

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra parazitologie**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Jolana Havlová

**Jednohostitelská trypanosomatida bezobratlých**

Monoxenous trypanosomatids of invertebrates

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Školitel specialista: Mgr. Zuzana Kotyková-Varadínová, Ph. D.

Praha 2017

## **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 15. 8. 2017

.....

## **Poděkování**

Mé největší poděkování patří bezpochyby mému školiteli Doc. Janu Votýpkovi nejen za jeho cenné rady a připomínky při psaní této práce ale také za veškerou metodickou pomoc, nápady a konzultace v průběhu mého studia. Také bych chtěla poděkovat Doc. Vyacheslavu Yurchenkovi za celkovou spolupráci. Další poděkování patří mé konzultance Mgr. Zuzaně Kotykové–Varadínové, která mě uvedla do „švábí“ problematiky, pomáhala mi s určováním a poskytovala mi materiál z chovů katedry Zoologie. Velké díky také patří chovatelům Jiřímu Hromádkovi, Břetislavu Fidrovi a Dr. Radkovi Aulickému z VÚRV za poskytnutý materiál. Zvlášť bych chtěla poděkovat hlavně Dr. Janě Bulantové, Mgr. Františkovi Jůnovi a Dr. Jakobovi Strakovi, kteří mi pomáhali s odchvy švábů. Poděkování také patří Doc. Jitce Vilímové, která mě umožnila odchytávat šváby v NP Podyjí. Další osobou bez které by část této práce zaměřená na ultrastruktury nikdy nevznikla a které patří jedno z největších poděkování za nespočet hodin konzultací je Dr. Miroslav Hyliš. Za konzultace ohledně ultrastruktury bičíku je určitě na místě poděkovat také Dr. Vladimíru Vargovi. Dále bych chtěla poděkovat za konzultaci a poskytnuté analýzy Mgr. Janu Davidovi Reitschlägerovi z ČHMÚ. V neposlední řadě bych chtěla velmi poděkovat Dr. Kateřině Jůzové za rady, pomoc s odchvy a za celkovou psychickou podporu i přátelství během mého studia. Nakonec bych chtěla poděkovat mým nejbližším přátelům a rodině, kteří mě v průběhu mého studia ve všem plně podporovali.

## ABSTRAKT

Třída Kinetoplastea zahrnuje volně žijící i parazitické zástupce. Jednou z nejznámějších skupin je řád Trypanosomatida, do kterého patří obligátní parazité (*Trypanosoma*, *Leishmania*) širokého spektra hostitelů. Mnohé druhy jsou velmi nebezpečnými patogeny člověka, jiné působí velké ekonomické ztráty v zemědělství. Nicméně převážná část trypanosomatid patří mezi jednohostitelské parazity hmyzu, kteří jsou pro své hostitele většinou nepatogenní. Jednohostitelská trypanosomatida parazitují převážně v řádech polokřídlých a dvoukřídlých.

Předložená diplomová práce se věnuje detekci nálezů jednohostitelskými trypanosomatidy u švábů odchycených na území České republiky a švábů pocházejících z několika různých chovů. Švábi jsou vhodní mechaničtí přenašeči různých patogenů (včetně parazitů), kteří ohrožují zdraví člověka i zvířat. První popis trypanosomatid ve švábech byl zdokumentován již na počátku 20. století, ale žádná studie se těmto nálezům důkladněji nevěnovala. Cílem této práce byla i podrobná morfologická a ultramikroskopická analýza a studium hostitelské specifity nedávno popsánoho druhu švábi herpetomonády *Herpetomonas tarakana*. Tato diplomová práce byla částečně podkladem již publikovaného článku „Diversity of trypanosomatids in cockroaches and the description of *Herpetomonas tarakana* sp. n.“, na který navazuje a dále jej rozvíjí.

**Klíčová slova:** Trypanosomatida, šváb, hostitelská specifita, ultrastruktury, bičík

## ABSTRACT

The class Kinetoplastea contains free-living and parasitic species. One of the most dominant group within the class is the order Trypanosomatida which includes obligate parasites (*Trypanosoma*, *Leishmania*) infecting a wide range of hosts. Some species are serious pathogens of humans and domestic animals and cause considerable losses. However, the majority of trypanosomatids belongs to monoxenous parasites of insect which are usually harmless to their hosts. Monoxenous trypanosomatids predominantly infect Hemiptera and Diptera.

This diploma thesis is focused on the detection of monoxenous trypanosomatids in cockroaches captured in the Czech Republic and cockroaches from different breedings. Cockroaches are very suitable mechanical vectors of many different pathogens (including parasites) and are significant health threat for humans and animals. First trypanosomatids in cockroaches were documented at the beginning of the 20<sup>th</sup> century, but there is no study focused on this topic specifically. Another aim of this thesis is morphological and ultramicroscopic analysis and the study of the host specificity of the recently described species *Herpetomonas tarakana*, isolated from a cockroach. My findings were partly used in the already published study “Diversity of trypanosomatids in cockroaches and the description of *Herpetomonas tarakana* sp. n.”; however the thesis continues and further develops the research on this topic.

Key words: Trypanosomatida, cockroach, host specificity, ultrastructures, flagellum

# Obsah

<b>1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>3</b>
2. 1 Jednohostitelská trypanosomatida .....	3
2. 2 Švábi jako hostitelé.....	6
2. 3 Experimentální infekce, diverzita a interakce trypanosomatid s jejich hostiteli.....	9
2. 3. 1 Experimentální infekce a studium hostitelské specifity .....	12
2. 3. 2 Experimentální infekce a způsob přenosu jednohostitelských trypanosomatid	17
2. 3. 2. 1 Horizontální způsob přenosu .....	17
2. 3. 2. 2 Vertikální způsob přenosu .....	23
2. 4 Ultrastruktura bičíku trypanosomatid.....	24
2. 4. 1 Axonéma, vnější membrána bičíku a paraxiální tyč.....	25
2. 4. 2 Periflagelární kapsa a „desmozomy“ .....	27
2. 4. 3 FP, FAZ, cytostom–cytofarynx komplex a mikrotubuly .....	29
<b>3 MATERIÁL A METODIKA.....</b>	<b>33</b>
3. 1 Švábi .....	33
3. 1. 1 Druhovú determinace odchycených švábů .....	34
3. 1. 2 Pitvy švábů .....	34
3. 2 Izolace a kultivace trypanosomatid .....	36
3. 2. 1 Příprava médií a kultur .....	36
3. 2. 2 Axenizace kontaminované kultury pomocí U-trubice .....	37
3. 2. 4 Příprava klonální/semiklonální axenické kultury.....	37
3. 2. 3 Detekce růstu buněk v čase .....	38
3. 2. 5 Kryoprezervace kultur .....	38
3. 3 Světelná a elektronová mikroskopie.....	39
3. 3. 1 Barvení buněk roztokem Giemsa-Romanowsky .....	39
3. 3. 2 Barvení buněk fluorescenčním barvivem DAPI.....	40
3. 3. 3 Příprava buněk pro vyšetření transmisním elektronovým mikroskopem (TEM) .....	40
3. 4 Molekulární analýzy .....	41
3. 4. 1 Izolace DNA .....	41

3. 4. 2 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	42
3. 4. 3 Horizontální elektroforéza a izolace PCR produktu.....	45
3. 4. 4 Sekvence a vyhodnocení sekvencí.....	46
3. 4. 5 AT klonování pomocí pGEM–T–easy vector system .....	47
3. 5 Experimentální infekce švábů .....	49
<b>4 VÝSLEDKY .....</b>	<b>51</b>
4. 1 Parazitologické vyšetření švábů .....	51
4. 2 Izolace a kultivace trypanosomatid .....	57
4. 3 Molekulární analýzy .....	58
4. 4 Stanovení morfortypů a měření buněk <i>Herpetomonas tarakana</i> .....	58
4. 5 Růstová křivka <i>Herpetomonas tarakana</i> v kultuře .....	62
4. 6 Popis ultrastruktury bičíku buněk <i>Herpetomonas tarakana</i> .....	63
4. 7 Studium hostitelské specifity <i>Herpetomonas tarakana</i> .....	72
<b>5 DISKUZE .....</b>	<b>76</b>
5. 1 Švábi z chovů i odchytů a jejich parazitologické vyšetření .....	76
5. 2 Kultivace trypanosomatid.....	81
5. 3 Morfologie buněk a ultrastruktura bičíku <i>Herpetomonas tarakana</i> .....	81
5. 4 Studium hostitelské specifity <i>Herpetomonas tarakana</i> .....	84
<b>6 ZÁVĚR .....</b>	<b>87</b>
<b>7 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY .....</b>	<b>89</b>
<b>8 PŘÍLOHA .....</b>	<b>103</b>

# 1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Čeleď Trypanosomatidae (řád Trypanosomatida; třída Kinetoplastea) představuje rozmanitou a intenzivněji studovanou skupinu prvoků. Největší pozornost je z pochopitelných důvodů zaměřena na dixenní (dvohostitelská) trypanosomatida, která kolují mezi bezobratlými (nejčastěji hmyzem nebo pijavkami) a obratlovci (vč. člověka) nebo rostlinami. Většina fylogenetických, morfologických i ultrastrukturálních studií se věnuje především rodům *Trypanosoma* a *Leishmania*, které mají velký lékařský, veterinární i ekonomický význam. Převážná část trypanosomatid nicméně náleží mezi monoxenní (jednohostitelské) parazity hmyzu, kterým se dlouhou dobu nevěnovala dostatečná pozornost. V posledních letech se však jednohostitelští zástupci stávají mnohem častěji předmětem zájmu vědeckých studií vzhledem k jejich schopnosti adaptace na různé podmínky prostředí (Schaub and Pretsch, 1981; Tieszen and Molyneux, 1989), extrémní biologické diverzitě, hostitelské (ne)specifitě, vlivu na hmyzí hostitele nebo významu pro pochopení původu a vývoje dixenních zástupců i samotného parazitismu (Maslov et al., 2007, 2013; Votýpka et al., 2013; Lukeš et al., 2014; Kozminsky et al., 2015; Flegontov et al., 2013, 2016). Někteří zástupci trypanosomatid mají ve své cytoplazmě endosymbiotické bakterie (Votýpka et al., 2014; Kostygov et al., 2016) a současně se mnozí z nich vyznačují i velmi redukovanou formu paraxiální tyče bičíku (Farina et al., 1986). Představují tak velmi dobrý modelový systém pro studium vzniku a funkce endosymbiózy (Teixeira et al., 2011; Votýpka et al., 2014; Kostygov et al., 2016).

V minulosti bylo celkově z více než jednoho milionu známých druhů hmyzu vyšetřeno parazitology  $\pm$  2 500 druhů na přítomnost trypanosomatid (Podlipaev, 2001). Pozornost v posledních letech byla zaměřena především na jednohostitelská trypanosomatida dvoukřídlých (Diptera) (např. Týč et al., 2013), ploštic (Heteroptera) (např. Maslov et al., 2007; Votýpka et al., 2010; Klepetková, 2010) a blech (Aphaniptera) (Duží, 2007; Suková, 2009; Votýpka et al., 2010). Proto jsem se ve své práci věnovala synantropním a sylvatickým švábům (Blattodea), jako další dosud podrobněji neprozkoumané skupině potenciálních hostitelů monoxenních trypanosomatid. Má diplomová práce byla součástí projektu, který byl iniciován mým školitelem a Dr. Vyacheslavem Yurchenkem z Ostravské univerzity. Část výsledků získaných v rámci méj diplomové práce byla zveřejněna v publikaci: **Diversity of trypanosomatids in cockroaches and the description of *Herpetomonas tarakana* sp. n.** (Yurchenko et al.,

2016 – viz **příloha č. 1**). Kromě detekce trypanosomatid ve švábech jsem se u nově popsaného druhu *Herpetomonas tarakana* zaměřila na studii jeho hostitelské specifity a na morfologii a ultrastrukturu buněk.

**Cíle práce:**

- I.** Detekce, identifikace a porovnání nákaz jednohostitelskými trypanosomatidy u sylvatických, synantropních a chovaných švábů.
- II.** Analýza morfotypů a studium ultrastruktury buněk se zaměřením na periflagelární kapsu, mikrotubuly a „desmozomy“ bičíku švábí herpetomonády druhu *Herpetomonas tarakana*.
- III.** Studium hostitelské specifity druhu *H. tarakana* pomocí experimentálních infekcí sylvatických, volně žijících a chovaných švábů.



## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

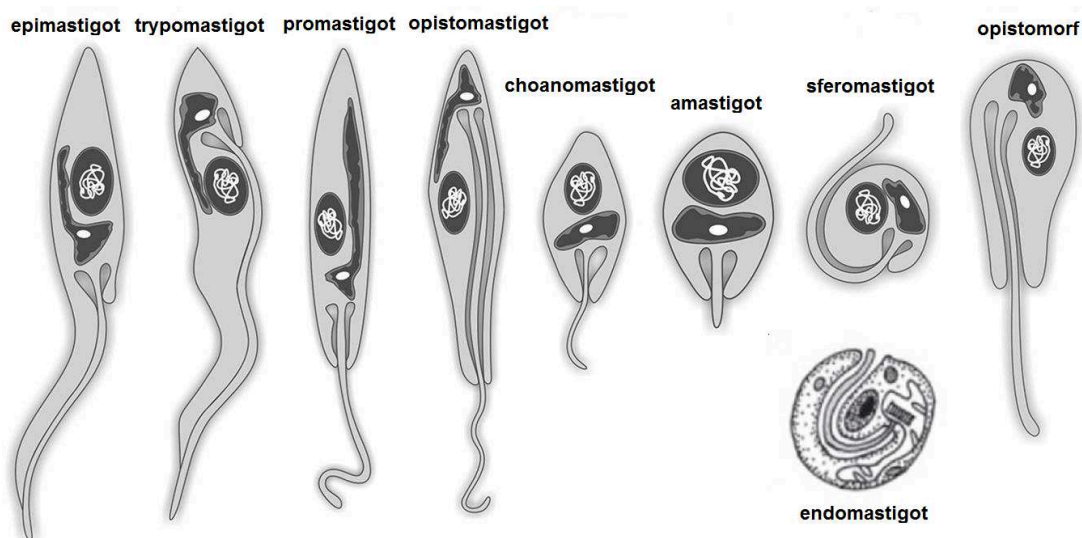
### 2.1 Jednohostitelská trypanosomatida

Trypanosomatida představují velký a různorodý řád protist z třídy Kinetoplastea, která je kompozicí ekvivalentní k dříve uznávanému řádu Kinetoplastida (Honigberg, 1963; Cavalier-Smith, 1981). Poslední taxonomické studie řadí třídu Kinetoplastea společně s třemi sesterskými skupinami (Euglenoidea, Diplonemea a Symbiontida) do exkavátního kmene Euglenozoa (Adl et al., 2012). V současnosti se třída Kinetoplastea dělí na dvě podtřídy. První podtřída **Prokinetoplastina** se skládá z jednoho řádu Prokinetoplastida, do kterého patří rody *Ichtyobodo* a *Perkinsela*. Druhá podtřída **Metakinetoplastina** zahrnuje čtyři řády (Neobodonida, Parabodonida, Eubodonida a Trypanosomatida) (podrobněji k jednotlivým řádům a zástupcům bodonid viz (Vickerman, 1994; Moreira, 2004; Simpson et al., 2006; Lukeš et al., 2014).

Trypanosomatida s jedinou čeledí Trypanosomatidae parazitují v bezobratlých, obratlovcích a rostlinách. Dokonce byl jejich výskyt zachycen i v některých prvocích: např. jako parazity nálevníků můžeme zmínit druh *Leptomonas karyophilus* v trepce *Paramecium trichium* (Gillies and Hanson, 1963; Fokin et al., 2014), *Leptomonas ciliatorum* napadající makronukleus břichobrvky *Paraholosticha sterkii* (Görtz and Dieckmann, 1987) a blíže neurčené druhy *Leptomonas* sp. v makronukleu lezounka *Euplotes* sp. nebo *Herpetomonas* sp. parazitující v makronukleu lezounka *Euplotes encysticus* (Fokin et al., 2014). Do roku 1990 bylo identifikováno 350 druhů hmyzu jako hostitelů monoxenních trypanosomatid (Podlipaev, 1990) a v průběhu dalších let přibylo přibližně 200 dalších druhů hmyzích hostitelů (Podlipaev, 2001). Několik studií odhalilo, že jednohostitelská trypanosomatida parazitují převážně v řádech polokřídělých (Hemiptera) a dvoukřídělých (Diptera). Další sporadické výskyty byly zachyceny u brouků (Coleoptera), blanokřídělých (Hymenoptera), motýlů (Lepidoptera), síťokřídělých (Neuroptera), rovnokřídělých (Orthoptera), (Podlipaev, 1990), blech (Siphonaptera) (Votýpka et al. 2013) a švábů (Blattodea) (Semans, 1943; Podlipaev, 1990).

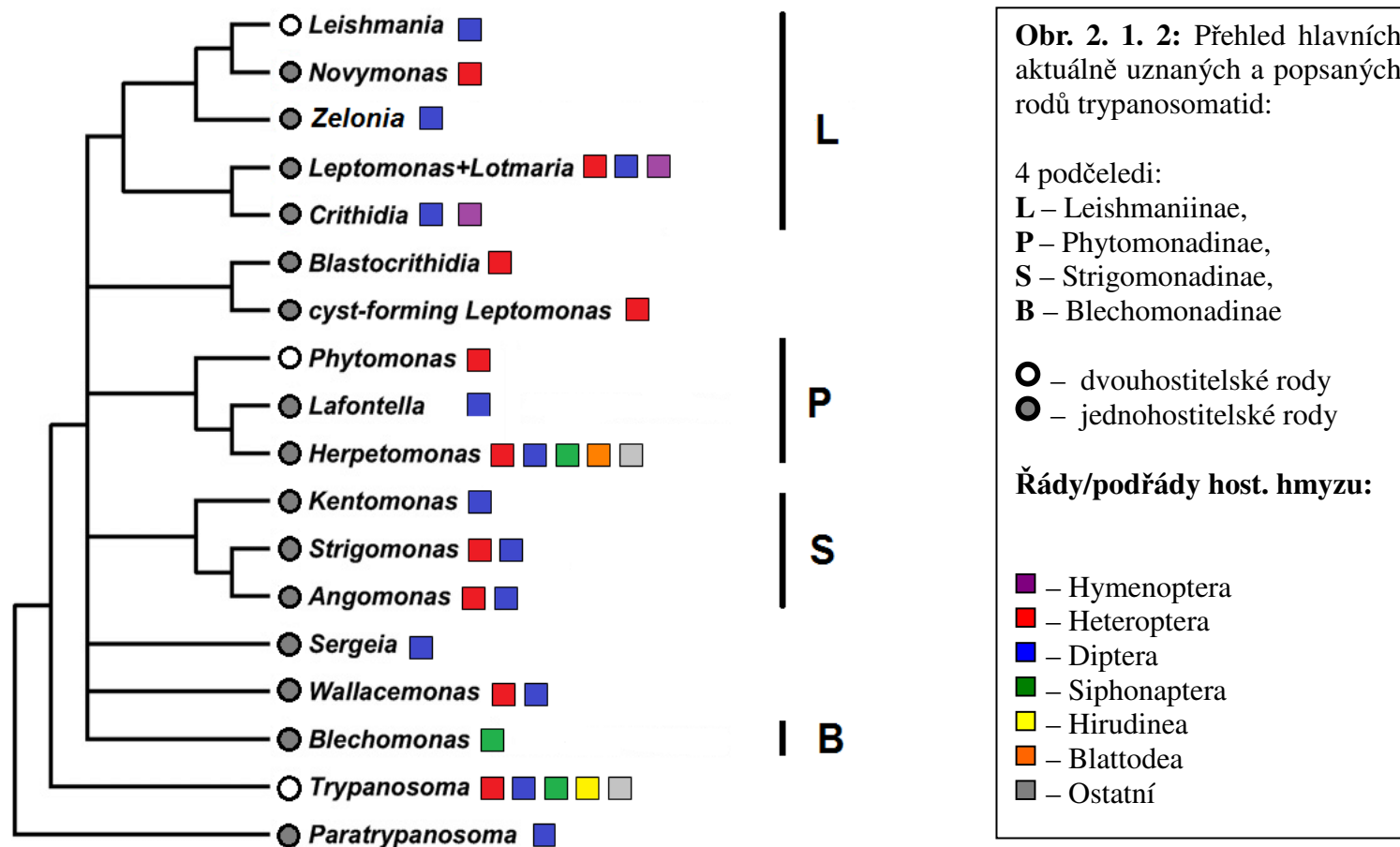
Původní taxonomický systém čeledi Trypanosomatidae byl vytvořen na základě rozdílů v morfologii (vzájemné pozici jádra, kinetoplastu a periflagelární kapsy bičíku, viz **obr. 2. 1. 1**) a životních cyklech (Wallace, 1966; Vickerman, 1976). Později došlo

k radikální změně systému za použití molekulárně fylogenetických metod zaměřených na sekvenování genů pro malou ribozomální podjednotku (18S rRNA), glykozomální glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu (gGAPDH) a „spliced-leader“ (SL) RNA (Maslov et al., 1996; Hollar et al., 1998; Lukeš et al., 1997; Podlipaev et al., 2004; Hamilton et al., 2004; Yurchenko et al., 2009). V současnosti jsou popsány tři rody dvouhostitelských trypanosomatid (*Leishmania*<sup>1</sup>, *Phytomonas* a *Trypanosoma*) a patnáct jednohostitelských rodů (viz **obr. 2. 1. 2**) (podrobný přehled viz (Kaufer et al., 2017)).



**Obr. 2. 1. 1:** Morfotypy trypanosomatid, které jsou popsány podle vzájemné polohy jádra, kinetoplastu a hloubky periflagelární kapsy bičíku (dle Maslov et al., 2013; d'Avila-Levy et al., 2015).

<sup>1</sup> V rámci leishmání dochází v současné době k tvorbě nového taxonomického systému, který však zatím není jednoznačně přijímán vědeckou komunitou (viz např. Kostygov and Yurchenko, 2017). Původní rod *Leishmania* se rozpadá na tři rody, *Endotrypanum*, *Porcisia* a *Leishmania*, který se dále dělí do čtyř podrodů: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* a *Mundinia*.



**Obr. 2. 1. 2:** Přehled aktuálně uznaných a popsaných rodů trypanosomatid (dle Yoshida et al., 1978; Podlipaev, 1990; Yurchenko et al., 2006; Svobodová et al., 2007; Yurchenko et al., 2008; Votýpka et al., 2010; Teixeira et al., 2011; Votýpka et al., 2012, 2013; Maslov et al., 2013; Flegontov et al., 2013; Týč et al., 2013; Borghesan et al., 2013; Yurchenko et al., 2014; Votýpka et al., 2014; Lukeš et al., 2014; Kostygov et al., 2014; Schwarz et al., 2015; Kozminsky et al., 2015; Yurchenko et al., 2016; Kostygov et al., 2016; Zanetti et al., 2016; Kaufer et al., 2017). V přehledu není zahrnut rod *Jaenimonas* (hostitelský řád: Diptera) (Hamilton et al., 2015).

## 2. 2 Švábi jako hostitelé

Švábi jsou v současnosti společně s termity řazeny do jednoho řádu Blattodea. Recentní molekulární a genetické studie totiž souhlasně podporují již starší hypotézu, že eusociální termiti jsou „jenom“ vnitřní skupinou švábů s blízkým vztahem k švábovi rodu *Cryptocercus* (Lo et al., 2000, 2003; Klass and Meier, 2006; Pellens et al., 2007; Inward et al., 2007; Lo et al., 2007; Ware et al., 2008; Murienne, 2009; Djernæs et al., 2012; Cameron et al., 2012; Djernæs et al., 2015). Z důvodů značné morfologické, fyziologické a biologické odlišnosti švábů a termitů, se však v této práci budu přidržovat klasického pojetí švábů (Blattaria), tedy myšleno bez termitů. Švábi představují relativně starobyrou skupinu hmyzu, s konzervativním celkovým vzhledem a téměř celosvětovým rozšířením s nejvyšší koncentrací v tropických oblastech. Doposud bylo popsáno více jak 4500 druhů (Beccaloni and Eggleton, 2013) a podle posledních fylogenetických studií je klasifikováno devět čeledí v třech nadčeledích (Corydoidea: Corydiidae + Nocticolidae; Blattoidea: Blattidae + Lamproblattidae + Anaplectidae + Tryonicidae + Cryptocercidae + termiti; Blaberoidea: Ectobiidae + Blaberidae) (Djernæs et al., 2015).

Většina švábu je volně žijící, obývající různorodé biotopy a mikrohabitaty, a jenom zřídkakdy přicházející do kontaktu s člověkem. Z medicijního a veterinárního hlediska je důležité tedy jenom necelé 1 % z celkové druhové diverzity švábů. Ti jsou jako synantropní škůdci dočasně anebo permanentně asociováni s lidským prostředím (Cochran, 1999). U synantropních zástupců švábů byly identifikovány viry, bakterie, mikroskopické houby (přehled viz (Roth and Willis, 1960) a paraziti (přehled některých parazitů nalezených ve švábech viz **tab. 2. 2. 1**). U většiny těchto patogenů fungují švábi jako mechaničtí přenašeči ohrožující zdraví člověka i zvířat (Brenner, 2002; Salehzadeh et al., 2007).

Švábi jsou vhodnými vektory mikroorganismů, protože jsou všežravci a také se velmi dobře přemísťují mezi různými částmi lidského prostředí. Mají dobře vyvinuté kousací ústní ústrojí a mimo jiné jsou u nich běžné potravní strategie jako koprofágie (požívání trusu), nekrofágie (požívání uhynulých těl hmyzu), kanibalismus (požívání jedinců vlastního druhu) a často u některých druhů také predace (požívání ulovené kořisti včetně švábů jiného druhu) (Cornwell, 1968; Cochran and Scheme, 1999; Kopanic and Schal, 1999; Brenner, 2002; Tabaru and Watanabe, 2003). Trávicí soustavu mají, stejně jako ostatní hmyz, rozdělenou na přední, střední a zadní střevo. Právě střední a především

zadní střevo se zdá být nejvhodnější pro uchycení patogenů (Cruden and Markovetz, 1987; Anjali, 2016). Do trusu se tak dostává velké množství bakterií, spór hub nebo cyst prvoků (Beams et al., 1959; Hoyte, 1961; Peregrine, 1974; Cruden and Markovetz, 1984, 1987).

**Tabulka 2. 2. 1:** Přehled některých parazitů nalezených ve švábech (další podrobný seznam parazitů zaznamenaných do r. 1960 například viz (Roth and Willis, 1960).

Druh parazita	Druh švába (hostitele/přenašeče)	Zdroje informací
<b>Helminti</b>		
<i>Ancylostoma duodenale</i>	<i>Diploptera punctata</i>	(Tatfeng et al., 2005)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>Blattella germanica</i> <i>Diploptera punctata</i> <i>Periplaneta brunnea</i> <i>Pycnoscelus surinamensis</i>	(Tatfeng et al., 2005; Kinfu and Erko, 2008; Hamu et al., 2014)
<i>Ascaris</i> spp.	<i>Periplaneta americana</i>	(Cazorla Perfetti et al., 2015)
<i>Blatticola blattae</i>	<i>Blattella germanica</i>	(Tsai and Cahill, 1970)
<i>Enterobius vermicularis</i>	<i>Blattella germanica</i> <i>Diploptera punctata</i> <i>Periplaneta brunnea</i>	(Tatfeng et al., 2005; Kinfu and Erko, 2008; Cazorla Perfetti et al., 2015)
<i>Hammerschmidtella diesingi</i>	<i>Blattella germanica</i> <i>Periplaneta americana</i>	(Tsai and Cahill, 1970; Peregrine, 1974; Fernández et al., 2001)
<i>Hammerschmidtella</i> spp.	<i>Periplaneta americana</i>	(Cazorla Perfetti et al., 2015)
<i>Leidynema appendiculatum</i>	<i>Periplaneta americana</i>	(Fernández et al., 2001)
<i>Taenia</i> spp.	<i>Blattella germanica</i> <i>Periplaneta brunnea</i> <i>Pycnoscelus surinamensis</i>	(Kinfu and Erko, 2008; Hamu et al., 2014)
<i>Thelastoma attenuatum</i>	<i>Periplaneta americana</i>	(Peregrine, 1974)
<i>Thelastoma</i> spp.	<i>Periplaneta americana</i>	(Cazorla Perfetti et al., 2015)
<i>Trichuris trichiura</i>	<i>Blattella germanica</i> <i>Diploptera punctata</i> <i>Pycnoscelus surinamensis</i>	(Tatfeng et al., 2005; Kinfu and Erko, 2008; Hamu et al., 2014)
<i>Strongyloides</i> sp.	<i>Blattella germanica</i>	(Hamu et al., 2014)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	<i>Diploptera punctata</i>	(Tatfeng et al., 2005)
<b>Protista</b>		
<i>Acanthamoeba hyalina</i>	<i>Blaberus craniifer</i>	(Briscoe, 1971)
<i>Balantidium blattarum</i>	<i>Blaberus craniifer</i>	(Briscoe, 1971)
<i>Balantidium coli</i>	<i>Blattella germanica</i> , <i>Diploptera punctata</i>	(Tatfeng et al., 2005; Hamu et al., 2014)
<i>Blastocystis hominis</i>	<i>Periplaneta americana</i>	(Fernández et al., 2001)
<i>Chilomastix mesnili</i>	<i>Periplaneta americana</i>	(Fernández et al., 2001)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Diploptera punctata</i> <i>Periplaneta americana</i>	(Fernández et al., 2001; Tatfeng et al., 2005)
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	<i>Diploptera punctata</i>	(Tatfeng et al., 2005)
<i>Cyclospora</i> spp.	<i>Periplaneta americana</i>	(Cazorla Perfetti et al., 2015)
<i>Cystoisospora</i> spp.	<i>Periplaneta americana</i>	(Cazorla Perfetti et al., 2015)
<i>Endolimax blattae</i>	<i>Blaberus craniifer</i> <i>Blatta orientalis</i> <i>Periplaneta americana</i>	(Lucas, 1927; Briscoe, 1971)
<i>Endolimax nana</i>	<i>Blattella germanica</i>	(Fotedar et al., 1991;

	<i>Periplaneta americana</i>	Fernández et al., 2001)
<i>Entamoeba blattae</i>	<i>Blatta orientalis</i> <i>Periplaneta americana</i>	(Beams et al., 1959; Tsai and Cahill, 1970; Peregrine, 1974; Cazorla Perfetti et al., 2015)
<i>Entamoeba coli</i>	<i>Blattella germanica</i> <i>Periplaneta americana</i> <i>Periplaneta brunnea</i> <i>Pycnoscelus surinamensis</i>	(Fotedar et al., 1991; Fernández et al., 2001; Pai et al., 2003; Kinfu and Erko, 2008; Hamu et al., 2014; Cazorla Perfetti et al., 2015)
<i>Entamoeba dispar/ histolytica</i>	<i>Blattella germanica</i> <i>Periplaneta americana</i> <i>Periplaneta brunnea</i> <i>Diploptera punctata</i>	(Fotedar et al., 1991; Pai et al., 2003; Taffeng et al., 2005; Kinfu and Erko, 2008; Hamu et al., 2014)
<i>Entamoeba moshkovski</i>	<i>Blattella germanica</i>	(Hamu et al., 2014)
<i>Entamoeba thomsoni</i>	<i>Blaberus craniifer</i> <i>Blatta orientalis</i> <i>Periplaneta americana</i>	(Lucas, 1927; Tsai and Cahill, 1970; Briscoe, 1971)
<i>Giardia duodenalis</i>	<i>Blattella germanica</i> <i>Periplaneta americana</i>	(Fernández et al., 2001; Hamu et al., 2014)
<i>Gregarina blattarum</i>	<i>Blaberus craniifer</i> <i>Blattella germanica</i>	(Tsai and Cahill, 1970; Briscoe, 1971)
<i>Hexamita sp.</i>	<i>Parasphaeria boleiriana</i>	(Brugerolle et al., 2003)
<i>Hypotrichomonas blattarum</i>	<i>Archimandrita tessellata</i> , <i>Blaberus atropos</i> , <i>B. craniifer</i> , <i>Blaberus sp.</i> , <i>Blaptica dubia</i> , <i>Eublaberus sp.</i> , <i>Gromphadorhina sp.</i> , <i>Nauphoeta cinerea</i>	(Céza et al., 2015)
<i>Iodamoeba bütschlii</i>	<i>Periplaneta americana</i>	(Fernández et al., 2001)
<i>Isospora belli</i>	<i>Diploptera punctata</i>	(Taffeng et al., 2005)
<i>Leptomonas sp./spp.</i> (Trypanosomatidae)	<i>Periplaneta americana</i>	(Fernández et al., 2001; Cazorla Perfetti et al., 2015)
<i>Lophomonas blattarum</i>	<i>Blaberus craniifer</i> <i>Blattella germanica</i> <i>Periplaneta americana</i>	(Tsai and Cahill, 1970; Briscoe, 1971; Fernández et al., 2001; Martínez-Girón and van Woerden, 2014; Cazorla Perfetti et al., 2015)
<i>Lophomonas striata</i>	<i>Blaberus craniifer</i> <i>Blatta orientalis</i> <i>Periplaneta americana</i>	(Beams et al., 1959; Tsai and Cahill, 1970; Peregrine, 1974; Cazorla Perfetti et al., 2015)
<i>Monocercomonas sp.</i>	<i>Parasphaeria boleiriana</i>	(Brugerolle et al., 2003)
<i>Monocercomonoides orthopterorum</i>	<i>Periplaneta americana</i>	(Peregrine, 1974)
<i>Monocercomonoides sp.</i>	<i>Parasphaeria boleiriana</i>	(Brugerolle et al., 2003)
<i>Nephridiophaga blatellae</i>	<i>Blattella germanica</i>	(Tsai and Cahill, 1970)
<i>Nyctotherus ovalis</i>	<i>Blaberus craniifer</i> <i>Blatta orientalis</i> <i>Periplaneta americana</i>	(Lucas, 1927; Beams et al., 1959; Tsai and Cahill, 1970; Briscoe, 1971; Peregrine, 1974; Lalpotu, 1980; Cazorla Perfetti et al., 2015)
<i>Nyctotherus periplanatae</i>	<i>Periplaneta americana</i>	(Lalpotu, 1980)
<i>Polymastix indica</i>	<i>Polyphaga indica</i>	(Krishnamurthy and Sultana, 1978)
<i>Polymastix sp.</i>	<i>Parasphaeria boleiriana</i>	(Brugerolle et al., 2003)

<i>Retortamonas blattae</i>	<i>Blaberus craniifer</i>	(Briscoe, 1971)
<i>Tetratrichomastix sp.</i>	<i>Parasphaeria boleiriana</i>	(Brugerolle et al., 2003)
<i>Toxoplasma gondi</i>	<i>Periplaneta americana</i> <i>Periplaneta australasiae</i>	(Brenner, 2002)

## 2. 3 Experimentální infekce, diverzita a interakce trypanosomatid s jejich hostiteli

Experimentální infekce potenciálních hostitelů parazity jsou nezbytné jak pro stanovení hostitelské specifity, tak i pro pochopení mechanismů přenosu parazitů. Vysoká (úzká) hostitelská specifita je definována jako schopnost parazita infikovat jednoho nebo několik blízce příbuzných druhů hostitelů. Naopak v širokém spektru hostitelských druhů se nachází parazit s nízkou specifitou k hostiteli (Maslov et al., 2013). Experimentální infekce v laboratorních podmínkách dokáží odhalit nové vazby mezi hostitelem a parazitem. Můžeme tak zjistit, že paraziti jsou často méně specifictí než jak se původně jevílo v přírodních podmínkách. Při experimentálních infekcích je pro správnou interpretaci výsledků nutné se pokusit vytvořit co nejpodobnější podmínky přirozenému prostředí, ve kterém se hostitel nachází (Poulin and Keeney, 2008). V několika pokusech byl například zaznamenán rozdíl efektivity buněk z hostitele a z kultury. Pokud se larvy octomilek několika různých druhů infikovaly buňkami *Jaenimonas drosophilae* získaných z těl jiných nakažených dospělých octomilek experiment se zdařil. Avšak v případě infekce kulturou buněk, která byla přidána do potravy, se larvy otomilek nenakazily (Hamilton et al., 2015) (viz **kap. 2. 3. 1**). Stejný výsledek byl zjištěn i při úspěšné infekci larev blech *Pulex simulans* suchým trusem s natrávenou krví a buňkami *Blechomonas pulexsimulantis* získaných od infikovaných dospělých blech. Jestliže se ale do suché neinfekční krve přidala kultura s blechomonádami larvy blech zůstaly bez infekce (Beard et al., 1989) (viz **kap. 2. 3. 2. 1**).

