom. Porovnávány byly všechny tři druhy, se kterými byly provedeny experimentální infekce a ve střevě komárů se uchytily a probíhal u nich vývoj (*T. sp.* “ring“, *T. ranarum*, *T. sp.* E). Roztěry byly provedeny z celého infikovaného střeva, takže přesná lokalizace jednotlivých morfotypů zkoumána nebyla. V průběhu infekce nebyly zaznamenány žádné nápadné změny v zastoupení a četnosti jednotlivých morfotypů. Zaznamenané morfotypy na obrázku (viz Obrázek 16) se vyskytovaly ve většině případů v průběhu celého cyklu. Očividné rozdíly v morfologii se mezi jednotlivými druhy trypanosom i mezi jednotlivými druhy

komárů také nevyskytovaly. Jejich polymorfii zaznamenává Obrázek 16, na kterém jsou znázorněny morfotypy dvou druhů trypanosom u stejného druhu komára *Cx. pipiens* f. *molesus*. Tyto morfotypy jsou velmi podobné těm, které byly zaznamenány i v kultivačních podmínkách (viz Obrázek 13).



**Obrázek 16:** Jednotlivé morfotypy dvou druhů trypanosom u experimentálně infikovaných komárů *Cx. molestus*. *A–C* morfotypy *T. ranarum*, *D–E* morfotypy *T. sp. E*. Měřítka – 5 µm (foto: autorka).

## 5 Diskuze

### 5.1 Prevalence trypanosom u zelených skokanů

Celkem bylo vyšetřeno 981 zelených skokanů (rod *Pelophylax*), u nichž celková prevalence dosahovala 71 %. Společně se skokany bylo na trypanosomy testováno také 44 vzorků z čolka obecného (*Lissotriton vulgaris*). Všechny vzorky byly ale negativní, proto se tato studie zaměřuje pouze na skokany rodu *Pelophylax*. Existuje několik studií zaměřených na výskyt trypanosom u rodu *Pelophylax* v Evropě i Asii (Desser & Yekutieli, 1986; Barta *et al.*, 1989; Molan *et al.*, 1989; Žičkus, 2002; Spodareva *et al.*, 2018) a zjištěná prevalence se pohybuje v rozmezí od 18 % (Izrael) po 75 % (Ukrajina), v obou případech u skokana skřehotavého (*P. ridibundus*). Zjištěné rozdíly v prevalenci mohou být podmíněny nízkou parazitémií (počtem trypanosom v krvi) vedoucí k falešné negativitě. Dalším důvodem vysvětlující tak veliké odlišnosti v prevalenci může být rozdíl ve vyšetřovaných lokalitách s jiným habitatem či prostředím narušené lidskou činností, které mohou ovlivňovat vztah parazit-přenašeč-hostitel (Cable *et al.*, 2017). Například čistota prostředí (vody) může mít vliv na množství přenašečů – pijavic (Leal *et al.*, 2009). Spodareva *et al.* (2018) detekovali rozdíly v prevalenci u *P. ridibundus* na dvou různých lokalitách – v rašeliništích (25 %) a na stálé vodní ploše (75 %). My jsme tak veliký rozdíl v prevalenci mezi jednotlivými státy a lokalitami nikde nenalezli, nicméně je nutné poznamenat, že žádná z našich lokalit nebyla tak atypická a nevhodná pro pijavice, jako jsou rašeliniště apod. Nejnižší prevalenci jsme zaznamenali v Černé Hoře (52 %) a nejvyšší na Kypru (86 %); tyto rozdíly však mohou souviset i s kvalitou odebraných vzorků a počtem vyšetřených jedinců. Navíc neexistuje žádná studie zabývající se prevalencí trypanosom u skokanů v žádném z námi studovaných evropských států.

Rozdíly mezi jednotlivými druhy skokanů v rámci rodu *Pelophylax* na území Evropy (s pominutím výše zmíněné výjimky 25 % u populace *P. ridibundus* v rašeliništích na Ukrajině) tak veliké nejsou. U *P. ridibundus* dosahovala na Ukrajině prevalence již výše zmíněných 75 % (Spodareva *et al.*, 2018) a u *P. esculentus-lessonae* v Litvě 65 % (Žičkus, 2002). Na Korsice detekovali Barta *et al.* (1989) u *P. esculentus* 59% prevalenci morfologicky určené trypanosomy jako *T. loriscatum*, nicméně společně se jmenovanou trypanosomou detekovali další 3 trypanosomy. Přestože celková prevalence není v této studii zaznamenána, bude nejspíše nabývat vyšších hodnot. V naší studii pak dosahovala prevalence u *P. esculentus* 77 % a u *P. ridibundus* 74 %. Nejnižší prevalence (vyjma skokanů *P. cretensis*, kde byli všichni skokani negativní a jejich negativita mohla být způsobena malým počtem vzorků –  $n = 7$ ) byla zaznamenána u *P. shqipericus* (40 %), největší pak u *P. epiroticus*, kde dosahovala 88 %. Při porovnání s jinými druhy žab je prevalence u rodu *Pelophylax* vyšší, což odpovídá způsobu jejich života. Terestrické druhy obojživelníků, které ve vodním prostředí netráví tolik času (ropuchy, rosničky, terestrické druhy skokanů včetně hnědých skokanů z Evropy atd.) vykazují celkově menší podíl zastoupení trypanosom než vodní skokani, což

souvisí s předpokladem, že přenašeči ve vodním prostředí jsou pijavice, kterým jsou vystaveny především vodní druhy žab (Barta & Dessler, 1984; Žičkus, 2002). Na druhou stranu striktně vodní žáby rodu *Xenopus* zdaleka tak vysoké procento infikovanosti nevykazovaly. V žábě *Xenopus laevis* byla na základě morfologie detekována trypanosoma druhu *T. rotatorium* (Fantham *et al.*, 1942), avšak africké studie sledující diverzitu parazitů různých druhů žab prezentovaly všechny žáby rodu *Xenopus* jako negativní na trypanosomy (Readel & Goldberg, 2010; Netherlands *et al.*, 2015). A to i přes to, že pijavice na tomto druhu vodních žab pozorovány byly (Kruger & Du Preez, 2015; Netherlands *et al.*, 2015). Možným vysvětlením může být nevhodnost drápatek jako hostitelů, nebo absence trypanosom v dané lokalitě (Netherlands *et al.*, 2015).

Signifikantně vyšší prevalence byla zaznamenána u starších jedinců. Detekovali jsme 75% prevalenci u dospělců, ale jen 45% u subadultů a 49% u juvenilů. Barta & Dessler (1984) u novosvětských vodních skokanů zaznamenali také vyšší prevalenci u větších, a tedy i starších jedinců. To naznačuje, že delší expozice vektoru znamená větší pravděpodobnost nákazy, která pak může přetrvávat delší dobu, možná i celoživotně. Hýsek & Žižka (1988) pozorovali infekci trypanosom ve skokanech i po jednom roce. Relativně vysoká infikovanost juvenilních jedinců, tedy těch, kteří se stejného roku metamorfovali, naznačuje možnou nákazu již ve fázi pulců (Barta & Dessler, 1984). Pulci se mohou nakazit trypanosomami prostřednictvím pijavic, které na pulcích sají (Bardsley & Harmsen, 1973). K přenosu však může docházet i prostřednictvím komárů *Culex territans*, kteří byli pozorováni, jak sají na metamorfujících pulcích (Dessler *et al.*, 1973). V pijavici *Hemiclepsis marginata* v Ázerbájdžánu byl popsán vývoj a přenos *T. neveulemaire* na skokana skřehotavého (Guseinov, 2011). Nicméně tato pijavice se běžně vyskytuje i v Evropě, kde se zdá jako nejvhodnějším přenašečem (Molyneux, 1977). Zároveň bylo dokázáno, že pokud má pijavice tohoto druhu příležitost, tak saje na pulcích (Sawyer & Fitzgerald, 1981), a proto by mohla být možným přenašečem i u nedospělých stádií žab v našich (a balkánských) podmínkách.

Vysoký rozdíl v prevalenci mezi samci a samicemi může značit upřednostňování samců žab hmyzími vektory, díky jejich atrakci k vokalizaci v období páření, ve kterém samci žab lákají své samice. Tento fenomén byl zaznamenán u dvoukřídlého hmyzu rodu *Corethrella* v Panamě (Aihara *et al.*, 2016). Tamní žáby vykazovaly značné pohlavní rozdíly v prevalenci trypanosom, samci s 40% a samice pouze s 6,6% prevalencí (Bernal & Pinto, 2016). Fonotaxe však byla sledována i u komárů *Cx. territans*, kteří se vyskytují v Evropě a jsou možnými přenašeči trypanosom (Bartlett-Healy *et al.*, 2008). My jsme v celkové prevalenci nezaznamenali signifikantní rozdíl mezi samci (74 %) a samicemi (72 %), tedy hypotéza nám nepotvrdila upřednostňování vokalizujících žab komáry. Testovali jsme i možné rozdíly v rámci jednotlivých druhů trypanosom (protože jen některé mohou být přenášeny hmyzem) a signifikantní rozdíly vykazovaly pouze trypanosomy *T. sp.* “ring“ a *T. ranarum*, nicméně byl zjištěn opačný trend, tedy samci byli tímto druhem trypanosom nakaženi

výrazně méně než samice. Nicméně se nejspíš jedná o nedostatečný počet vzorků (samci – 9 a 6 jedinců, samice – 31 a 28 jedinců, popořadě).