Hostitelská specifita je ovlivňována schopností parazita přizpůsobit se prostředí a hostiteli. Pokud se parazit dokáže adaptovat k podmínkám, ve kterých se hostitel přirozeně nachází, zvyšuje se tak pravděpodobnost infekce nových potenciálních hostitelů ze stejného prostředí a dochází tak ke snížení specifity k jednomu hostiteli (Dick and Patterson, 2007).

Úzká nebo naopak široká hostitelská specifita byla v předchozích letech zjištěna u

několika druhů jednohostitelských trypanosomatid. Původní paradigma, že každý hostitel má svého specifického parazita, které bylo aplikováno při taxonomii monoxenních trypanosomatid, se ukázalo jako nevhodné (McGhee and Cosgrove, 1980; Podlipaev, 2000; Podlipaev et al., 2004; Maslov et al., 2007; Votýpka et al., 2010, 2012; Maslov et al., 2013; Kozminsky et al., 2015).

Vysoká hostitelská specifita jednohostitelských trypanosomatid byla podporována specifickými interakcemi mezi dixenními druhy a jejich hmyzími vektory. U leishmáníí jsou zaznamenány specifické komplexní interakce mezi povrchovými lipofosfoglykanovými (LPG) molekulami a galektiny na povrchu mikrovil středního střeva flebotomů, které jsou nezbytné k úspěšnému vývoji parazita. Například flebotom *Phlebotomus papatasi* je schopen díky specifickým LPG přenášet a podporovat vývoj pouze leishmáníí *Leishmania major* (Pimenta et al., 1994; Kamhawi et al., 2004; Dostálová and Volf, 2012). V tomto specifickém vektorovi leishmanie *L. major* (včetně obou hybridních kmenů) kolonizovali stomodeální valvu a infekce přetrvala do desátého dne, zatímco leishmanie *Leishmania infantum* byly defekovány společně se zbytky krve a ve flebotomech se nedokázaly vyvíjet. V permisivních flebotomech *Lutzomyia longipalpis* se všechny kmeny leishmáníí v dané studii naopak vyvíjeli dobře (Volf et al., 2007).

Zatímco vývoj dixenních trypanosomatid ve vektorovi vede k produkci infekčních (např. metacyklických) stádií, u monoxenních zástupců je hlavním cílem udržet se po celý život v hostiteli, který maximalizuje možnost přenosu do dalších hostitelů (Kozminsky et al., 2015). U některých jednohostitelských druhů trypanosomatid byly také potvrzené specifické interakce mezi jejich povrchovými glykokonjugáty a vhodnými receptory ve střevě omezeného spektra hostitelů. Trypanosomatida jsou v hmyzím hostiteli přichycená pomocí bičíku ke stěně celého střeva nebo se nachází pouze v jedné konkrétní části. Místo, které preferují pro přichycení je nejčastěji střední a zadní střevo. Někdy se mohou vyskytovat i v Malphigických trubicích nebo hemolymfě (Wallace, 1966; Smirnov and Lipa, 1970; McGhee and Cosgrove, 1980; Maslov et al., 2013; Frolov et al., 2017).

Jednohostitelské blastocritidie *Blastocritidia triatoma* kolonizují epitel středního střeva, stěnu zadního střeva a rektum zákeřnice *Triatoma infestans*. Při studiu kolonizací rektální oblasti zákeřnice bylo zjištěno, že buňky blastocritidií jsou přichycené v jiné části, než kterou preferují k adhezi ve stejném hostiteli dixenní trypanosomy *Trypanosoma cruzi* (Schaub and Böker, 1986; Schaub et al., 1992). Specifické interakce byly také zaznamenány mezi bičíky buněk monoxenních leptomonád *Leptomonas wallacei* a perimikroviální membránou sekretovanou buňkami epitelu středního střeva a také mezi



stěnou zadního střeva fytofágních ploštiček *Oncopeltus fasciatus* (Romeiro et al., 2003a). Při pasáži ze středního do zadního střeva dochází ke změně morfologie buněk leptomonád a glykokonjugátů na jejich povrchu. Ve středním střevě jsou buňky štíhlé, vřetenovitě protáhlé a mají dlouhé bičíky. V zadním střevě přetrvává stále vřetenovitý tvar ale leptomonády jsou kratší a během průniku se na jejich povrch exprimují nové glykokonjugáty (např. GS-I a HPA). S postupným přechodem do rekta se buňky zakulacují (Romeiro et al., 2003b).

Nedávné studie hostitelské specifity doplněné o výzkumy biodiverzity odhalily asociace mezi některými velkými hostitelskými skupinami (řády) a hlavními klady trypanosomatid. Například byl potvrzen určitý stupeň specifity trypanosomatid rodů *Herpetomonas* (Podlipaev et al., 2004; Týč et al., 2013) a *Angomonas* k hostitelskému řádu dvoukřídlých. Vzácně zástupci obou rodů byli (morfologicky i molekulárně) identifikováni v ploštících (Heteroptera) a tyto náhodné výskyty se přičítaly jejich vysoké schopnosti predace (Týč et al., 2013). Také byly objevené menší skupiny (typové jednotky/druhy) trypanosomatid s hostitelskou specifitou na úrovni čeledě nebo rodu. Leptomonády *Leptomonas pyrrocoris* byly izolovány ze střeva ploštic čeledi ruměnicovitých (Pyrrocoridae) v Evropě, Středozeří, Střední Americe, Africe i v Asii (Číně). V Evropě se nejčastěji nachází v ruměnici pospolné (*Pyrrocoris apterus*). V Ghaně, Ekvádoru, Kostarice a Číně byl výskyt leptomonád potvrzen v ruměnicích rodu *Dysdercus* (Votýpka et al., 2012b). Další druh, který zatím nemá jméno a je označován jako typová jednotka Ch14 (v neotropické oblasti jako TU6/7) dosáhla globální distribuce s relativně úzkou hostitelskou specifitou. Tento druh byl nalezen pouze v čeledi nohatěnkovitých (Alydidae) v Asii i Americe (Maslov et al., 2007). V opačném případě byla zaznamenána u některých druhů trypanosomatid široká hostitelská specifita s kosmopolitní distribucí. Blastocritidie (*Blastocritidia*) zastoupené typovou jednotkou Ch1 se vyskytují ve třech hostitelských čeledích (nohatěnkovití, hlavěnkovití (Geocoridae) a kněžicovití (Pentatomidae)) z Asie (Votýpka et al., 2010). Jako typová jednotka TU44 byly izolované z vroubenkovitých (Coreidae) v neotropické oblasti (Maslov et al., 2007), z ruměnicovitých v Evropě (Votýpka et al., 2012b) a z hlavěnkovitých, kněžicovitých, zákeřnicovitých (Reduviidae), štítovkovitých (Scutelleridae) v Africe (Votýpka et al., 2012). Nicméně tyto případy poukazují na nízkou hostitelskou specifitu trypanosomatid stále v rámci řádu polokřídlých. V některých případech může být spektrum hostitelů ještě širší. Například critidie *Crithidia confusa* (TU56) parazitují v ploštících (ploštičkovití (Lygaeidae), zákeřnicovití) i dvoukřídlých (bzučivky – Calliphoridae) (Votýpka et al., 2012).

Zástupci z řádů dvoukřídlých a polokřídlých byli upřednostněni jako hostitelé monoxenních trypanosomatid zřejmě právě díky způsobu příjmu potravy. Jejich potrava je bohatá na organické zdroje zásluhou kontaminace infikovaným trusem od nakažených hostitelů. Běžně u nich také dochází ke koprofágii, nekrofágii a predaci (viz **kap. 2. 3. 2. 1**). Ke zvýšení možnosti přenosu trypanosomatid také přispívá časté agregační chování při příjmu potravy typické pro dvoukřídlé nebo život v husté lokální populaci polokřídlých (Maslov et al., 2013). Predace je například běžným jevem právě u ploštic, které se živí jiným hmyzem. Nejčastěji jejich kořistí bývají zástupci z řádu dvoukřídlých. Experimentální infekce mohou potvrdit, zda je hostitel specifický nebo pouze kumuluje parazity z potravy. Například v zákeřnicích *Zelus leucogrammus* byla potvrzená přítomnost některých trypanosomatid pouze do chvíle, kdy jim byly jako zdroj potravy podávány mouchy, masařky a bzučivky (Carvalho and Deane, 1974).

### **2. 3. 1 Experimentální infekce a studium hostitelské specifity**

Jak je zmíněno výše, v první polovině minulého století byla problematika zaměřená na hostitelskou specifitu trypanosomatid probírána víceméně sporadicky. Počáteční studie všechna trypanosomatida nalezená v doposud nepopsaném hostiteli identifikovaly jako nový druh. Poměrně velkým úskalím v minulosti byla skutečnost, že se všechny studie spoléhaly při určování jednotlivých druhů trypanosomatid na experimentální infekce a morfologii, což s sebou vždy neslo riziko záměny. Stejně riziko tak hrozí i v případě experimentálních infekcí pokud je hostitel nakažen více druhy trypanosomatid a ty jsou rozeznávány pouze mikroskopicky.

Například pro herpetomonádu *Herpetomonas muscarum* bylo používáno několik odlišných jmen. Teprve až experimentální infekce doplněné morfologickou analýzou odhalily, že se opakovaně jednalo o stejný druh, který byl nalezen v mouchách různých rodů a druhů (Hoare, 1923; Wenyon, 1926; Fantham and Robertson, 1927; Wallace, 1966). Pro infekční pokusy byly jako modelové organismy vybrány neinfikované laboratorní kolonie bzučivky obecné (*Calliphora erythrocephala*), bzučivky zelené (*Lucilia sericata*), bzučivky *Cochliomyia macellaria*, bzučivky *Phormia regina*, mouchy domácí (*Musca domestica*) a masařky *Sarcophaga bullata*. Zatímco kolonie mouchy domácí vznikla z (neinfikovaných) larev odebraných z koňského trusu, ostatní výše zmíněné druhy pocházejí z laboratorních kolonií. Princip metody experimentálních infekcí spočíval v tom,

že vyizolovaný obsah celého střeva s buňkami *H. muscarum* jednoho druhu hostitele byl potravou pro ostatních pět výše uvedených druhů. Výsledky těchto experimentů dokázaly, že izolát parazita z kteréhokoli druhu uvedených much dokáže nakazit i ostatní druhy (Becker, 1923a; b). Skutečnost, že druh *H. muscarum* má nízkou hostitelskou specifitu, dokázaly i další úspěšné experimentální pokusy, při kterých byly kulturou buněk infikovány mouchy domácí, bzučivky *Phormia regina*, bzučivky zlaté (*Lucilia caesar*) a bzučivky zelené (Drbohlav, 1925).

Moucha domácí byla vybrána také jako modelový organismus pro podobnou studii týkající se hostitelské specifity monoxenních trypanosomatid druhů *H. muscarum* a *Crithidia luciliae*, které byly původně izolovány z bzučivky zelené. Prostřednictvím sterilních smotků vaty namočených do kultur obou druhů trypanosomatid byly zdárně infikované laboratorní chovy mouchy domácí. V rámci stejné studie byly provedeny ještě pokusy infikovat kolonie komára tropického (*Aedes aegypti*) a komára pisklavého (*Culex pipiens*) kulturou buněk *C. luciliae*, ale k přenosu infekce nedošlo (Wallace and Clark, 1959).

Druh *Herpetomonas muscarum* byl na základě odlišných typů kinetoplastů později rozdělen do dvou poddruhů – *H. muscarum muscarum* a *H. muscarum ingenoplastis*. Mouchy domácí (původní hostitelé *H. m. muscarum*) a bzučivky *Phormia regina* (původní hostitelé *H. m. ingenoplastis*) byly experimentálně infikované kulturami obou poddruhů. V případě poddruhu *H. m. muscarum* se v obou hostitelích vytvořila slabá infekce, která trvala pár dní. Úspěšnost nákazy poddruhem *H. m. ingenoplastis* v mouchách domácích byla 45 % ale pátý den byly všechny vzorky negativní<sup>2</sup>, zatímco 96 % bzučivek (*P. regina*) bylo pozitivních a délka infekce přesáhla dvanáct dní. Ve smíšené kultuře převažovaly z 98 % buňky poddruhu *H. m. muscarum*. Jednotlivé poddruhy herpetomonád se lišily ve velikosti a tvaru kinetoplastu. Při pokusech infikovat bzučivky smíšenou kulturou byly v hostitelích přítomni oba poddruhy první dva dny. Zbýlých dvacet dní se v bzučivkách vyskytovaly pouze buňky poddruhu *H. m. ingenoplastis* (Rogers and Wallace, 1971).

Dalším zástupcem s hostitelskou specifitou pokrývající různé druhy příslušného hostitelského rodu je nově popsán druh jednohostitelských trypanosomatid *Jaenimonas drosophilae*. Původně se jednalo o izolát z octomilek *Drosophila falleni*. Experimentální infekce doplněné molekulárními analýzami odhalily schopnost druhu *J. drosophilae*

---

<sup>2</sup> Infekce poddruhem *H. m. ingenoplastis* by v mouchách domácích měla fungovat. Autoři tuto podivnost ale ve svém článku nevysvětlují. Nezaznamenala jsem žádný komentář k tomuto jevu ani v dalších článcích.

infikovat široké spektrum fylogeneticky vzdáleně příbuzných hostitelů, a to i z odlišných podrodů. Čerstvě vylíhlým (neinfikovaným) larvám octomilek *D. falleni* (podrod *Drosophila*), *D. neotestacea* (podrod *Drosophila*) a octomilek obecných (*D. melanogaster*, podrod *Sophophora*) (Clark et al., 2007; Miller, 2015) byla poskytnuta potrava obsahující buňky druhu *J. drosophilae* získané z těl infikovaných octomilek. U larev všech druhů exponovaných nákaze se projevila velmi rychle poměrně silná infekce, která u většiny jedinců přetrvala do dospělosti. Pokud se larvám octomilek přidala do potravy kultura buněk infekce byla příliš slabá a krátkodobá. Při injikaci buněk do hemolymfy dospělců octomilky obecné došlo k úhynu všech jedinců. Nízkou hostitelskou specifitu i široké geografické rozšíření druhu *J. drosophilae* také prokázala zpětná analýza sekvencí trypanosomatid, které byly získané v předchozích letech z velkého počtu octomilek *Drosophila ananassae* odchytených ve volné přírodě na Havaji (Chandler and James, 2013). Následná molekulární studie původně blíže neurčených trypanosomatid prokázala, že se jedná právě o druh *J. drosophilae* (Hamilton et al., 2015).

Při studiu hostitelské specifiky *Blastocrithidia euschisti*, *Blastocrithidia* sp., *Leptomonas leptoglossi* a několika druhů rodu *Crithidia* byly jednotlivé ploštičky *Oncopeltus fasciatus* intrarektálně injikované buňkami těchto trypanosomatid. Druhy *L. leptoglossi* (původně z vroubenky *Leptoglossus phyllopus*) a *B. euschisti* (původně z kněžice *Euschistus servus*) se v ploštičkách nedokázaly množit a infekce nakonec z hostitele vymizela. Naopak šest morfologicky odlišných druhů critidií (*C. acanthocephali* z vroubenky *Acanthocephala femorata*, *C. fasciculata* z komára pisklavého, *C. luciliae* z bzučivky zelené, *C. oncopelti* z jiné kolonie ploštiček *Oncopeltus* sp., *Crithidia* sp. ze zákeřnice *Arilus cristatus* a *Crithidia* sp. z ploštice *Euryophthalmus davisii*) se v ploštičkách intenzivně množilo, ale nepřenesly se do další generace. Infekce trypanosomatidy *Blastocrithidia* sp. (ze zákeřnic *Melanolestes picipes*) se v ploštičkách nejenom plně rozvinula, ale navíc se dokázala přenést i do sedmi dalších generací. Jednotlivé druhy trypanosomatid byly v ploštičkách rozlišeny pouze morfologicky a mohlo tak dojít k záměně mezi jednotlivými druhy (Hanson and McGhee, 1963). Pro další experimentální studii byly využity stejné kultury buněk critidií jako ve výše zmíněném pokuse. Smotek vaty namočený v jednotlivých kulturách critidií byl podán laboratorním koloniím octomilek obecných, potemníků moučných (*Tenebrio molitor*) a cvrčků domácích (*Acheta domesticus*). Jednotlivé druhy critidií byly také injikovány do hemocoelu potemníků, cvrčků a octomilek *Drosophila virilis*. Ve všech případech se infekce zdařila a přítomnost buněk v hostiteli byla morfologicky potvrzená; jedinou výjimku tvořila

perorální infekce octomilek obecných, ze kterých se nákaza po prvním týdnu vytratila (Schmittner and McGhee, 1970). V následujícím experimentu byly použity čtyři druhy jednohostitelských trypanosomatid: *B. euschisti* (z kněžice *Euschistus servus*), *C. acanthocephali* (z vroubenky *Acanthocephala femorata*), *C. luciliae* (z bzučivky zelené) a *C. mellificae* (z včely medonosné (*Apis mellifera*)). Buňky z kultur jednotlivých druhů byly intrarektálně injikované do třetího a čtvrtého nymfálního instaru laboratorně chovaných krevsajících zákeřnic *Triatoma infestans* a *Rhodnius prolixus*. Podobně jako v předchozích studiích bylo mikroskopicky potvrzeno, že trypanosomatida v experimentálních hostitelích přežívají a ve většině případů se silně množí dokonce i dva měsíce po infekci (Hanson et al., 1968).

Zákeřnice velmi často napadají jakýkoli hmyz, který vysávají svým dlouhým sosákem (proboscis). V přírodě jsou to nejčastěji zástupci dvoukřídlých (Carvalho and Deane, 1974; Schaub et al., 1989). Ve střevním traktu zákeřnic *Zelus leucogrammus* byly opakovaně morfologicky identifikovány buňky *Blastocrithidia triatomae*, *Crithidia luciliae*, *Herpetomonas muscarum* a *Leptomonas* sp. Po odchytu z přírodních podmínek se v izolované populaci zákeřnic dokázal šířit pouze druh *B. triatomae* a ostatní monoxenní trypanosomatida se postupně vytrácela. Pokud byly zákeřnice z chovu krmené odchyceným hmyzem (především mouchami, masařkami a bzučivkami), okamžitě v nich byla potvrzená přítomnost buněk *C. luciliae* a *H. muscarum*. Hmyzožravé zákeřnice tedy mohou být díky predaci dočasnými hostiteli pro trypanosomatida, která kumulují z potravy (Carvalho and Deane, 1974).

Pro porovnání hostitelské specifity a intenzity infekce trypanosomatidami s/bez endosymbiontů byli komáři tropičtí (*Aedes aegypti*) infikováni kulturou buněk *Strigomonas culicis* (původně izolovanými ze zákeřnice *T. infestans*). V nedávné době byl tento druh s endosymbiontem přeřazen z původního rodu *Blastocrithidia* do nově vytvořeného rodu *Strigomonas* (Brum et al., 2014). Do kultury byly namočeny kousky vaty, na kterých pak vyhladovělí komáři sáli. V obou případech se infekce zdařila a byla potvrzená nízká hostitelská specifita. Kmeny *S. culicis* s endosymbionty se ve střevě komárů dokonce velmi ochotně množily (Fampa et al., 2003).

Od výše zmíněných experimentálních studií se odrazil výzkum hostitelské specifity druhů *Crithidia bombi* a *Crithidia mellificae*. Tyto druhy představují jednohostitelská trypanosomatida, která byla dlouhou dobu považována za jediná nalezená ve svých hostitelích – čmelácích, v případě druhu *C. bombi* (Gorbunov, 1987) a včelách, v případě druhu *C. mellificae* (Langridge and McGhee, 1967). O několik let později byl ve včelách i

čmelácích potvrzen výskyt dalších jednohostitelských trypanosomatid. V čmelácích byly nalezené critidie *Crithidia expoeki* (Schmid-Hempel and Tognazzo, 2010) a ve včelách byl zachycen druh *Lotmaria passim* (Schwarz et al., 2015). Pro studium hostitelské specifity druhů *C. mellificae* a *C. bombi* byly z volně žijících kolonií odebrané včely medonosné a čmeláci zemní (*Bombus terrestris*, poddruh *dalmatinus*). Dospělci i právě vylíhlí jedinci obou druhů byli mikroskopicky vyšetřeni na přítomnost trypanosomatid. Včely staré deset dní a čmeláci ve věku osmi dní umístění do sterilních boxů byly infikovány přes kontaminovanou potravu. Včelám byl podán cukerný roztok smíchaný s trusem, který obsahoval buňky druhu *C. bombi*. Trus byl získán od čmeláků zemních dalšího poddruhu (*B. terrestris audax*). Čmeláci byli infikováni cukerným roztokem smíchaným s homogenizovanými zadními střevy (proctodeum) včel medonosných přirozeně infikovaných a obsahujících buňky druhu *C. mellificae*. Po infekci v různých intervalech bylo vyšetřováno střevo včel a trus čmeláků mikroskopicky zkontrolován. I přes schopnost *C. bombi* infikovat více druhů čmeláků (Shykoff and Schmid-Hempel, 1991; Durrer and Schmid-Hempel, 1994; Schmid-Hempel, 1998) a ekologickou podobnost a fylogenetickou příbuznost (Cardinal and Danforth, 2011) čmeláků s včelami medonosnými, nebyla tato dostačující pro zkřížené infekce mezi těmito hostiteli. Autoři označili druhy *C. mellificae* a *C. bombi* za trypanosomatida s vysokou hostitelskou specifitou na úrovni tribů (Apini, Bombini) (Ruiz-González and Brown, 2006). Je ale otázkou, zdali tyto druhy critidií opravdu vykazují uvedenou vysokou specifitu ke svým hostitelům, protože v minulosti byla dokázána naopak nízká hostitelská specifita *C. mellificae* (viz výše) při experimentálních infekcích se zákeřnicemi *T. infestans* a *R. prolixus* (Hanson et al., 1968).

Omezená hostitelská specifita byla také experimentálně potvrzena u nedávno objeveného druhu *Sergeia podlipaevi*, který byl původně nalezen v malpighických trubicích tiplíků *Culicoides festivipennis* (podrod *Oecacta*) a *Culicoides truncorum* (podrod *Oecacta*). Vzdáleně příbuzní tiplíci *Culicoides nubeculosus* (podrod *Monoculicoides*) byli experimentálně infikováni buňkami *S. podlipaevi* buď sáním na smotku vaty namočeného do kultury, nebo krví přes membránu. Infekce byla úspěšná v obou případech sání (Svobodová et al., 2007).

Přestože v několika případech bylo odhaleno, že jednohostitelská trypanosomatida mají poměrně široké spektrum hostitelů, existují i důkazy o specifických interakcích. Druh *Blechnomonas pulexsimulantis* (přeřazení z rodu *Leptomonas* do rodu *Blechnomonas* viz Votýpka et al., 2013) izolovaný z blechy *Pulex simulans* potvrdil vysokou hostitelskou specifitu. Při experimentálních infekcích byly právě vylíhlé larvy blechy kočičí

(*Ctenocephalides felis*) z laboratorního chovu infikovány trusem blechy *P. simulans*, které byly odebrány z volně žijícího psa. Pro kontrolu, zda je trus infekční, byly infikované i larvy blech *P. simulans*. Všechny larvy se nechaly zakuklit a infekce se zkoumala až u dospělých jedinců. Zatímco infekce v případě dospělých blech *P. simulans* byla potvrzená, všechny blechy kočičí byly negativní a druh *B. pulexsimulantis* tak prokázal svou vysokou hostitelskou specifitu (Beard et al., 1989).

### **2. 3. 2 Experimentální infekce a způsob přenosu jednohostitelských trypanosomatid**

Virulence a způsob přenosu jsou rozhodujícími faktory, které určují vztahy mezi hostitelem a parazitem. Obecně existují dva způsoby přenosu parazitů mezi hmyzími hostiteli: a) **horizontální**, ve kterém dochází k přenosu mezi dvěma jedinci, a to buď z hostitele na hostitele, nebo z hostitele nejprve do prostředí a teprve odtud do dalšího hostitele; b) **vertikální**, ve kterém je parazit přenášen z rodiče na potomstvo (Goertz et al., 2007; Erler et al., 2012).

#### **2. 3. 2. 1 Horizontální způsob přenosu**

Horizontální přenos je nejběžnější způsobem šíření jednohostitelských trypanosomatid mezi hostitelským hmyzem. Několik autorů (viz níže) potvrdilo experimentálními infekcemi přenos trypanosomatid horizontální cestou, ke kterému dochází prostřednictvím kontaminace prostředí i potravy infekčními stádii (bičíkovci nebo pseudocystami), koprofágie (požívání trusu), nekrofágie (požívání uhynulých těl hmyzu), kanibalismu (požívání jedinců vlastního druhu) a predace (dravého způsobu života, požívání ulovené kořisti).

Přenos monoxenních trypanosomatid přes kontaminovanou potravu je často umožněn fytofágním hmyzem. Několikrát byl potvrzen přenos dvouhostitelských trypanosomatid rodu *Phytomonas* prostřednictvím ploštic, které sají rostlinné šťávy, plody a semena. V ovocných plodech byl ale také zaznamenán výskyt zástupců rodů *Herpetomonas*, *Leptomonas* a *Crithidia* (Catarino et al., 2001; Marín et al., 2007; Zanetti et al., 2016).

Při kontaminaci prostředí je zapotřebí, aby se životní cyklus parazita synchronizoval s hostitelovým, resp. aby se ve stejnou dobu nacházela infekční stádia trypanosomatid na stejném místě jako vajíčka, larvy, kukly nebo dospělci dalších potenciálních hostitelů. Kontinuita životních cyklů je pravděpodobně nejsnadněji dodržena

ve vlhkém či vodním prostředí, které je u některých druhů hmyzích hostitelů nezbytné pro jejich vývoj a zároveň je vhodné pro buňky trypanosomatid (McGhee and Cosgrove, 1980). Jedinou překážkou je zde zimní období, kdy je nutné přečkat diapauzu v hostiteli a přenést se do jeho další generace. Například v bruslařkách *Gerris odontogaster* (Tieszen and Molyneux, 1989) nebo čmeláčích zemních (Brown et al., 2003) byla potvrzená schopnost trypanosomatid přežít hibernaci a infikovat další hostitelé.

V rámci studie hostitelské specifity druhu *Herpetomonas muscarum* bylo experimentálně dokázáno, že mouchy vyhledávají vlhké prostředí pro kladení vajíček, které zároveň kontaminují trusem. V přirozených podmínkách byly pozorované mouchy domácí, masařky (*Sarcophaga*) i bzučivky (*Calliphora*, *Cochliomyia*, *Lucilia* i *Phormia*) při kladení vajíček i uvolňování trusu do vlhkého masa, které je pro ně zároveň zdroj potravy. Pro potvrzení tohoto způsobu přenosu trypanosomatid mezi mouchami byl proveden laboratorní experiment, při kterém infikované bzučivky (*Lucilia*) kontaminovaly trusem s bičíkovci krysí maso, na kterém se živily. Do nádoby s takto infikovaným masem byly poté umístěny neinfikované bzučivky (*Lucilia* a *Phormia*) a masařky, u kterých se po dvanácti dnech potvrdila infekce (Becker, 1923b). Podobným způsobem využívají patrně vlhké prostředí pro přenos parazita *Herpetomonas megaseliae* i mouchy hrbilky *Megaselia scalaris*, které v experimentu kladly vajíčka do vlhkých podestýlek morčat (Daggett et al., 1972).

Prostřednictvím kontaminace potravy dochází k přenosu jednohostitelských trypanosomatid *Crithidia bombi* mezi čmeláky *Bombus* spp. při společném opylování květů. Při opylování čmeláci uvolňují infikovaný trus, který se dostává do květů s nektarem. V rámci experimentálních infekcí byly neinfikované dělnice čmeláků hájových (*Bombus lucorum*) a čmeláků zemních (*Bombus terrestris*) umístěny do sterilních boxů s hadincem obecným (*Echium vulgare*), jehož květy byly předtím kontaminované buňkami *C. bombi*: k rostlinám se buď umístili infikované dělnice čmeláků, nebo se do květů pomocí mikrokapiláry aplikoval infekční cukerný roztok namísto nektaru. V obou případech se vnitrodruhový přenos critidií mezi dělnicemi zdařil (Durrer and Schmid-Hempel, 1994). V další studii byl v experimentálních podmínkách studován potenciál včel medonosných (*A. mellifera*) fungovat jako (pasivní) přenašeči čmeláčího druhu *Crithidia bombi*. Včely po infekci cukerným roztokem s příměsí trusu čmeláků zemních (*B. terrestris* poddruhu *audax*) dokázaly ve svém střevě udržet infekci nespécifickým parazitem po dobu pěti dní. Buňky critidií sice nedokázaly ve včelách vytvořit stabilní dlouhodobou infekci, ale byly schopné i po průchodu jejich trávicím traktem nakazit



čmeláky. Kromě toho způsobu dokážou zřejmě včely v přírodě přenášet i čmeláci crithidie, které se náhodně dostanou na končetiny či chloupky jejich těla po kontaktu s kontaminovanými rostlinami (Ruiz-González and Brown, 2006).

Přenos přes vodu byl potvrzen experimentálními infekcemi u druhů *Blastocrithidia gerridis* a *Crithidia flexonema*, jejichž bičíkatá stádia byla izolována z trusu vodních ploštic, bruslařky obecné (*Gerris lacustris*) a bruslařky *Gerris odontogaster*, které se permanentně vyskytují na hladině vody. Oba druhy trypanosomatid se úspěšně přenesly z přirozeně infikovaných dospělců bruslařky obecné (*G. lacustris*) do dospělých i nymfálních stádií bruslařek stejného druhu pocházejících z (neinfikovaného) laboratorního chovu, a to právě prostřednictvím kontaminace vodního prostředí trusem infikovaných jedinců. V dalším pokusu byla potvrzena infekce laboratorní kolonie bruslařky obecné kulturou buněk *C. flexonema*, která byla přidána do vody k bruslařkám po dobu dvou hodin (v případě *B. gerridis* byl tento způsob přenosu neúspěšný) (Tieszen and Molyneux, 1989). Stejným způsobem byla provedena experimentální infekce larev komárů *Culiseta incidens* trypanosomatidy *Crithidia fasciculata*. Infekce se vytrácela ihned po svlékání a znovu se objevovala v následujícím larválním instaru. Poslední larvální instar se po nákaze zakuklil a infekce přetrvala až do dospělého stádia. V laboratorních podmínkách bylo také prokázáno, že dospělci komárů v rámci koloběhu infekce zase kontaminují vodní prostředí, ve kterém se nachází larvy a to buď trusem, nebo rozkládajícími těly po úhynu (v přírodě jsou pravděpodobně možné oba způsoby) (Clark et al., 1964). Další experiment dokázal, že infekce se mezi bruslařkami obecnými může šířit i kanibalismem nebo nekrofágií. Laboratorně chované nymfy druhého instaru požíraly mechanicky poškozená těla infikovaných dospělců. Kanibalismus či nekrofágie byly u bruslařek několikrát pozorovány i v přírodních podmínkách, a to především v jarním období, kdy se dospělé ploštice po přezimování páří, samice kladou vajíčka a hynou. V rámci této studie byla potvrzena přítomnost trypanosomatid (*B. gerridis* i *C. flexonema*) v dospělých bruslařkách *G. odontogaster* po hibernaci, což vysvětluje nejvyšší míru infekce na přelomu května/června. Kromě zvýšené možnosti kanibalismu a nekrofágie se navíc do vody uvolňují trypanosomatida z těl uhynulých bruslařek (Tieszen and Molyneux, 1989).

U druhu *B. gerridis* izolovaného ze střeva bruslařky rybníční (*Gerris paludum*) a bruslařky *G. fossarum* byla zaznamenána tvorba cystických forem, které se spolu s trusem dostávají do vody a zachytávají se na listech vodních rostlin. Tento typ pseudocyst se tvoří v rektální oblasti hostitele, kde se buňka dvakrát dělí a u (čtyř) nově vzniklých

buněk dochází k degeneraci bičíku a tvoří se z nich tenkostěnné pseudocysty. Podobné cystické formy buněk byly také nalezeny u druhu *Leptomonas jaculum*, který parazituje v trávicí soustavě splešťule blátivé (*Nepa cinerea*) (Porter, 1909a; b).

Pseudocysty vyskytující se u některých trypanosomatid (zejména rodu *Blastocrithidia*) jsou relativně velmi odolné amastigotní formy buněk (označované jako tzv. „straphanger“) přizpůsobené pro přenos infekce mezi hostiteli mimo vodní prostředí. Nejedná se o cysty v pravém slova smyslu, protože jejich povrch chrání pouze zesílená pelikula. Vnější stěna, která běžně pokrývá cysty jiných prvoků, zde chybí (Gibbs, 1947, 1950; McGhee and Hanson, 1962; Reduth and Schaub, 1988). Přesto bylo prokázáno, že pseudocysty *Blechromonas pulexsimulantis* v suchém trusu hostitele dokážou zachovat infekční schopnosti po dobu dvou měsíců (Gibbs, 1947) a v případě *Blastocrithidia triatoma* dokonce po tři roky (Schaub and Pretsch, 1981). Ultrastruktura pseudocyst jednotlivých trypanosomatid není zcela jednotná. Silná plazmatická membrána u druhů *Blechromonas pulexsimulantis* a *B. ctenocephali* obsahuje jemné spáry a na rozdíl od cystických forem *Blastocrithidia triatoma* i zřetelné subpelikulární mikrotubuly (Molyneux and Croft, 1980; Peng and Wallace, 1982; Reduth and Schaub, 1988; Beard et al., 1989). Skutečnost, že pseudocysty jsou rezistentní vůči vysychání, zvyšuje možnost šíření jednohostitelských trypanosomatid mezi hmyzími hostiteli prostřednictvím koprofágie a kontaminace vnějšího prostředí.

Koprofágie jako způsob přenosu jednohostitelských trypanosomatid, při kterém hostitel pozře spolu s trusem i buňky parazita (včetně pseudocyst), byla studována u několika skupin hostitelského hmyzu. Prostřednictvím experimentálních infekcí bylo dokázáno, že se blechy psí (*Ctenocephalides canis*) infikují parazity *Blechromonas ctenocephali* (syn. *Leptomonas ctenocephali* (Podlipaev, 1990; Votýpka et al., 2013)) během larválního stádia. Trus dospělých blech je pro larvy do jisté míry hlavním potravním zdrojem. Nově vylíhlé larvy byly experimentálně infikované suchým trusem s natrávenou krví a buňkami blechomonád dospělých blech odchycených ze psa. Zatímco ve středním střevě (mesenteron) larev se nachází pouze volně pohybliví dělící se promastigoti, tak v zadním střevě jsou buňky permanentně přichycené ke stěně. Přichycení bičíkovci brzy začnou podléhat encystaci a tvoří se zde velké množství amastigotních (pseudocystických) stádií. U dospělých blech je typický výskyt promastigotů a pseudocyst pouze v zadním střevě a rektu (Wenyon, 1926; Gibbs, 1947). Stejným způsobem (přes suchý trus volně se vyskytujících blech) se infikovali larvy blechy *Pulex simulans* (z laboratorního chovu) buňkami parazita *Blechromonas pulexsimulantis*. Potvrzením významu pseudocyst *B.*

*pulexsimulantis* v přenosu parazitů byla skutečnost, že se infekce objevila v 94 % dospělých blech, jejichž larvy byly infikované suchým trusem s blechomonádami. V případě nákazy larev suchou psí krví s příměsí buněk blechomonád z kultury se přenos nezdařil (Beard et al., 1989).

Ke kontaminaci půdy infekčním trusem dochází velmi často při kladení vajíček. Dospělé samice ploštic *Cenaeus carnifex* kladou vajíčka do půdy a zároveň defekují. První nymfální instary se v přírodě pravděpodobně líhnou pod zemí, kde jsou v kontaktu s pseudocysty trypanosomatid z trusu dospělců. Pro ověření způsobu přenosu trypanosomatid *Blastocrithidia familiaris* (syn. *Crithidia familiaris* – (Podlipaev, 1990)) se desinfekcí ošetřená vajíčka ploštic *C. carnifex* umístila do nádoby se sterilní zeminou. Do substrátu se poté přidal obsah vypitvaných zadních střev dospělých ploštic, která obsahovala velké množství pseudocyst. U většiny jedinců druhého nymfálního instaru byla infekce potvrzená. V hojném počtu a dokonce ve formě pseudocyst se nacházely v zadním střevě a rektu nymfálních stádií (stejně jako u dospělců). V počátcích infekce byly všechny buňky ve formě epimastigotů, ale pseudocysty se tvořily pouze z promastigotů. Později jsou v zadním střevě a rektu pouze promastigoti, k jejichž bičíku je přichyceno až pět amastigotních forem (Gibbs, 1950). Formování pseudocyst bylo zaznamenáno i u druhu *Blastocrithidia papi* v malpigických trubcích ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*). Pre-cystická stadia jsou zde připojena k bičíku „mateřských“ epimastigotů většinou po trojicích (Frolov et al., 2017).

Na rozdíl od předchozích experimentů, laboratorní přenos trypanosomatid *Leptomonas oncopelti* z dospělých do nymfálních stádií ploštiček *Oncopeltus fasciatus* upozornil na přítomnost pseudocyst pouze v trusu dospělců. Vajíčka odebraná z neinfikované laboratorní kolonie ploštic byla umístěna do chovu infikovaných dospělců stejného druhu. Přestože infekce byla opakovaně potvrzená (pitvou) u nymf, nikdy se buňky leptomonád (a pseudocyst) neobjevily v rektu nebo jejich trusu. Teprve v okamžiku, kdy nymfální stadia dospěla a jejich trávicí trubice se zcela vyvinula, sestoupili paraziti do rekta. V rektu dospělých ploštiček se velmi často nacházely tři nebo čtyři pseudocysty přichycené k bičíku promastigotů a tvorba pseudocyst byla pozorována už ve středním střevě (McGhee and Hanson, 1962).

Koprofágie a také kanibalismus jsou důležité potravní strategie pro přenos trypanosomatid mezi některými krevsajícími plošticemi z čeledi Reduviidae. Mezi zákeřnicemi *Triatoma infestans* se přenáší prostřednictvím koprofágie původce Chagasovy choroby – dixenní druh *Trypanosoma cruzi* (Schaub, 1988) a také monoxenní druh

*Blastocrithidia triatoma* (Schaub et al., 1989). Pro *T. cruzi* je to pouze doplňující způsob přenosu, hlavní je přes sání zákeřnic na obratlovcích (Noireau et al., 2009). Experimentální infekce několikrát potvrdily, že přenos pomocí koprofágie byl úspěšnější a nákaza byla vyšší v případě *B. triatoma* oproti *T. cruzi*. Pravděpodobně je to následek schopnosti jednohostitelských trypanosomatid tvořit pseudocysty, které se vyskytují v hojném počtu v trusu infikovaných ploštic. V přenosu *B. triatoma* je koprofágie nejúčinnější, pokud je trus čerstvý. Přestože si pseudocysty dokážou udržet infekčnost ve vnějších podmínkách až tři roky (Schaub and Pretsch, 1981), nákaza suchým trusem je v přírodě pravděpodobně možná pouze při větším množství trusu a trypanosomatid. Patrně i povrch hostitele, na kterém zákeřnice sají, je vhodný pro přenos infekce. Při společném experimentálním sání infikovaných a neinfikovaných zákeřnic *T. infestans* na stejném kuřeti z laboratorního chovu došlo ke kontaminaci kůže i peří infikovaným trusem. Kontaminace byla dostatečná pro přenos blastocritidií mezi zákeřnicemi (Schaub et al., 1989; Schaub and Jensen, 1990).

Kanibalismus je často pozorovaný jev mezi agresivními druhy ploštic, a to jak v přírodě, tak v laboratorních podmínkách. Při experimentálních infekcích krevsajících zákeřnic *Dipetalogaster maxima* bylo agresivní chování sledováno u vyhladovělých nymfálních stádií. Nejprve se první nymfální instary infikovaly pseudocystami *B. triatoma* sáním přes membránu a nechaly se svléknout se do druhého instaru. Poté k nim byly přidány neinfikované a vyhladovělé první nymfální instary, které ihned začali sát na infikovaných jedincích. Kanibalistické ploštice většinou při útoku vysávají pouze obsah žaludku (případně hemolymfu) a napadený jedinec (druhá ploštice) přežívá. Toto chování bylo často pozorované v koloniích zákeřnic *D. maxima* a sporadicky u zákeřnic *T. infestans* (Schaub et al., 1989). Stejný postup kanibalistického chování v přírodě i laboratorním chovu volí i ploštice *Cenaeus carnifex*. Při experimentálních infekcích bylo potvrzeno, že promastigoti i pseudocysty *Blastocrithidia familiaris* se vyskytovaly ve střevě napadené i útočící ploštice (Gibbs, 1950). Kanibalismus byl velmi častý, a to i přes dostatek jiné potravy, v chovu zákeřnic *Zelus leucogrammus*. Prostřednictvím experimentálních infekcí se zjistilo, že se mezi populacemi těchto zákeřnic šíří trypanosomatid *Blastocrithidia triatomae galvaei* právě pomocí kanibalismu (Carvalho and Deane, 1974). Také v rámci populace ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) se již mezi nymfami přenáší druh *Blastocrithidia papi*. Experimentální infekce potvrdily, že se nymfy infikují od dospělců pomocí nekrofágie případně koprofágie (Frolov et al., 2017).

### 2. 3. 2. 2 Vertikální způsob přenosu

Pro úspěšný vertikální přenos (podobně jako horizontální přenos, viz výše) je zapotřebí adaptace parazita k podmínkám prostředí, ve kterých se hostitel přirozeně nalézá (Solter, 2006). Pro setrvání parazita v populaci hostitelského hmyzu, který migruje (např. ploštička *O. fasciatus*), může mít vertikální přenos zásadní význam (Dias et al., 2014).

Vertikální způsob přenosu existuje ve dvou formách – (i) transovariální, při kterém se parazité přenáší přes ovaria do vajíček a (ii) transovum, v němž se buňky parazita dostanou na povrch vaječné skořápky, jejíž zbytky se stanou první potravou pro vylíhlé larvy nebo nymfy (Dias et al., 2014).

V minulosti byl transovariální přenos monoxenních trypanosomatid mezi bezobratlými hostiteli několikrát navržen, ale doposud jej nikdo nepotvrdil. Některé studie popisují výskyt jednohostitelských trypanosomatid ve vaječnicích samiček hostitele. Například buňky *Blastocrithidia gerridis* byly nalezené ve vaječnicích velkého procenta dospělých samiček bruslařek rybníčních (*Gerris paludum*). Bičíkovci byli dokonce spatřeni při aktivním pronikání přes stěnu střeva do vaječnicků. Stejný jev byl pozorován při infekci vaječnicků splešťule blátivé (*Nepa cinerea*) trypanosomatidy *Leptomonas jaculum*. Autorka uvádí, že infekce sice byla v obou případech nalezena ve vaječnicích hostitele, ale ve vajíčkách se buňky trypanosomatid nevyskytovaly. Paraziti zřejmě podléhají degeneraci ve vaječnicích a transovariální přenos je tak znemožněn (Porter, 1909a; b). V rozsáhlé studii, při které byl zkoumán přenos trypanosomatid *Blastocrithidia gerridis* a *Crithidia flexonema* mezi bruslařkami obecnými (*Gerris lacustris*) rovněž nebyl transovariální přenos potvrzen. Žádné buňky trypanosomatid nebyly nalezené ve vaječnicích ani ve vajíčkách bruslařek (Tieszen and Molyneux, 1989). Naopak v genitálním traktu (vaječnicích i vejcovodech) zákeřnice *Zelus leucogramus* byli velmi často nalézáni bičíkovci *Blastocrithidia triatomae galvai* v rozetách. Dokonce i v rámci experimentu, při kterém byl desinfikován povrch vajíček, se potvrdila infekce u 14 % vylíhlých nymf. Povrchová desinfekce ale zřejmě nebyla dostatečná a na povrchu vaječných skořápek zůstaly odolné pseudocysty (po kontaminaci trusem), kterými se vylíhlé nymfy zákeřnic nakazily. Přesto ale nebyla možnost transovariálního přenosu vyvrácena (Carvalho and Deane, 1974). V rámci experimentálních infekcí jsou často zakládány neinfikované kolonie hostitelů z vajíček, která byla odebrána infikovaným dospělcům. Následně jsou povrchově desinfikována (např. opláchnuta 10% formalínem, destilovanou vodou apod.) a/nebo umístěna do sterilních podmínek. Ve většině případů byly vylíhlé larvy/nymfy bez infekce, což nepřímo dokazuje neexistenci transovariálního přenosu (Hanson and McGhee,

1963; Daggett et al., 1972; Bailey and Brooks, 1972; Schaub et al., 1989; Tieszen and Molyneux, 1989; Beard et al., 1989).

Naopak možnost přenosu prostřednictvím kontaminace povrchů vajíček trusem s trypanosomatidy zmiňuje řada autorů (Gibbs, 1950; Carvalho and Deane, 1974; Schaub et al., 1989; Schaub and Jensen, 1990). Poprvé byla existence vertikálního přenosu potvrzena ve formě transovum u trypanosomatid *Leptomonas wallacei*, jejichž pseudocysty (amastigoti) byly nalezeny na povrchu vaječných skořápek ploštičky *Oncopeltus fasciatus*. Experimentální studie potvrdily, že samice ploštiček (vzhledem k blízkosti kladélka a řitního otvoru) při kladení kontaminují povrch vajíček pseudocystami. Vylíhlé nymfy, které se živí zbytky vaječných skořápek, se tak okamžitě infikují. Pokud byl předtím povrch vaječných skořápek desinfikován, vylíhlé ploštičky byly na přítomnost trypanosomatid negativní (Dias et al., 2014). Stejným způsobem byl potvrzen transovum přenos trypanosomatid *Blastocrithidia papi* v populaci ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) (Frolov et al., 2017).

## 2. 4 Ultrastruktura bičíku trypanosomatid

Vzhledem k malé velikosti buněk trypanosomatid je detailní analýza jejich ultrastruktur závislá především na vyšetření tenkých řezů pomocí elektronové mikroskopie. V eukaryotické buňce trypanosomatid (viz **obr. 2. 4. 3**) se nalézají typické organely, kterými jsou jádro s jadérkem, ribosomy, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, vakuoly, mitochondrie a cytoskelet. V buňkách trypanosomatid byly navíc objevené unikátní organely, ve kterých probíhají glykolytické procesy, a proto byly označeny jako glykosomy. Dalšími jedinečnými a typickými strukturami jsou subpelikulární mikrotubuly (MT) pod cytoplazmatickou membránou, filamentární síť uvnitř bičíku a kinetoplast (McGhee and Cosgrove, 1980; de Souza, 2008).

V rámci této DP se zabývám zejména výškou kinetoplastu, ultrastrukturou bičíku a periflagelární kapsy. Subpelikulární MT se nachází v podélné řadě těsně pod cytoplazmatickou membránou buňky. Celkový počet je variabilní ale vzdálenost mezi jednotlivými subpelikulárními MT je konstantní, a to patrně zásluhou jemných filamentárních spojů. U buněk *Wallacemonas collosoma* byly potvrzené i spoje mezi MT a cytoplazmatickou membránou (Linder and Staehelin, 1977; Kostygov et al., 2014).

V místě, kde se tvoří periflagelární kapsa některé subpelikulární MT končí, jiné mění směr a s určitým odstupem od membrány periflagelární kapsy pokračují (Preston, 1969; Paulin and McGhee, 1971).

Buňky trypanosomatid mají jednu velkou mitochondrii jejíž součástí je kinetoplast. Jedná se o specifický úsek se silně nahromaděnou DNA v podobě sítě vzájemně propojených malých (minikroužků) a velkých (maxikroužků) kruhových molekul (Vickerman, 2000; Lukeš et al., 2002). V blízkosti kinetoplastu se nachází bazální tělísko (s probazálním tělískem<sup>3</sup>) jediného bičíku a podrobné studie nakonec dokázaly, že tato lokalizace není náhodná. Mezi oběma strukturami je „pevná“ komplexní vazba (tzv. TAC) utvořená dvěma řadami filament. První spojuje bazální tělísko s vnější membránou mitochondrie a druhá vnitřní mitochondriální membránu a kinetoplast (Robinson and Gull, 1991; Ogbadoyi et al., 2003).

#### **2. 4. 1 Axonéma, vnější membrána bičíku a paraxiální tyč**

Bazální tělísko představuje proximální konec bičíku, který je tvořen devíti trojicemi MT. Distálním směrem se prodlužuje a z trojic se stávají dvojice periferně uložených MT (se vzorcem  $9 \times 2 + 0$ ), které vytváří přechodnou zónu mezi bazálním tělískem a bazální destičkou. Z bazální destičky se dále tvoří centrální pár jednoduchých MT a vzniká tak axonéma bičíku se vzorcem  $9 \times 2 + 2$  MT (Vickerman, 1976; Lacomble et al., 2009). Každý pár periferních MT je spojen se sousedním párem nexinovou vazbou, nese vnitřní a vnější dyneinové raménko a směrem k centrálnímu páru MT radiální paprsek. Všechny tyto struktury se podílejí na pohybu bičíku (Branche, 2006).

Axonéma ohraničená vlastní membránou roste směrem k povrchu buňky skrz velkou membránovou invaginaci neboli periflagelární kapsu (Höög et al., 2012) (viz **kap. 2. 4. 2**). Přestože jsou cytoplazmatická membrána, membrána periflagelární kapsy a membrána bičíku vzájemně propojené, jejich biochemické složení a funkce se zcela liší (Fridberg et al., 2007). Při studiu bičíku dobytčí trypanozómy (*Trypanosoma brucei brucei*) byly popsány tři struktury, které oddělují membránu periflagelární kapsy od membrány bičíku. První definovanou strukturou jsou vnitřní přechodná vlákna, která vystupují z distálního konce bazálního tělíska a pojí se k membráně bičíku na bázi

---

<sup>3</sup> Probazální tělísko se váže k bazálnímu tělísku i kinetoplastu a slouží k tvorbě nové axonemy bičíku při dělení buňky (Lacomble et al., 2009).

periflagelární kapsy. Druhá je prstencovitá struktura (tzv. „collarete“, viz **obr. 2. 4. 1**) umístěná na vnější straně membrány bičíku v přechodné zóně mezi bazálním tělískem a bazální destičkou. Tvoří ji deskovité fibrily, které navzájem propojují devět pravidelně rozmístěných zdvojených tubicovitých jednotek. Poslední strukturou jsou paprskovitá vlákna lokalizovaná na vnitřní straně membrány bičíku podél proximální oblasti bazálního tělíška a přechodné zóny (Lacomble et al., 2009).

Bičík trypanosomatid navíc zahrnuje komplexně organizovanou strukturu, která byla pojmenována jako paraxiální, paraxonemální nebo nejčastěji jako paraflagelární tyč (PFR; paraflagellar rod) (Vickerman, 1962). Struktura podobná PFR byla nalezená i u příbuzného krásnoočka (*Euglena*) (Hyams, 1982) a také trojrožce *Ceratium tripos* (z kmene obrněnek, Dinoflagellata) (Maruyama, 1982). PFR je složena ze sítě filamentárních vláken, která jsou umístěná podél axonémy. V příčném řezu má PFR podobu mřížky se třemi odlišnými doménami (krátké proximální, intermediální a rozsáhlejší distální), které jsou definované na základě jejich polohy k axonémě. Proximální a distální zóna je tvořena elektrodenzními destičkami, které se skládají z tenkých (7–10 nm) a silných (25 nm) filamentárních vláken. Silná filamenta se skládají ze dvou těsně přilehlých tenkých vláken. Tenká a silná filamenta se vzájemně překřičují pod úhlem 100° a tak vytváří podobu mřížky PFR patrnou v podélných řezech. Proximální zóna je tvořena dvěma destičkami, přičemž destička blíže ke středu je vždy připojená krátkými filamenti k 4. až 7. periferní dvojici MT axonémy bičíku. Dvojice periferních MT číslo jedna je rovnoběžná s centrální dvojicí MT. Distální zónu tvoří až jedenáct destiček. Všechny destičky jsou rovnoběžné s hlavní osou axonémy a vzdálenost mezi nimi je přibližně 20 nm. Méně elektrodenzní intermediální zónu tvoří 5 nm tenká filamenta, která spojují proximální a distální část PFR. Z každého místa vybíhají vlákna po dvou a jsou oddělena mezerou vzdálenou 20 nm (de Souza and Souto-Pradrón, 1980; Farina et al., 1986).

Počátek i délka PFR se může u jednotlivých druhů trypanosomatid lišit. V případě *T. brucei* začíná PFR ve volné části bičíku mimo periflagelární kapsu a probíhá podél axonémy až do distálního konce bičíku (Lacomble et al., 2009). Studie zaměřené na organizaci bičíku u druhů *Phytomonas davidi* a *Herpetomonas megaseliae* naopak prokázaly počátek PFR již uvnitř periflagelární kapsy (Cunha et al., 1984; Farina et al., 1986; Moreira-Leite et al., 1999). Analýza bičíku promastigotního stádia leishmanie *Leishmania mexicana* také dokázala přítomnost PFR uvnitř periflagelární kapsy, ale až za tzv. límcem („collar“ – viz **kap. 2. 4. 2**) (Wheeler et al., 2016). V amastigotech jak *L. mexicana* tak *T. cruzi* PFR dokonce chybí zcela. Tvoří se až při přeměně v promastigoty



(u leishmanií), či v epimastigoty a trypomastigoty (u trypanozómy). Tedy ve chvíli, kdy se bičík začíná prodlužovat (Meyer, 1968; de Souza and Souto-Padrón, 1980; Wheeler et al., 2016). U leishmanií navíc chybí v amastigotním stádiu i centrální pár MT (axonéma bičíku má vzorec  $9 \times 2 + 0$ ) (Gluezn et al., 2010).

Funkce PFR jsou stále předmětem studií a živých diskuzí. Nejpravděpodobněji je PFR nezbytná pro plnohodnotný pohyb bičíku, poskytuje podporu pro metabolické regulátory ovlivňující aktivitu buňky a napomáhá přichycení k epitelu v bezobratlém hostiteli (Gadelha et al., 2005). Monoxenní trypanosomatida, která mají ve své buňce přítomnou endosymbiotickou bakterii (*Angomonas deanei* (dříve *Crithidia deanei* a *Herpetomonas roitmani*), *A. desouzai* (dříve *Crithidia desouzai*) a *Strigomonas culicis* (dříve *Blastocrithidia culicis*)) PFR postrádají nebo je pravděpodobně redukována (Freymuller and Camargo, 1981; Motta et al., 1991; Silva et al., 1991; Teixeira et al., 2011). Skutečnost, že PFR je silně redukována v šířce i délce byla dokázána při molekulární i morfologické studii bičíku *A. deanei*. Velmi nevýrazná PFR začíná v místě, kde se nachází již zmíněný „límec“ periflagelární kapsy a pokračuje podél axonémy do 1/3 bičíku. Přesto k základním funkcím, které má PFR plnit u ostatních trypanosomatid je tato redukována forma dostačující (Gadelha et al., 2005). Rovněž u nově popsaného rodu *Kentomonas*, který se také vyznačuje přítomností symbiotické bakterie a je fylogeneticky blízce příbuzný rodům *Angomonas* a *Strigomonas*, byla nalezena pouze rudimentární PFR (Votýpka et al., 2014).

#### **2. 4. 2 Periflagelární kapsa a „desmozomy“**

Periflagelární kapsa (dále jen FP) je definována jako hluboká specializovaná invaginace cytoplazmatické membrány. Začíná v místě přechodné zóny bičíku, který vystupuje z cytoplazmy. Horní část definuje místo, kde se bičík dostává z buňky do vnějšího prostředí (Vickerman, 1976).

FP tvoří dvě odlišné domény oddělené elektrodenzní filamentární strukturou neboli límcem („collar“) (Sherwin and Gull, 1989). Límec obklopuje v daném místě FP a nemá u všech trypanosomatid stejnou podobu. V buňkách trypomastigotů *T. brucei* jej tvoří jedna řada elektrodenzního materiálu (viz **obr. 2. 4. 1**) (Absalon et al., 2008; Lacomble et al., 2009), zatímco na povrchu FP promastigotů i amastigotů *L. mexicana* má podobu dvou řad (Wheeler et al., 2016). Proximální oblast (před límcem) je rozšířená a u leishmanií bývá obklopena mnoha vakuolami. V blízkosti této oblasti se nachází cytoplazmatické

mikrotubuly, které pravděpodobně nasměrují endocytované vakuoly dál do cytoplazmy (podobný jev byl zaznamenán i u buněk *C. fasciculata* a *W. collosoma*, podrobněji viz níže) (Brooker, 1971a; Linder and Staehelin, 1977; Weise et al., 2000; Wheeler et al., 2016). Distální oblast (za límcem) FP se zužuje do krčku („neck“), který má cylindrický tvar (Lacomble et al., 2009; Wheeler et al., 2016).

V místě, kde bičík vystupuje z FP se vytváří adhezní spoje mezi bičíkatou membránou a membránou FP. Spoje v podobě elektrodenzních plaků různého tvaru a velikosti jsou často označovány jako „desmozomy“. Mnoho autorů ale s tímto názvem nesouhlasí kvůli jistým odlišnostem od klasických desmozomů, které se nacházejí mezi živočišnými tkáněmi. Nejběžnějšími názvy, které můžeme nalézt v pracích zaměřených na bičík trypanosomatid jsou následující: spoje podobné desmozomům, těsné spoje, adhezní zóna nebo macula adherens. Těsné spoje trypanosomatid jsou unikátní protože se tvoří v rámci jedné buňky. Membrána bičíku se v určité části krčku „nafoukne“ a pomocí „desmozomů“ přilne k membráně FP. „Desmozomy“ se vždy tvoří pouze na vnitřní straně membrán. V prostoru mezi nimi lze vidět pomocí elektronové mikroskopie extracelulární materiál, který tvoří pravděpodobně vlákna filament (Anderson and Ellis, 1965; Vickerman, 1969; Brooker, 1970; Linder and Staehelin, 1977; Brooks, 1978; Absalon et al., 2008; Wheeler et al., 2016).

První spoje tohoto typu byly zaznamenány u trypomastigotů *Trypanosoma lewisi* mezi membránami v zóně, kde bičík vystupuje z FP a přiléhá k cytoplazmatické membráně (Anderson and Ellis, 1965). „Desmozomy“ mohou začínat v oblasti límce a pokračovat pravidelně i nepravidelně po celém krčku FP (vždy závisí na morfotypu trypanosomatid); tento typ byl nalezen např. u critidií *C. fasciculata*. V rámci studie critidií byly rozlišeny tři typy „desmozomů“. **Typ A**, který definovaly desmozomy mezi membránami bičíku a FP. Membrána bičíku může mít při výstupu z FP asymetrický tvar a stejně tak mohou být po celé délce krčku nepravidelně umístěné i „desmozomy“. Z vnitřní strany obou membrán se nachází přesně proti sobě 3–5 svazků elektrodenzních fibril. Pod membránou FP i bičíku lze vidět v cytoplazmě linii filament, z kterých se tvoří plaky „desmozomů“ a membrána bičíku bývá zesílená. **Typ B** byl označen v případě dočasných těsných spojů mezi membránami dvou přilehlých bičíků, které se nachází mimo FP. Nemají tak složitou strukturu jako typ A. Membrány bičíků jsou často zesílené a „desmozomy“ mají tvar souvislé elektrodenzní filamentární linie. Tento typ „desmozomů“ je typický pro buňky, které vytváří rozety v kulturách (např. buňky *Herpetomonas muscarum*). Poslední typ je nazván jako „**hemidesmozomy**“, které vznikají mezi membránou bičíku a kusy nečistot

v kultuře nebo cytoplazmatickou membránou jiné buňky. „Hemidesmosomy“ také umožňují adhezi buněk trypanosomatid ke střevní stěně hostitele (Brooker, 1970; Brooks, 1978). Takové spoje byly zaznamenány například mezi buňkami critidií *C. fasciculata* a střevní stěnou komára *Anopheles gambiae* (Brooker, 1971b), mezi mikrovily enterocytů ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) a bičíkem buněk *Blastocrithidia papi* sp. n. (Frolov et al., 2017) nebo mezi epimastigoty *Trypanosoma lewisi* a stěnou rekta blechy krysí (*Nosopsyllus fasciatus*) (Molyneux, 1969).

### 2. 4. 3 FP, FAZ, cytostom–cytofarynx komplex a mikrotubuly

U trypanosomatid, které nemají specializovanou membránovou invaginaci neboli cytostom–cytofarynx komplex, je strukturou sloužící k příjmu živin periflagelární kapsa (FP). Vzhledem k pevné vazbě mezi subpelikulárními MT a cytoplazmatickou membránou trypanosomatid je sekrece a transport makromolekulárních látek omezen na oblast FP (podrobný přehled transportních dějů trypanosomatid viz (Webster and Russell, 1993; Clayton et al., 1995; McConville et al., 2002).

V oblasti FP se nachází MT, z nichž některé byly u vybraných modelových druhů trypanosomatid podrobně definované. V proximální oblasti FP byl už v minulosti zaznamenán soubor čtyř specializovaných mikrotubulů (Anderson and Ellis, 1965; Paulin and McGhee, 1971). Tento soubor byl definován jako mikrotubulární kvartet (MTQ), který začíná v oblasti bazálního tělíska a levotočivým směrem stoupá nahoru podél FP. V roce 1989 byl MTQ u *T. brucei* označen jako součást tzv. FAZ (Flagellum Attachment Zone). Původně byla FAZ zóna popsána jako komplex cytoskeletárních struktur, které bočně připevňují bičík k cytoplazmatické membráně. Kromě MTQ zahrnuje FAZ elektrodenzní filamentum (FAZ filamentum), které začíná až v oblasti krčku FP a je orientované rovnoběžně s MTQ. Navíc v zóně přichycení membrány bičíku k cytoplazmatické membráně buňky se vytváří těsné membránové spoje – „desmozomy“ (Vickerman, 1969; Sherwin and Gull, 1989; Höög et al., 2012).

U *T. brucei* prochází MTQ mezerou v límci (viz **obr. 2. 4. 1**) a pokračuje až do oblasti subpelikulárních MT, ke kterým je antiparalelně orientován. V této oblasti je MTQ spojené s částí endoplazmatického retikula. Mezi MTQ a subpelikulárním MT je mezera, ve které je umístěné FAZ filamentum. FAZ filamentum se k MTQ připojuje až v oblasti krčku FP, ale není přichycené k její membráně. V oblasti krčku je také zaznamenán osamocený cytoplazmatický mikrotubul, který leží blízko FAZ filamenta (Lacomble et al.,

2009; Höög et al., 2012).

Dříve byla FAZ zóna přivlastňována pouze trypanozomám *T. brucei*. Podobná struktura však byla objevená a popsána i u *L. mexicana* (viz **obr. 2. 4. 2** dle (Wheeler et al., 2016) a lze proto předpokládat, že se jedná o obecněji rozšířenou mikrostrukturu. Stejně jako v předchozím případě i u leishmanií MTQ vzniká v oblasti bazálního tělíska, těsně přiléhá k membráně FP a prochází mezerou v límci. Nad límcem se k MTQ paralelně připojuje FAZ filamentum. MTQ i FAZ filamentum nepravidelně končí v oblasti krčku (tj. nedostávají se až do oblasti subpelikulárních MT). V oblasti probazálního tělíska leishmaniových promastigotů se navíc tvoří sada MTQ, která je však velmi krátká. V blízkosti FP byly také zaznamenány 3–4 další MT ve dvou skupinách. První skupinu tvoří 1–2 MT orientované souběžně s FP. Druhá skupina 1–2 MT směřuje od FP do cytoplazmy. Pravděpodobně se jedná o MT, které souvisí s lysozomy. V promastigotech leishmanií se nachází trubicovitá struktura s mnoha vakuolami (tzv. MVT), která je lemována MT a vždy se nachází poblíž Golgiho aparátu a FP, kde dochází k endocytóze (Weise et al., 2000; Wheeler et al., 2016).

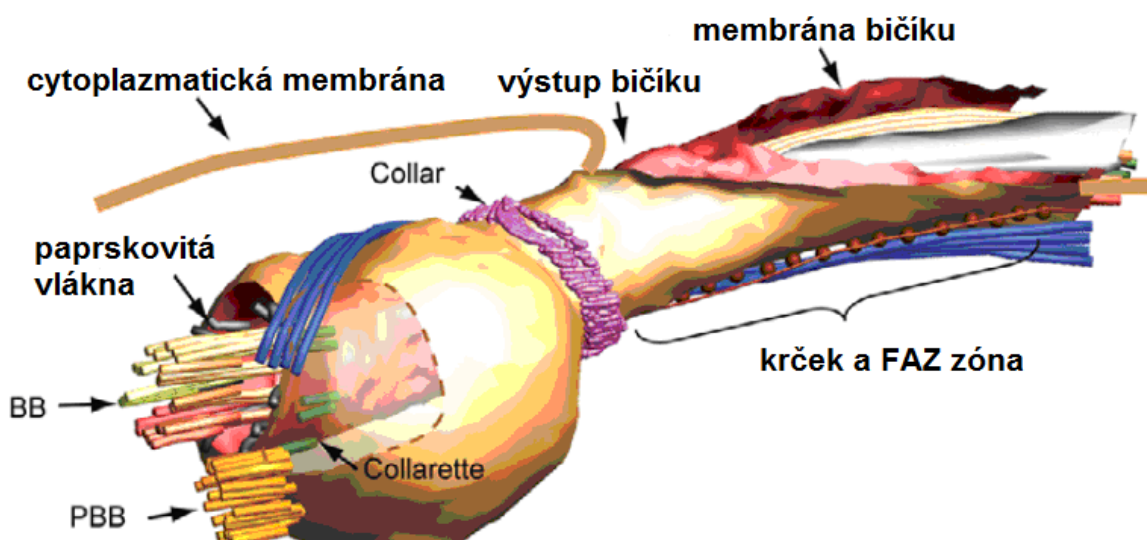
Membránou uzavřené vakuoly (MVB) nebo trubicovité struktury (MVT) plné malých vakuol byly popsány i u dalších druhů trypanosomatid. V distální oblasti FP rejnočí trypanozómy *Trypanosoma rajae* a critidie *C. fasciculata* (viz **obr. 2. 4. 3**) byl definován cytosom-cytofaryngeální komplex. Na jedné straně v blízkosti Golgiho aparátu FP se nachází hluboká membránová invaginace, jejíž počátek je označen jako cytosom. Za ním se nachází cytofarynx, dlouhá membránová struktura vyztužená 5–6 MT, která se orientuje do cytoplazmy. V buňkách critidií byl navíc potvrzen výskyt čtyř dalších mikrotubulů lokalizovaných blízko membrány FP (Preston, 1969; Brooker, 1971a).

Některé druhy trypanosomatid mají vyvinutý cytosom-cytofaryngeální komplex, který tvoří druhá specializovaná invaginace v cytoplazmatické membráně buňky. Tento komplex byl v minulosti zaznamenán již u některých zástupců z řádů Eubodonida a Neobodonida (Moreira, 2004). Dále byl potvrzen i v buňkách *Trypanosoma mega* (Steinert and Novikoff, 1960) a stejná struktura je hlavním místem endocytózy i v epimastigotech *T. cruzi* (Alcantara et al., 2014).