Vysokou míru směsných infekcí (71 %), kterou jsme v naší studii zaznamenali, zjistili u trypanosom zelených skokanů i Spodareva *et al.* (2018) na Ukrajině, kde byly mix infekce zaznamenány kromě jednoho případu ve všech sledovaných skokanech. Přestože byly směsné infekce zaznamenány již dříve (Ferreira *et al.*, 2007b), nebyly zdaleka tak běžné. Je však velmi pravděpodobné, že u starších studií zaměřených na morfologii nebyla často vzhledem k vysoké míře polymorfismu a pleomorfismu mix infekce zaznamenána (Bardsley & Harmsen, 1969; Žičkus, 2002). V naší studii jsme v jednom případě detekovali směsnou infekci až šesti druhů. To, že jich nebylo detekováno více (nebo častěji) neznamená, že by se v našich vzorcích nemohlo vyskytovat větší množství druhů. Odečítání “peaků“ z programu Geneious je však nemuselo odhalit, protože tato metoda má své limity. Již nad rámec této diplomové práce bylo několik vybraných vzorků se směsnými infekcemi podrobena nanoporovému sekvenování a výsledky velmi dobře korespondují s výsledky získanými odečítáním vícenásobných “peaků“, avšak šest druhů je pravděpodobně maximální relativně spolehlivě detekovatelný počet. Nicméně žádná jiná studie takto početnou směsnou infekci nezaznamenává. Pouze Desser (2001) popsal pět různých druhů z jednoho jedince, nicméně je popisoval na základě morfologie a mohlo se jednat jen o různé morfotypy menšího počtu druhů. Spodareva *et al.* (2018) diskutují, že se všechny (nebo alespoň většina) druhů v mix infekci přenáší naráz, a proto se mohou směsné infekce vyskytovat v tak velkém procentu testovaných vzorků, což vysvětluje i naše výsledky. Na základě našich výsledků bohužel není možné spekulovat o případné vektorové (pijavky vs. komáři) specifitě.

## 5.2 Výskyt trypanosom v různých tkání

Naše výsledky ukázaly a potvrdily očekávaný výskyt žabích trypanosom nejen v krvi, ale také v játrech, v nichž byl výskyt trypanosom popsán již dříve (Fantham *et al.*, 1942; Reilly & Woo, 1982c). Nicméně nedetekovali jsme žádnou infekci v testovaných srdcích, a to i přes to, že v srdci byl výskyt popsán také (Lemos *et al.*, 2013). Bohužel jsme v těchto případech neměli kontrolu, zda byli skokani opravdu negativní nebo zda se v krvi trypanosomy vyskytovaly a v srdcích nikoli. U vzorků z jater byla u dvou pozitivních vzorků testována i krev, v tomto případě byla krev u obou vzorků negativní i přes pozitivní nález v játrech. Tuto situaci může vysvětlovat migrace trypanosom z periferní krve do orgánů v průběhu dne, kdy během dne se v periferní krvi parazitémie zvyšuje (Southworth *et al.*, 1968). Jelikož odběry probíhaly v dopoledních hodinách, je možné, že u trypanosom probíhal výše popsáný cyklus a v periferní krvi ještě nebyly přítomny v dostatečném množství.

Migrace trypanosom byla sledována i v průběhu roku, kde autoři sledovali vzrůst krevní parazitémie na jaře, která přetrvávala do léta, někdy i do podzimu (Johnson *et al.*, 1993; Bartlett-Healy *et al.*, 2009). My jsme měli možnost získat krev žab v ÚŽFG AV ČR v Liběchově během pitev probíhajících v prosinci. Všech sedm skokanů bylo negativních, což je velmi netypické (bohužel vnitřní orgány nebyly z logistických důvodů otestovány). Jejich negativita mohla být způsobena právě migrací trypanosom z periferní krve do vnitřních orgánů v průběhu zimy. Nenašla jsem sice žádnou studii, ve které by výzkumníci testovali žáby a jejich trypanosomy v zimě, ale studie zaměřující se na efekt teploty na parazitémii potvrdila, že při nižší teplotě je mnohem nižší periferní parazitémie než při teplotě vyšší (Bardsley & Harmsen, 1969). Je tedy možné předpokládat, že v důsledku chladu se trypanosomy v zimě stěhují z periferní krve do vnitřních orgánů.

### 5.3 Druhová diverzita trypanosom

Ve střední Evropě a na Balkánském poloostrově jsme detekovali celkem 13 druhů žabích trypanosom (včetně typu G, ze kterého se nám nepodařilo získat dostatečně kvalitní sekvenci). Výpočet odhadu celkového počtu druhů jednoznačně ukázal, že se nám ve zkoumaných lokalitách u skokanů rodu *Pelophylax* podařilo zachytit naprostou většinu druhů. Dokonce bylo testováno i další 74 vzorků (které v této diplomové práci nejsou zahrnuty) z Maďarska, Německa, Ukrajiny, Libanonu, Tádžikistánu a Kyrgyzstánu, avšak k rozšíření parazitofauny a celkové diverzity trypanosom nedošlo.

Pět z námi zjištěných druhů (MOTU) se shodovalo s morfologicky či fylogeneticky definovanými druhy pocházejícími z Česka a Ukrajiny (*T. lorricatum*, *T. ranarum*, *T. rotatorium*, *T. sp.* “nautilus“ a *T. sp.* “ring“) (Spodareva *et al.*, 2018). První molekulárně charakterizovaný izolát *T. rotatorium* pochází z Kanady (Clark *et al.*, 1995), nicméně je fylogeneticky velmi vzdálený sekvencím evropských *T. rotatorium* (Spodareva *et al.*, 2018 a tato studie). Jak již bylo uvedeno, kvůli polymorfismu a pleomorfismu jsou pozorované morfotypy často nesprávně zařazovány do druhů, což dvojnásobně platí u druhu *T. rotatorium*, protože tato trypanosoma je uváděna u několika různých druhů žab po celém světě (Bardsley & Harmsen, 1973; Werner & Kirwin, 1993; Spodareva *et al.*, 2018). Jelikož je *T. rotatorium* původně popsána z evropských zelených skokanů (Mayer, 1843), Spodareva *et al.* (2018) se zcela odůvodněně domnívají, že kanadský izolát představuje nový, ještě nepopsaný druh. Podobný scénář platí i pro sekvence evropských a kanadských zástupců *T. ranarum*, a to i přes jejich fylogenetickou blízkost (nicméně v případě kanadského izolátu *T. ranarum* vstupuje do hry ještě velmi pochybná kvalita samotné sekvence).

Z celkového počtu námi detekovaných druhů jich je osm nových, dosud nepopsaných (nepojmenovaných) a molekulárně necharakterizovaných (jako MOTU). K druhu *T. lorricatum*, který představuje důležitý článek vysvětlující evoluční vztahy v rámci skupiny “Aquatic clade“ (Spodareva *et al.*, 2018), přibýly tři další druhy (*T. sp.* H, I a K) nacházející se na bázi skupiny rybích trypanosom,

kteře hypotézu o parafyletickém původu žabích trypanosom podporují. Několik předchozích studií sice chápe skupinu žabích trypanosom jako monofylum (Ferreira *et al.*, 2007b, 2008, 2015; Attias *et al.*, 2016), nicméně vzhledem k fylogenetickému postavení *T. loricatum* a třech našich nově detekovaných druhů se ukazuje, že se jedná společně s rybími trypanosomami spíše o parafyletickou skupinu. Toto postavení žabích trypanosom ukazuje, že obojživelníci jsou primárními hostiteli trypanosom (Spodareva *et al.* 2018) a je tedy symbolické, že první trypanosoma byla objevena právě u žab. Rybí trypanosomy se do svých hostitelů (zprvu sladkovodních) přenesli teprve sekundárně, a to díky společnému přenašeči, kterým jsou pijavice (Molyneux, 1977).

Další nový druh, *T. sp. J*, je sesterská s trypanosomou *T. therezieni* izolovanou z chameleona, nicméně podpora této společné skupiny je velmi nízká a pravděpodobně se jedná o arteficiální spojení. Příbuznost chameleoni trypanosomy s trypanosomami z žab se vysvětluje nízkou hostitelskou specifitou vektorů (pravděpodobně komárů) mezi žábami a plazy vedoucí k výměně hostitelů (Haag *et al.*, 1998). Zajímavé je postavení druhu *T. sp. F*, který zaujímá sesterské postavení (byť nestabilní) k celému vodnímu kladu, a to ve všech analýzách (ML, MP, Bayesovská analýza), a je tedy jednoznačným kandidátem na celogenomové sekvenování.

## 5.4 Hostitelská a geografická specifita

Hostitelská specifita žabích trypanosom byla sice popsána v několika málo případech, nicméně vždy v rámci čeledí, nikoliv druhů. Určitá hostitelská specifita byla zaznamenána u čeledí Bufonidae, Hylidae i Ranidae, kde trypanosomy nedokázaly experimentálně infikovat druhy z fylogeneticky vzdálenějších čeledí žab (Anderson & Ayala, 1968; Reilly & Woo, 1982b; Martin & Dessler, 1991b). Mezi nimi byla testována i kanadská *T. ranarum*, která nedokázala nakazit ropuchy ani rosničky (Martin & Dessler, 1991b). Naše druhy trypanosom pocházejí sice z několika druhů skokanů, nicméně pouze jednoho rodu. Když pomínu *T. sp. L*, která byla detekována pouze v jednom jedinci a *T. sp. G* ve dvou jedincích, všechny ostatní druhy trypanosom se vyskytovaly ve více druzích skokanů, a proto se zdá, že minimálně v rámci rodu *Pelophylax* nejsou zjištěné druhy trypanosom druhově specifické.

Jediný rozdíl je patrný z rozdílné dominance druhů u endemických balkánských skokanů *P. epeiroticus* a *P. shqipericus* oproti ostatním sledovaným druhům. U ostatních druhů zřetelně dominují *T. loricatum*, *T. rotatorium* a *T. sp. "nautilus"*. U *P. shqipericus* dominuje hlavně *T. sp. E* a *T. sp. F*, u *P. epeiroticus* je zastoupení trypanosom pestřejší a oproti jiným druhům skokanů je v něm ve velkém zastoupen *T. sp. I* a *T. sp. H*. Jelikož se jedná o balkánské druhy skokanů, jejich rozdíly by se daly vysvětlit geografii, nicméně třetí druh vyskytující se na Balkánském poloostrově, *P. kurtmuelleri* (121 pozitivních jedinců), vykazuje podobné zastoupení trypanosom jako střeoevropské druhy. Zjištěný rozdíl v zastoupení trypanosom může být způsoben i menším počtem detekovaných pozitivních jedinců u *P. epeiroticus* (81) a *P. shqipericus* (24). Větší množství

otestovaných jedinců by odhalilo, zda je odlišné druhové zastoupení trypanosom typické pro tyto dva zkoumané druhy skokanů, či se jednalo o vzorkovací artefakt. Nutno ale poznamenat, že *P. epeiroticus* hostí 10 druhů trypanosom, což je největší množství mezi všemi sledovanými druhy žab, což může souviset nejenom s geografíí (na Balkánském poloostrově je větší diverzita obecně, viz níže), ale i s nějakými (dosud neidentifikovanými) aspekty jeho způsobu života.

S hostitelskou specifitou je však úzce spjatá i geografická specifita. Ve střední Evropě byla detekována nižší druhová diverzita trypanosom (celkem 8 druhů) než na Balkánském poloostrově (12). Na Balkánském poloostrově se jako jediná nevyskytovala *T. ranarum*, kterou jsme detekovali pouze v Česku a na Slovensku. V Evropě byl tento druh trypanosomy původně morfologicky popsán z Německa (Lankester, 1871) a následně byl molekulárně potvrzen také v Česku a na Ukrajině (Spodareva et al., 2018). Její geografické rozšíření tedy zůstává, z dosud neobjasněných příčin, omezené na střední Evropu. Genetická diverzita parazitů (ale i hostitelů) může odrážet historické procesy jako je střídání dob ledových a meziledových ve čtvrtohorách (Hewitt, 2000; Mikulíček et al., 2021). V době glaciálů docházelo k ústupu druhů do klimaticky vhodných refugií v mediteránu, odkud v interglaciálech zase expandovali na území předtím pokryté ledovcem. Jedno z jižních refugií představoval i Balkánský poloostrov (Stewart et al., 2010), kde docházelo ke vzniku (či uchování) značné genetické diverzity a zdá se, že toto refugium je zdrojem značné části postglaciálních expanzí na sever. Díky těmto čtvrtohorním změnám má jižní Evropa obecně větší genetickou rozmanitost druhů (Hewitt, 2000). Tento rozdíl diverzity mezi střední Evropou a Balkánem může korespondovat i s diverzitou parazitických organismů v závislosti na diverzitě jejich hostitelů (Mikulíček et al., 2021), což potvrzují i výsledky této diplomové práce.

## 5.5 Morfologie trypanosom v hostitelích a v kultuře

### 5.5.1 Krevní formy

Detekované trypanosomy v této práci byly rozřazeny na čtyři různé morfotypy, které byly následně porovnány s již morfologicky popsánými druhy trypanosom v Evropě u rodu *Pelophylax* a všechny byly přiřazeny k dříve popsáným druhům/MOTU (Mayer, 1843; Lankester, 1871; Spodareva et al., 2018).

Morfotyp loricatum-like je rozdělen na 3 varianty podle velikosti a tvaru, které jsou zařazeny do jednoho morfotypu i na základě Molan et al. (1989). Tito autoři popisující *T. loricatum* dokumentovali krevní formy tohoto druhu v různých velikostech a tvarech. Morfotyp *T. rotatorium* byl rozdělen podle Spodareva et al. (2018) na dvě varianty: narrow form a broad form. Nicméně morfotyp rotatorium-like narrow form byl s porovnáním s morfotypy u *P. ridibundus* v Iráku podobný také *T. neveuleimare* (Molan et al., 1989). Autoři ale trypanosomy popisovali pouze na základě morfologie a my jsme *T. neveuleimare* geneticky vůbec nedetekovali. Dokonce

*T. neveulemaire* podle popisu Barta *et al.* (1989) je morfologicky podobná spíše námi označenému morfotypu ring-like, který byl pojmenován na základě podobnosti s *T. sp. "ring"* (Spodareva *et al.*, 2018). Izolát *T. neveulemaire* z bývalé Jugoslávie je s *T. sp. "ring"* fylogeneticky velmi příbuzný, nicméně k tomuto izolátu původní morfologie přiřazena nebyla (Martin *et al.*, 2002; Spodareva *et al.*, 2018).

V mnoha aspektech se zdá, že morfologické pojmenovávání druhů vede ke značným zmatkům a nesprávnému označování druhů. Navíc morfologie, kterou jsme pozorovali v nativních preparátech, je zcela rozdílná od morfologie na trvalých preparátech. Bohužel ani v této diplomové práci jsme nedokázali přiřadit konkrétní morfospecies ke genospecies. Už jen to, že geneticky bylo detekovaných 13 druhů, nicméně morfotypy byly rozřazeny pouze do 4 skupin (s rozdělením na všechny varianty do 7 skupin), značí že morfologie není vhodné kritérium pro popis nových druhů, ale ani k jednoznačnému přiřazení ke stávajícím druhům. To dokládá i Ferreira *et al.* (2007b) v Brazílii, který odhalil celkem 11 morfotypů, které se lišily velikostí i tvarem nejen mezi jednotlivými druhy žab a mezi jedinci téhož druhu, ale dokonce i v rámci jednoho jedince. Na druhou stranu pozorovali morfologicky podobné trypanosomy u různých druhů ze stejných i jiných čeledí hostitelů. Nicméně nejproblematičtější částí při popisu morfologie krevních stádií trypanosom zůstává skutečnost, že u skokanů se ve většině případů jedná o směsné infekce, a tak je poměrně obtížné jednoznačně přiřadit získané sekvence k příslušnému morfologickému typu.

### **5.5.2 Stádia v kultuře**

U krevních morfotypů jsou problematické hlavně výše zmíněné a velmi frekventované směsné infekce. Proto byl náš cíl otestovat morfotypy kultur, které obsahují pouze jeden druh, který po čase převládne nad ostatními. Nicméně všechny pozorované kultury obsahují vícero morfologických forem a stádií parazitů, které se navíc vzájemně podobají napříč testovanými čtyřmi druhy trypanosom. Morfologie buněk z kultur tedy není vhodná k použití jejich vzájemného rozlišení. Podobné morfologické formy námi pozorované v kulturách se moc neliší i od již popsanych (Ayala, 1971; Martin & Desser, 1991a; Lemos *et al.*, 2013; Attias *et al.*, 2016).

### **5.5.3 Rozlišení druhů na základě velikosti kinetoplastu**

Vzhledem k obtížné využitelnosti morfologie krevních stádií (směsné infekce apod.) a nejednoznačnosti morfologicky vysoce variabilních buněk v kulturách jsme se rozhodli otestovat, zda se mezi jednotlivými druhy, které byly k dispozici v kultuře, liší struktura či vzhled kinetoplastu. Kinetoplast má velmi variabilní tvar (zejména výšku) a v rámci rodu *Trypanosoma* se velmi liší velikostí a také počtem vrstev minikroužků. Neliší se pouze mezi jednotlivými druhy trypanosom různých skupin obratlových hostitelů, ale i v rámci stejné třídy obratlovců (Lukeš & Votýpka, 2000;

Votýpka *et al.*, 2002; Zídková *et al.*, 2012; Cooper *et al.*, 2017). Vzhled i velikost kinetoplastu se liší také u žabích trypanosom (Martin & Desser, 1991a; Attias *et al.*, 2016, 2022).

V rámci našich měření jsme potvrdili, že výška kinetoplastu je stálou veličinou, a tedy že se u příslušného druhu neliší v případě různých pasáží, geograficky vzdálených kmenů, různých genotypů, a dokonce ani mezi stádii z kultur a stádii v hmyzím přenašeči (experimentálně infikovaných komárů). Tyto výsledky naznačují, že výška kinetoplastu je stabilní a vhodný determinační znak, jelikož je její hodnota stálá. Otázkou zůstává, zda je tomu tak i v případě krevních forem, ale ověření této možnosti je v současné době metodicky téměř nemožné. Martin & Desser (1991a) sice pozorovali rozdíl ve velikosti kinetoplastu *T. fallisi* v kultuře a v nakažené pijavici, nicméně molekulární důkaz, že se jednalo o stejný druh, chybí.