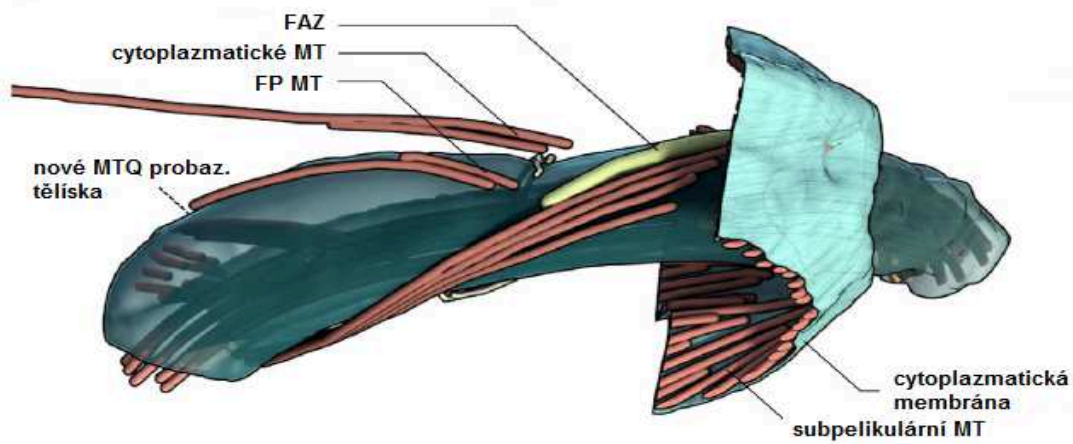
Během přeměny epimastigotů na trypomastigoty u *T. cruzi* komplex mizí. Z vnitřní strany FP vybíhá k cytosomu přes povrch cytoplazmatické membrány speciální elektrodenzní doména, která je označena jako preoral-ridge. V cytoplazmě jsou pozorované dvě sady MT, které doprovází cytofarynx. První soubor čtyř MT vzniká pod membránou FP a pokračuje pod preoral-ridge dál paralelně s cytofarynxem. Druhý soubor

tří MT vybíhá z oblasti pod membránou cytotostomu a stejně jako předchozí prochází podél cytofarynxu. Obě dvě sady vytváří „žlábek“. Jedna strana cytofarynxu je bez MT a nachází se v ní plno malých vakuol. V blízkosti cytofarynxu je umístěn Golgiho aparát a jádro. Další kvartet MT odpovídající MTQ vybíhá z blízkosti bazálního tělíska, spirálně obtáčí membránu FP a končí v oblasti subpelikulárních MT (Alcantara et al., 2014).

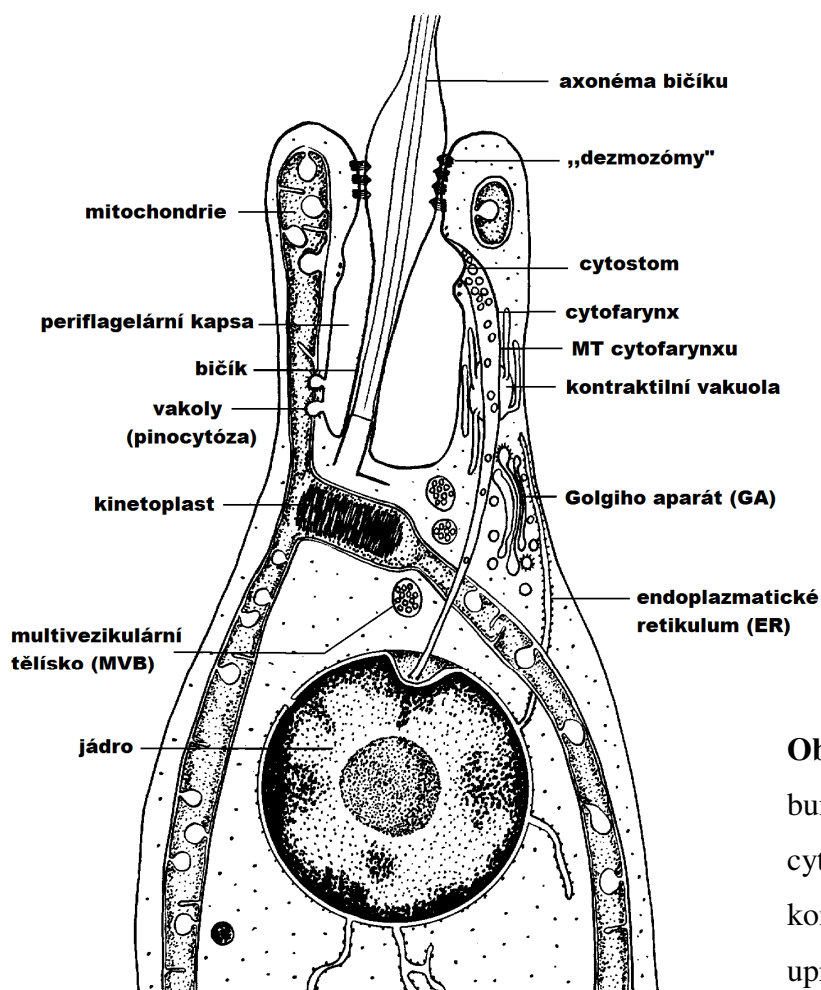
Při analýze buněčných ultrastruktur se v promastigotech nejbazálnějšího zástupce trypanosomatid, rodu *Paratrypanosoma*, prokázala kombinace MTQ FP promastigotů *L. mexicana* s cytotom-cytofaryngeálním komplexem epimastigotů *T. brucei*. V oblasti bazálního tělíska je přítomen MTQ, který stejně jako u leishmáníí obtáčí FP a končí pod jejím horním okrajem. Z krčku FP vybíhá soubor přibližně pěti MT okolo preoral-ridge a podél cytofarynxu pokračují dál do cytoplazmy (Skalický et al., 2017).



**Obr. 2. 4. 1:** Ultrastruktura bičíku a FP trypanosomatidů *T. brucei*: BB – bazální tělísko, PBB – probazální tělísko (Lacomble et al., 2009).



**Obr. 2. 4. 2:** Periflagelární kapsa (FP), FAZ zóna a okolní mikrotubuly – 1–2 MT souběžné s FP a 1–2 MT směřující do cytoplazmy leishmanie *L. mexicana* (Wheeler et al., 2016).



**Obr. 2. 4. 3:** Eukaryotická buňka critidie *C. fasciculata*, cytostom-cytofaryngeální komplex (dle Brooker, 1971a, upraveno).

## 3 MATERIÁL A METODIKA

### 3.1 Švábi

Přítomnost trypanosomatid byly zjišťována u chovaných, synantropních i volně žijících druhů švábů. Ve většině případů bylo nutné odchyťovat synantropní druhy ve večerních hodinách. Naopak u volně žijících druhů švábů odchyťovaných na území ČR byla aktivita nejvyšší odpoledne. Švábi byli ručně odchyťováni do plastových boxů (různé velikosti), které byly následně umístěné do prostoru naší laboratoře. Pro zamezení možné vzájemné kontaminace bylo nutné boxy pravidelně čistit a desinfikovat 70% etanolem. Potřeba opakování desinfekce závisela na druhu (velikosti) švábů, množství jejich trusu, průběhu a rychlosti pitev. Další prevencí před kontaminací bylo umístění velkých švábů do jednoho boxu po 3–4 jedincích, zatímco u menších druhů tvořilo skupinu 5–6 jedinců. Do boxů byl přidán kus filtračního papíru a plastová zkumavka s vodou utěsněná papírovým ubrouskem nebo smotkem vaty. Jako zdroj potravy sloužily ovesné vločky, psí granule, kus jablka nebo chleba. Některé skupiny (populace) byly po negativním vyšetření na přítomnost trypanosomatid využity pro experimentální infekce.

Synantropní druhy švábů byly odchycené v letech 2014 – 2016 převážně z prostorů skleníků a terárií Stanice přírodovědců v Praze (50°04'31.0"N, 14°24'00.4"E). Další synantropní švábi byli získáni z expozice krokodýlů zoologické zahrady v Plzni (49°45'28" N, 13°21'36" E), expozice želv zoologické zahrady v Praze (50°7'0.099"N, 14°24'39.676"E) a prostoru zvířetníku Katedry parazitologie PřF UK v Praze (50°04'20.3"N, 14°25'27.7"E).

V průběhu let 2015 – 2016 probíhaly odchty volně žijících švábů především na území Prahy a to v okolí Divoké Šárky (50°06'28.3"N, 14°20'57.9"E) a Prokopského údolí (50°2'26" N, 14°22'44" E). V první polovině května roku 2016 byly také provedeny odchty na několika místech v Národním parku Podyjí (48°50'41.4"N, 15°55'12.7"E) na Jižní Moravě. Odchyt švábů v NP Podyjí byl umožněn doc. Jitkou Vilímovou z Katedry zoologie v rámci předmětu „Speciální exkurze ze zoologie“ v této oblasti.

Různé chované druhy švábů jsem získala převážně z chovů Katedry zoologie PřF UK od Mgr. Zuzany Kotykové-Varadínové. Další šváby mi poskytli chovatelé Dr. Jana Bulantová, Jiří Hromádka, Břetislav Fidra, Mgr. František Jůna a Dr. Radek Aulický z VÚRV, v.v.i. ČR.

### 3. 1. 1 Druhová determinace odchycených švábů

Dospělci švábů byli na základě morfologických znaků určeni do druhů za odborné pomoci Mgr. Zuzany Kotykové-Varadínové dle klíčů Fauna Slovenska: Blattaria – šváby; Mantodea – modlivky (Vidlička, 2001), Blattaria, Mantodea Orthoptera & Dermaptera: of the Czech and Slovak Republics: České a Slovenské republiky (Kočárek et al., 2005) a zjednodušeného klíče v publikaci Cockroaches: their biology, distribution and control (Cochran and Scheme, 1999).

Kvůli nedostatečným determinačním znakům (např. absence křídel) nymfálních stádií volně žijících švábů bylo nutné izolovat DNA ze stehna (femuru) a následně provést barcodingovou analýzu tří jedinců z příslušné skupiny za použití specifických primerů 12S/16S (dle Djernæs et al., 2015) (podrobněji viz **kap. 3. 4**). Nymfální stádia byla v některých případech také určena podle dospělců, kteří se s nimi nacházeli na stejném místě v odchytové lokalitě.

### 3. 1. 2 Pitvy švábů

Pomůcky a chemikálie:

- skleněné kádinky, skleněné Petriho misky
- laboratorní pinzety – přímé, měkké entomologické a hodinářské
- laboratorní nůžky
- sterilní Pasteurovy pipety, injekční stříkačka (Chirana, insulin 1ml)
- 70% etanol, fyziologický roztok (150 mM NaCl), 100 µl eluční pufr (EB – Roche)
- podložní a krycí skla
- sterilní plastové minizkumavky 1,5 ml (Eppendorf)
- binokulární lupa SZX12, Olympus Optica, Inc.
- světelný mikroskop Olympus CX31

Všichni pitvaní švábi byli určeni do druhu, v případě švábů z chovů byla druhová příslušnost určena příslušným chovatelem. U všech pitvaných jedinců bylo také určeno, zda se jedná o dospělé (♂/♀) nebo nymfální stádium.

Švábi byli usmrceni v kádince naplněné 70% etanolem a opláchnuti fyziologickým roztokem. Poté byly (velké druhy) přeneseny na sterilní Petriho misku nebo (malé druhy) na sterilní podložní sklo do kapky fyziologického roztoku pod binokulární lupou. Nůžkami se opatrně nastříhly okraje zadečkového článku a ostrými hodinářskými pinzetami bylo



vytaženo střevo, které se přeneslo do druhé čisté kapky fyziologického roztoku (viz **obr. 3. 1. 1**). Velké střevo (většinou velkých druhů švábů) bylo nutné předem rozstříhnout a oddělit přední, střední a zadní část. Každá část byla homogenizována pomocí fyziologického roztoku a kapka homogenátu přenesena na podložní sklo. Zbytek střev se přenesl do plastových minizkumavek (Eppendorf) se 100 µl elučního pufru pro pozdější izolaci DNA trypanosomatid. Střevo nebo homogenát byl překryt sterilním krycím sklem a vzniklý preparát byl vyšetřen na přítomnost trypanosomatid pod světelným mikroskopem při fázovém kontrastu a celkovém zvětšení 400x. Po vyšetření preparátu, který byl vytvořen z celého kusu střeva (většinou u malých druhů švábů) bylo nutné přenést minimálně část předního, středního a zadního střeva do 100 µl elučního pufru v plastové minizkumavce. Minizkumavky se střevy v elučním pufru byly uskladněny v -20 °C pro následnou izolaci DNA a specifickou PCR na trypanosomatida.

Pokud byla v preparátu pozorována živá trypanosomatida, bylo nutné přenést homogenát nebo malou část střeva do plastové minizkumavky s 1 ml kultivačního média pomocí injekční stříkačky. Poté byl preparát s buňkami nafixován a obarven (viz níže). Při pozitivním nálezů trypanosomatid v průběhu vyšetření světelnou mikroskopií byly zaznamenány morfotypy buněk pozorovaných trypanosomatid, lokalizace (stomodeum / mezenteron / proktodeum) a síla infekce: slabá infekce do několika buněk (+), střední infekce do stovek buněk (++) a velmi silná infekce tisíců buněk (+++).



**Obr. 3. 1. 1:** Vypitvané střevo ♀ rusce lesního (*Ectobius sylvestris*) s vyznačením jednotlivých částí.

## 3. 2 Izolace a kultivace trypanosomatid

### Pomůcky, chemikálie a kultury:

- sterilní plastové falkony (15ml a 50 ml Corning), plastové minizkumavky (1,5 ml Ependorf), ploché kultivační láhve 25 cm<sup>2</sup> (Corning), ploché kultivační zkumavky „flat tubes“ (7 ml Nunc), U-trubice, mikrotitrační destičky (Greiner), Bürkerova komůrka, ampule CryoTube™ Vials (Nunc), zamrazovací nádoba Cryo 1 °C Freezing Container (Nalgene)
- pipety (10 µl – 50 ml), injekční stříkačky (Chirana)
- filtry Millex-GV Syringe filter unit 22 µl (Millex)
- tekutá média:
  - Brain Heart Infusion BHI (Gibco) + destilovaná voda
  - RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) – médium pro očištění kultury přes U-trubici
  - Kondiciované médium
- 10% fetální kravské sérum (FCS-Sigma-Aldrich, Gibco)
- Hemin 10 mg/ml (rozpuštěno v 0,1M Na OH)
- Amikin (Bristol-Myers Squibb) – 100 mg/ml
- Penicilin 100 000 U/ml
- smrtící (ředící) roztok - 0,85% NaCl + 1% formaldehyd
- Dimetylsulfoxid „DMSO“ (Sigma-Aldrich), tekutý dusík
- kultury buněk OSR-18 a OSR-27 (Doc. V. Yurchenko z Ostravské univerzity)
- inverzní mikroskop (IX, Olympus Optica, Inc)

### 3. 2. 1 Příprava médií a kultur

#### 1. BHI + H + A/P + FCS

Do skleněné nádoby o objemu 200 ml bylo smícháno 3,9 g BHI a 100 ml destilované vody. Směs byla sterilizována autoklávem a po zchlazení byl přidán hemin („H“ – 0,5 ml/100 ml), antibiotikum amikin („A“ – 200 µl/100 ml média) a 10% FCS. Vzhledem k tomu, že kultury OSR-18 a OSR-27 dodané z Ostravské univerzity i nově získávané primokultury ze švábů byly kontaminované bakteriemi aj., bylo zprvu nutné přidat do media i penicilin („P“ – 200 µl/100 ml). Do takto připraveného média byly přeneseny buňky trypanosomatid v případě pozitivního nálezu. V případě kontaminace kvasinkami, plísněmi a bakteriemi byla kultura přečištěna pomocí U-trubice (viz níže) a pravidelně po jednom týdnu

pasážována v poměru 10-100 µl kultury / 1 ml čistého média. Kultury rostly v termostatu při 23 °C.

## 2. Kondiciované médium

Kontaminovaná kultura buněk OSR-18 (později definován druh *H. tarakana* Yurchenko et al., 2016 – viz **příloha č. 1**) byla nejprve přeočkována do ploché kultivační láhve s médiem (BHI + H + A/P + FCS) v poměru 200 µl kultury/ 20 ml média.

Dobře narostlá kultura byla přepipetována do 15ml falkony a centrifugována 5 minut při zrychlení 15 000 x g. Supernatant byl pomocí jehly nasát do injekční stříkačky, poté byla jehla odejmuta a na stříkačku se nasadil filtr (Millex-GV Syringe filter unit 22 µl). Supernatant byl přefiltrován do sterilní 15ml falkony a jako tzv. kondiciované médium uchován v lednici. Výroba tohoto média byla nutná kvůli vytvoření ideálních podmínek pro přípravu axenické a klonální kultury.

### **3. 2. 2 Axenizace kontaminované kultury pomocí U-trubice**

Speciálně tvarovaná zkumavka (U-trubice) byla do poloviny v obou ramenech naplněná médiem RPMI-1640. Do jednoho ramene bylo velmi opatrně přidáno malé množství kontaminované kultury, poté se obě ramena uzavřela víčky a U-trubice se umístila do termostatu (23 °C). Druhý den byla zjišťována přítomnost buněk v opačném rameni. Při úspěšném pokusu byly pipetou odebrány buňky cca 1 cm pod hladinou a přeočkovány do ploché kultivační zkumavky („flat tubes“), ve které byl 1 ml kondiciovaného média. Po jednom týdnu byla axenická kultura pravidelně kontrolována pod inverzním mikroskopem a přeočkovávána do standardního média (BHI + H + A + FCS<sup>4</sup>).

### **3. 2. 4 Příprava klonální/semiklonální axenické kultury**

Pro vytvoření klonální kultury byla provedena izolace metodou mezního ředění dle laboratorního protokolu. Ve stručnosti byla nejprve odebrána axenická kultura do plastové minizkumavky. Část byla odebrána pro izolaci DNA, PCR a sekvenaci. Zbytek byl využit pro spočítání buněk v Bürkerově komůrce. Po zjištění koncentrace buněk (na 1 ml kultury) se axenické inokulum naředilo do konečné koncentrace tak, aby ve 25 ml kondiciovaného

---

<sup>4</sup> Vzhledem k tomu, že kultura byly zbavena kontaminace, nebylo potřeba dále přidávat do media penicilín.

média bylo  $\pm 10$  buněk trypanosomatid. Ředěnou suspenzí pak byla po 250  $\mu$ l naplněna každá jamka sterilní mikrotitrační destičky. Po čtyřech dnech byla zkontrolována přítomnost buněk v jamkách pod inverzním mikroskopem. Pozitivní jamka byla vyočkována do 1 ml kondiciovaného média. V logaritmické fázi růstu se kultura přeočkovala a zároveň byla odebrána část na další izolaci DNA.

Semiklonální kultura byla vytvořena desítkovou ředící řadou na mikrotitrační destičce. Opět bylo použito kondiciované médium pro větší úspěch izolace a namnožení buněk. Poté se pokračovalo stejně jako v předchozím pokusu.

Klonální (příp. semiklonální) kultura byla pravidelně po jednom týdnu pasážována. Namnožená kultura byla v exponenciální fázi růstu odebrána pro izolaci totální DNA, zhotovení roztěrů, elektronovou mikroskopii a experimentální infekce.

### **3. 2. 3 Detekce růstu buněk v čase**

Pro stanovení exponenciální fáze růstu buněk byla každý den v průběhu jednoho týdne odebrána část rostoucí kultury. Koncentrace buněk (na 1 ml média) byla počítána v Bürkerově komůrce (při ředění 10 až 100 $\times$ ). Po vytvoření klonální/semiklonální kultury byly zároveň při každém počítání vytvořeny tři roztěry, které byly obarvené Giemsou (viz níže) pro analýzu morfotypů buněk. Naměřené hodnoty (pro dva nezávislé pokusy) byly analyzovány a graficky vyhodnoceny pomocí programu Statistica 5.1.

### **3. 2. 5 Kryoprezervace kultur**

Pro uskladnění kultury v kryobance Katedry parazitologie PřF UK byl k buňkám přidán dimethylsulfoxid (výsledná koncentrace 5 a 10 %). Směs se rozpipetovala do zamrazovacích ampulí CryoTube<sup>TM</sup> Vials, které se umístily do zamrazovací nádoby Cryo 1 °C Freezing Container. Zamrazovací nádoba byla vložena na 24 hodin do  $-70$  °C a poté byly ampule přemístěné do tekutého dusíku ( $-196$  °C).

### 3. 3 Světelná a elektronová mikroskopie

#### 3. 3. 1 Barvení buněk roztokem Giemsa-Romanowsky

##### Chemikálie a pomůcky:

- fyziologický roztok, smrtící roztok - 0,85% NaCl + 1% formaldehyd
- odmaštěná podložní skla, mikrozkušavky (1,5 ml Eppendorf)
- Poly-L-lysin (Sigma-Aldrich)
- podložní skla Superfrost (Thermo Scientific)
- Methanol (Lach-Ner)
- Giemsa stain (Sigma-Aldrich) + destilovaná voda (ředěno 20x)
- imerzní olej
- světelný mikroskop Olympus CX31, Olympus BX51 se zabudovanou CCD kamerou DP-72

Buňky z kultury byly odpipetovány do mikrozkušavky a přibližně deset minut ponechány ve svislé poloze, případně stočeny centrifugou. Pelet buněk byl pomalým tahem pipety dvakrát promyt fyziologickým roztokem. Třetí možností bylo buňky naředit smrtícím roztokem, jemným tahem pipety promíchat a nanést na podložní sklo. Na odmaštěné podložní sklo byla napipetována kapka Poly-L-lysinu a druhým podložním sklem byl proveden pod úhlem 45° roztěr po celé délce. Po zaschnutí byly stejným způsobem rozetřeny i buňky trypanosomatid. Případně byla kapka buněk přenesena rovnou na podložní sklo Superfrost. Pokud byl preparát vytvořen z vypitvaného střeva byl roztěr proveden na stejném podložním skle, na kterém bylo střevo vyšetřováno pod mikroskopem. Preparát se nechal zaschnout, poté se nafiloval metanolem (5 min) a po dalším sušení byl obarven připraveným roztokem Giemsa-Romanowsky (25 min). Po obarvení byl preparát opláchnut destilovanou vodou. Kvalita obarvených preparátů pro focení a měření buněk byla zkontrolována pod světelným mikroskopem Olympus CX31.

##### 3. 3. 1. 1 Měření buněk a stanovení morfotypů

Giemsou obarvené preparáty byly prohlédnuty pod světelným mikroskopem Olympus BX51 za použití imerzního oleje a celkového zvětšení 1000×. Preparáty vytvořené roztěrem střev i roztěrem kultury byly porovnané z hlediska morfotypů buněk. Morfotypy buněk byly určovány pomocí definic z předešlých studií (viz **kap. 2. 1**). U morfotypů se

porovnávala pozice jádra, kinetoplastu, periflagelární kapsy a délka bičíku. V případě preparátů zhotovených roztěrem kultury bylo analyzováno a nafoceno 54 buněk, u kterých se zaznamenal morfortyp, celková délka a šířka buňky, délka bičíku, vzdálenost kinetoplastu od jádra a vzdálenost kinetoplastu i jádra od anteriorního konce buňky. Snímky buněk i měření bylo provedeno pomocí CCD kamery DP-72 a programu QuickPhoto Micro 3.0 (Olympus). Naměřené hodnoty, jako rozdíly v šířce a délce buněk, jejich vzájemný poměr a délka bičíku, byly analyzovány a graficky vyhodnoceny metodou ANOVA (Statistica 5.1).

Pro určení morfortypů buněk *H. tarakana* byly zhotoveny preparáty roztěrem kultury, která byla odebraná pátý den po přeočkování a vzniklé preparáty byly obarvené giemsou (viz **kap. 3. 3. 1**). Pro porovnání, zda jsou morfortypy odlišné v hostiteli byly v rámci experimentálních infekcí vždy po pitvách také obarveny roztěry střev.

### **3. 3. 2 Barvení buněk fluorescenčním barvivem DAPI**

Buňky z kultury byly dvakrát promyty ve fyziologickém roztoku, resuspendovány v menším objemu fyziologického roztoku, kápnuty na odmaštěné podložní sklo a byl zhotoven roztěr. Po zaschnutí a nafixování metanolem (viz výše) bylo na buňky nanášeno 20  $\mu$ l montovacího média VECTASHIELD s fluorochromem DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol). Médium bylo zakryto krycím sklem a jeho okraje se orámovaly lakem na nehty. Snímky buněk byly provedeny pomocí CCD DP-71 kamery připevněné ke světelnému mikroskopu Olympus BX51 a programu QuickPhoto Micro 3.0 (Olympus).

### **3. 3. 3 Příprava buněk pro vyšetření transmisním elektronovým mikroskopem (TEM)**

#### 1. Chemická fixace

Výhodou chemické fixace je stabilizace, imobilizace a okamžité zafixování bílkovin. Chemická fixace byla provedená v Biologickém centru AV ČR v Českých Budějovicích v laboratoři Ing. J. Nebesářové. Stočený pelet buněk byl fixován 24 hodin při teplotě 4 °C v 2,5% glutaraldehydu, který byl naředěn 0,1 M kakodylátovým pufrům (pH 7,2) a následně postfixován 2 hodiny ve 2% OsO<sub>4</sub> naředěném stejným pufrům. Nafixovaný vzorek byl odvodněn vzestupnou acetonovou řadou. Dehydratované vzorky byly zality do pryskyřice Poly/Bed 812/Araldite 502 naředěné 100% acetonem a poté převedeny do čisté pryskyřice. Vzniklé bločky byly nařezány v laboratoři elektronové mikroskopie PřF UK na ultramikrotonu Ultracut E (Reichert-Jung) a sítě se vzorky kontrastovány octanem

uranylu a citrátem olovnatým.

## 2. Mrazová substituce (FS)

Při kryometodách je velkou výhodou skutečnost, že preparát zůstává zachován co nejlíže nativnímu stavu. Naše vzorky byly rychle zamrazeny metodou vysokotlakého zamrazování (HPF) přístrojem High Pressure Freezer EM PACT2 (Leica Microsystems) v Biologickém centru AV ČR v Českých Budějovicích. Po centrifugaci byl pelet buněk smíchán s 20% hovězím sérovým albuminem (BSA), centrifugován a malá kapka buněk byla zamrazena pomocí rychlého přenosného systému (RTS) s tekutým dusíkem v HPF přístroji. Po zamrazení byl vzorek převeden do předem zmrazeného ( $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) substitučního média (2%  $\text{OsO}_4$  rozpuštěném ve 100% acetonu). Následně dle laboratorního protokolu došlo k pozvolnému vícekrokovému zvyšování teploty. Vzorky byly promyty acetonem a směsí acetonu s pryskyřicí stejně jako při chemické fixaci a další postup byl podobný jako v předchozí metodě. Pro podrobnější analýzu periflagelární kapsy bylo provedeno několik sériově nakrájených řezů. Vzdálenost mezi jednotlivými řezy, které byly následně pokládány za sebou na síťku činila  $\pm 75\text{ nm}$ .

Preparáty vytvořené oběma metodami byly prohlédnuty a nafoceny transmisním elektronovým mikroskopem TEM JEOL JEM-1011 s CCD kamerou Valeta a akvizčním softwarem iTEM 5. 1. (Olympus Soft Imaging Soution GmbH). Při analýze ultrastruktury buněk jsem se zaměřila zejména na bičík, periflagelární kapsu, okolní mikrotubuly, „desmozómy“ a kinetoplast. Kinetoplasty buněk (28 pro každou metodu) byly změřeny v šířce a výšce. Naměřené hodnoty (zejména výška) byly analyzovány a graficky vyhodnoceny metodou ANOVA (Statistica 5.1). Výsledná šířka kinetoplastů byla hodnocena pouze přibližně, protože se většinou nepodaří pozorovat (a tedy i změřit) kinetoplast v celé šířce (část se dostane mimo rovinu řezu).

## **3. 4 Molekulární analýzy**

### **3. 4. 1 Izolace DNA**

#### Pomůcky a chemikálie:

- sterilní plastové písty, sterilní plastové minizkumavky (Eppendorf 1,5 ml), skalpel
- fyziologický roztok
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)

- Quick DNA™ MicroPrep (Zymo Research)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich)

#### Izolace DNA švábů

Pro barcodingovou analýzu nymfálních stádií švábů bylo v průběhu pitvy odděleno stehno (femur), které se až do dalšího zpracování uchovalo v plastové minizkumavce se 100 µl elučního pufru při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po rozmrazení bylo stehno nařezáno očištěným skalpelem a přeneseno zpět do minizkumavky, do které se přidalo 200 µl lyzačního pufru a 40 µl proteinázy K. Výsledná směs byla homogenizována sterilním plastovým pístem a inkubována při  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu tří hodin. Další postup navázal na běžný protokol, který je součástí kitu High Pure PCR Template Preparation Kit. Celková DNA byla elulována do 100 µl elučního pufru. U nymfálních stádií švábů pocházejících z jedné lokality byla izolována DNA vždy minimálně ze tří jedinců.

#### Izolace DNA trypanosomatid

Totální DNA byla izolována ze střeva švábů (tzv. environmentální (ENVI) vzorky) nebo z buněk trypanosomatid z kultury. Střevo švábů bylo standardně uchováno ve 100 µl elučního pufru (v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a po rozmrazení byla izolace provedena dle protokolu poskytnutého výrobcem kitu High Pure PCR Template Preparation Kit. Kultura buněk byla nejprve dvakrát resuspendována ve fyziologickém roztoku po centrifugaci a poté se pokračovalo dle stejného návodu. Celková DNA byla elulována do 100 µl elučního pufru. V případě, že bylo DNA ve vzorku málo (např. slabá infekce spatřená při pitvě) bylo k buňkám střeva přidáno 40 µl proteinázy K (z kitu Roche) a dále se postupovalo dle návodu, který je součástí kitu Quick DNA™ MicroPrep. Celková DNA při izolaci z malého množství byla elulována do 15 µl elučního pufru.

### **3. 4. 2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

#### Pomůcky a chemikálie:

- Combi PPP Master mix (Top-Bio), PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio)
- templátová DNA
- specifické primery (viz **tab. 3. 4. 2. 2**)
- PCR cycler s teplotními cykly (viz **tab. 3. 4. 2. 3**)



**Tabulka 3. 4. 2. 1:** Složení amplifikační reakce do objemu 25  $\mu$ l

Master mix	12,0 $\mu$ l
PCR H <sub>2</sub> O	10,0 $\mu$ l
vzorek DNA	1,0 $\mu$ l
primer F (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
primer R (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l

Standardní PCR byla použita pro barcodingovou analýzu nymfálních stádií švábů, při které byl amplifikován gen pro mitochondriální **12S** a **16S rRNA** s použitím specifických primerů 12S–F/R + 16S–F/R (dle Djernæs et al., 2015)

U všech izolátů byl pro detekci trypanosomatid (kinetoplastid) amplifikován a sekvenován gen pro malou ribozomální podjednotku (**SSU rRNA** neboli **18S rRNA**). Sekvence pro SSU rRNA z environmentálních vzorků byla získána prostřednictvím vícenásobné (tzv. nested) PCR, která umožní zachytit i velmi malé množství templátové DNA trypanosomatid. V prvním amplifikačním kroku byla DNA amplifikována vnějšími primery S763 + S762 (dle Maslov et al., 1996). Vzniklý produkt je templátem pro druhý amplifikační krok, ve kterém jsou použity vnitřní primery TrN–F2 + TrN–R2 (dle Votýpka et al., 2015).

V případě DNA izolované z kultury buněk byly pro amplifikaci SSU rRNA použity kinetoplastidové specifické primery S763 + S762 nebo univerzální eukaryotické primery Medlin-A + Medlin-B (dle Medlin et al., 1988). U kultivovatelných izolátů byl u trypanosomatid amplifikován gen pro **glykosomální glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (gGAPDH)** pomocí specifických primerů GAPDH-Y–F + GAPDH-Y–R (dle Yurchenko et al., 2006) nebo M200 + M201 (dle Yurchenko et al., 2009).

Pro jemnější rozlišení mezi jednotlivými druhy/populacemi trypanosomatid nebo v rámci popisu nového druhu byl u izolátů z kultury i některých environmentálních vzorků amplifikován gen pro **,spliced leader (SL) RNA**. Amplifikace genu pro SL RNA byla provedena s použitím primerů M167 + M168 (dle Westenberger et al., 2004) nebo ME1 + ME2 (dle Podlipaev et al., 2004) před AT zaklonováním do kompetentních buněk *Escherichia coli*, které bylo nutné pro získání výsledné sekvence vzhledem k přítomnosti dlouhé polyA oblasti v semikonzervativní části sledovaného genu (viz **kap. 3. 4. 5**).

**Tabulka 3. 4. 2. 2:** Přehled použitých primerů pro PCR

Gen	Primer	Orientace primeru	Sekvence primeru 5'→ 3'
12S rRNA	12S-F	forward	ACTATGTTACGACTTATCTC
	12S-R	reverse	AAACTAGGATTAGATACCC
16S rRNA	16S-F	forward	CGCCTGTTTAAACAAAAACAT
	16S-R	reverse	TTTAATCCAACATCGAGG
SSU rRNA	Medlin A	forward	CTGGTTGATCCTGCCAG
	Medlin B	reverse	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC
	S763	forward	CATATGCTTGTTTCAAGGAC
	S762	reverse	GACTTTTGCTTCCTCTAWTG
	TrN-F2	forward	GARTCTGCGCATGGCTCATTACATCAGA
	TrN-R2	reverse	CRCAGTTTGATGAGCTGCGCCT
gGAPDH	Y-F	forward	aga gga tccATGGCTCCGMTCAAGGTTGGC
	Y-R	reverse	aga gga tccTTACATCTTCGAGCTCGCGSSGTC
	M200	forward	ATGGCTCCVVTCAARGTWGGMAT
	M201	reverse	TAKCCCCACTCRTRTRCRTCACCA
SL RNA	M167	forward	GGGAAGCTTCTGTACTWTATTGGTA
	M168	reverse	GGGAATTCAATAAAGTACAGAAACTG
	ME1	forward	TTCTGTACTTTATTGGTA
	ME2	reverse	CAATAAAGTACAGAAACTG

**Tabulka 3. 4. 2. 3:** Přehled teplotních cyklů pro amplifikaci

Kombinace primerů	Počet opakování	Teplota (°C)	Čas (min)
Barcoding švábů 12S-F/R 16S-F/R	1	95	1:00
	35	95	1:00
		48	1:00
		72	1:30
	1	72	7:00
SSU (izolát z kultury) Medlin A/B	1	94	5:00
	40	94	1:00
		55	1:30
		72	1:30
	1	72	5:00
SSU S763/763	1	94	1:00
	40	94	1:00
		45	1:30
		72	1:30
	1	72	5:00
SSU TrN-F2/R2	1	94	5:00
	35	94	1:00

		64	1:30
		72	1:30
	1	72	5:00
<b>gGAPDH M200 + M201 Y-F + Y-R</b>	1	94	3:00
	32	94	1:00
		55	0:30
	72	1:30	
1	72	5:00	
<b>SL (izolát z kultury) M167/M168, ME1/ME2</b>	1	95	4:30
	32	95	0:30
		42	1:00
		65	2:30
	1	95	0:30
		50	1:00
		72	2:30
		50	1:00
72	5:00		
<b>SL (ENVI izolát) M167/M168, ME1/ME2</b>	1	94	4:00
	4	94	0:30
		42	1:00
		65	2:30
	45	94	0:30
		50	1:00
		72	2:30
	1	50	1:00
1	72	10:00	

### 3. 4. 3 Horizontální elektroforéza a izolace PCR produktu

#### Pomůcky a chemikálie:

- PCR produkt
- agaróza (Invitrogen Ltd.)
- TAE pufr (AppliChem GmbH)
- SybrSafe DNA gel stain (Invitrogen Ltd.)
- GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas life science)
- sterilní skalpel a sterilní plastové minizkumavky (Eppendorf 1,5 ml)
- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich)
- PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio, s.r.o.)