Přestože ultrastruktura kinetoplastu žabích trypanosom byla studována v několika případech (Steinert, 1960; Desser, 1976; Martin & Desser, 1991a; Attias *et al.*, 2022), pouze u *T. herthameyeri* a *T. fallisi* byla měřena jejich výška (Martin & Desser, 1990; Attias *et al.*, 2016). U žádných evropských druhů nebyla doposud ultrastruktura studována. My jsme porovnali výšku kinetoplastu u pěti druhů trypanosom, u kterých se navzájem signifikantně lišila. Trypanosomy *T. loricaatum* (142,9±33,4 nm) a *T. sp. H* (180,0±36,6 nm), které obě vykazovaly klasickou jednoduchou diskovitou strukturu kinetoplastu a jejich naměřené výšky byly nejmenší, patří zároveň obě do skupiny trypanosom fylogeneticky příbuzných k rybím trypanosomám. Kinetoplast *T. sp. E* (212,6±38,8 nm) vykazuje 2 vrstvy minikroužků a *T. sp. "ring"* dokonce 3 vrstvy (301,1±66 nm) (viz též Lukeš & Votýpka 2000). I přes jejich rozdílně ultrastrukturální rysy v počtu vrstev se jejich výška neliší o více než 90 nm a navíc se jedná o fylogeneticky příbuzné druhy. Společně s trypanosomou *T. ranarum* (549,2±93,8 nm), u které je kinetoplast odlišný a nápadně vyšší, patří sice do stejného kladu (An04/Frog 1), ale jiného subkladu. Kinetoplast *T. ranarum* je oproti ostatním velmi vysoký a nevykazuje žádné vrstvy minikroužků. *T. fallisi*, která je fylogeneticky příbuzná (sesterská) *T. ranarum*, vykazuje sice menší výšku kinetoplastu (388 – 425 nm), ale jejich struktura je podobná (Martin & Desser, 1990).

V rozsáhlé studii o ptačích trypanosomách byly izoláty rozděleny do dvou skupin na základě výšky kinetoplastu: izoláty s kinetoplastem pod 500 nm a nad 500 nm. Jejich výška sice neumožňovala identifikaci konkrétního druhu, ale trypanosomy náležící do jedné nebo druhé skupiny byly fylogeneticky příbuzné (Zídková *et al.*, 2012). Z našich výsledků je také patrné, že i u námi studovaných zástupců se vyskytuje určitý fylogenetický vztah a podobná struktura anebo výška kinetoplastových disků. Druhů žabích trypanosom se známou výškou a strukturou kinetoplastů je však zatím poměrně málo, a proto bude nutné získat další výsledky pro potvrzení této hypotézy.

## 5.6 Experimentální infekce komárů

Komáři rodu *Culex territans* jsou předpokládáni vektorů trypanosom obojživelníků. Důkaz nepochází pouze z experimentálních infekcí (Desser *et al.*, 1973), ale také z molekulárních studií, které dokázaly přítomnost trypanosom náležících do “Aquatic clade“ z nasáté krve volně odchycených samic komárů společně s determinací jejich žabího hostitele (Bartlett-Healy *et al.*, 2009). Vzhledem k tomu, že tento komáří druh přednostně saje na obojživelnících (Savage *et al.*, 2007), je lákán vokalizací samců žab (Bartlett-Healy *et al.*, 2008) a vyskytuje se i v Česku (Rettich *et al.*, 2007), jsme se rozhodli s tímto druhem provést experimentální infekce se získanými druhy skokaních trypanosom. Bohužel kolonizace komárů, respektive odchov dopadl neúspěšně a my jsme proto museli upustit od původního plánu. Pokusili jsme se proto o experimentální infekce s druhy komárů, které jsou na katedře parazitologie běžně chováni, tedy *Cx. pipiens* f. *molestus*, *Cx. quinquefasciatus* a *Aedes aegypti*.

Všechny tři výše zmíněné druhy preferují k sání teplokrevné hostitele jako jsou savci a ptáci. Avšak například ve studii hostitelských preferencí *Cx. quinquefasciatus* v USA byla u 4 % nasátých samic zjištěna žabí krev (Savage *et al.*, 2007). Také *Aedes aegypti* v laboratorních podmínkách sál v několika případech na žabách, jeho ochota sát se ale zvětšovala se zvýšenou teplotou žabích hostitelů (Causey, 1939; Willis, 1958; Bailey, 1962; Ramos & Urdaneta-Morales, 1977). Přes to, že Bailey (1962) zmiňuje, že v USA *Aedes aegypti* běžně saje v přirozeném prostředí na skokanech, v rozsáhlém přehledovém článku o hostitelích těchto komárů v Evropě žáby nejsou zmíněny (Cebrián-Camisón *et al.*, 2020). Zda se v hostitelské preferenci komárů *Cx. pipiens* f. *molestus* objevují žabí hostitelé, není známo. Sání na žábě bylo dokázáno pouze při experimentálních infekcích, kdy komáři sáli velmi neochotně, spíše pod podmínkou zvýšením teploty žáby elektrickou lampou (Witenberg & Gerichter, 1944). Autoři, kteří sledovali vývoj hlístice v komárovi, zmiňují, že tento komár v přirozeném prostředí není vhodný přenašeč. Z toho vyplývá, že šance na přenos žabích trypanosom v přírodě je u těchto druhů komárů mizivá. Nicméně předpokládáme, že vývoj a lokalizace parazitů ve střevě komárů by mohl být obdobný jako v případě přirozeného přenašeče.

Tuto naši domněnku potvrzuje i velmi podobný vývoj žabích trypanosom sledovaný v některých případech až do 100 hodin po sání experimentálně infikovaných mamaliofilních komárů *Aedes aegypti* a *Culex pipiens* s porovnáním s batrachofilním druhem komára *Culex territans* (Bailey, 1962; Desser *et al.*, 1973; Ramos & Urdaneta-Morales, 1977). I přes to, že konkrétně u komárů *A. aegypti* sledovali autoři vývoj trypanosom jen do defekace komárů (tj. max. 60 hodin po sání), neopodstatněně uvádí, že jsou přenašeči žabích trypanosom (Bailey, 1962). Navíc v jejich studii byly ve střevě komárů zaznamenány zbytky krve ještě 5 DPI. Autoři nepopisují výskyt trypanosom ve střevě po tomto kritickém dni (tedy dni defekace), a protože paraziti mohou být v tento moment z hostitele vyloučeni, je předčasné uvažovat o možnosti zapojení tohoto druhu komára do přenosu trypanosom. My jsme sice prokázali u některých druhů trypanosom (zejména *T. ranarum*,

*T. sp.* “ring“ a *T. sp.* E) vývoj ve všech sledovaných druzích komárů, a to i po defekaci, nicméně vzhledem k velmi malé až nulové pravděpodobnosti sání na žabách ve volné přírodě, jsou tyto komáří druhy sice možnými, ale epidemiologicky nevhodnými přenašeči. Přesto naše výsledky naznačují, že u těchto druhů trypanosom mohou hrát vhodné druhy komárů roli v jejich přenosu mezi žabími hostiteli.

Naše výsledky experimentálních infekcí také ukázaly, že dva druhy trypanosom z pěti testovaných se ve střevě komárů po jejich defekaci neuchytily. Jednalo se konkrétně o *T. loricaatum* u komárů *Cx. pipiens f. molestus* a *Cx. quinquefasciatus* a o *T. sp.* H u komárů *Cx. pipiens f. molestus*. Jelikož se pokusy z časových i dalších důvodů neopakovaly, není vyloučeno, že i přes totožnou metodiku s ostatními druhy trypanosom se v použité kultuře nevyskytovaly správné infekční formy. Dalším vysvětlením negativy infikovaných komárů může být neadaptibilita trypanosom na komáří přenašeče, a tedy zapojení jiných vektorů, pravděpodobně pijavic. Ostatní tři druhy se po defekaci ve střevě komárů uchytily a je pravděpodobné, že jsou na přenos prostřednictvím komárů adaptované. Pitvané slinné žlázy byly ve všech případech negativní, proto k přenosu pravděpodobně nedochází při samotném sání. Negativita slinných žláz byla dokumentována i v několika dalších studiích (Bailey, 1962; Desser *et al.*, 1973; Ramos & Urdaneta-Morales, 1977).

Experimentální infekce s trypanosomou *T. ranarum* ukázaly signifikantní rozdíl v počtu nakažených samic v rámci tří testovaných druhů komárů. Experimentální infekce byla provedena dvakrát nezávisle pro druhy *Cx. quinquefasciatus* a *A. aegypti* a třikrát pro druh *Cx. pipiens f. molestus*. I přes snahu o maximálně identické podmínky a stejnou metodiku v rámci opakovaných sání se vyskytly signifikantní rozdíly v prevalenci, které mohly mimo jiné souviset se stavem kultur parazitů apod. Prevalence trypanosom v komárech po defekaci u druhého (a na infekci úspěšnějšího) pokusu dosahovala 77 % u *Cx. pipiens f. molestus*, a byla signifikantně vyšší než u *A. aegypti* (34 %) a *Cx. quinquefasciatus* (23 %). Přestože oba testovaní komáři rodu *Culex* patří do komplexu *Cx. pipiens*, a přes zcela identické podmínky v metodice nákazy, jsou jejich prevalence velmi rozdílné. Toto zjištění je jen obtížně vysvětlitelné, protože lze předpokládat, že fyziologické a imunologické mechanismy budou u obou druhů téměř identické. Ve studii, kde probíhala experimentální infekce současně u *Cx. pipiens* a *A. aegypti*, zaznamenali autoři mnohem více uchycených trypanosom i jejich vyšší intenzitu u rodu *Aedes* (Ramos & Urdaneta-Morales, 1977), což je opět nepředpokládaný výsledek. Nicméně žádná studie nepopisuje rozdíl mezi druhy rodu *Culex*.

Vývoj trypanosom v komárech jsme sledovali do 21 DPI, nicméně ostatní studie zaznamenávaly vývoj v komárech maximálně do 100 hodin po sání, což je necelých 5 dní (Bailey, 1962; Desser *et al.*, 1973; Ramos & Urdaneta-Morales, 1977). Vývoj byl ovšem ve všech případech popisován podobně: tedy že trypanosomy se postupem času stěhovaly z midgutů do hindgutů, kde infekce zůstávala. Naše výsledky ukázaly stejný průběh změn v lokalizaci trypanosom v rámci

komářího střeva. Avšak pátý den po experimentálním sání autoři zaznamenávali už jen infekce lokalizované v hindgutu, zatímco naše studie ukázala infekci v midgutu u druhu *T. sp.* E ještě 12 DPI, nicméně se jednalo jen o ojedinělý případ. Od tohoto dne už trypanosomy zůstávaly pouze v různých částech zadního střeva. Podobná lokalizace nebyla zaznamenána pouze u komárů, ale také u jiných druhů hmyzích přenašečů. Výskyt trypanosom ve středním a zadním střevě byl zaznamenán u *Corethrella wirthi* (Johnson *et al.*, 1993) a *Lutzomyia vexator* (Anderson & Ayala, 1968; Ayala, 1971). Přenos u druhů, kde vývoj končí v zadní části střeva, je uváděn jako možný prostřednictvím požití komárů žábami v průběhu sání (Ramos & Urdaneta-Morales, 1977). Tento způsob nákazy byl experimentálně prokázán u flebotomů, kdy nakaženým hmyzem krmili ropuchy, které se staly pozitivními (Anderson & Ayala, 1968). U rodu *Corethrella* pravděpodobně infekce žab probíhá přes defekaci uskutečňovanou ještě v průběhu sání (Johnson *et al.*, 1993; Borkent, 2008). Obě možnosti u komárů podporují fakt, že komár *Culex territans* se krmí na žabách do úplného nasátí dlouhou dobu, a to více jak 40 minut (Reinhold *et al.*, 2021). Tato dlouhá doba sání umožňuje vylučování vody v průběhu sání (prediureze), která u komára *Cx. territans* pozorována byla (Ferguson *et al.*, 2013). Tato tekutina může obsahovat infekční stádia parazita a tím nakazit hostitele. Výskyt těchto forem savčích druhů trypanosom byl potvrzen u komára *Aedes aegypti* (Brotánková *et al.*, 2022), a lze tedy uvažovat o této formě přenosu také u žabích trypanosom.

Rozetovité útvary trypanosom byly v rámci této práce pozorovány pouze v zadní části střeva. Nicméně autoři zkoumající vývoj trypanosom u *A. aegypti* našli rozety už pár hodin po sání ve středním střevě (Bailey, 1962; Ramos & Urdaneta-Morales, 1977), ovšem v hindgutu je pozorovali také (Ramos & Urdaneta-Morales, 1977). Přestože přichycení trypanosom ke stěně střeva (zejména hindgutu) pozorováno bylo a autoři předpokládali uchycení trypanosom ke stěně střeva pomocí volného bičíku (Bailey, 1962), detail přichycení byl pod elektronovým mikroskopem pozorován u žabích trypanosom pouze u pijavic (Desser, 1976). Autoři pozorovali připojení trypanosom pomocí bičíku ke stěně trávicí soustavy pijavic prostřednictvím hemidesmosomů, stejně tak, jak jsme to pozorovali i v naší studii. Toto přichycení k chitinózní výstelce bylo popsáno opakovaně a je zcela běžné u různých druhů přenašečů savčích a ptačích trypanosom (Garcia & Azambuja, 1991; Votýpka & Svobodová, 2004; Brotánková *et al.*, 2022).

Zdá se, že vývoj různých druhů trypanosom ve střevě komárů probíhá víceméně podobně, jelikož žádné nápadné rozdíly v morfologii jsme nezaznamenali. Pozorované morfotypy se nelišily ani mezi jednotlivými druhy komárů. Podobná morfologie s drobnými rozdíly byla zaznamenána i v jiných studiích nejen v komárech, ale i ve flebotomech či pijavicích (Anderson & Ayala, 1968; Bailey, 1962; Martin & Desser, 1991a). Morfotypy trypanosom ze střev komárů jsou podobné formám z kultur, což odpovídá představě, že kultivační podmínky dávají vznik vektorovým stádiím. Martin & Desser (1991a) také pozorovali podobné morfotypy vektorových stádií (v pijavici) a v kultuře, avšak s některými ultrastrukturálními rozdíly, které vysvětlují možným rozdílem

v kultivačních podmínkách. Také Ayala (1971) zaznamenal vliv prostředí na morfologii žabích trypanosom – stejný druh trypanosomy vykazoval patrné rozdíly mezi dvěma typy média a vektorovým stádiem. Kultivační podmínky tedy značně ovlivňují morfologii, a proto buňky z vektorů či kultur nenesou dostatečně charakteristické znaky použitelné pro determinaci příslušného druhu trypanosom.

## 6 Závěr

Celkem bylo zpracováno 981 jedinců zelených skokanů pocházejících ze střední Evropy a Balkánského poloostrova a trypanosomy byly detekovány v 697 jedincích, což představuje velmi vysokou prevalenci (71 %). Signifikantní rozdíl v nákaze byl zaznamenán ve vztahu k věku skokanů, kde dospělí jedinci byli infikováni signifikantně více (75 %) než juvenilové (49 %) a subadulti (45 %). Naopak pohlaví hostitelů na celkový výskyt trypanosom nemělo vliv (samci – 72 %, samice – 74 %), rozdíl mezi pohlavím byl pozorován pouze u druhů *T. sp. "ring"* a *T. ranarum*, kde se tyto trypanosomy vyskytovaly více u samic. Byla také zaznamenána vysoká míra směsných infekcí, které ze všech pozitivních vzorků tvořily 71 % a bylo zjištěno až šest druhů trypanosom v jednom jedinci.

Detekováno bylo celkem 13 druhů trypanosom a odhad druhové bohatosti předpokládá maximálně o jeden druh více. U pěti z detekovaných druhů trypanosom se jedná o již už dříve popsané či alespoň molekulárně charakterizované zástupce (*T. loricatum*, *T. ranarum*, *T. rotatorium*, *T. sp. "ring"* a *T. sp. "nautilus"*), zbývajících osm je možné považovat za nové druhy (*Trypanosoma* sp. E, F, G, H, I, J, K a L).

Dominantními druhy parazitů vyskytujícími se u všech druhů skokanů jsou *T. rotatorium*, *T. loricatum* a *T. sp. "nautilus"*. Hostitelská specifita nebyla prokázána ani u jednoho druhu trypanosomy nebo skokana. Největší diverzita byla zaznamenána u druhu *P. epeiroticus*, u kterého bylo zjištěno celkem deset druhů trypanosom. Celkově větší diverzita trypanosom byla zaznamenána na Balkánském poloostrově, kde se vyskytuje dvanáct druhů, zatímco ve střední Evropě pouze osm.

Bohužel jednoznačný vztah mezi morfospecies a genospecies nebyl v rámci této diplomové práce popsán. Nicméně bylo potvrzeno, že morfologie krevních forem ani stádií z kultur či vektorů není dostatečně spolehlivým parametrem pro určování žabích druhů trypanosom. Morfotypy byly zařazeny do čtyř skupin (a celkem sedmi variant), což neodpovídá 13 molekulárně detekovaným druhům trypanosom. Morfotypy se navíc stoprocentně neshodovaly s předpokládaným genotypem v žádném ze studovaných případů. U pěti kultivovaných druhů (*T. loricatum*, *T. ranarum*, *T. sp. "ring"*, *T. sp. E* a *T. sp. H*) byla měřena výška kinetoplastu, která se mezi testovanými druhy vzájemně signifikantně liší.

Z pěti testovaných druhů trypanosom potvrdily experimentální infekce vývoj parazitů v komárech *Culex pipiens* f. *molestus* u tří (*T. ranarum*, *T. sp. "ring"* a *T. sp. E*) a je tedy možné, že tyto druhy využívají pro svůj přenos právě komáry. Trypanosoma *T. ranarum* vykazovala signifikantně vyšší procento infekce u komára *Cx. pipiens* f. *molestus* v porovnání s *Cx. quinquefasciatus* a *A. aegypti*. Lokalizace všech tří druhů trypanosom se ve střevě komárů v průběhu infekce přemístila z midgutů do hindgutů, kde paraziti setrvali až tři týdny od nákazy ve volných formách nebo rozetách přichycených ke stěně střeva prostřednictvím hemidesmosomů.