Produkt získaný polymerázovou řetězovou reakcí byl analyzován pomocí horizontální elektroforézy na 1% agarózovém gelu vytvořeném smícháním agarózy a TAE pufru. Směs byla po rozpuštění varem mírně zchlazena a poté se přidalo interkalační barvivo SybrSafe, které později zajistilo zviditelnění DNA pod UV světlem. Na gel byl před aplikací vzorků nanesen marker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus pro odečtení velikosti PCR produktu. Po dokončení elektroforézy byly gely se vzorky zdokumentované fotograficky.

Pokud byl na gel nanesen celý objem vzorku nebo elektroforéza prokázala přítomnost dvou produktů ve stejném vzorku, vzniklé pruhy (bandy) byly vyřezány sterilním skalpelem pod UV světlem. Vzorky umístěné do sterilní minizkumavky byly zváženy a poté z nich byla izolována DNA. Druhou možností bylo nanést na horizontální elektroforézu menší objem vzorku a zbytek PCR produktu byl využit pro izolaci DNA. V obou dvou případech se postupovala dle návodu, který je součástí purifikačního kitu High Pure PCR Product Purification Kit.

#### **3. 4. 4 Sekvence a vyhodnocení sekvencí**

Izolovaná DNA z PCR produktu byla sekvenována pomocí amplifikačních primerů (pro nested PCR se jednalo o vnitřní primery) viz **tab. 3. 4. 2. 2** a v případě SSU (délka produktu cca 2kb) byly použity i další vnitřní primery (viz **tab. 3. 4. 4. 1**). Všechny primery byly v koncentraci 3,2 pmol/μl. Sekvenační směs byla připravená z 6,5 μl DNA s 1,5 μl primeru a poté byla poslána do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK. Pokud výsledná sekvence nevyšla dobře, byl do laboratoře zaslán PCR produkt s primery zvlášť a směs byla namíchána pracovníky příslušného pracoviště.

Výsledná sekvence ve formě fluorescenčních křivek byla zkontrolována a upravena v programu BioEdit, do kterého byl integrován algoritmus Clustal (případně sekvence zkontroloval a opravil můj školitel v programu Genious). Upravená sekvence byla uložena ve formátu FASTA a pomocí algoritmu BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) byla porovnána s dostupnými sekvencemi.<sup>5</sup>

---

<sup>5</sup> Fylogenetické analýzy sekvencí SSU, GAPDH a SL genů z isolátů poskytnutých Dr. V. Yurchenkem byly provedené mým školitelem Doc. Votýpkou.

**Tabulka 3. 4. 4. 1:** Vnitřní primery používané k sekvenaci SSU

Název primeru	Orientace primeru	Sekvence 5'→ 3'
1000 F	forward	AGACGAACTACAGCGAAGGCAT
1000 R	reverse	ATGCCTTCGCTGTAGTTCGTCT
1510 F	forward	CAGGTCTGTGAYGCTG
1510 R	reverse	CAGCRTACACAGACCTG
577 F	forward	GCCAGCACCCGCGGT
577R	reverse	ACCGCGGGTGCTGGC

### 3. 4. 5 AT klonování pomocí pGEM–T–easy vector system

#### Pomůcky a chemikálie:

- vstupní DNA izolována z gelu (PCR produkt)
- Combi PPP Master Mix (Top-Bio), PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio)
- primery ME167/168, ME1/ME2, pGEM SP6/T7
- Luria-Bertani broth (LB) (Sigma-Aldrich) + destilovaná voda
- Bacto™ Agar (Chemos) + destilovaná voda
- pGEM – T Easy Vector System, T4 ligáza, (Promega)
- kompetenční buňky *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen Ltd.)
- Ampicilin (Labmark)
- Isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) (Fermentas Life Science)
- Bromo-chloro-indolyl-galaktopyranosid (X-Gal) (Fermentas Life Science)
- Pure Yield™ Plasmid Miniprep System (Promega)
- sterilní minizkumavky (Eppendorf 1,5 ml), sterilní falkony (Sigma, 15 ml), bakteriální klička

Proces klonování je rozdělen do několika dní. Před začátkem celého procesu bylo nejprve připravené LB médium smícháním 20 g sypkého LB s 1 l destilované vody, po sterilizaci autoklávkem (120 °C) a shlazení bylo médium skladováno v lednici při 4 °C. Předem se připravily také agarové plotny smícháním 20 g sypkého LB s 15 g sypkého BactoAgaru a 1 l destilované vody. Takto připravené horké médium bylo ihned po sterilizaci ve sterilním flowboxu rozplněno po 15 ml do sterilních Petriho misek a 20 minut se nechalo tuhnout s odklopeným víčkem. Po ztuhnutí a zavíčkování se plotny obalily parafilmem a dnem vzhůru se uskladnily v lednici (4 °C).

1. den: Izolovaná DNA z kultury nebo ENVI vzorků byla amplifikována specifickými

primery (M167/M168 nebo ME1/ME2). Poté byla provedená PCR, horizontální elektroforéza a jednotlivé proužky (bandy) byly z gelu extrahovány. Po izolaci DNA z gelu byla změřena její molární koncentrace na spektrofotometru (NanoDropu ND-1 000). Následně se připravila ligační směs, která se nechala ligovat přes noc v lednici (4 °C). Ligační směs (viz **tab. 3. 4. 5. 1**) tvořily pGEM plasmidy otevřené restriktázou EcoRV (GAT/ATC), T4 ligáza, ligační pufr a fragmenty DNA pro zaklonování.

**Tabulka 3. 4. 5. 1:** Složení ligační směsi v případě nízké/dostatečné koncentrace PCR produktu

Nízká koncentrace	Ligační pufr	5 µl
	pGEM plasmidy	1 µl
	PCR produkt	3 µl
	T4 ligáza	1 µl
Dostatečná koncentrace	Ligační pufr	5 µl
	pGEM plasmidy	1 µl
	PCR produkt	1 µl
	T4 ligáza	1 µl
	PCR H <sub>2</sub> O	2 µl

2. den: Na ledu bylo ke 100 µl kompetenčních buněk *E. coli* přidáno 10 µl ligační směsi, po dvaceti minutách se minizkumavky přenesly z ledu na termoblok (42 °C), kde se nechala směs buněk s plasmidy 45 sekund „šokovat“ a poté se vrátily na led. Následně (mimo led) byla každá minizkumavka doplněna 1 ml LB média a umístěná na třepačku (90 minut, 37 °C, 220 rpm). Během této doby byla na každou plotnu nanесena sterilní bakteriální kličkou směs ampicilinu (25 µl), IPTG (100 µl) a XGALu (20 µl). Poté se stejným způsobem na takto připravenou plotnu nanесlo 100 µl narostlých buněk a plotny se uložily dnem vzhůru do termostatu (37 °C) do dalšího dne.

3. den: Nejprve se ve sterilním flowboxu pipetoval 1 ml LB média do 15 ml falkon nebo 1,5 ml minizkumavek. Z každé plotny se sterilní špičkou (10 µl) vypíchlо 5 bílých kolonií (tj. kolonií s vloženým produktem), každá kolonie se přenesla do sterilní minizkumavky s 10 µl PCR H<sub>2</sub>O. Z resuspendované směsi se 2 µl přenesly do LB média. Minizkumavky byly vloženy do cycleru s programem LIKV (viz **tab. 3. 4. 5. 3**), při kterém došlo k degradaci buněčných stěn, DNA-áz a uvolnění DNA. Mezitím byl smíchán master mix, PCR H<sub>2</sub>O, specifické primery (ME1+ME2, M167+168 nebo SP6+T7) a po skončení cyklu se přidala DNA (viz **tab. 3. 4. 5. 4**). Po amplifikační reakci a horizontální elektroforéze se vybraly dva klony z každého vzorku, které se přenesly z LB média (4 µl) do nové 15 ml

falkony s čistým LM médiem (4 ml) a ampicilinem (4 µl). Falkony se do druhého dne nechaly v třepačce.

**4. den:** Z narostlých buněk se izoloval plazmid dle návodu, který byl součástí kitu Pure Yield™ Plasmid Miniprep System (Promega), množství DNA v PCR produktu se změřilo na spektrofotometru. Namíchaná sekvenační směs s primery SP6/T7 (**tab. 3. 4. 5. 2**) se odeslala do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK.

**Tabulka 3. 4. 5. 2:** Primery SP6/T7 použité pro amplifikaci/sekvenaci

pGEM	SP6	forward	TATTTAGGTGACACTATAG
	T7	reverse	TAATACGACTCACTATAGGG

**Tabulka 3. 4. 5. 3:** Teplotní cyklus LIKV směsi

Teplota (°C)	Čas (min)
96	5:00
50	1:50
96	1:50
45	1:00
96	1:00
40	1:00

**Tabulka 3. 4. 5. 4:** Složení reakční

Master mix	7,0 µl
PCR H <sub>2</sub> O	5,0 µl
vzorek DNA	1,0 µl
primer F (10 pmol/ µl)	0,5 µl
primer R (10 pmol/ µl)	0,5 µl

### 3. 5 Experimentální infekce švábů

Pro stanovení hostitelské specifity jednohostitelského trypanosomatida druhu *Herpetomonas tarakana* (kmen OSR-18 izolovaný z rusce laponského (*Ectobius lapponicus*) Doc. V. Yurchenkem) byly provedeny experimentální infekce synantropních, volně žijících i chovaných švábů prostřednictvím potravy. Nejprve byla část švábů z dané skupiny vypitvána pro potvrzení absence přirozené infekce. Švábi byli umístěni do sterilních boxů po 3–6 jedincích a byla jim odebrána voda i potrava. Doba vyhladovění trvala 5–12 dní (záviselo na druhu a velikosti jedinců). Švábi byli v průběhu hladovění každý den kontrolováni. V případě zaznamenaného úhynu bylo ihned přistoupeno k infekci zbylých jedinců. Dobře narostlá kultura herpetomonád se nechala nasáknout do drobných kousků usušeného konzumního chleba a následně byla podána vyhladovělým švábům na malých Petriho miskách. Po 30–60 minutách byla infikovaná potrava švábům odebrána a pod mikroskopem byla zkontrolována životaschopnost herpetomonád. V následujících

dnech byly chovné boxy s infikovanými šváby opakovaně čištěny a desinfikovány, aby nedocházelo k případným reinfekcím v důsledku požívání trusu, který by mohl obsahovat vyloučená stádia parazitů. Kontroly infikovaných švábů byly prováděné první (1DPI<sup>6</sup>) a sedmý den (7DPI) odebráním trusu (v případě volně žijících druhů bylo nutné provést pitvu střev několika jedinců), který byl následně vyšetřen světelnou mikroskopií. Poslední čtrnáctý den (14DPI), byli švábi usmrceni a bylo jim vypitváno střevo. Střevo byla vyšetřena světelnou mikroskopií, a rovněž pomocí specifické nested PCR (viz výše). V případě prvních třech experimentálních infekcí, při kterých ještě nebyla zavedena standardní metoda PCR byla střevo vyšetřeno pouze světelnou mikroskopií (resp. výsledky nebyly potvrzené pomocí PCR).

---

<sup>6</sup> DPI: Den/Dní Po Infekci



## 4 VÝSLEDKY

### 4. 1 Parazitologické vyšetření švábů

Pro zjištění přítomnosti trypanosomatid ve švábech bylo v průběhu tří let získáno a vypitváno celkem 510 jedinců. Získaní švábi zařazení celkem do čtyř čeledí, 26 rodů a 36 druhů byli rozděleni do tří kategorií (chovaní, synantropní a volně žijící, viz **tab. 4. 1. 1**). U pozitivních nálezů byla druhová determinace parazitů provedena na základě srovnání získaných sekvencí SSU s dostupnými sekvencemi v databázích.

Z první kategorie (**chované druhy**) bylo vyšetřeno 179 (84 ♀♀, 71 ♂♂, 24 nymf) jedinců, kteří byli získáni z šesti různých chovů. U sedmi druhů z chovu Katedry zoologie PřF UK a dvou druhů z chovu Jiřího Hromádky byl zjištěn původ a rok založení (viz **tab. 4. 1. 1**). Žádný z chovaných švábů nebyl infikován trypanosomatidy, pouze u jednoho dospělého jedince ♀ rusa domácího (*Blattella germanica*, Ectobiidae) z chovu Katedry zoologie PřF UK byla získána SSU sekvence kinetoplastida blíže neurčeného druhu rodu *Bodo* (Metakinetoplastina; Eubodonida).

Druhá kategorie (**synantropní druhy**) čítala celkem 104 (40 ♀♀, 53 ♂♂, 11 nymf) jedinců, kteří byli odchyceni v letech 2014 až 2016 ze skleníků a terárií Stanice přírodovědců v Praze, expozice želv zoologické zahrady v Praze, expozice krokodýlů zoologické zahrady v Plzni a prostorů zvířetníku Katedry parazitologie. V žádném druhu z této kategorie nebyla potvrzena infekce trypanosomatidy. Ze dvou samic švába amerického (*Periplaneta americana*, Blattidae) odchyceného na Stanici přírodovědců byla získána sekvence SSU, která se z 98 % shodovala s druhem *Dimastigella trypaniformis* (Metakinetoplastina; Neobodonida) a jedná se tedy pravděpodobně o blízce příbuzný druh či o geneticky odlišnou populaci v rámci tohoto druhu.

Třetí kategorii tvořily **volně žijící druhy** odchytávané od začátku května do konce září/října v průběhu let 2015 až 2016 na území České republiky. Pro odchyt dospělců byla nejvhodnější druhá polovina května až konec července. Nymfální stádia byla odchycená počátkem května nebo v září/říjnu.

V letech 2015–2016 bylo získáno celkem 117 jedinců ze dvou lokalit v okolí Divoké Šárky a Prokopského údolí. Na jedné lokalitě v okolí Divoké Šárky bylo odchyceno 88 švábů náležících do dvou druhů: 4 ♀♀ + 1 ♂ rusce laponského (*Ectobius lapponicus*) a 28 ♀♀ + 22 ♂♂ + 33 nymf rusce lesního (*E. sylvestris*) (Ectobiidae). Ve

střevě jedné ♀ a dvou ♂♂ rusce lesního byla při vyšetření světelnou mikroskopií nalezena slabá infekce (+) v proktodeu, ale následná PCR byla negativní a infekce tedy nebyla potvrzena. Ve středním a zadním střevě třech dalších jedinců nymfálního stádia rusce lesního byla při mikroskopickém vyšetření zachycena slabá infekce (+). Po izolaci DNA ze střev těchto tří jedinců a amplifikaci genu pro SSU rRNA byly získány sekvence. Identické sekvence z prvních dvou jedinců byly z 99 % identické s druhem *Dimastigella trypaniformis* (Metakinetoplastina; Neobodonida), sekvence z třetího jedince měla shodu s rodem *Dimastigella* pouze z 89 %.

V okolí Prokopského údolí bylo na jedné lokalitě odchyceno 29 jedinců (6 ♀♀, 4 ♂♂, 19 nymf) rusce plamatého (*Phyllostroma maculata*, Ectobiidae). Při mikroskopickém vyšetření střev nebyla u žádného dospělého prokázána přítomnost trypanosomatid. Naopak v jednom jedinci nymfálního stádia byla potvrzená přítomnost trypanosomatida, který byl na základě sekvence SSU určen do druhu *Crithidia fasciculata*.

V roce 2015 také bylo odchyceno sedm nymfálních stádií rusce lesního z okolí terénní stanice Ruda (Veselí nad Lužnicí) náležící PřF UK. Žádný jedinec však nebyl infikován. Dalších sedm dospělců (4 ♀♀, 3 ♂♂) rusce plamatého bylo odchyceno mým školitelem u Mikulova (Jižní Morava). Ve čtyřech jedincích (3 ♀♀ a 1 ♂) byla při mikroskopickém vyšetření potvrzená středně silná infekce (++) trypanosomatidy v zadním střevě. Po osekvenování genů pro SSU rRNA byly všechny izoláty určeny jako druh *Herpetomonas tarakana*.

V první polovině května roku 2016 bylo odchyceno 96 jedinců ze čtyř vzájemně vzdálených lokalit Národního parku Podyjí. Všichni odchycení šváby byly v posledním nymfálním instaru. U všech odchycených jedinců došlo během jednoho týdne k metamorfóze a mohli tak být určeni do druhů. Při mikroskopickém vyšetření byla infekce trypanosomatidy zachycená ve střevech 29 jedinců (30% prevalence), ale PCR potvrdila pouze 16 pozitivních vzorků (17% prevalence) (přehled viz **tab. 4. 1. 2**). Z lokality Nad Šobesem bylo odchyceno 33 jedinců (13 ♀♀ + 16 ♂♂ rusce lesního; 3 ♀♀ + 1 ♂ rusce plamatého), žádný z nich nebyl infikován. Lokalita Sealsfieldův kámen čítala 33 jedinců rusce lesního (18 ♀♀, 15 ♂♂), z nichž bylo 12 infikovaných trypanosomatidy (36% prevalence), ale pouze v 8 případech byla infekce potvrzená PCR (24% prevalence). V lokalitě Listnatý les Havraníky bylo odchyceno 19 jedinců rusce lesního (12 ♀♀, 7 ♂♂), z kterých bylo 15 pozitivních (79% prevalence), ale PCR potvrdila infekci pouze u sedmi jedinců (37% prevalence). Z lokality Havranické vřesoviště bylo získáno 11 švábů (6 ♀♀ + 1 ♂ rusce lesního; 1 ♀ + 3 ♂♂ rusce plamatého) a pouze ve dvou jedincích rusce lesního

byla mikroskopicky potvrzená přítomnost buněk trypanosomatid (18% prevalence).  
Následná PCR potvrdila infekci pouze v jednom z těchto dvou jedinců (9% prevalence).

**Tabulka 4. 1. 1:** Přehled vyšetřených švábů na přítomnost kinetoplastid/trypanosomatid v letech 2014 až 2016

Chovné druhy	Druh	Chov/Lokalita	Celkem/ Pozitivní	Druh/Rod kinetoplastid*
	<i>Blaberus discoidalis</i>	Jiří Hromádka	1/0	---
	<i>Blaberus giganteus</i>	Jiří Hromádka	1/0	---
	<i>Blatta orientalis</i>	Kat. zoologie PřF UK <sup>7</sup>	13/0	---
	<i>Blattella germanica</i>	Kat. zoologie PřF UK <sup>8</sup>	3/1	<b><i>Bodo</i> sp.</b>
		Kat. zoologie PřF UK <sup>9</sup>	10/0	---
		VÚRV, v.v.i.	10/0	---
	<i>Blattella</i> sp.	Kat. zoologie PřF UK <sup>10</sup>	15/0	---
	<i>Byrsotria rothi</i>	Jiří Hromádka	1/0	---
		Břetislav Fidla	5/0	---
	<i>Deropeltis</i> sp. <sup>11</sup>	Kat. zoologie PřF UK	4/0	---
		Jiří Hromádka	1/0	---
	<i>Diploptera punctata</i>	Jiří Hromádka	1/0	---
	<i>Elliptorhina javanica</i>	Jiří Hromádka	1/0	---
	<i>Elliptorhina chopardi</i>	Jiří Hromádka	1/0	---
	<i>Ergaula capucina</i>	Kat. zoologie PřF UK	10/0	---
<i>Eublaberus distantis</i>	Jiří Hromádka	1/0	---	
	Kat. zoologie PřF UK	2/0	---	
<i>Eublaberus posticus</i>	Jiří Hromádka	1/0	---	
<i>Eublaberus serranus</i>	Jiří Hromádka	1/0	---	

\* Druhové/Rodové určení na základě sekvence SSU

<sup>7</sup> Původně synantropní, město Varna (Bulharsko), odchyt 2012

<sup>8</sup> Původně synantropní, město Peking (Čína), odchyt 2013

<sup>9</sup> Původně synantropní, město Nachičevan (Ázerbájdžán), odchyt 2016

<sup>10</sup> Původně volně žijící, louky Wondo Genet (Etiopie), odchyt 2014

<sup>11</sup> Původně synantropní, město Jinka (Etiopie), odchyt 2009

	<i>Eurycotis floridana</i>	Jiří Hromádka	1/0	---
	<i>Gromphadorhina oblongonota</i>	Jiří Hromádka	1/0	---
	<i>Gromphadorhina portenosa</i>	Jiří Hromádka	1/0	---
	<i>Henschoutedenia flexivitta</i>	Jiří Hromádka	1/0	---
	<i>Loboptera decipiens</i>	Kat. zoologie PřF UK	2/0	---
	<i>Lucihormetica verrucosa</i>	Břetislav Fidra	9/0	---
	<i>Nauphoeta cinerea</i>	Jana Bulantová	14/0	---
	<i>Panchlora nivea</i>	František Jůna	24/0	---
	<i>Phoetalia pallida</i>	Jiří Hromádka	1/0	---
	<i>Polyphaga aegyptiaca</i> <sup>12</sup>	Jiří Hromádka	1/0	---
		Kat. zoologie PřF UK	5/0	---
	<i>Pycnoscelus nigra</i>	Jiří Hromádka	1/0	---
	<i>Pycnoscelus striata</i>	Jiří Hromádka	1/0	---
	<i>Pycnoscelus tenebriger</i>	Jiří Hromádka	1/0	---
	<i>Rhyparobia maderae</i>	Jiří Hromádka	1/0	---
	<i>Supella longipalpa</i>	Kat. zoologie PřF UK <sup>13</sup>	10/0	---
	<i>Symploce incuriosa</i>	Kat. zoologie PřF UK	12/0	---
	<i>Therea olegrandjeani</i>	Jiří Hromádka	1/0	---
		Kat. zoologie PřF UK	10/0	---
	<b>Synantropní druhy</b>	<i>Blattella germanica</i>	Expozice želvy, ZOO Praha	15/0
<i>Nauphoeta cinerea</i>		Skleník, Stanice přírodovědců (Praha)	4/0	---
<i>Periplaneta</i>		Zvířetník Katedra	9/0	---

<sup>12</sup> Původně volně žijící, jeskyně Korfu, odchyt 2012-2014

<sup>13</sup> Původně synantropní, město Athény (Řecko), odchyt 2015

	<i>australasiae</i>	parazitologie			
	<i>Periplaneta americana</i>	Skleník, Stanice přírodovědců (Praha)	56/2	<b><i>Dimastigella cf. trypaniformis</i></b> (98% identita)	
Volně žijící druhy		Expozice krokodýli, ZOO Plzeň	20/0	---	
	<i>Ectobius lapponicus</i>	Divoká Šárka (Praha)	5/0	---	
	<i>Ectobius sylvestris</i>		Divoká Šárka (Praha)	83/3	<b><i>Dimastigella cf. trypaniformis</i></b> 2x (99% identita) <b><i>cf. Dimastigella</i></b> 1x (89% identita)
			Terénní stanice Ruda (Veselí n. L.)	7/0	---
			NP Podyjí (4 lokality)	88/16	<b><i>Herpetomonas tarakana</i></b>
	<i>Phyllodromica maculata</i>		Prokopské údolí (Praha)	29/1	<b><i>Crithidia fasciculata</i></b>
			Mikulovsko (Morava)	7/4	<b><i>Herpetomonas tarakana</i></b>
		NP Podyjí (2 lokality)	8/0	---	

**Tabulka 4. 1. 2:** Přehled pozitivních infekcí dospělců rusce lesního (*E. sylvestris*) pocházejících ze tří lokalit NP Podyjí

Vzorek	Pohlaví	Lokalita	Střevo <sup>14</sup>	Síla infekce <sup>15</sup>	PCR	Druh
S340	♀	S. kámen	P	+	–	?
S341*	♀	S. kámen	M+P	++	+	<i>H. tarakana</i>
S342	♀	S. kámen	P	++	+	<i>H. tarakana</i>
S364*	♂	S. kámen	M+P	+++	+	<i>H. tarakana</i>
S365	♀	S. kámen	M+P	++	+	<i>H. tarakana</i>
S366	♀	S. kámen	P	+	+	<i>H. tarakana</i>
S367	♂	S. kámen	M	+	+	<i>H. tarakana</i>

<sup>14</sup> Část střeva kde se nacházela infekce: S – stomodeum, M – mezenteron, P – proktodeum

<sup>15</sup> Síla infekce: + několik buněk, ++ stovky buněk, +++ tisíce buněk

\* V těchto případech se zdařila kultivace

S368	♀	S. kámen	S	+	-	?
S369	♂	S. kámen	S	+	-	?
S370	♀	S. kámen	M+P	++	+	<i>H. tarakana</i>
S371	♀	S. kámen	M	+	-	?
S375	♂	S. kámen	M+P	+	+	<i>H. tarakana</i>
S379*	♀	List. les	P	+++	+	<i>H. tarakana</i>
S381	♂	List. les	P	+	-	?
S382	♂	List. les	M+P	+++	+	<i>H. tarakana</i>
S383	♂	List. les	P	++	+	<i>H. tarakana</i>
S384	♀	List. les	P	+	+	<i>H. tarakana</i>
S385	♂	List. les	P	++	+	<i>H. tarakana</i>
S386	♀	List. les	P	+	-	?
S387	♂	List. les	M	++	+	<i>H. tarakana</i>
S388	♀	List. les	P	++	+	<i>H. tarakana</i>
S389	♂	List. les	P	++	-	?
S390	♀	List. les	P	+	-	?
S391	♀	List. les	M+P	+	-	?
S392	♀	List. les	P	+	-	?
S393	♀	List. les	P	+	-	?
S394	♀	List. les	P	+	-	?
S403	♂	H. vřes.	P	+	-	?
S405	♀	H. vřes.	P	++	+	<i>H. tarakana</i>

## 4. 2 Izolace a kultivace trypanosomatid

V rámci spolupráce s Doc. V. Yurchenkem z Ostravské Univerzity nám byly poskytnuty kultury buněk OSR-18 a OSR-27 pocházející z rusce laponského (*Ectobius lapponicus*). Obě dosud neaxenizované kultury byly nejprve očištěny od plísní, kvasinek a bakterií pomocí použití U-trubice. Během pokusů byly původní kultury umístěné do kultivačních láhví a vlákna plísní byla průběžně mechanicky odstraňována (pro snížení kontaminace a zlepšení přísunu kyslíku ke kultuře). V původní kultuře buněk OSR-18 se velmi dobře množily plísně i buňky trypanosomatid, po axenizaci se však buňky přenesené do čistého média BHI (+ 10% FCS, hemin a amikin) přestaly množit. Podobně se také přestaly množit buňky po odstranění plísní z původní kultury buněk OSR-27 a kultura zanikla. V druhém pokusu byly buňky (OSR-18) po axenizaci pomocí U-trubice přeneseny do kondiciovaného média, kde již rostly velmi dobře. Poté byla axenická kultura dvakrát rozklonována oběma popsánymi způsoby (viz **kap. 3. 2. 4**). Po vyočkování klonů do kondiciovaného média se buňky namnožily pouze v případě semiklonální kultury, která byla označena jako OSR-18 CL2. U této kultury byla osekvenována SSU pro potvrzení její shodnosti s původní kulturou, dále byla stanovena růstová křivka (viz **obr. 4. 5. 1**) a roztěry buněk byly obarvené fluorescenčním barvivem DAPI a Giemsou-Romanowsky pro popis morfortypů a změření příslušných parametrů (viz dále). Dále byly z odebrané kultury vytvořeny preparáty pro TEM, a to chemicky i kryometodou, a také byla tato kultura využita pro experimentální infekce a stanovení hostitelské specifity tohoto parazita.

Při mikroskopickém vyšetření mnou vypitvaných střev švábů byla potvrzená přítomnost buněk trypanosomatid (případně kinetoplastid) ve 33 jedincích. Ve všech případech byl homogenát nebo část střev přenesen do média BHI (s 10% FCS, heminem a amikinem). Kultivace a úspěšné namnožení buněk se zdařilo pouze v třech případech (S341, S364, S379; viz **tab. 4. 1. 2**). Následná PCR a sekvenace potvrdila, že ve všech třech kulturách jsou buňky *Herpetomonas tarakana* (tedy identické s izolátem OSR-18) a nebylo tak nutné kultury dále axenizovat a klonovat.

Kvůli podezření, že se jedná o buňky z rodu *Dimastigella* (Kinetoplastea), byla u tří jedinců rusce lesního část středního a zadního střeva umístěná nejenom do média BHI, ale také do LB média používaného pro klonování (viz **kap. 3. 4. 5**). Nicméně kultivace se nezdařila ani v jednom případě. Později nám byly poskytnuty dvě kultury (Z310, Z323) s buňkami kinetoplastid od Mgr. Michaela Kotyky, který studuje parazity švábů ze skupiny

Parabasala. Kultury pocházely ze zadních střev dvou jedinců blíže neurčených druhů švábů (♀) *Rhabdoblatta* sp. (Z310) a (♂) *Gyna* sp. (Z323). Po osekvenování genů pro SSU rRNA byly buňky z kultury Z310 určeny jako *Dimastigella trypaniformis* (100% shoda) a z kultury Z323 jako *Phanerobia* cf. *pelophila* (99% shoda); oba rody náleží mezi Metakinetoplastina (Neobodonida). Médium vhodné pro buňky parabasal tedy bylo zřejmě vhodné i pro buňky těchto kinetoplastid.

### 4. 3 Molekulární analýzy

Kromě našich pozitivních vzorků (viz **tab. 4.1.1**) a izolátu z kultury OSR-18 CL2 jsem také osekvenovala gen pro malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) u dalších vzorků získaných od Dr. V. Yurchenka. Jednalo se vzorky označené jako OSR-21, OSR-26, OSR-27, OSR-28, OSR-29, OSR-32, OSR-33 a OSR-34. Tyto „ENVI“ vzorky byly získané z vypitvaných střev volně žijících rusců laponských (OSR-26 až OSR-29; původní hostitel také pro OSR-18), rusců plamatých (OSR-32 až OSR-34) a rusce *Phyllodromica chladeki* (OSR-21). U izolátů OSR-18, 27 a 34 byl také pro jemnější rozlišení amplifikován a osekvenován gen pro glykosomální glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázu (gGAPDH) a po zaklonování také gen pro „spliced leader“ (SL RNA). Na základě fylogenetických analýz SSU rRNA a GAPDH, které provedl můj školitel Doc. Votýpka, byly identifikovány dva druhy: *Herpetomonas* sp.<sup>16</sup> (izoláty OSR27/29/32) a formálně nově popsáný *Herpetomonas tarakana* (izoláty OSR-18/21/26/28/29/33/34) (podrobněji Yurchenko et al., 2016, viz **příloha č. 1**).

### 4. 4 Stanovení morfotypů a měření buněk *Herpetomonas tarakana*

Morfotypy buněk *Herpetomonas tarakana* byly definovány na základě pozice jádra, kinetoplastu, periflagelární kapsy a délky bičíku. Vyšetřením roztěrů kultury světelnou mikroskopií byly prokázány celkem čtyři morfotypy buněk: promastigoti, choanomastigoti dvojího typu (s krátkým/dlouhým bičíkem), opistomorfy a endomastigoti (viz **obr. 4. 4. 1**). Morfotypy buněk *in vitro* byly morfologicky shodné s buňkami *in situ* (viz **obr. 4. 4. 2**),

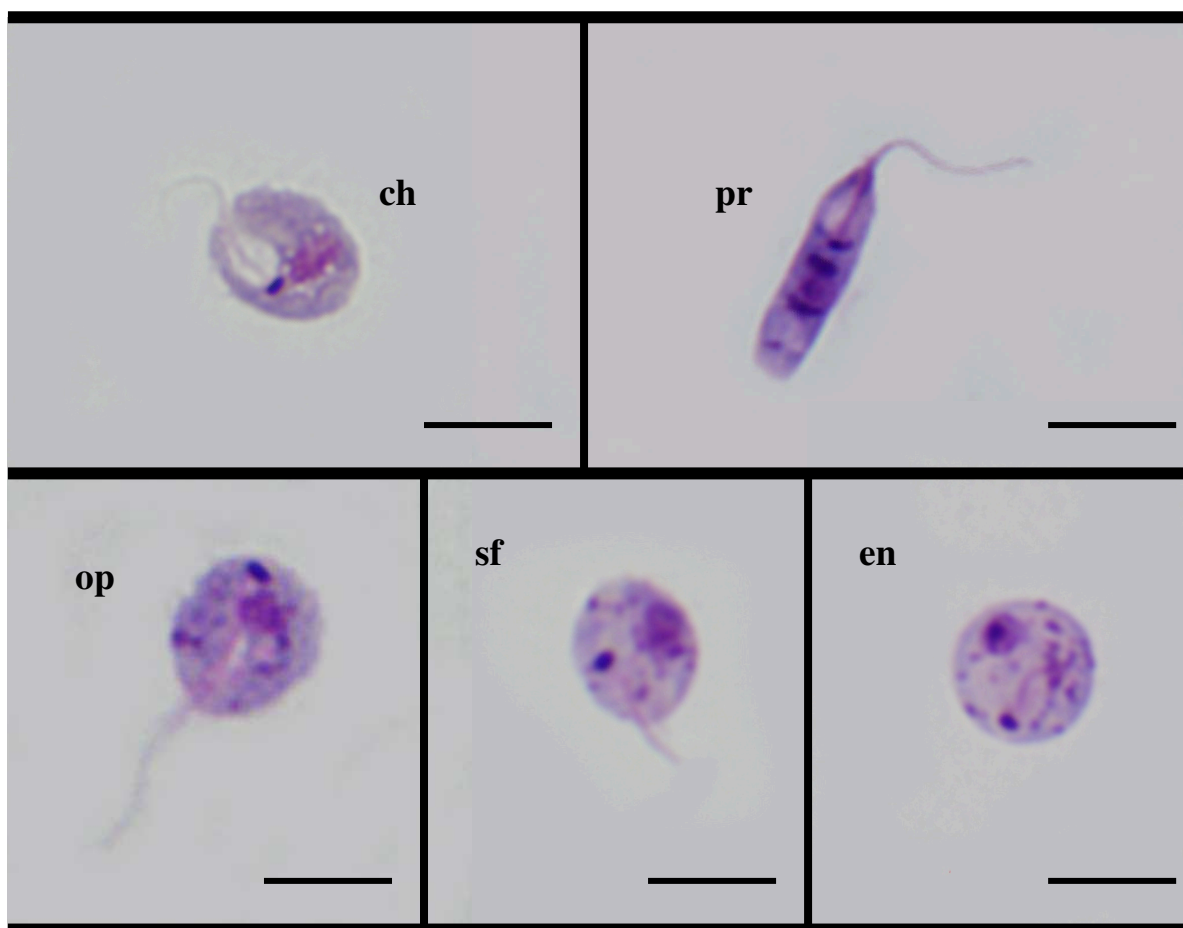
---

<sup>16</sup> Druh *Herpetomonas* sp. nebyl formálně popsán jako nový druh, protože se nepodařilo získat jeho kulturu.

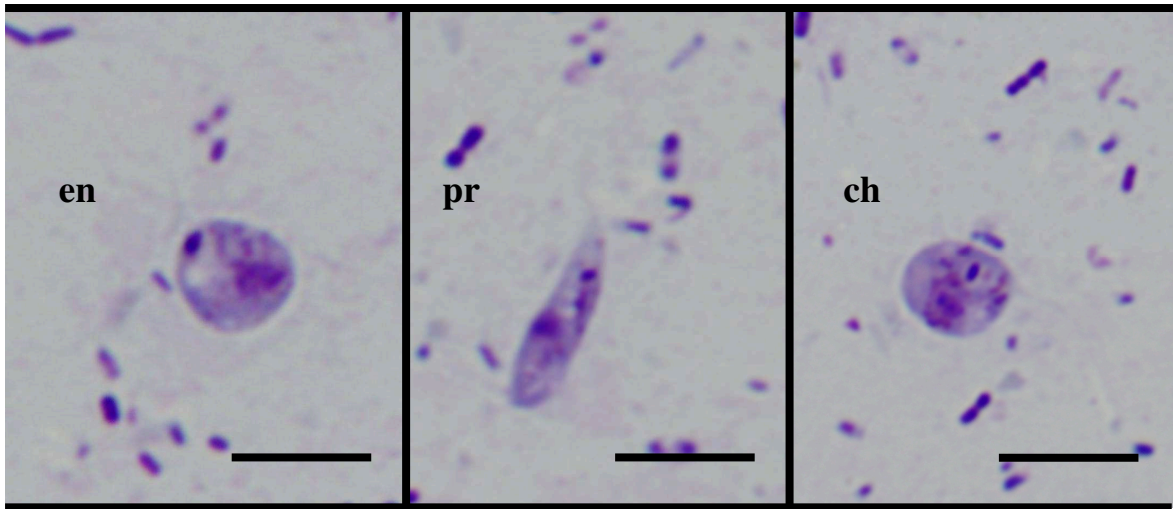


tedy ve střevě švábů. Preparáty vzniklé roztěrem kultury byly také obarveny fluorescenčním barvivem DAPI, které prokázalo absenci bakteriálních endosymbiontů v buňkách (viz **obr. 4. 4. 3**).

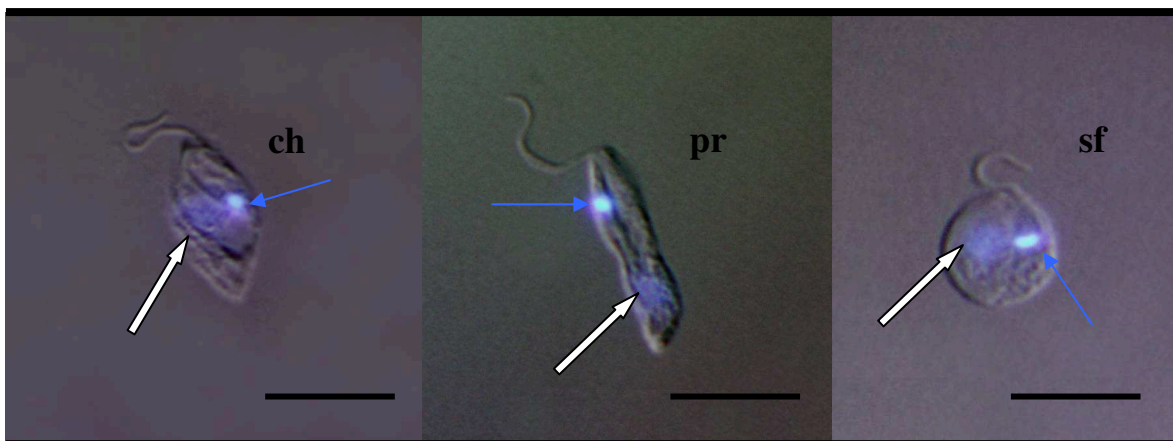
V kultuře i ve střevě hostitele tvořily promastigoti a choanomastigoti s krátkým i dlouhým bičíkem absolutní většinu (tzn. > 90 % buněk). Na preparátech zhotovených roztěrem kultury bylo vybráno 50 buněk (promastigoti + choanomastigoti) a u obou morfotypů byla změřena celková délka a šířka buňky a délka bičíku (vzájemné signifikantní rozdíly viz **obr. 4. 4. 5**), vzdálenost kinetoplastu od jádra a vzdálenost kinetoplastu i jádra od anteriorního konce buňky (viz **tab. 4. 1. 3**).



**Obrázek 4. 4. 1:** Buněčné morfotypy *H. tarakana* v kultuře: **ch** – choanomastigot, **pr** – promastigot, **op** – opisthont, **sf** – choanomastigot s krátkým bičíkem, **en** – endomastigot. Měřítka 5  $\mu\text{m}$ .



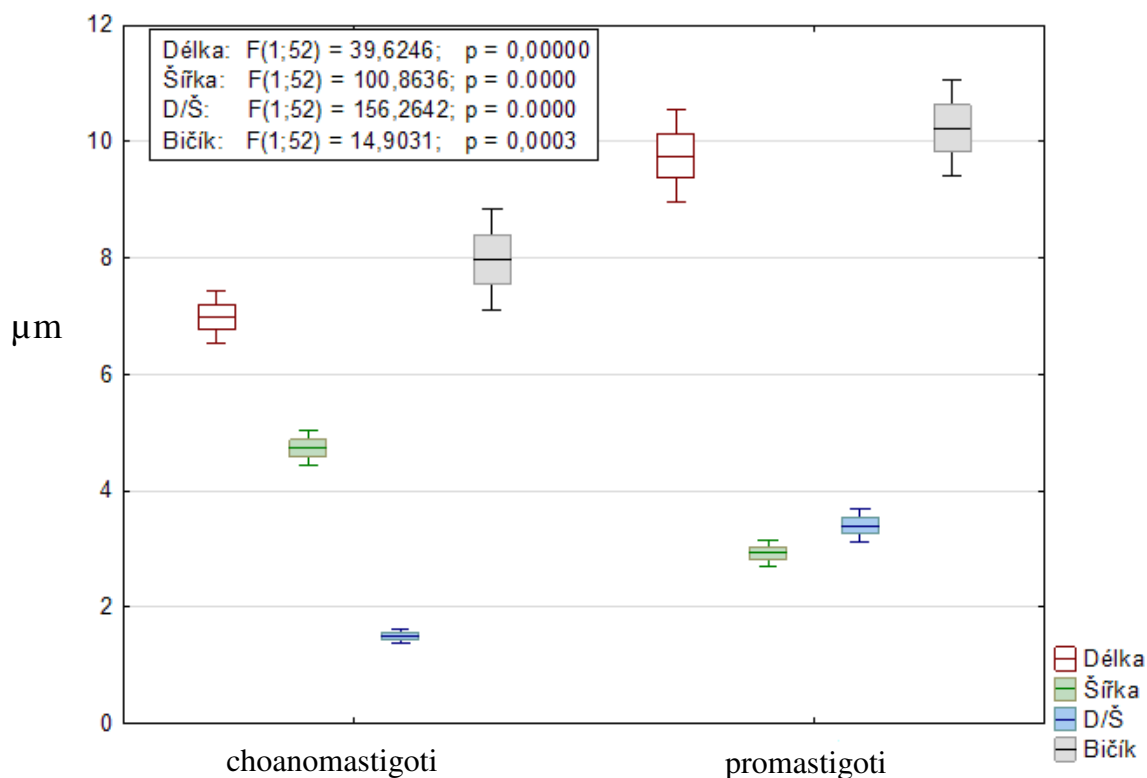
**Obrázek 4. 4. 2:** Buněčné morfotypy *H. tarakana* ve střevě rusce lesního: **en** – endomastigot, **pr** – promastigot, **ch** – choanomastigot. Měřítko 5 µm.



**Obrázek 4. 4. 3:** Roztěr kultury buněk *H. tarakana* obarvené fluorescenčním barvivem DAPI; k – kinetoplast (modrá šipka), J – jádro (bílá šipka), **ch** – choanomastigot, **pr** – promastigot, **sf** – choanomastigot s krátkým bičíkem. Měřítko 5 µm.

**Tabulka 4. 1. 3:** Základní morfologické charakteristiky choanomastigotu a promastigotu herpetomonády *H. tarakana* z kultury.

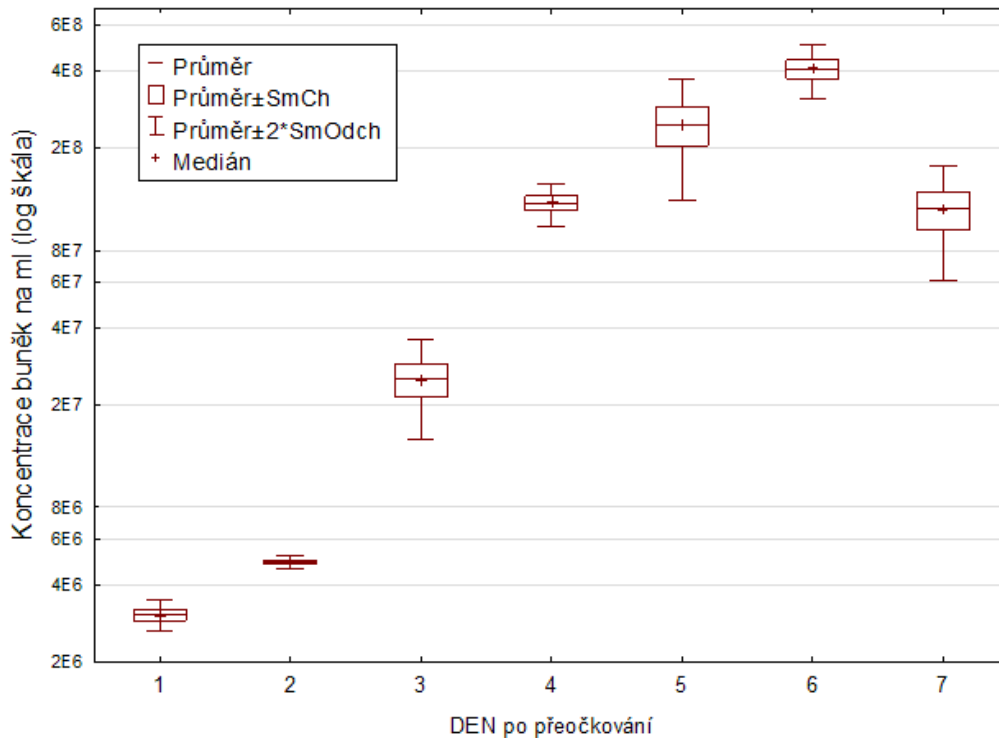
	<b>Choanomastigot</b>	<b>Promastigot</b>
<b>Délka buňky (μm)</b>	<b>7,0</b>	<b>9,8</b>
Rozptyl (μm)	1,1	2,0
Minimum (μm)	4,7	6,9
Maximum (μm)	9,6	14,0
<b>Šířka buňky (μm)</b>	<b>4,7</b>	<b>2,9</b>
Rozptyl (μm)	0,8	0,5
Minimum (μm)	3,5	1,6
Maximum (μm)	6,2	4,0
<b>Délka/šířka (μm)</b>	<b>1,5</b>	<b>3,4</b>
Rozptyl (μm)	0,3	0,7
Minimum (μm)	0,8	2,3
Maximum (μm)	1,9	4,5
<b>Anteriorní konec buňky od jádra (μm)</b>	<b>4,4</b>	<b>4,6</b>
Rozptyl (μm)	1,1	0,7
Minimum (μm)	2,2	3,3
Maximum (μm)	7,1	5,9
<b>Anteriorní konec buňky od kinetoplastu (μm)</b>	<b>3,6</b>	<b>2,8</b>
Rozptyl (μm)	1,2	1,0
Minimum (μm)	1,2	1,4
Maximum (μm)	5,9	5,5
<b>Vzdálenost jádra od kinetoplastu (μm)</b>	<b>1,3</b>	<b>1,8</b>
Rozptyl (μm)	0,9	0,8
Minimum (μm)	0,1	0,2
Maximum (μm)	2,9	3,7
<b>Délka bičíku (μm)</b>	<b>8,0</b>	<b>10,2</b>
Rozptyl (μm)	2,2	2,1
Minimum (μm)	4,3	6,0
Maximum (μm)	13,3	15,3



**Obrázek 4. 4. 4:** Rozdíly v délce, šířce a jejich vzájemném poměru a v délce bičičku u choanomastigotů a promastigotů *H. tarakana* z kultury.

#### 4. 5 Růstová křivka *Herpetomonas tarakana* v kultuře

Pro zjištění exponenciální/stacionární fáze byly buňky *H. tarakana* OSR-18 CL2 počítány dvakrát nezávisle v sedmi po sobě následujících dnech. Velmi rychle rostoucí buňky procházely čtyřmi klasickými fázemi (růstová křivka viz **obr. 4. 5. 1**). Při každém počítání byly zhotoveny roztěry pro porovnání změny morfortypů buněk v jednotlivých dnech (přehled morfortypů *H. tarakana* viz **obr. 4. 4. 1**). Promastigoti v kultuře převažovali první, druhý, šestý a sedmý den po očkovaní. Choanomastigotů a opisthomorfů bylo nejvíce 2. – 5. den po očkovaní. Sedmý den (fáze odumírání) se v kultuře krom promastigotů a choanomastigotů objevily také endomastigoti. Kultura byla pátý den (v exponenciální fázi) odebíraná především pro morfologické analýzy a experimentální infekce.



**Obrázek 4. 5. 1:** Růstová křivka buněčné kultury *H. tarakana*: 1. den (klidová lag-fáze) – ↑ (mnoho) promastigoti, ↓ (málo) choanomastigoti; 2. den (začátek exponenciální log-fáze) – ↑ promastigoti, ↑ choanomastigoti, objevují se opistomorfy; 3. den – ↓ promastigoti, ↑ choanomastigoti a opistomorfy; 4. den + 5. den stejné jako v třetím dni po očkování; 6. den (stacionární fáze) – ↑ promastigoti, ↑ choanomastigoti, ↑ opistomorfy; 7. den (fáze odumírání) – ↑ promastigoti, ↑ choanomastigoti, ↑ endomastigoti, ↓ opistomorfy.

#### 4. 6 Popis ultrastruktury bičíku buněk *Herpetomonas tarakana*

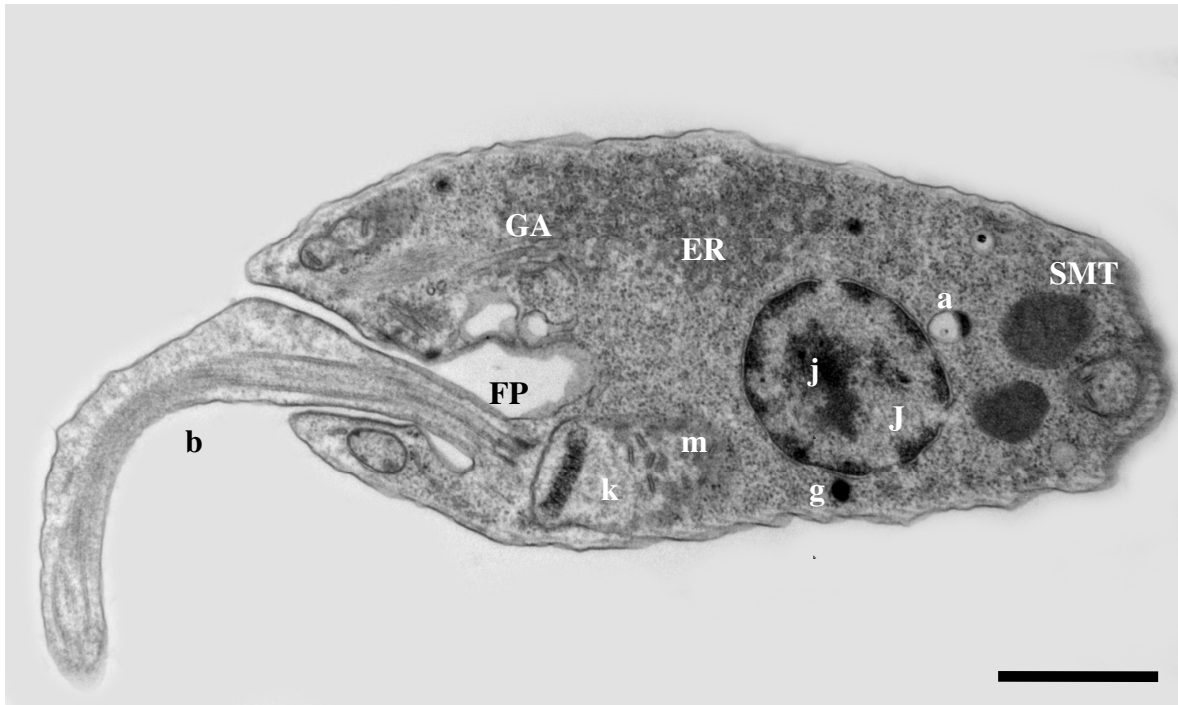
V buňkách herpetomonád (OSR-18 CL2) zpracovaných chemicky i mrazovou substitucí (HPF) pro transmisní elektronovou mikroskopii byly nalezené všechny typické orgány trypanosomatid (viz **obr. 4. 6. 1**). Výsledná šířka kinetoplastu měřila  $593 \pm 82$  nm u preparátů zpracovaných mrazovou substitucí a  $668 \pm 123$  nm u preparátů fixovaných chemicky<sup>17</sup>.

<sup>17</sup> Šířka kinetoplastu se hodnotila pouze přibližně, protože se většinou nepodaří pozorovat kinetoplast v celé šířce.

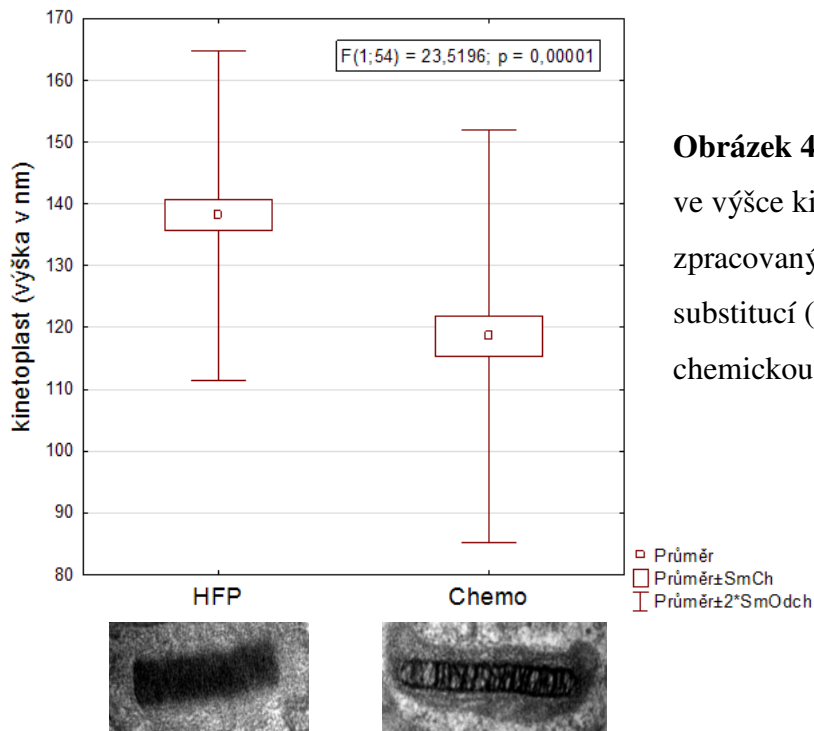
Byla rovněž změřena výška kinetoplastu, která je mj. závislá na použité technice a v případě HPF je signifikantně větší (viz **obr. 4. 6. 2**).

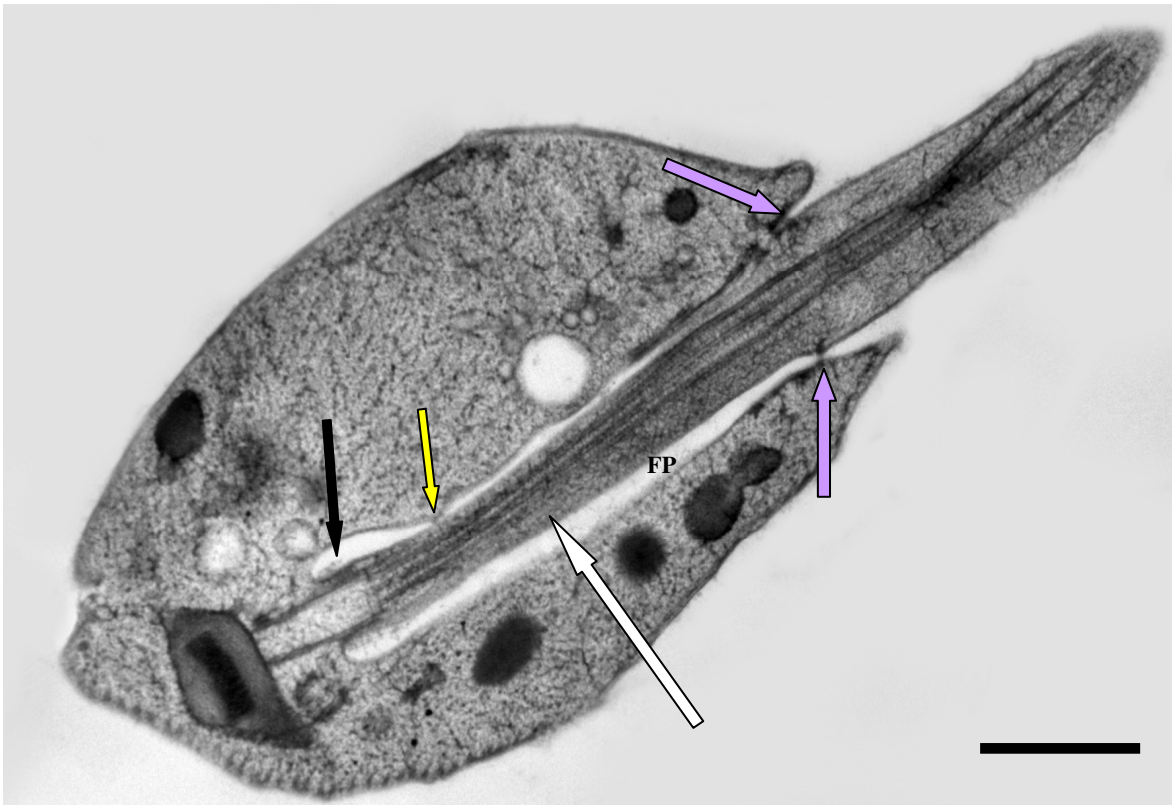
Podél axonémy bičíku se vzorcem  $9 \times 2 + 2$  MT byla umístěná paraxiální tyč (PFR), která začínala již v periflagelární kapse (FP) (viz **obr. 4. 6. 3**). Na vnější straně bičíkaté membrány mezi bazálním tělískem a bazální destičkou byla zaznamenána struktura připomínající „collarete“ (viz **obr. 4. 6. 3**). Proximální a distální oblast FP byla oddělena límcem „collar“ (viz **obr. 4. 6. 3, 4. 6. 4**). V oblasti krčku nad límcem byla zachycena membránová invaginace s MT a velkým množstvím vakuol, které směřovaly do cytoplazmy podél FP (viz **obr. 4. 6. 5**). Vakuoly byly nalezené i uvnitř FP (viz **obr. 4. 6. 6**). Na příčných řezech byly zaznamenány dvě skupiny MT. První byla tvořená 5–10 MT, které se nacházely blízko FP, doprovázely výše zmíněné vakuoly a směřovaly do cytoplazmy (viz **obr. 4. 6. 7 A-D**). Druhou tvořila čtveřice MT, které se vyskytovaly na opačné straně FP a vždy byly umístěné těsně vedle sebe (viz **obr. 4. 6. 7 A-D**). Obě skupiny byly zaznamenány na sériích řezů, které zachytily délku FP v rozsahu cca 300 – 450 nm (viz **obr. 4. 6. 8**). V přechodné zóně byla zaznamenána skupina MT, u které však nebylo vždy možné určit, do které skupiny patří (viz **obr. 4. 6. 9**). Okolo bazálního tělíska se žádné MT z takto popsaných skupin nenacházely. Pouze v několika případech byla v blízkosti bazálního tělíska zaznamenána MT struktura, kterou nebylo možné blíže specifikovat (viz **obr. 4. 6. 10**).

V oblasti krčku, kde bičík opouští FP, se dále nacházely adhezní spoje „desmozomy“ mezi membránou bičíku a membránou FP. Ve většině případů byly „desmozomy“ pozorované po obou stranách membrány bičíku (viz **obr. 4. 6. 3, 4. 6. 4, 4. 6. 5, 4. 6. 6, 4. 6. 11B**). Na několika snímcích byla jedna strana FP delší (viz **obr. 4. 6. 5, 4. 6. 6, 4. 6. 11F**). Také byly několikrát při pozorování preparátů spatřeny „hemidesmosomy“ mezi membránou bičíku a cytoplazmatickou membránou jiné buňky (viz **obr. 4. 6. 11 D-E**).

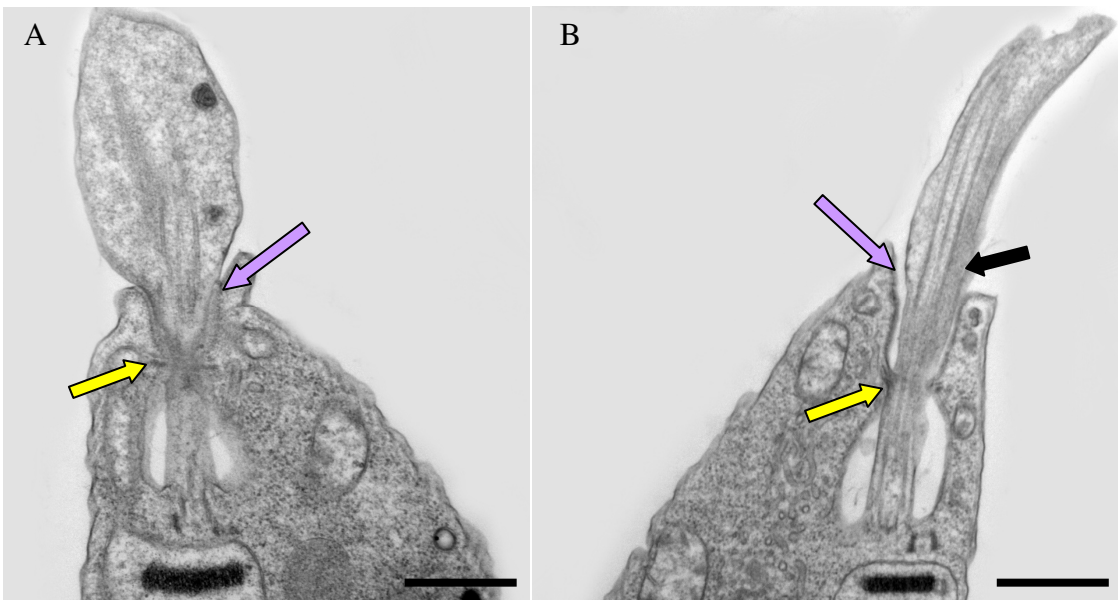


**Obrázek 4. 6. 1:** Typická buňka *H. tarakana*: J – jádro; j – jádérko; g – glykosom; m – mitochondrie; k – kinetoplast; ER – endoplazmatické retikulum; GA – Golgiho aparát; SMT – subpelikulární mikrotubuly; a – acidokalcizom; b – bičík; FP – periflagelární kapsa. Měřítko 100 nm.



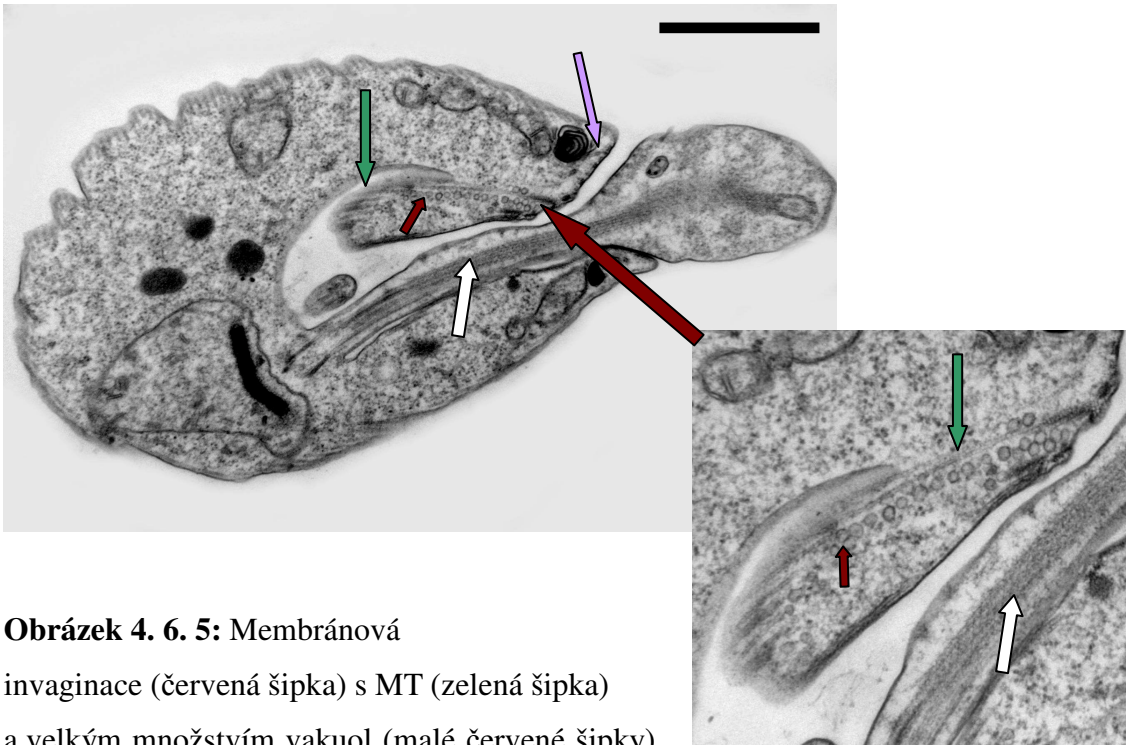


**Obrázek 4. 6. 3:** Opisthomorf *H. tarakana* a paraxiální tyč (bílá šipka) uvnitř periflagelární kapsy (FP); struktura kolem bičíkaté membrány připomínající „collarete“ (černá šipka), límec oddělující proximální a distální oblast FP (žlutá šipka), „desmosomy“ (fialová šipka). Měřítko 1  $\mu\text{m}$ .

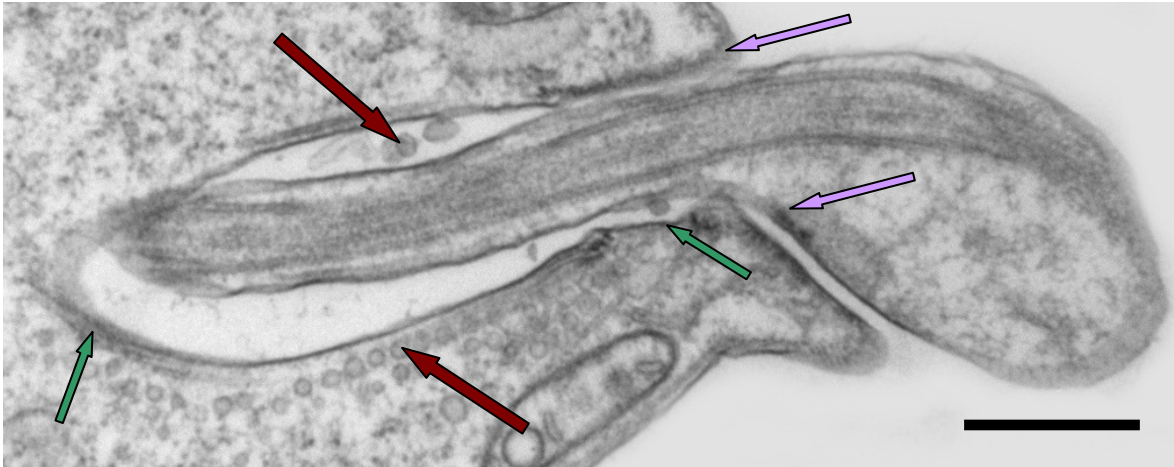


**Obrázek 4. 6. 4:** Choanomastigoti *H. tarakana*. Proximální a distální oblast periflagelární kapsy: „collar“ (žlutá šipka), „desmosomy“ (fialová šipka), paraxiální tyč (černá šipka). Měřítko: A – 1  $\mu\text{m}$ ; B – 2  $\mu\text{m}$ .