## 7 Seznam literatury

- Aihara, I., de Silva, P., & Bernal, X. E. (2016). Acoustic preference of frog-biting midges (*Corethrella* spp.) attacking túngara frogs in their natural habitat. *Ethology*, 122(2), 105–113.
- Anderson, J. R., & Ayala, S. C. (1968). Trypanosome transmitted by *Phlebotomus*: First report from the Americas. *Science*, 161(3845), 1023–1025.
- Attias, M., Sato, L. H., Ferreira, R. C., Takata, C. S. A., Campaner, M., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. G., & de Souza, W. (2016). Developmental and ultrastructural characterization and phylogenetic analysis of *Trypanosoma herthameyeri* n. sp. of Brazilian Leptodactylidae frogs. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(5), 610–622.
- Attias, M., Vidal, J. C., Takata, C. S. A., Campaner, M., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. G., & de Souza, W. (2022). Remarkable kinetoplast, cytostome-cytopharynx complex, and storage-related structures as dissected by three-dimensional reconstruction of *Trypanosoma* sp. 858 isolated from a toad (Amphibia: Anura). *Micron*, 152, 1–9.
- Ayala, S. C. (1970). Two new trypanosomes from California toads and lizards. *The Journal of Protozoology*, 17(3), 370–373.
- Ayala, S. C. (1971). Trypanosomes in wild california sandflies, and extrinsic stages of *Trypanosoma bufophlebotomi*. *The Journal of Protozoology*, 18(3), 433–436.
- Bailey, J. K. (1962). *Aedes aegypti* as a possible new invertebrate host for frog trypanosomes. *Experimental Parasitology*, 12(3), 155–163.
- Bardsley, J. E., & Harmsen, R. (1969). The trypanosomes of Ranidae. I. The effects of temperature and diurnal periodicity on the peripheral parasitaemia in the bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw). *Canadian Journal of Zoology*, 47(3), 283–288.
- Bardsley, J. E., & Harmsen, R. (1970). The trypanosomes of Ranidae. II. The effects of excitation and adrenalin on the peripheral parasitaemia in the bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw). *Canadian Journal of Zoology*, 48, 1317–1319.
- Bardsley, J. E., & Harmsen, R. (1973). The trypanosomes of anura. *Advances in Parasitology*, 11(C), 1–73.
- Barrow, J. H. (1953). The biology of *Trypanosoma diemyctyli* (Tobey). I. *Trypanosoma diemyctyli* in the leech, *Batrachobdella picta* (Verrill). *Transactions of the American Microscopical Society*, 72(3), 197–216.
- Barta, J. R., & Desser, S. S. (1984). Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. *Journal of Wildlife Diseases*, 20(3), 180–189.
- Barta, J. R., Boulard, Y., & Desser, S. S. (1989). Blood parasites of *Rana esculenta* from Corsica: Comparison of its parasites with those of eastern North American ranids in the context of host phylogeny. *Transactions of the American Microscopical Society*, 108(1), 6–20.
- Bartlett-Healy, K., Crans, W., & Gaugler, R. (2008). Phonotaxis to amphibian vocalizations in

- Culex territans* (Diptera: Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 101(1), 95–103.
- Bartlett-Healy, K., Crans, W., & Gaugler, R.** (2009). Vertebrate hosts and phylogenetic relationships of amphibian trypanosomes from a potential invertebrate vector, *Culex territans* Walker (Diptera: Culicidae). *Journal of Parasitology*, 95(2), 381–387.
- Bernal, X. E., Rand, A. S., & Ryan, M. J.** (2006). Acoustic preferences and localization performance of blood-sucking flies (*Corethrella* Coquillett) to túngara frog calls. *Behavioral Ecology*, 17(5), 709–715.
- Bernal, X. E., & Pinto, C. M.** (2016). Sexual differences in prevalence of a new species of trypanosome infecting túngara frogs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 5(1), 40–47.
- Billet, A.** (1904). Sur le *Trypanosoma inopinatum* de la grenouille verte d'Algérie et sa relation possible avec les Drepanidium. *Comptes Rendus de La Société de Biologie*, 57, 161–164.
- Bisconti, R., Martino, G., Chiochio, A., Siclari, A., & Canestrelli, D.** (2019). Balkan marsh frogs *Pelophylax kurtmuelleri* (Gayda, 1940) introduced in the Aspromonte National Park, southern Italy. *BioInvasions Records*, 8(1), 26–33.
- Borkent, A.** (2008). The frog-biting midges of the world (Corethrellidae: Diptera). *Zootaxa*, 1804, 1–456.
- Brotánková, A., Fialová, M., Čepička, I., Brzoňová, J., & Svobodová, M.** (2022). Trypanosomes of the *Trypanosoma theileri* group: Phylogeny and new potential vectors. *Microorganisms*, 10, 1–17.
- Cable, J., Barber, I., Boag, B., Ellison, A. R., Morgan, E. R., Murray, K., Pascoe, E. L., Sait, S. M., Wilson, A. J., & Booth, M.** (2017). Global change, parasite transmission and disease control: Lessons from ecology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1719), 1–17.
- Causey, O. R.** (1939). *Aedes* and *Culex* mosquitoes as intermediate hosts of frog filaria, *Foleyella* sp. *American Journal of Epidemiology*, 29-Section(2), 79–81.
- Cebrián-Camisón, S., Puente, J. M. de la, & Figuerola, J.** (2020). A literature review of host feeding patterns of invasive aedes mosquitoes in Europe. *Insects*, 11(12): 848, 1–16.
- Chao, A., & Chiu, C.** (2016). Species richness: estimation and comparison. *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*, 1: 26, 1–38.
- Choleva, L.** (2005). Může se stát skokan zelený druhem? *Živa*, 3, 133–135.
- Clark, C. G., Martin, D. S., & Diamond, L. S.** (1995). Phylogenetic relationships among anuran trypanosomes as revealed by riboprinting. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 42(1), 92–96.
- Cooper, C., Thompson, R. C. A., Botero, A., Kristancic, A., Peacock, C., Kirilak, Y., & Clode, P. L.** (2017). A comparative molecular and 3-dimensional structural investigation into cross-

- continental and novel avian *Trypanosoma* spp. in Australia. *Parasites and Vectors*, 10:234, 1–13.
- Desser, S. S., McIver, S. B., & Ryckman, A.** (1973). *Culex territans* as a potential vector of *Trypanosoma rotatorium*. I. Development of the flagellate in the mosquito. *The Journal of Parasitology*, 59(2), 353–358.
- Desser, S. S., McIver, S. B., & Jez, D.** (1975). Observations on the role of simuliids and culicids in the transmission of avian and anuran trypanosomes. *International Journal for Parasitology*, 5, 507–509.
- Desser, S. S.** (1976). The ultrastructure of the epimastigote stages of *Trypanosoma rotatorium* in the leech *Batrachobdella picta*. *Canadian Journal of Zoology*, 54, 1712–1723.
- Desser, S. S., & Yekutieli, D.** (1986). Blood parasites of amphibians and reptiles in Israel. *Israel Journal of Zoology*, 34(1–2), 77–90.
- Desser, S. S.** (2001). The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. *The Journal of Parasitology*, 87(1), 152–160.
- Diamond, L. S.** (1965). A study of the morphology, biology and taxonomy of the trypanosomes of Anura. *Wildlife Disease*, 44, 1–77.
- Domeneghetti, D., Bruni, G., Fasola, M., & Bellati, A.** (2013). Discovery of alien water frogs (gen. *Pelophylax*) in Umbria, with first report of *P. shqipericus* for Italy. *Acta Herpetologica*, 8(2), 171–176.
- Dormann, C. F., Gruber, B., & Fründ, J.** (2008). Introducing the bipartite package: analysing ecological networks. *R News*, 8(2), 8–11.
- Dubey, S., Leuenberger, J., & Perrin, N.** (2014). Multiple origins of invasive and “native” water frogs (*Pelophylax* spp.) in Switzerland. *Biological Journal of the Linnean Society*, 112(3), 442–449.
- Fantham, H. B., Porter, A., Richardson, L. R., Fantham, H. B., Porter, A., & Richardson, L. R.** (1942). Some haematozoa observed in vertebrates in eastern Canada. *Parasitology*, 34(2), 199–226.
- Ferguson, L. V., Kirk Hillier, N., & Smith, T. G.** (2013). Influence of *Hepatozoon* parasites on host-seeking and host-choice behaviour of the mosquitoes *Culex territans* and *Culex pipiens*. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2(1), 69–76.
- Ferreira, R. C.** (2007a). Diversidade e filogenia de Tripanossomas de anuros. *Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo*.
- Ferreira, R. C., Campaner, M., Viola, L. B., Takata, C. S. A., Takeda, G. F., & Teixeira, M. M. G.** (2007b). Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitology*, 134(11), 1623–1638.

- Ferreira, R. C., De Souza, A. A., Freitas, R. A., Campaner, M., Takata, C. S. A., Barrett, T. V., Shaw, J. J., & Teixeira, M. M. G.** (2008). A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55(5), 427–435.
- Ferreira, J. I. G., da Costa, A. P., Ramirez, D., Roldan, J. A. M., Saraiva, D., Fountier, G. F.R., Sue, A., Zambelli, E. R., Minervino, A. H. H., Verdade, V. K., Gennari, S. M., & Marcili, A.** (2015). Anuran trypanosomes: phylogenetic evidence for new clades in Brazil. *Systematic Parasitology*, 91(1), 63–70.
- Forzán, M. J., Vanderstichel, R. V., Ogbuah, C. T., Barta, J. R., & Smith, T. G.** (2012). Blood collection from the facial (maxillary)/musculo-cutaneous vein in true frogs (family Ranidae). *Journal of Wildlife Diseases*, 48(1), 176–180.
- Foster, W. A., & Walker, E. D.** (2019). Mosquitoes (culicidae). In *Medical and veterinary entomology*. Academic press, 261-325.
- Garcia, E. S., & Azambuja, P.** (1991). Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitology Today*, 7(9), 240–244.
- Gibson, W. C., Lom, J., Pecková, H., Ferris, V. R., & Hamilton, P. B.** (2005). Phylogenetic analysis of freshwater fish trypanosomes from Europe using ssu rRNA gene sequences and random amplification of polymorphic DNA. *Parasitology*, 130(4), 405–412.
- Goater, T. M.** (2000). The leech, *Oligobdella biannulata* (Glossiphoniidae) on desmognathine salamanders: Potential for trypanosome transmission? *The American Midland Naturalist*, 144(2), 434–438.
- Govedich, F. R., Moser, W. E., & Davies, R. W.** (2001). Annelida: Clitellata, Hirudinea, Euhirudinea. *Freshwater Invertebrates of the Malaysian Region. Kuala Lumpur: Academy of Sciences Malaysia*, 175-190.
- Gruby** (1843). Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaire, *Trypanosoma sanguinis*. *Comptes Rendus Hebdomadaire Des Séances de l'Académie Des Sciences, Paris*, 17, 1134–1136.
- Guseinov, M. A.** (2011). A study of the life cycle of *Trypanosoma neveulemaire*, a blood parasite of the marsh frog *Pelophylax ridibundus*, in the organism of the leech *Hemiclepsis marginata*. *Boletim Da Universidade Nacional de Kharkiv*, 14(971), 103–111.
- Haag, J., O'hUigin, C., & Overath, P.** (1998). The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 91(1), 37–49.
- Hamilton, P. B., Stevens, J. R., Gidley, J., Holz, P., & Gibson, W. C.** (2005). A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *International Journal for Parasitology*, 35(4), 431–443.
- Hewitt, G.** (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405, 907–913.

- Hillis, D. M., & Davis, S. K.** (1986). Evolution of ribosomal DNA: Fifty million years of recorded history in the frog genus *Rana*. *Evolution*, *40*(6), 1275–1288.
- Hýsek, J., & Žižka, Z.** (1988). Changes in the morphology of *Trypanosoma* sp. in the frog blood during a year. *Archiv Fur Protistenkunde*, *136*(1), 39–44.
- Isaak-Delgado, A. B., López-Díaz, O., Romero-Callejas, E., Martínez-Hernández, F., Muñoz-García, C. I., Villalobos, G., & Rendón-Franco, E.** (2020). Morphological and molecular characteristics of hemoparasites in vaillant's frogs (*Lithobates vaillanti*). *Parasitology Research*, *119*, 1891–1901.
- Jablonski, D., Wynn, A., Masroor, R., Papenfuss, T., Litvinchuk, S. N., & Mazepa, G.** (2021). The genus *Pelophylax* (Amphibia, Ranidae) in Pakistan: museum collections and possible distribution. *Herpetozoa*, *34*, 141–147.
- Jakes, K. A., O'Donoghue, P. J., & Adlard, R. D.** (2001). Phylogenetic relationships of *Trypanosoma chelodina* and *Trypanosoma binneyi* from Australian tortoises and platypuses inferred from small subunit rRNA analyses. *Parasitology*, *123*(5), 483–487.
- Johnson, R. N., Young, D. G., & Butler, J. F.** (1993). Trypanosome transmission by *Corethrella wirthi* (Diptera: Chaoboridae) to the green treefrog, *Hyla cinerea* (Anura: Hylidae). *Journal of Medical Entomology*, *30*(5), 918–921.
- Kato, H., Uezato, H., Sato, H., Bhutto, A. M., Soomro, F. R., Baloch, J. H., Iwata, H., & Hashiguchi, Y.** (2010). Natural infection of the sand fly *Phlebotomus kazeruni* by *Trypanosoma* species in Pakistan. *Parasites and Vectors*, *3*:10.
- Kolenda, K., Pietras-Lebioda, A., Hofman, S., Ogielska, M., & Pabijan, M.** (2017). Preliminary genetic data suggest the occurrence of the Balkan water frog, *Pelophylax kurtmuelleri*, in southwestern Poland. *Amphibia Reptilia*, *38*(2), 187–196.
- Kostygov, A. Y., Karnkowska, A., Votýpka, J., Tashyreva, D., Maciszewski, K., Yurchenko, V., & Lukeš, J.** (2021). Euglenozoa: Taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. *Open Biology*, *11*, 1–47.
- Kruger, N., & Du Preez, L.** (2015). Reproductive strategies of the kangaroo leech, *Marsupiobdella africana* (Glossiphoniidae). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *4*(1), 142–147.
- Lankester, E. R.** (1871). On *Undulina*, the type of a new group of Infusoria. *Journal of Cell Science*, *2*(44), 387–389.
- Leal, D. D. M., O'Dwyer, L. H., Ribeiro, V. C., Silva, R. J., Ferreira, V. L., & Rodrigues, R. B.** (2009). Hemoparasites of the genus *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and hemogregarines in anurans of the São Paulo and Mato Grosso do Sul States - Brazil. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, *81*(2), 199–206.
- Lehmann, D. L.** (1952). Notes on the life cycle and infectivity of *Trypanosoma barbari*. *The Journal of Parasitology*, *38*(6), 550–553.

- Lemos, M., Morais, D. H., Carvalho, V. T., & D'Agosto, M.** (2008). First record of *Trypanosoma chattoni* in Brazil and occurrence of other trypanosoma species in brazilian frogs (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Parasitology*, 94(1), 148–151.
- Lemos, M., Souza, C. S. F., Da Costa, S. C. G., Souto-Pradrón, T., & D'Agosto, M.** (2013). Isolation and in vitro culture of trypanosomes from *Leptodactylus ocellatus* from the atlantic forest in a new experimental culture medium. *Journal of Parasitology*, 99(1), 164–167.
- Lopes, A. H., Gomes, M. T., Dutra, F. L., Vermelho, A. B., Meyer-Fernandes, J. R., Silva-Neto, M. A. C., Souto-Pradrón, T., & Vieira, D. P.** (2010). Intracellular signaling pathways involved in cell differentiation in trypanosomatids. *Open Parasitology Journal*, 4, 102–110.
- Lukeš, J., & Votýpka, J.** (2000). *Trypanosoma avium*: Novel features of the kinetoplast structure. *Experimental Parasitology*, 96(3), 178–181.
- Lun, Z. R., & Desser, S. S.** (1996). Analysis of isolates within species of anuran trypanosomes using random amplified polymorphic DNA. *Parasitology Research*, 82(1), 22–27.
- Martin, D. S., & Desser, S. S.** (1990). A light and electron microscopic study of *Trypanosoma fallisi* n. sp. in toads (*Bufo americanus*) from Algonquin Park, Ontario. *The Journal of Protozoology*, 37(3), 199–206.
- Martin, D. S., & Desser, S. S.** (1991a). Development of *Trypanosoma fallisi* in the leech, *Desserobdella picta*, in toads (*Bufo americanus*), and in vitro. *Parasitology Research*, 77(1), 18–26.
- Martin, D. S., & Desser, S. S.** (1991b). Infectivity of cultured *Trypanosoma fallisi* (Kinetoplastida) to various anuran species and its evolutionary implications. *The Journal of Parasitology*, 77(3), 498–500.
- Martin, D. S., Desser, S. S., & Hong, H.** (1992). Allozyme comparison of three trypanosoma species (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) of toads and frogs by starch-gel electrophoresis. *The Journal of Parasitology*, 78(2), 317–322.
- Martin, D. S., Wright, A.-D. G., Barta, J. R., & Desser, S. S.** (2002). Phylogenetic position of the giant anuran trypanosomes *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveulemairi*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18S rRNA gene sequences. *The Journal of Parasitology*, 88(3), 566–571.
- Maslov, D. A., Lukes, J., Jirku, M., & Simpson, L.** (1996). Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: Implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 75(2), 197–205.
- Mayer, A. F. I.** (1843). Spicilegium observationum anatomicarum de organo electrico in raiis anelectricis et de haematozois. *Bonnae: Caroli Georgii*.
- Mikuliček, P., Mešková, M., Cyprich, M., Jablonski, D., Papežík, P., Hamidi, D., Pekşen, Ç. A., Vörös, J., Herczeg, D., & Benovics, M.** (2021). Weak population-genetic structure of a widely distributed nematode parasite of frogs in the western Palearctic. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 59(8), 1689–1702.