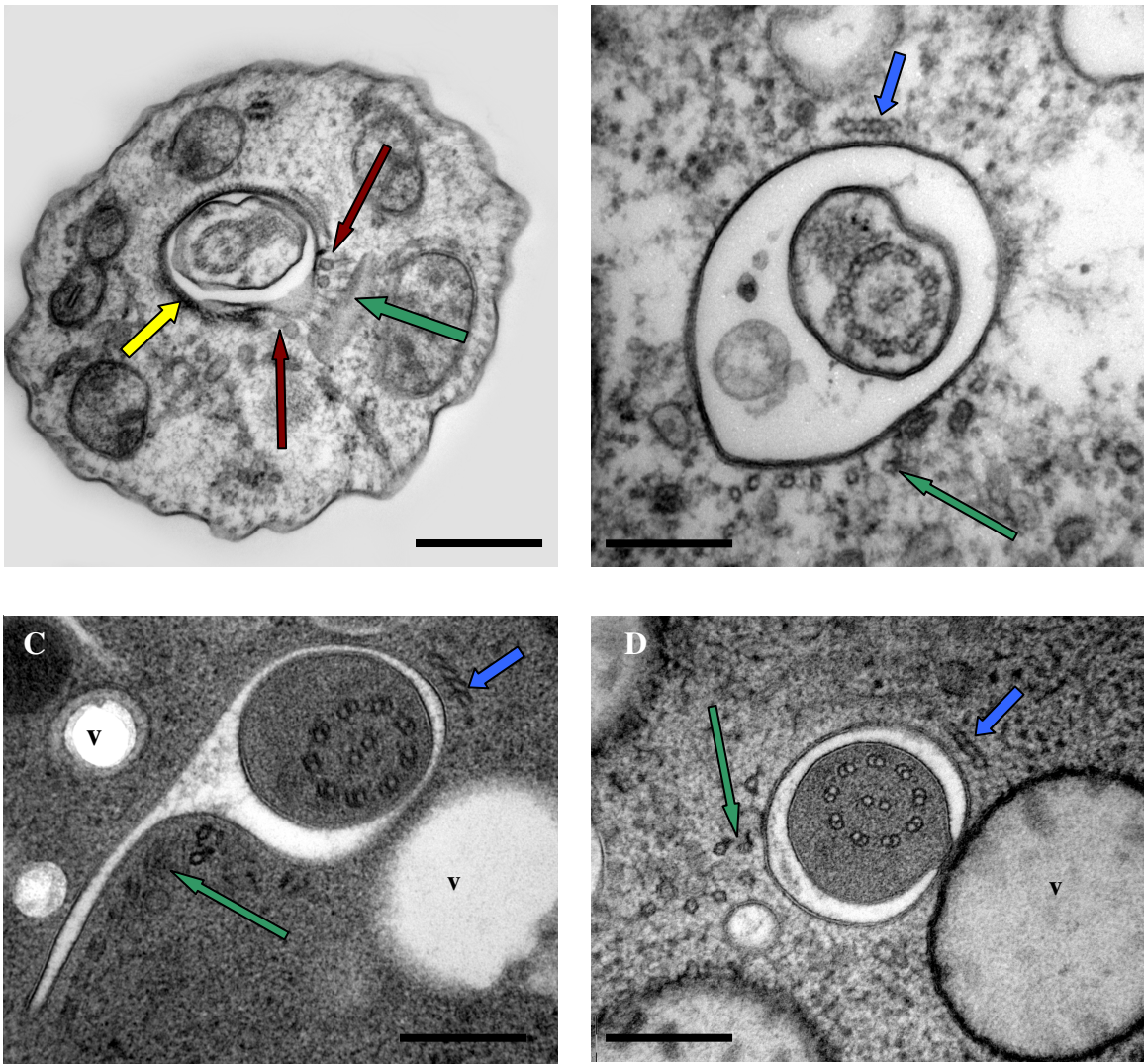




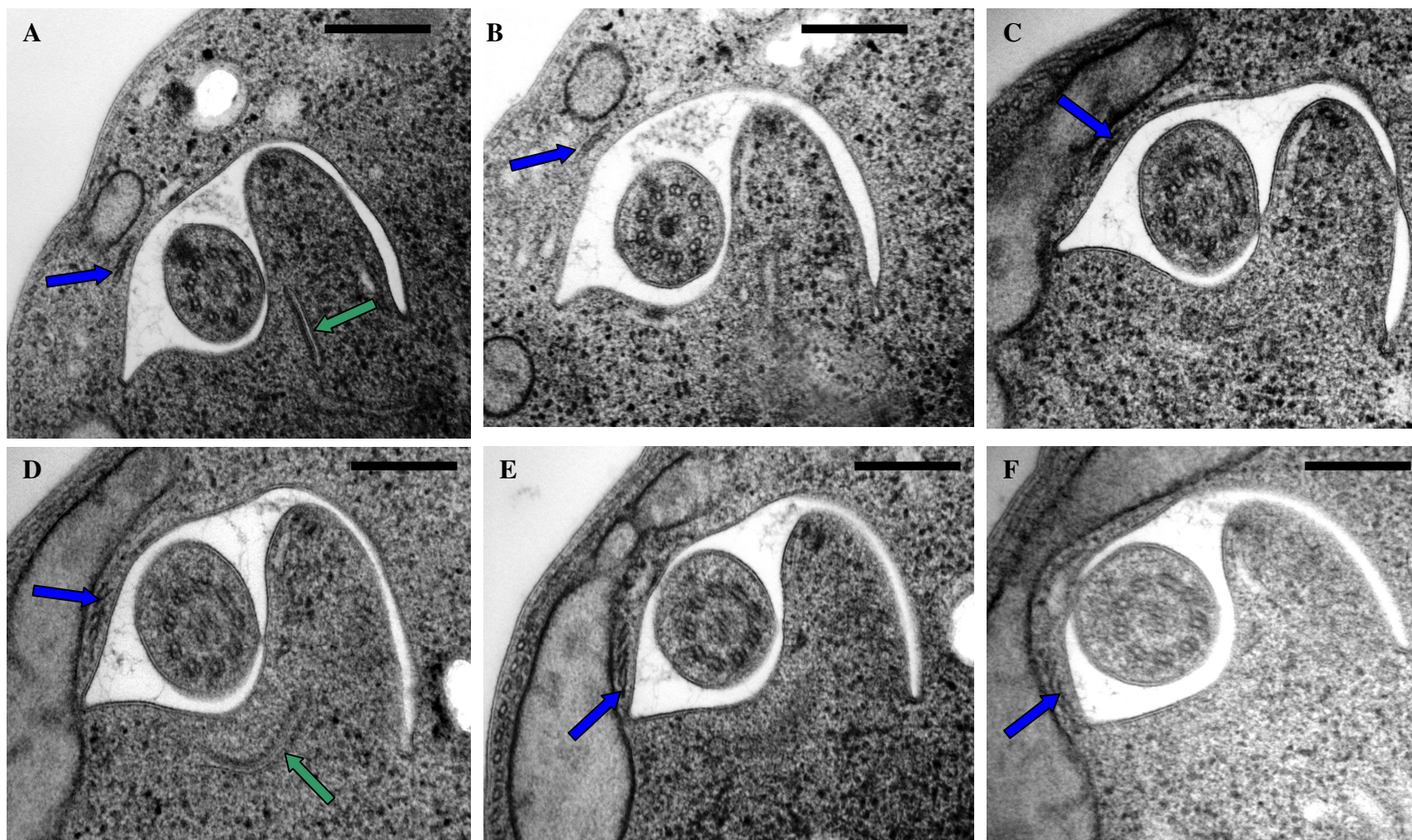
**Obrázek 4. 6. 5:** Membránová invaginace (červená šipka) s MT (zelená šipka) a velkým množstvím vakuol (malé červené šipky), které směřují do cytoplazmy podél periflagelární kapsy. Axonéma bičíku (bílá šipka) a „desmosomy“ (fialová šipka). Měřítko 100 nm.



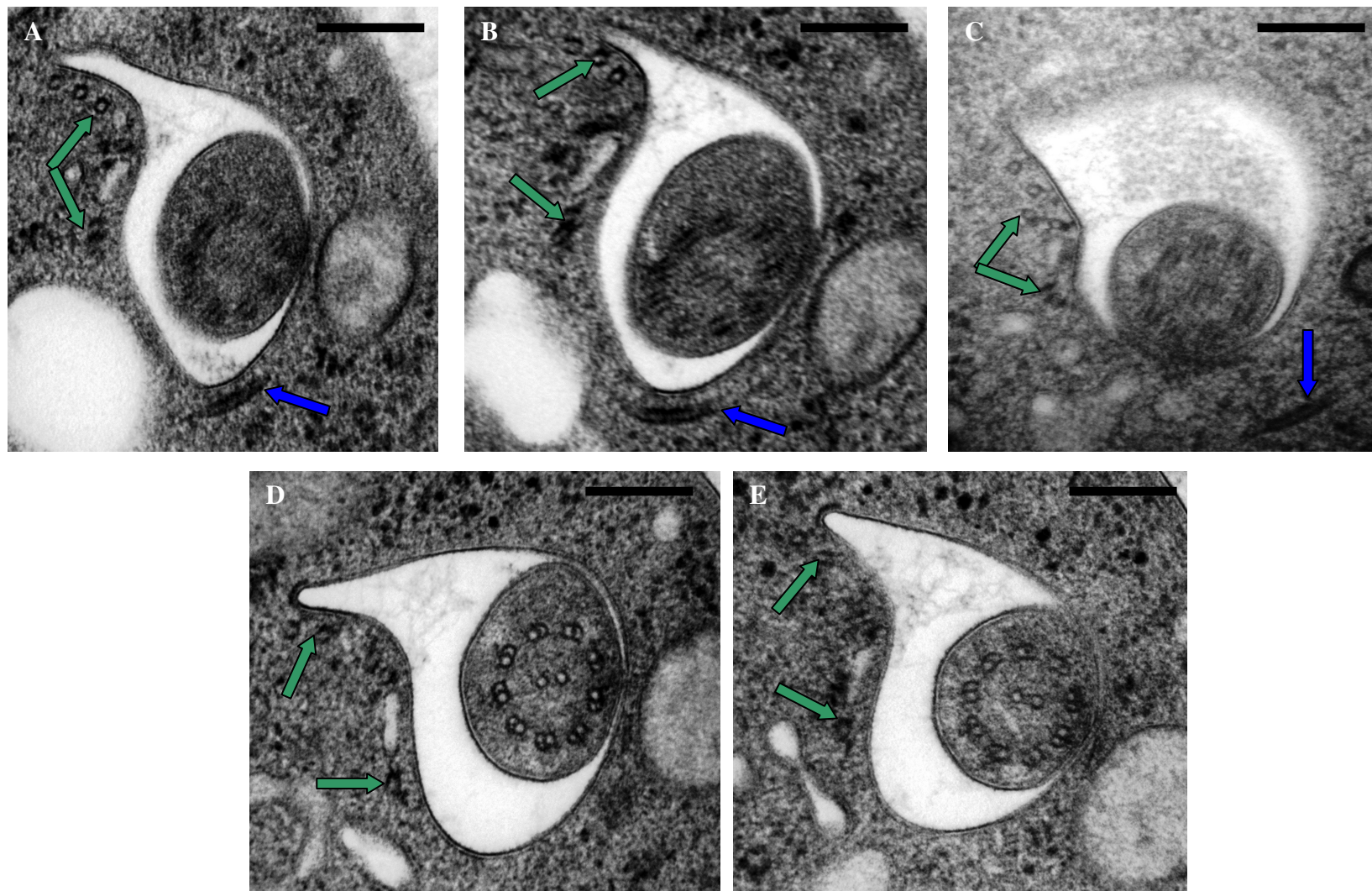
**Obrázek 4. 6. 6:** MT za membránovou invaginací (zelená šipka), vakuoly uvnitř cytoplazmy FP a cytoplazmy (červená šipka). Vakuoly se pravděpodobně díky endocytóze nacházely také v periflagelární kapse (FP). Mezi membránou bičíku a membránou FP se vytvářejí „desmosomy“ (fialová šipka). Měřítko 1  $\mu$ m.



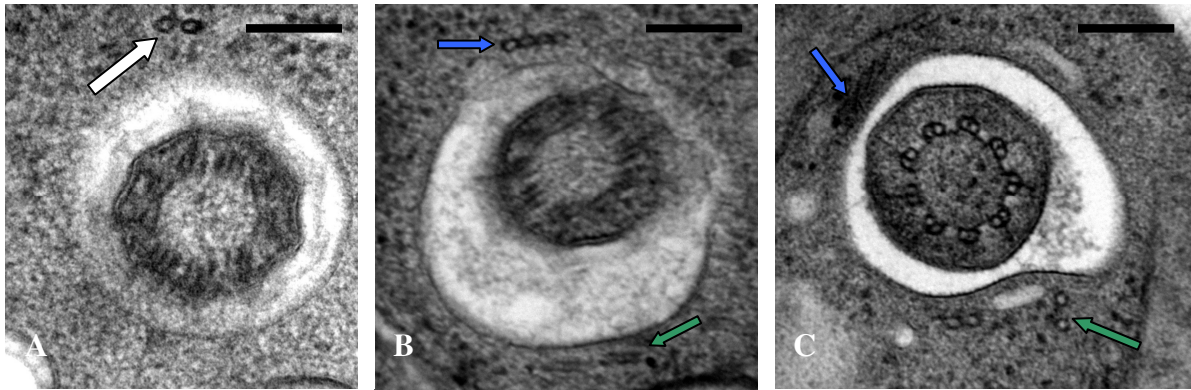
**Obrázek 4. 6. 7:** Příčné řezy buňkou a dvě skupiny MT v okolí periflagelární kapsy (FP). První skupina 6–8 MT (obecně pozorováno 5–10 MT) s nepravidelným uspořádáním (zelená šipka); druhá skupina čtyř těsně umístěných MT na opačné straně v blízkosti FP (modrá šipka). Na obrázku A byla zaznamenána prstencovitá struktura „collar“ (žlutá šipka). Také byly zpozorovány v cytoplasmě velké vakuoly (v), dále malé vakuoly související s MT a membránovou invaginací (červená šipka). Měřítko: A – 500 nm; B – 200 nm (chemicky fixované); C/D – 200 nm (HPF).



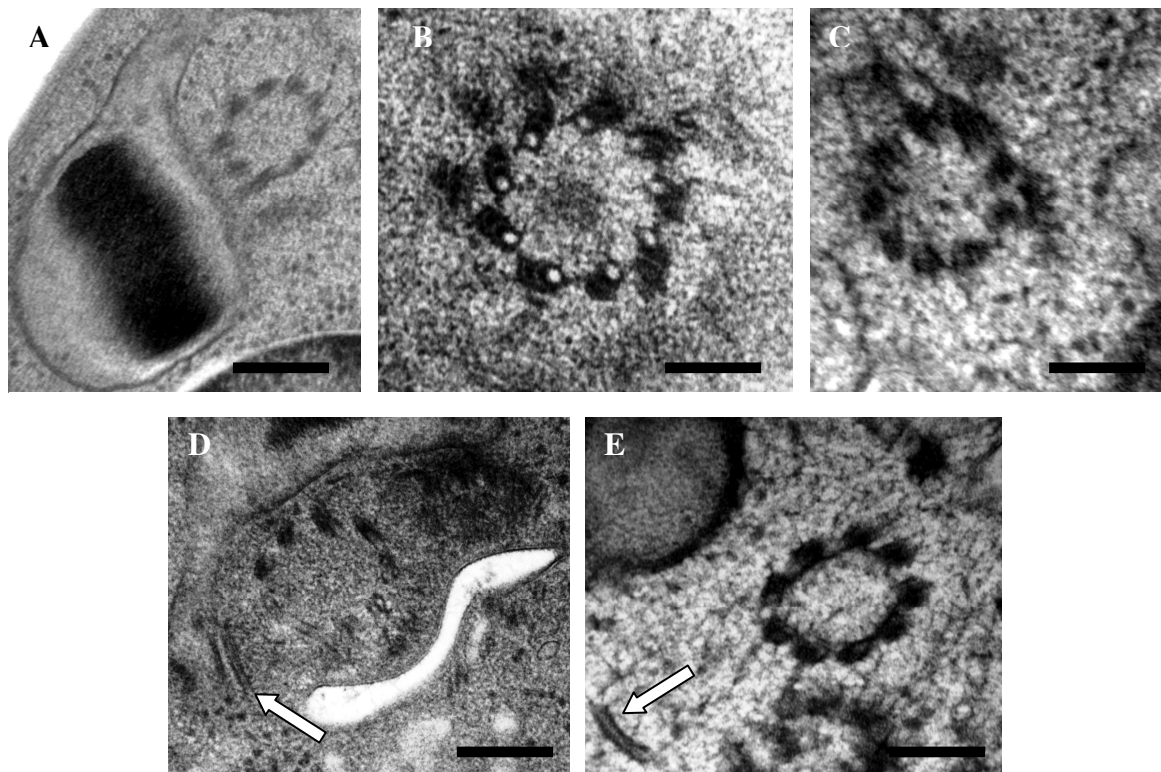
**Obrázek 4. 6. 8. 1:** Série řezů bičíkem a periflagelární kapsou (do hloubky cca 450 nm; vzdálenost mezi jednotlivými řezy je 75 nm). Na všech obrázcích je vidět čtveřice těsně nahlučených MT nad periflagelární kapsou blízko mitochondrie (modrá šipka). Na obr. A a D je zachycen MT pod periflagelární kapsou; zřejmě se jedná o MT související s membránovou invaginací (zelená šipka). Měřítko 200 nm.



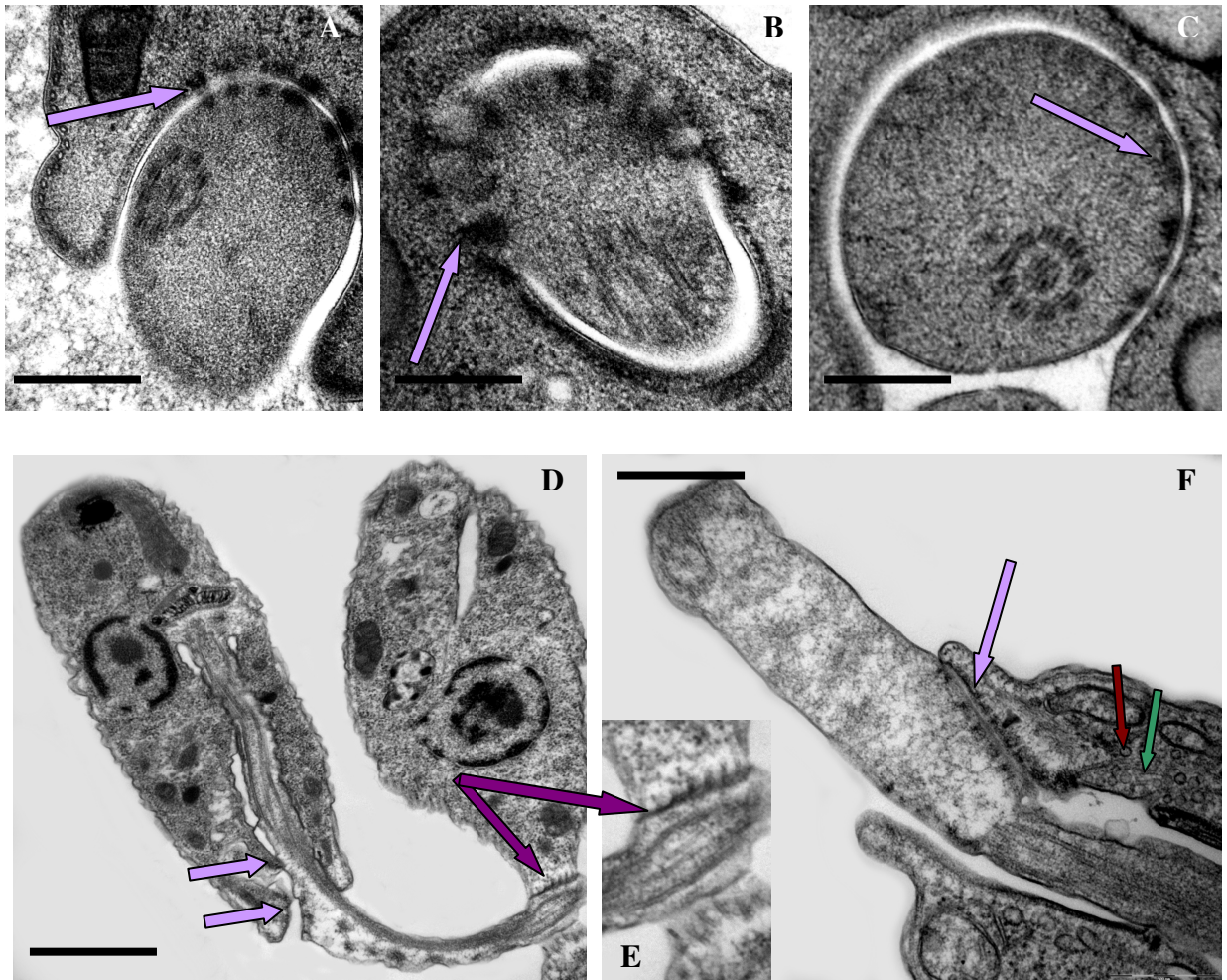
**Obrázek 4. 6. 8. 2:** Série řezů bičíkem a FP (do hloubky cca 300 nm). Dvě skupiny MT: čtveřice těsně nahlučených MT (modrá šipka), nepravidelně uspořádané MT zřejmě náležící k membránové invaginaci (zelená šipka). Obr. D a E bez čtveřice MT. Měřítko 200 nm.



**Obrázek 4. 6. 9 (A-C):** Přechodná zóna bičíku a několik skupin MT okolo periflagelární kapsy (FP): blíže nedefinovaná skupina MT (bílá šipka); skupina 4–5 MT s nepravidelným uspořádáním blízko FP (zelená šipka); čtveřice těsně umístěných MT zobrazená na **obr. 4. 6. 7** (modrá šipka). Měřítko 200 nm.



**Obrázek 4. 6. 10 (A-E):** Absence MT skupin popsanych na **obr. 4. 6. 9** v blízkosti bazálního tělíska (A-C); na snímcích D a E je zmíněný blíže nespécifikovaný MT (bílá šipka). Měřítko 200 nm.



**Obrázek 4. 6. 11 (A-F):** „Desmosomy“ mezi membránou bičíku a membránou peritragelární kapsy (světle fialové šipky). Mezi membránou bičíku jedné buňky a cytoplazmatickou membránou druhé buňky byly zaznamenány „hemidesmosomy“ (D a E; tmavě fialové šipky). Na obrázku F je také přítomna invaginace membrány FP, vakuoly (červená šipka) a přídružené MT (zelená šipka). Měřítko: A-C, F – 200 nm; D-E – 1  $\mu$ m.

#### 4. 7 Studium hostitelské specifity *Herpetomonas tarakana*

Pro stanovení hostitelské specifity jednohostitelského trypanosomatida *H. tarakana* původně izolovaného z rusce laponského (*Ectobius lapponicus*) z čeledi Ectobiidae bylo postupně v laboratorních podmínkách provedeno dvanáct experimentálních infekcí s dospělci švábů náležících do sedmi druhů šesti odlišných rodů. Pro infekce byli vybráni jednak zástupci stejné čeledi (Ectobiidae), ze který byl parazit izolován, a dále pak tři

odlišných čeledí: Blaberidae, Corydiidae a Blattidae. Podrobný přehled použitých švábů k experimentálním infekcím viz níže a přehledný graf viz **obr. 4. 7. 1** V rámci prvních tří infekčních pokusů byla infekce kontrolována pouze světelnou mikroskopií, u ostatní navíc i pomocí nested PCR.

Švábi šedí (*Nauphoeta cinerea* – Blaberiidae) odchyceni na Stanici přírodovědců (Praha). S tímto druhem byly provedeny dva experimentální pokusy (první s čtrnácti jedinci, druhý s třinácti jedinci), při kterých švábi hladověli osm dní. Infekce vymizely ze všech švábů do čtrnácti dnů (PCR kontrola byla provedena pouze při druhé infekci).

Švábi američtí (*Periplaneta americana* – Blattidae) odchyceni na Stanici přírodovědců (Praha). S tímto druhem byly provedeny dvě experimentální infekce. V obou případech švábi hladověli dvanáct dní. V prvním pokusu, ve kterém proběhly kontroly pouze světelnou mikroskopií, bylo nakaženo čtrnáct jedinců a infekce ze všech vymizela do sedmého dne. V druhém pokusu bylo infikováno 27 jedinců a všichni švábi byli negativní až čtrnáctý den (kontrola byla provedena světelnou mikroskopií i PCR).

Švábi obecní (*Blatta orientalis* – Blattidae) z chovu Katedry zoologie (původně synantropní švábi odchyceni ve Varně). Po třinácti dnech hladovění bylo infikováno dvacet jedinců, ze kterých se infekce vytratila do čtrnácti dnů.

Švábi kapucíni (*Ergaula capucina* – Corydiidae) z chovu Katedry zoologie (laboratorní linie bez určení původu). Po sedmi dnech hladovění bylo infikováno 32 jedinců a do čtrnácti dnů infekce vymizela.

Rusi domácí (*Blattella germanica* – Ectobiidae) z chovů Katedry zoologie a Výzkumného ústavu rostlinné výroby (původně synantropní švábi odchyceni v Pekingu). V obou experimentech švábi hladověli šest dní a PCR kontrola byla provedená až při infekcích se šváby z VÚRV. V prvním pokusu (21 jedinců, katedra Zoologie) se infekce vytratila do čtrnácti dnů. Podobně jako v druhém pokuse, ve kterém bylo 18 švábů z 29 negativní při kontrole již sedmý den.

Rusi *Blattella* sp. (Ectobiidae) z chovu Katedry zoologie (původně volně žijící švábi odchyceni v Etiopii). Po sedmi dnech hladovění bylo infikováno 28 jedinců, z nichž už při kontrole sedmý den bylo 21 negativních, a ze zbytku infekce zmizela do čtrnácti dnů.

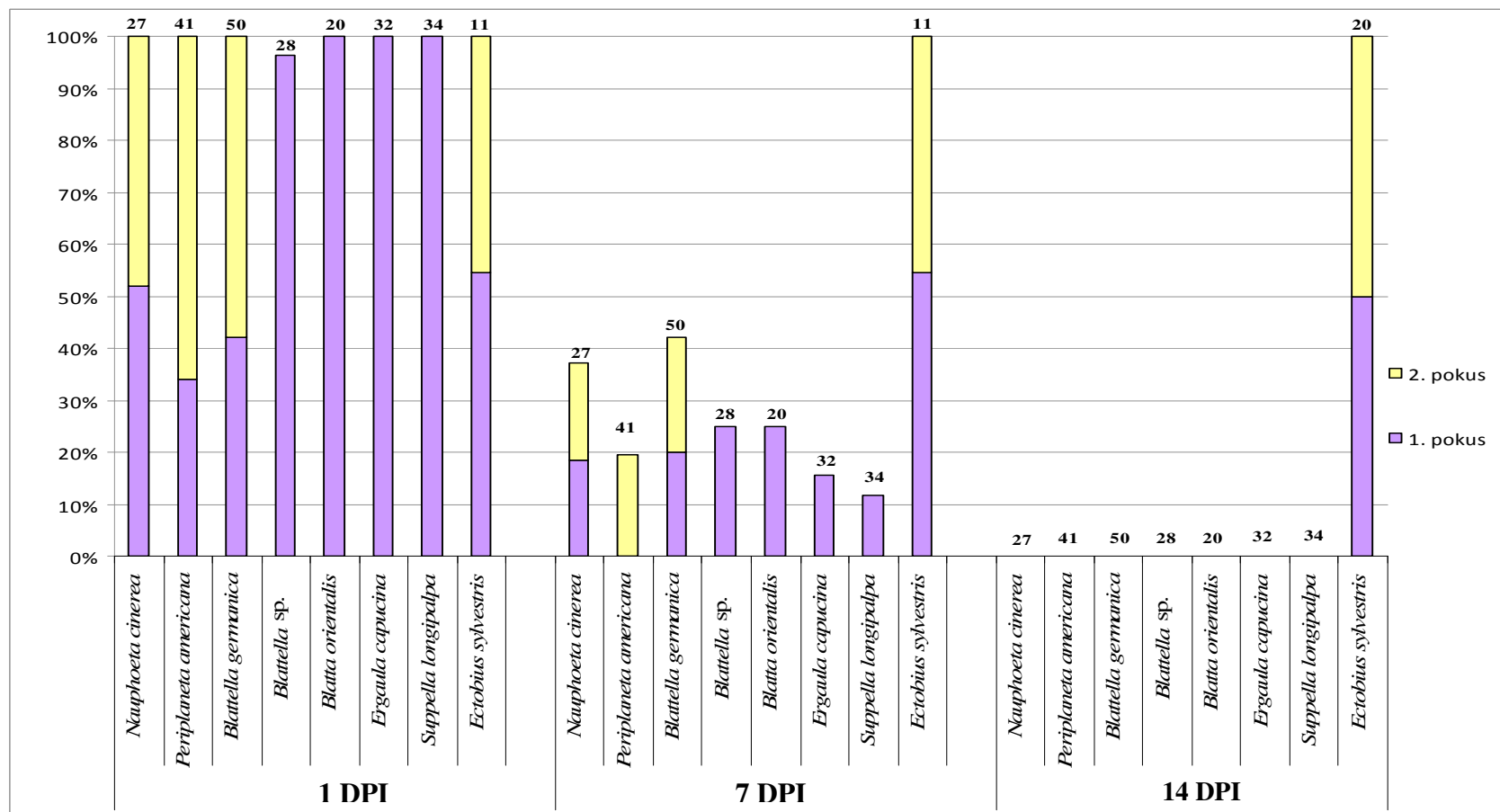
Švábi hnědopruzí (*Supella longipalpa* – Ectobiidae) z chovu Katedry zoologie (původně synantropní švábi odchyceni v Athénách). Po sedmi dnech hladovění bylo infikováno 34 jedinců a nákaza vymizela z třiceti jedinců do sedmi dnů, ze zbylých švábů do čtrnácti dnů.

Rusci lesní (Ectobiidae) odchyceni na lokalitě Nad Šobesem (NP Podyjí) a z okolí Divoké Šárky (Praha)<sup>18</sup>. V případě obou experimentálních infekcí rusci hladověli pět dní a celkem tři kontroly byly provedeny pitvou střev, vyšetřením světelnou mikroskopií a PCR. V prvním případě (rusci z NP Podyjí) bylo infikováno 22 jedinců, při první kontrole (1 DPI) bylo vypitváno šest jedinců, dalších šest bylo vypitváno při druhé kontrole (7 DPI) a nakonec (14 DPI) bylo vypitváno deset zbývajících jedinců. V druhém případě (rusci z okolí Divoké Šárky) bylo vypitváno pět jedinců 1 DPI, dalších pět jedinců 7 DPI a zbylých deset jedinců 14 DPI. Ve střevě švábů z obou experimentů se nacházely herpetomonády při všech kontrolách.

---

<sup>18</sup> Na obou těchto lokalitách byli všichni pitvaní jedinci negativní, a proto jsme se rozhodli je využít pro experimentální infekce (jako pozitivní kontrolu).





**Obrázek 4. 7. 1:** Podíl nakažených jedinců 1., 7. a 14. den po infekci (DPI) u osmi různých druhů švábů, u kterých byla provedena experimentální infekce druhem *Herpetomonas tarakana* OSR-18 CL2 (původně izolovaného z druhu *Ectobius laponicus*). První pokusy s druhy *Nauphoeta cinerea*, *Periplaneta americana* a *Blattella germanica* byly kontrolovány pouze světelnou mikroskopií, u druhu *Ectobius sylvestris* byly kontroly provedeny pouze pitvou (ne vyšetřením trusu). Čísla ve sloupcích značí celkový počet kontrolovaných švábů.

## 5 DISKUZE

### 5.1 Švábi z chovů i odchytů a jejich parazitologické vyšetření

V průběhu let 2014 – 2017 bylo v rámci této diplomové práce získáno z šesti různých chovů, čtyř synantropních prostředí a osmi přírodních lokalit ČR celkem 784 švábů. Z nich bylo 510 jedinců vyšetřeno na přítomnost kinetoplastid (se zaměřením na trypanosomatida) a 274 jedinců bylo využito pro experimentální infekce (resp. studii hostitelské specifity herpetomonády *Herpetomonas tarakana* podrobněji popsané v této práci a v publikaci Yurchenko et al., 2016 - viz **příloha č. 1**).

Švábi z chovů (179 pro vyšetření / 164 pro experimentální infekce) byli předem druhově určeni chovatelem. U sedmi druhů z chovu Katedry zoologie a dvou druhů z chovu Jiřího Hromádky byl zjištěn i původ a rok založení příslušné kolonie. Pět chovů bylo založeno původně ze synantropních druhů a ve dvou případech byl chov vytvořen dokonce z volně žijících druhů. Žádné zástupce trypanosomatid se v chovaných švábech nepodařilo nalézt, pouze v jedné dospělé samici rusa domácího z chovu Katedry zoologie, který byl založen ze synantropních jedinců odchycených v Pekingu roku 2013, byla zjištěna infekce blíže neurčeným druhem rodu *Bodo*. Příslušníci rodu *Bodo* jsou v běžných podmínkách volně žijící zástupci kinetoplastid z řádu Eubodonida a podtřídy Metakinetoplastina (Moreira, 2004; D'Avila-Levy et al., 2009; Lukeš et al., 2014; Adl et al., 2012) obývající různé vodní prostředí, většinou více či méně znečištěné organickými látkami. Vzhledem k několika nálezům rodu *Bodo* v různých hostitelích (Maslov and Simpson, 1995; Simpson et al., 2006; Vandersea et al., 2015) lze uvažovat i ve výše zmíněném případě o specifickém dlouhodobém výskytu ve švábech hostitelích, nelze ale ani vyloučit možnost, že se jednalo pouze o krátkodobou pasáž z vnějšího prostředí.

Cílem odchytů švábů nebylo zmapování výskytu druhů trypanosomatid v jednotlivých oblastech České republiky, ale získání informací o dalších potenciálních hostitelích monoxenních trypanosomatid. Celkem bylo odchyceno 172 synantropních švábů (104 pro vyšetření a 68 pro experimentální infekce) ze skleníků a terárií Stanice přírodovědců v Praze, expozice želv zoologické zahrady v Praze, expozice krokodýlů zoologické zahrady v Plzni a prostorů zvířetníku Katedry parazitologie. V těchto prostorech byly nalezeny dospělci i nymfální stádia čtyř snadno systematicky zařaditelných

druhů švábů: švábi australský (*Periplaneta australasiae*), švábi americký (*Periplaneta americana*), švábi šedí (*Nauphoeta cinerea*) a rusi domácí (*Blattella germanica*). V žádném z těchto případů se švábi nevyskytovali v obytných prostorách, nicméně skleníky a terária splňovaly veškeré nároky na vlhko, teplo a potravní zdroje, které tyto synantropní druhy vyžadují (podrobněji viz Cochran and Scheme, 1999).