- Miyata, A.** (1976). Anuran haemoprotozoa found in the Vicinity of Nagasaki. *Tropical Medicine*, 18(3), 125–134.
- Molan, A. L., Saeed, I. S., & Miyata, A.** (1989). Haemoprotozoa detected in *Rana ridibunda* in Iraq. *Japanese Society of Systematic Zoology*, 40, 3–12.
- Molyneux, D. H.** (1977). Vector relationships in the Trypanosomatidae. *Advances in Parasitology*, 15(C), 1–82.
- Moravec, J.** (2019). Obojživelníci a plazi České republiky. *Academia*.
- Moser, W. E., Govedich, F. R., & Klemm, D. J.** (2009). Annelida, Hirudinida (Leeches). *Encyclopedia of Inland Waters*, 2, 116–123.
- Netherlands, E. C., Cook, C. A., Kruger, D. J. D., du Preez, L. H., & Smit, N. J.** (2015). Biodiversity of frog haemoparasites from sub-tropical northern KwaZulu-Natal, South Africa. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(1), 135–141.
- Papežik, P., Kubala, M., Jablonski, D., Doležalková-Kaštánková, M., Choleva, L., Benovics, M., & Mikulíček, P.** (2021). Morphological differentiation of endemic water frogs (Ranidae: *Pelophylax*) from the southwestern Balkans. *Salamandra*, 57(1), 105–123.
- Poloprutská, K.** (2020). Výskyt a diverzita trypanosom obojživelníků. *Bakalářská práce. Praha, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra parazitologie*.
- Rajabi, F., Javanbakht, H., & Sajjadi, S. S.** (2017). A preliminary study of haemoparasites in marsh frogs, *Pelophylax ridibundus* (Ranidae) from Iran. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(4), 1314–1317.
- Ramos, B., & Urdaneta-Morales, S.** (1977). Hematophagous insects as vectors for frog trypanosomes. *Revista de Biología Tropical*, 25(2), 209–217.
- Readel, A. M., & Goldberg, T. L.** (2010). Blood parasites of frogs from an equatorial African montane forest in western Uganda. *Journal of Parasitology*, 96(2), 448–450.
- Reilly, B. O., & Woo, P. T. K.** (1982a). Susceptibility of the leech *Batracobdella picta* (Verrill) to *Trypanosoma andersoni* Reilly and Woo and *Trypanosoma grylli* Nigrelli (Kinetoplastida). *Canadian Journal of Zoology*, 60(6), 1441–1445.
- Reilly, B. O., & Woo, P. T. K.** (1982b). The biology of *Trypanosoma andersoni* n. sp. and *Trypanosoma grylli* Nigrelli, 1944 (Kinetoplastida) from *Hyla versicolor* LeConte, 1825 (Anura). *Canadian Journal of Zoology*, 60(2), 116–123.
- Reilly, B. O., & Woo, P. T. K.** (1982c). The in vivo and in vitro development of *Trypanosoma andersoni* Reilly and Woo, 1982 and *Trypanosoma grylli* Nigrelli, 1944 (Kinetoplastida). *Canadian Journal of Zoology*, 60(2), 124–133.
- Reilly, B. O., & Woo, P. T. K.** (1982d). The ultrastructure of an anuran trypanosome, *Trypanosoma andersoni* Reilly and Woo, 1982 (Kinetoplastida). *Canadian Journal of Zoology*, 60(2), 134–138.

- Reinhold, J. M., Shaw, R., & Lahondère, C.** (2021). Beat the heat: *Culex quinquefasciatus* regulates its body temperature during blood feeding. *Journal of Thermal Biology*, *96*, 1–7.
- Rettich, F., Imrichova, K., & Šebesta, O.** (2007). Seasonal comparisons of the mosquito fauna in the flood plains of Bohemia and Moravia, Czech Republic. *European Mosquito Bulletin*, *23*, 10–16.
- Roberts, L. S., & Janovy, J.** (2009). Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations of parasitology (8th editio). *McGraw-Hill*, 77–88.
- Savage, H. M., Aggarwal, D., Apperson, C. S., Katholi, C. R., Gordon, E., Hassan, H. K., Anderson, M., Charnetzky, D., Millen, L. M. C., Unnasch, E. A., & Unnasch, T. R.** (2007). Host choice and west nile virus infection rates in blood-fed mosquitoes, including members of the *Culex pipiens* complex, from Memphis and Shelby County, Tennessee, 2002-2003. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *7*(3), 365–386.
- Sawyer, R. T., & Fitzgerald, S. W.** (1981). Leech biology and behaviour. Oxford University Press, Oxford, 7–26.
- Schenková, J., Sychra, J., Košel, V., Kubová, N., & Horecký, J.** (2009). Freshwater leeches (Annelida: Clitellata: Hirudinida) of the Czech Republic (Central Europe): check-list, new records, and remarks on species distributions. *Zootaxa*, *2227*(1), 32–52.
- Siddall, M. E., & Desser, S. S.** (1992). Alternative leech vectors for frog and turtle trypanosomes. *The Journal of Parasitology*, *78*(3), 562–563.
- Soares, M. J., Souto-Pradrón, T., Bonaldo, M. C., Goldenberg, S., & de Souza, W.** (1989). A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, *75*, 522–527.
- Southworth, G. C., Mason, G., & Seed, J. R.** (1968). Studies on frog trypanosomiasis. I. A 24-Hour cycle in the parasitemia level of *Trypanosoma rotatorium* in *Rana clamitans* from Louisiana. *The Journal of Parasitology*, *54*(2), 255–258.
- Spodareva, V. V., Grybchuk-Ieremenko, A., Losev, A., Votýpka, J., Lukeš, J., Yurchenko, V., & Kostygov, A. Y.** (2018). Diversity and evolution of anuran trypanosomes: Insights from the study of European species. *Parasites and Vectors*, *11*:447, 1–12.
- Srisuton, P., Phumee, A., Sunantaraporn, S., Boonserm, R., Sor-suwan, S., Brownell, N., Pongsakul, T., & Siriyasatien, P.** (2019). Detection of leishmania and trypanosoma DNA in field-caught sand flies from endemic and non-endemic areas of leishmaniasis in Southern Thailand. *Insect*, *10*(238), 1–11.
- Steinert, M.** (1960). Mitochondria associated with the kinetonucleus of *Trypanosoma mega*. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, *8*(2), 542–546.
- Steinert, M., & Novikoff, A. B.** (1960). The existence of a cytostome and the occurrence of pinocytosis in the trypanosome, *Trypanosoma mega*. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, *8*(2), 563–569.

- Stewart, J. R., Lister, A. M., Barnes, I., & Dalén, L.** (2010). Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1682), 661–671.
- Toontong, P., Sunantaraporn, S., Tiawsirisup, S., Pongsakul, T., Boonserm, R., Phumee, A., Siriyasatien, P., & Preativatanyou, K.** (2022). First report of anuran trypanosoma DNA in flat-tailed house geckos (Reptilia: Gekkonidae) collected from Southern Thailand: no evidence as a reservoir for human trypanosomatids. *Pathogens*, 11(247), 1–12. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020247>
- Vojtková, L.** (1982). Parazitofauna obojživelníků ČSSR, její ekologické a praktické aspekty. *Univerzita JE Purkyně*.
- Volf, P., Hajmova, M., Sadlova, J., & Votypka, J.** (2004). Blocked stomodeal valve of the insect vector: Similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International Journal for Parasitology*, 34(11), 1221–1227.
- Votýpka, J., Oborník, M., Volf, P., Svobodová, M., & Lukeš, J.** (2002). *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): Phylogeny and identification of vectors. *Parasitology*, 125(3), 253–263.
- Votýpka, J., & Svobodová, M.** (2004). *Trypanosoma avium*: Experimental transmission from black flies to canaries. *Parasitology Research*, 92, 147–151.
- Werner, J. K., & Kirwin, J.** (1993). Blood parasites of amphibians from Sichuan province, People's Republic of China. *The Journal of Parasitology*, 79(3), 356–363.
- Willis, E. R.** (1958). The use of artificial heat to induce mosquitoes to feed on cold-blooded animals. *Annals of the Entomological Society of America*, 51(3), 257–261.
- Witenberg, G., & Gerichter, C.** (1944). The morphology and life history of *Foleyella duboisi* with remarks on allied filariids of amphibia. *The Journal of Parasitology*, 30(4), 245–256.
- Woo, P. T. K.** (1969a). The development of *Trypanosoma canadensis* of *Rana pipiens* in *Placobdella* sp. *Canadian Journal of Zoology*, 47(6), 1257–1259.
- Woo, P. T. K.** (1969b). Trypanosomes in amphibians and reptiles in southern Ontario. *Canadian Journal of Zoology*, 47, 981–988.
- Woo, P. T. K., & Bogart, J. P.** (1986). Trypanosome infection in salamanders (order: Caudata) from eastern North America with notes on the biology of *Trypanosoma ogawai* in *Ambystoma maculatum*. *Canadian Journal of Zoology*, 64(1), 121–127.
- Žičkus, T.** (2002). The first data on the fauna and distribution of blood parasites of amphibians in Lithuania. *Acta Zoologica Lituanica*, 12(2), 197–202.
- Zídková, L., Čepicka, I., Szabová, J., & Svobodová, M.** (2012). Biodiversity of avian trypanosomes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(1), 102–112.
- Zwach, I.** (2009). Obojživelníci a plazi České republiky. *Grada Publishing as*.