Synantropní druhy švábů jsou ideálními přenašeči lidských a zvířecích patogenů (viz **tab. 2. 2. 1**; Roth and Willis, 1960). V průběhu mikroskopického vyšetření střev jsem ve všech švábech (chovaných i volně žijících) zaznamenala infekce různými bakteriemi. Ve všech synantropních a některých chovaných jedincích byla nalezena vajíčka i dospělci roupů, trofozoiti hromadinek, trofozoiti různých zástupců parabazal, cysty améb a nálevníci druhu *Nyctotherus ovalis*. Pro moji práci však další podrobnější diagnostické analýzy těchto parazitů nebyly důležité, navíc se ve všech uvedených případech jedná s největší pravděpodobností o vlastní parazity švábů, kteří nejsou přenosní na jiné živočichy. Ačkoli mikroskopické vyšetření celkem 56 švábů amerických, odchycených na Stanici přírodovědců, neprokázalo žádnou infekci trypanosomatidy, byla ze dvou jedinců získána sekvence SSU s 98% podobností s druhem *Dimastigella trypaniformis* (Neobodonida, Metakinetoplastina), který byl v minulosti izolován mj. i ze střeva termita *Mastotermes darwiniensis* (Berchtold et al., 1994; Breunig et al., 1993; Moreira, 2004; Lukeš et al., 2014). Termiti (Isoptera / Termitoidae) jsou dle recentní molekulární a genetické studie řazeny do nadčeledi Blattoidea společně s čeledí Blattidae, do které patří i švábi rodu *Periplaneta* (tedy i šváb americký). Nicméně druh *Dimastigella trypaniformis* se běžně nachází ve sladké vodě, půdě a často je zaznamenán i ve vlhkých podestýlkách, které jsou kontaminované močí zvířat. Někteří autoři tímto zdůvodňují právě zmíněný nález v termitech (Vickerman, 1978, 2000). Je tedy vysoce pravděpodobné, že i v případě švábů se jedná o kontaminaci z prostředí. V ostatních synantropních švábech nebyla zaznamenána žádná další infekce kinetoplastidy.

Lokality pro odchyt volně žijících švábů ČR byly vybrány v souladu s historickými údaji o výskytu jednotlivých druhů, které jsou přehledně popsány na portálu Informačního systému ochrany přírody (<http://portal.nature.cz>). Na území ČR se ve volné přírodě nachází pět druhů švábů: rusec *Ectobius erythronotus nigricans*; rusec síťnatokřídý (*Phyllodromica megerlei*), rusec plamatý (*Phyllodromica maculata*), rusec laponský (*Ectobius lapponicus*) a rusec lesní (*Ectobius sylvestris*). Všichni patří do čeledi Ectobiidae (Kocarek et al., 1999; Kočárek et al., 2005). Z okolí Divoké Šárky, Prokopského údolí, terénní stanice Ruda, Mikulovska a NP Podyjí bylo odchyceno celkem 269 švábů, kteří

náleželi ke třem druhům – rusec lesní, rusec laponský a rusec plamatý. Ze skupin švábů odchycených z lokalit v okolí Divoká Šárky a Nad Šobesem (NP Podyjí), kteří byli při mikroskopickém vyšetření i PCR negativní, byla část jedinců (celkem 42) použita pro experimentální infekce (viz **kap. 5. 4**).

Všichni dospělci rusců (tj. 210, z toho 42 využito pro experimentální infekce) byli kategorizováni do druhů na základě morfologických znaků pomocí determinačních klíčů (viz **kap. 3. 1. 1**). Nymfální stádia (tj. 14) byla systematicky zařazena pomocí barcodingové analýzy tří jedinců ze skupiny odchycené na konci září z okolí Divoké Šárky a ze skupiny odchycené na konci října z okolí Terénní stanice Ruda. Švábi z obou skupin byli určeni jako rusci lesní. Zbylá nymfální stádia (tj. 45) byla určena do druhů podle dospělců, kteří se s nimi nacházeli na stejném místě v dané odchytové lokalitě, protože o švábech je známo, že jsou to většinou tvorové sociální, žijící ve skupinách složených z jedinců vlastního druhu. Dle dostupné literatury mi není znám popis takové agregace švábů v přirozených podmínkách, která by byla konstituována z jedinců odlišných druhů. Etologická pozorování v laboratořích navíc ukázala, že sociální druhy švábů preferují skupinu tvořenou z jedinců vlastního druhu a také, že se jedinci dvou druhů z uměle vytvořených smíšených skupin segregují v prostoru (Roth and Cohen, 1973; Leoncini and Rivault, 2005; Bell et al., 2007; Varadínová et al., 2010). Tento způsob segregace jsem zaznamenala například při odchycích na jedné lokalitě v okolí Divoké Šárky, kde se nacházely na dvou cca 10 metrů od sebe vzdálených místech dvě skupiny švábů. První skupinu tvořili rusci laponský a druhou rusci lesní. Podobně i v lokalitě Havranické vřesoviště byli jasně oddělené skupiny rusců lesních na okraji lesa a rusců plamatých na osluněné stráni pod keři.

V první polovině května roku 2016 bylo odchyceno celkem 96 nymfálních stádií volně žijících švábů ze čtyř vzdálených lokalit NP Podyjí (Nad Šobesem, Sealsfieldův kámen, Listnatý les Havraníky a Havranické vřesoviště). V předchozích letech ve stejnou dobu byli na těchto lokalitách mými kolegy z katedry Zoologie odchytáváni pouze dospělci. Klimatologická data pořízená koncem dubna na klimatologické stanici v Kuchařovicích (10 km severovýchodně od míst mých odchytů, ± ve stejné nadmořské výšce 334 m) ukazují na extrémní teplotní odchylky od dlouhodobého průměru z let 1971–2000. Na konci dubna roku 2016 byly teploty na celém území ČR abnormálně nízké. Odchylna od normálu činila  $-5,0$  °C a odchylna teplotního minima v přízemní vrstvě (měřena cca 5 cm nad zemským povrchem) činila  $-5,6$  °C. Během srovnávacího období nikdy k tak výrazným odchylkám nedošlo a lze tak předpokládat, že to byl důvod

opožděného vývoje hmyzu včetně švábů (informace mi sdělil Mgr. Jan David Reitschläger z ČHMÚ). Nicméně odchycení jedinci byly v posledním nymfálním instaru a během 1–2 týdnů, ve kterém byli umístěni do sterilních boxů v prostoru naší laboratoře, došlo k metamorfóze a následnému určení do druhů.

V NP Podyjí byli švábi odchyceni ze čtyř lokalit. Všichni jedinci z lokality Nad Šobesem byly negativní na trypanosomatida. V zbylých třech lokalitách (Sealsfieldův kámen, Listnatý les Havraníky a Havranické vřesoviště) byli nalezeni infikovaní šváby. Přestože při mikroskopickém vyšetření švábů odchycených z těchto tří lokalit bylo 29 jedinců pozitivních na infekci trypanosomatidami (30% prevalence; celkově ze všech (tj. 510) vyšetřených švábů 6% prevalence), PCR potvrdila pouze 16 pozitivních vzorků (17% prevalence, celkově 3% prevalence) a dokonce jsme pomocí PCR nezachytili ani středně silnou infekci (++) v jednom jedinci rusce lesního (vzorek S389). Není jasné proč se PCR nezdařila. Mohlo například dojít k přenesení nedostatečného množství buněk do elučního pufru (pro následnou izolaci DNA), protože část střev byla umístěná do kultivačního média. Nicméně v tomto případě se nezdařila ani kultivace a nemohlo tak dojít k izolaci DNA z kultury. Získané sekvence SSU potvrdily, že se ve všech případech PCR pozitivních rusců z NP Podyjí jedná o druh *Herpetomonas tarakana*, který byl nalezen i ve čtyřech z celkového počtu sedmi jedinců rusce plamatého z Mikulovska. Původně byl tento druh herpetomonády izolován z jedinců rusce laponského odchycených v Šilheřovicích (Morava), rusce plamatého odchycených v Štramberku (Morava) a rusců *Phyllodromica chladeki* odchycených v Muráni (SR) (Yurchenko et al., 2016 - viz **příloha č. 1**). Je tedy otázkou na jakých podmínkách je závislá geografická distribuce druhu *Herpetomonas tarakana*. Na základě našich dat je pravděpodobně výskyt *H. tarakana* omezen na oblast Moravy (a dále pak na východ) a v Čechách se nevyskytuje. Nicméně pro potvrzení této hypotézy by bylo potřeba analyzovat větší množství švábů z většího počtu lokalit.

Pro vývoj patogenů (vč. kinetoplastid) je obecně nejvhodnější střední a zadní střevo švábů (Cruden and Markovetz, 1984; Anjali, 2016), což se potvrdilo i při mém mikroskopickém vyšetření. Zadní střevo je vystlané kutikulou (Anjali, 2016), která se při metamorfóze svléká. Je otázkou, zda tato skutečnost negativně neovlivňuje infekce trypanosomatidy. U švábů z NP Podyjí jsme pozorovali, že se infekce z volně žijících švábů po metamorfóze nemizí. Odchycení švábi se během jednoho týdne svlékly ve sterilních boxech umístěných v laboratoři a ve 29 jedincích z celkového počtu 96 byly zaznamenány buňky trypanosomatid (viz výše). Není však jasné, zda se při svlékání např. dramaticky nesníží počet trypanosomatid apod. Přenos parazitů mezi šváby usnadňuje fakt,

že žijí v agregacích (viz výše) a nově vylíhlá nymfální stádia se živí z části trusem dospělců. Pokud tedy nejsou infikováni dospělci, tak se infekce většinou neobjeví ani v další generaci (Kopanic and Schal, 1999). Nejpravděpodobnějším způsobem šíření trypanosomatid (i dalších parazitárních infekcí) mezi populacemi švábů je tedy koprofágie. U švábů však byla potvrzená i nekrofágie, kanibalismus a predace, jako vhodný způsob přenosu patogenů (Cornwell, 1968; Cochran and Scheme, 1999; Kopanic and Schal, 1999; Tabaru and Watanabe, 2003).

V rámci této práce lze o přenosu trypanosomatid prostřednictvím nekrofágie nebo predace uvažovat v případě infekce nymfálního stádia rusce laponského (z Prokopského údolí) critidií *Crithidia fasciculata*, jejíž přirození hostitelé patří do řádu Diptera (Podlipaev, 1990). Šváb se tedy pravděpodobně nakazil pozřením infikovaného dvoukřídlého hostitele. Vzhledem k potravním strategiím švábů (a sociálnímu způsobu života) jsme však očekávali mnohem vyšší prevalence infekcí jak specifickými, tak i nespecifickými druhy trypanosomatid (získanými z potravy).

U volně žijících švábů odchycených z okolí Divoké Šárky nebyla potvrzena žádná infekce trypanosomatidy. Výjimkou byli pouze tři dospělí jedinci (jedna ♀ a dva ♂♂) rusce lesního odchycení v červenci roku 2016, v jejichž proktodeu byla mikroskopicky nalezena slabá infekce (+), ale následná PCR byla bohužel negativní. Je tedy možné, že infekce byla natolik slabá, že jí PCR nedokázala zachytit nebo také mohlo dojít k chybné morfologické determinaci a pozorované buňky nenáležely mezi kinetoplastida. Ze dvou nymfálních stádií rusce lesního (ze stejné lokality) byly získány sekvence SSU s 99% podobností s druhem *Dimastigella trypaniformis* a z jednoho nymfálního stádia stejného druhu byla získána sekvence SSU, která byla pouze z 89% identická s rodem *Dimastigella*. Je tedy otázkou, zda k tomuto rodu náleží či nikoliv, jednoznačně se však jedná o zástupce bodonid. Nicméně je zde malý rozdíl oproti předchozímu případu, kdy byl druh podobný dimastigele *Dimastigella trypaniformis* nalezen ve dvou jedincích švába amerického, který patří do stejné nadčeledi jako termiti. Rusci lesní jsou totiž řazeni do čeledi Ectobiidae a nadčeledi Blaberoidea, která je od předchozí skupiny fylogeneticky vzdálená. Do stejné nadčeledi patří také čeleď Blaberidae, z které pochází dva volně žijící blíže neurčené druhy švábů *Rhabdoblatta* sp. a *Gyna* sp. Z kultury Z310 (*Rhabdoblatta* sp.) byla získána sekvence SSU se 100% identitou s druhem *Dimastigella trypaniformis* a z kultury Z323 (*Gyna* sp.) byly buňky určeny jako *Phanerobia* cf. *pelophila* (99% shoda; dřívější označení pro tento druh bylo *Dimastigella* sp. (von der Heyden et al., 2004)). Oba dva zástupci z volně žijících rodů patří, stejně jako v předchozím případě, do podtřídy

Metakinetoplastina. Opět se tedy dá předpokládat, že k infekci došlo prostřednictvím kontaminace z prostředí. Nicméně doposud byly dimastigely *D. trypaniformis* známé jako komenzálové pouze ze střev termitů (Dolezel et al., 2000), kteří patří se šváby do jednoho řádu Blattodea. Je tedy otázkou zda se jedná pouze o krátkodobé pasáže nebo zda termity a švábi mohou být pro bodonida vhodnými dlouhodobými hostiteli.

## 5. 2 Kultivace trypanosomatid

Poněkud zvláštní fenomén jsem zaznamenala při axenizaci kultur buněk OSR-18 a OSR-27. Buňky se zprvu velmi dobře množily pouze v kontaminované kultuře s dostatkem plísní. Ve chvíli, kdy jsem buňky (OSR-18) po axenizaci přenesla do čistého média (BHI + 10% FCS, hemin a amikin), přestaly se množit. Stejně se také přestaly množit buňky v původní kultuře buněk OSR-27, která po odstranění plísně zanikla. K podobnému jevu došlo i při pokusech vytvořit axenickou kulturu buněk *Blastocrithidia papi* (Frolov et al., 2017). Jakmile byla kultura očištěna od kontaminací, buňky se přestaly dělit a nakonec uhynuly, zatímco původní kultura s plísněmi byla úspěšně namnožena (Frolov et al., 2017). Nicméně v případě kultury buněk OSR-18 jsme tuto komplikaci vyřešili přenesením axenizovaných buněk do kondiciovaného média. Nakonec se povedlo tuto kulturu úspěšně axenizovat, namnožit a vytvořit z ní klonální kulturu OSR-18 CL2, která se již bez problémů množí v normálním růstovém mediu.

## 5. 3 Morfologie buněk a ultrastruktura bičíku *Herpetomonas tarakana*

Typické morfotypy pro rod *Herpetomonas* jsou opistomastigoti, buňky s dlouhou periflagelární kapsou a kinetoplastem uloženým za jádrem (Vickerman, 2000; Maslov et al., 2013). Nicméně herpetomonády tvoří v hostitelích velmi často také promastigoty (Rogers and Wallace, 1971; Santos et al., 2005; Zidkova et al., 2010; Borghesan et al., 2013). V naší kultuře OSR-18 CL2 i ve střevech experimentálně nakažených volně žijících švábů tvořily absolutní většinu (tzn. > 90 % buněk) promastigoti a choanomastigoti. Promastigoti jsou typickými morfotypy pro buňky rodu *Leptomonas*, *Phytomonas* a *Leishmania*. Choanomastigoti jsou zase běžné a typické morfotypy pro rod *Crithidia*. Při sledování růstové křivky (viz **kap. 4. 5**) ubylo promastigotů pouze 3. – 5. den, kdy se den,

kdy se v kultuře objevily opistomorfy. Opistomorfy jsou podobné opistomastigotům, liší se pouze ve tvaru buňky a jsou typické pro trypanosomatida obsahující endosymbionty (Teixeira et al., 2011; Maslov et al., 2013), tj. pro rody *Angomonas* a *Strigomonas*. Poslední den měření (tj. 7. den po pasážování), kdy buňky procházely fází odumírání, se v kultuře objevily endomastigoti, kteří jsou zase běžní pro rod *Wallacemonas* (Maslov et al., 2013; Yurchenko et al., 2014; Kostygov et al. 2014). Podle všeho tedy druh *Herpetomonas tarakana* tvoří různé morfotypy, jejichž zastoupení a výskyt se mění v průběhu kultivace. Tyto údaje dokazují, že se jedná o další vysoce polymorfní druh, který vytváří i jiné morfotypy než opistomastigoty. Podobně byla polymorfie dokázána již v minulosti u dalších trypanosomatid (Yurchenko et al., 2008; Zidkova et al., 2010; Teixeira et al., 2011; Borghesan et al., 2013; Votýpka et al., 2013; Yurchenko et al., 2014) a bylo tak znovu potvrzeno, že morfologie buněk trypanosomatid není vhodným klasifikačním znakem pro taxonomii.

Pro TEM byla kultura odebírána pátý den, kdy se na roztěrech nejčastěji objevovaly choanomastigoti, opistomorfy a v menší míře také promastigoti. V rámci studie ultrastruktury herpetomonády *H. tarakana* byla u buněk fixovaných chemicky i mrazovou substitucí měřena výška kinetoplastu. V případě HPF byly hodnoty signifikantně vyšší (viz **obr. 4. 6. 2**) a pravděpodobně odpovídaly více realitě. Při kryometodách zůstává preparát zachován co nejlíže nativnímu stavu, protože okamžitá fixace vysokotlakým zamrazením zachová lépe morfologii buňky. Naopak při chemické fixaci pomocí glutaraldehydu se objevují fixační artefakty jako změna objemu, denaturace různých komponent vedoucí ke změně struktury nebo prostorové změny způsobené síťováním proteinů (Frankl et al., 2015).

Podobně jako v buňkách *Phytomonas davidi* a *Herpetomonas megaseliae* (Janovy et al., 1974; Cunha et al., 1984; Farina et al., 1986; Moreira-Leite et al., 1999) začíná paraxiální tyč (PFR) bičíku *H. tarakana* uvnitř periflagelární kapsy. Délka i jednotlivé oblasti periflagelární kapsy (FP) trypanosomatid se liší v závislosti na morfotypu buňky. FP je rozdělena na proximální a distální část tzv. límcem („collar“). U promastigotů leishmáníí *L. mexicana* prokázala analýza bičíku přítomnost PFR uvnitř FP, ale až za límcem. Dle předchozích studií ultrastruktury opistomastigotů *Herpetomonas megaseliae* se zdá, že je límec oproti promastigotům leishmáníí umístěn v hlubší části FP, a proto se nachází tak hluboko i PFR (Wheeler et al., 2016). U buněk *H. tarakana* byl zachycen podobný jev ve FP opistomorfů, kde lze vidět rozšířenou proximální oblast, náznak límce a dlouhou distální oblast neboli krček (viz **obr. 4. 6. 3**). Nicméně některé fotografie jiných



buněk naznačují opak. U choanomastigotů lze vidět PFR i za límcem v proximální oblasti (viz **obr. 4. 6. 4B**), ačkoli nelze vyloučit, že se nejedná o artefakt následkem fixace. Stejný případ můžeme také vidět i u další fotografie nedefinovaného morfotypu, kde PFR začíná v první třetině FP (viz **obr. 4. 6. 5**). Je tedy možné, že buňky studovaného druhu herpetomonády jsou značně polymorfní i v tomto ultrastrukturám znaku.

Přestože límec není na všech fotografiích buněk vždy zřejmý, v oblasti krčku FP se nachází membránová invaginace s 5ti až 10ti mikrotubuly a velkým množstvím vakuol směřujících do cytoplazmy v oblasti podél FP (viz **obr. 4. 6. 5, 4. 6. 6, 4. 6. 11F**). Tato struktura se velmi podobá cytostomu a cytofarynxu, které jsou popsány v buňkách *Crithidia fasciculata* (Brooker, 1971a). V critidiích byly navíc popsány i vakuoly, které se nacházely v matrix FP (podobně jako na **obr. 4. 6. 6**) a procházely endocytózou přes cytostom a cytofarynx do cytoplazmy (Brooker, 1971a; McConville et al., 2002). A stejně jako v případě critidií i u buněk *H. tarakana* je na příčném řezu bičkem potvrzen kromě přítomnosti skupiny mikrotubulů patrně náležících k cytofarynxu i výskyt čtyř dalších mikrotubulů blízko membrány FP (viz **obr. 4. 6. 7, 4. 6. 8, 4. 6. 9B**). Tyto mikrotubuly se vždy nacházely v jedné řadě, těsně nahlučené vedle sebe a blízko membrány FP. Naopak mikrotubuly na opačné straně FP (přiřazované k cytofarynxu) jsou od sebe poměrně vzdálené a nachází se v různých pozicích vůči sobě i FP. Obě skupiny mikrotubulů jsem dokázala zachytit i na sérii řezů, které zaznamenaly délku FP v rozsahu cca 300 – 500 nm (viz **obr. 4. 6. 8**). Na opačné straně FP jsou na některých řezech zachycené jednotlivé mikrotubuly, které zřejmě náleží ke zmíněné skupině mikrotubulů asociovaných s cytofarynxem. V oblasti bazálního tělíska se v několika málo případech nacházel osamocený mikrotubul, ale bohužel nebylo jasné, ke které skupině náležel.

Není rovněž zřejmé, zda zmíněná čtveřice mikrotubulů souvisí s mikrotubulárním kvartetem, který byl nalezen například v blízkosti FP leishmáníí *L. mexicana* (Wheeler et al., 2016), buněk *Paratrypanosoma* (Skalický et al., 2017), trypanozomy *Trypanosoma brucei* (Lacomble et al., 2009) nebo trypanozomy *Trypanosoma cruzi* (Alcantara et al., 2014). Pro podrobnější analýzu mikrotubulů v buňkách *H. tarakana* by bylo do budoucna vhodné provést sériovou elektronovou tomografii, pomocí které byly definované všechny skupiny mikrotubulů ve výše zmíněných druzích trypanosomatid.

Pozorované „desmozomy“ byly umístěné mezi membránou FP a membránou bičku, která se v určité části krčku „nafoukla“. „Desmozomy“ byly umístěné po obou stranách bičku (viz **obr. 4. 6. 4, 4. 6. 5, 4. 6. 6, 4. 6. 11B**). Na některých snímcích jsem zaznamenala, že jedna strana FP, kde se nachází potenciální cytostom-cytofarynx komplex,

je delší a desmozomy jsou přítomné ze strany membrány bičíku i ze strany membrány FP po celé délce (viz obr. 4. 6. 5, 4. 6. 6, 4. 6. 11F). Elektrodenzní plaky měly tvar čtvercový nebo obdélníkový, tedy podobný jako byl zaznamenán v případě „desmozomů“ buněk *Crithidia fasciculata* (Brooker, 1970). Úzké obdélníkové plaky rovněž vytvářely „hemidesmozomy“ mezi membránou bičíku jedné buňky a cytoplazmatickou membránou druhé buňky (viz 4. 6. 11D).

#### 5. 4 Studium hostitelské specifity *Herpetomonas tarakana*

Pro stanovení hostitelské specifity určitého druhu parazitů je důležité, aby infekce v experimentálních podmínkách nebyly výrazně odlišné od infekcí hostitelů odchycených z přírody (Poulin and Keeney, 2008). Dále je za potřebí mít k dispozici hostitele (v našem případě kolonii švábů), u které víme, že není přirozeně infikovaná parazity a po nákaze nebude vystavena náhodné kontaminaci (Becker, 1923b). Při experimentálních infekcích s volně žijícími druhy švábů jsem se snažila v laboratoři vytvořit ty nejvhodnější podmínky, protože druh *H. tarakana* byly původně izolován z volně žijícího rusce laponského (*Ectobius lapponicus*), a u tohoto druhu (ani u dalších druhů rodu *Ectobius*) neexistuje žádná chovná kolonie. Do sterilních boxů jsem vkládala složené kusy filtračního papíru jako náhradu dubového a jiného listí, ve kterém švábi žijí, a také jsem se snažila dodržet potřebnou vlhkost (resp. snažila jsem se zajistit švábům stálý zdroj vody s výjimkou času před samotnou infekcí). Boxy byly pravidelně čištěné a desinfikované pro zamezení případné kontaminace (tj. re-infekce) vlastním infikovaným trusem. U odchycených synantropních švábů amerických (*P. americana*) a švábů šedých (*N. cinerea*) nešlo vždy hromadění trusu v boxech zabránit. Nákaza se však u těchto druhů nevyskytovala nikdy déle než do 7. DPI, takže nebylo nutné zvažovat možnost dlouhodobé perzistence infekce v důsledku re-infekcí z vlastního trusu. U švábů také především při nedostatku potravy dochází často kromě koprofágie ke kanibalismu a nekrofáгии (viz výše). Tento fakt experimentální infekce mírně komplikoval, protože bylo nutné, aby švábi před experimentální infekcí dostatečně vyhladověli a vyžízneli, jinak nebyli ochotni infikovanou potravu přijímat (resp. bylo obtížné její příjem kontrolovat). Nicméně šváby jsem pravidelně kontrolovala a jakmile jsem zaznamenala úhyn, byla švábům podána infekční potrava. Z tohoto důvodu jsem vždy před experimenty připravila dvě kultury herpetomonád nachystané k infekci švábů. Jedna z nich byla založena o cca dva dny dříve

a v případě úhynu tak bylo možné švábům ihned podat dobře narostlé inokulum buněk. Experimentální infekce byly provedené celkem s 274 jedinci sedmi druhů švábu ze čtyř čeledí: Blaberidae (27 synantropních švábů šedých), Blattidae (41 synantropních švábů amerických), Corydiidae (32 švábů kapucínů – *Ergaula capucina*) a Ectobiidae. V rámci čeledi Ectobiidae (kam patří i původní hostitel herpetomonády *H. tarakana*, rusec laponský) byly experimentální infekce provedeny jednak s 42 rusci lesními (odchycených pro experimentální infekce ze dvou lokalit), 50 rusi domácími (*Blattella germanica*) získaných ze dvou chovů, 29 rusi *Blattella* sp. pocházejících z jednoho chovu a 34 švábů hnědopruhých (*Supella longipalpa*) získaných též z jednoho chovu. Při kontrolním odběru trusu 7. den po infekci nákaza výrazně poklesla, a to u všech druhů švábů s výjimkou rusců lesních. V případě prvního pokusu se šváby americkými nákaza dokonce zcela vymizela. Při pitvách 14. den po infekci bylo zjištěno, že nákaza u všech druhů švábů (opět s výjimkou rusců lesních) zcela vymizela (viz **obr. 4. 7. 1**). Tento výsledek poukazuje na dvě skutečnosti. Jednak potvrzuje původní hypotézu o vysoké hostitelské specifitě *H. tarakana* (Yurchenko et al., 2016 - viz **příloha č. 1**). Jednak je to důkaz, že stádia v kultuře OSR-18 CL2 jsou stále infekční pro hostitele. V průběhu některých experimentálních infekcí bylo dokázáno, že jednohostitelská trypanosomatida ovlivňuje kultivace a buňky z kultury jsou méně infekční v porovnání s nákazou hostitelů za přirozených podmínek (Tieszen and Molyneux, 1989). Dokonce v případě druhu *Jaenimonas drosophilae* se infekce zdařila pouze pokud se larvy octomilek infikovaly buňkami trypanosomatid získaných z těl nakažených dospělých octomilek, naopak při infekci stadii parazita z kultury se larvy nenakazily (Hamilton et al., 2015). Nicméně v našem případě byly infekce vhodného hostitelského druhu švába prostřednictvím kontaminované potravy úspěšné. Můžeme tedy předpokládat, že prostřednictvím koprofágie, kanibalismu, nekrofágie a predace dochází k šíření tohoto druhu herpetomonády mezi jedinci dané populace švábů ve volné přírodě.

Pro ideální experimentální infekci je předpokladem, že paraziti, kterými se hostitel perorálně nakazí přes kontaminovanou potravu, se dokáží usadit v trávicím traktu, vytvářet stejné morfotypy jako v původním hostiteli, množit se a budou infekční pro další jedince. (Becker, 1923b). U všech experimentálně nakažených rusců byla 14. den po nazeze potvrzena ve středním a zadním střevě střední (++) až silná infekce (+++) druhem *H. tarakana*. Z morfotypů převládaly promastigoti a choanomastigoti (viz **obr. 4. 4. 2**), podobně jako v kultuře.

Bohužel experimentální infekce zaměřené na jiný způsob přenosu než perorální, např. transovariální (podrobně viz **kap. 2. 3. 2**), by pravděpodobně nebylo možné uskutečnit a pokud ano, tak pouze v krátkém časovém rozmezí ( $\pm$  v průběhu 3-4 týdnů), neboť volně žijící šváby z rodů *Ectobius* i *Phyllodromica* zřejmě není možné chovat v zajetí. Moji kolegové z Katedry zoologie se několikrát pokusily vytvořit vhodné podmínky k chovu těchto švábů odchycených v přírodě na území ČR, ale pokaždé bez úspěchu. Zřejmě je pro namnožení u těchto švábů potřebná hibernace (Kotýková-Varadínová, nepublikováno). Další komplikací je i zvýšená citlivost volně žijících rusců na manipulaci. Odchyceným jedincům rusce lesního nebylo možné při experimentálních infekcích odebrat trus bez poškození vedoucího k následnému úhynu. Proto u těchto rusců musela být zvolena kontrola úspěšnosti experimentálních infekcí prostřednictvím pitev.

## 6 ZÁVĚR

V průběhu let 2014 – 2017 bylo v rámci této diplomové práce získáno 784 švábů z šesti různých chovů, čtyř synantropních prostředí a osmi přírodních lokalit ČR. Tito švábi systematicky náleželi do čtyř čeledí, 26 rodů a 36 druhů.

Infekce trypanosomatidy byla zaznamenána ve střevech pouze volně žijících švábů. Celková prevalence nákazy trypanosomatidy v 510 vypořádaných jedincích činila pouhá 4 %, avšak u rusců (přirozených hostitelů druhu *Herpetomonas tarakana*) dosahovala prevalence 9%. Kromě herpetomonády *H. tarakana* byla v jednom rusci plamatém (*Phyllodromica maculata*) nalezena infekce druhem *Crithidia fasciculata*. Dále byl v jednom jedinci rusa domácího (*Blattella germanica*) z chovu zjištěn výskyt blíže neurčeného druhu rodu *Bodo*. Ze dvou švábů amerických (*Periplaneta americana*) a tří rusců lesních (*Ectobius sylvestris*) byly získány sekvence SSU s různou podobností k rodu *Dimastigella*. Sekvence ze dvou synantropních švábů amerických se shodovala z 98 % a sekvence ze dvou dalších volně žijících rusců lesních se shodovala z 99% s druhem *Dimastigella trypaniformis*. Sekvence z pátého volně žijícího rusce lesního měla shodu s rodem *Dimastigella* pouze z 89 %.

Kultura buněk OSR-18 byla axenizována a rozklonována. Ze semiklonální kultury buněk OSR-18 CL2 byly získány sekvence SSU, GAPDH a SL genů. U nově popsánoho druhu *Herpetomonas tarakana* byly určeny a popsány základní morfotypy a stanovena růstová křivka buněk v kultuře.

V buňkách *Herpetomonas tarakana* (kmen OSR-18 CL2) byly pomocí transmisní elektronové mikroskopie popsány ultrastruktury bičíku a změřena výška kinetoplastu. Okolo membrány bičíku byla zaznamenána struktura připomínající „collarete“. Proximální a distální oblast periflagelární kapsy odděloval límec „collar“. V oblasti krčku byla zachycena membránová invaginace s mikrotubuly a velkým množstvím vakuol připomínající cytotom-cytofaryngeální komplex. Tato skupina mikrotubulů se na příčných řezech (vč. sériových) nacházela v blízkosti periflagelární membrány v nepravidelném uspořádání. Dále byla okolo periflagelární membrány, a to i v sérii řezů, zaznamenána čtveřice těsně nahlučených mikrotubulů. Obě dvě skupiny mikrotubulů se nacházely i v přechodné zóně bičíku. U bazálního tělíska byl zaznamenán výskyt jednoho blíže nezařazeného mikrotubulu.

Mezi membránou bičíku a membránou periflagelární kapsy byly přítomné

„desmozomy“ tvořené čtvercovými nebo obdélníkovými plaky. Úzké obdélníkové plaky také tvořily „hemidesmozomy“ mezi membránou bičíku jedné buňky a cytoplazmatickou membránou druhé buňky.

Experimentální infekce s druhem *Herpetomonas tarakana* (kmen OSR-18 CL2) byly provedeny v laboratorních podmínkách s 274 šváby ze čtyř čeledí, šesti rodů a sedmi druhů. Odběrem trusu byly zhotoveny kontroly první a sedmý den po infekci. Pitvy čtrnáctý den po infekci prokázaly úplnou ztrátu infekce u všech synantropních a chovaných druhů švábů. Pouze ve střevech rusců lesních (*Ectobius sylvestris*) se udržela infekce i čtrnáctý den po nákaze a herpetomonáda *Herpetomonas tarakana* (původně izolovaná z rusce laponského, *Ectobius lapponicus*) tak prokázala vysokou hostitelskou specifitu pravděpodobně na úrovni hostitelského rodu.

## 7 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Absalon, S., Blisnick, T., Bonhivers, M., Kohl, L., Cayet, N., Toutirais, G., Buisson, J., Robinson, D., and Bastin, P. (2008). Flagellum elongation is required for correct structure, orientation and function of the flagellar pocket in *Trypanosoma brucei*, *Journal of Cell Science*, 121, 3704–3716.
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A., and Spiegel, F. W. (2012). The revised classification of eukaryotes, *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59, 429–493.
- Alcantara, C. L., Vidal, J. C., de Souza, W., and Cunha-e-Silva, N. L. (2014). The three-dimensional structure of the cytostome-cytopharynx complex of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, *Journal of Cell Science*, 127, 2227–2237.
- Anderson, W. A., and Ellis, R. A. (1965). Ultrastructure of *Trypanosoma lewisi*: flagellum, microtubules, and the kinetoplast, *The Journal of Protozoology*, 12, 483–499.
- Anjali, S. (2016). Cockroach: Introduction, feeding and digestion in cockroach, *Zoology Notes* (<http://www.notesonzoology.com/cockroaches/cockroach-introduction-feeding-and-digestion-in-cockroach/2033>).
- Bailey, C. H., and Brooks, W. M. (1972). Histological observations on larvae of the eye gnat, *Hippelates pusio* (diptera: Chloropidae), infected with the flagellate *Herpetomonas muscarum*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 19, 342–353.
- Beams, H. W., Tahmisian, T. N., Devine, R., and Anderson, E. (1959). The fine structure of the nuclear envelope of *Endamoeba blattae*, *Experimental Cell Research*, 18, 366–369.
- Beard, C. B., Butler, J. F., and Greiner, E. C. (1989). In vitro growth characterization and host-parasite relationship of *Leptomonas pulexsimulantis* n. sp., a trypanosomatid flagellate of the flea *Pulex simulans*, *The Journal of Parasitology*, 75, 658–668.
- Beccaloni, G., and Eggleton, P. (2013). Order Blattodea. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.). Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness (Addenda 2013)., *Zootaxa*, 3703, 46–48.
- Becker, E. R. (1923a). Observations on the morphology and life history of *Herpetomonas muscae-domesticae* in North American muscoid flies, *The Journal of Parasitology*, 9, 199–213.
- Becker, E. R. (1923b). Transmission experiments on the specificity of *Herpetomonas muscae-domesticae* in muscoid flies, *The Journal of Parasitology*, 10, 25–34.
- Bell, W. J., Roth, L. M., and Nalepa, C. A. (2007). Cockroaches: ecology, behavior, and natural history, *Johns Hopkins University Press*, Baltimore, 230 pp.
- Berchtold, M., Philippe, H., Breunig, A., Brugerolle, G., and König, H. (1994). The phylogenetic position of *Dimastigella trypaniformis* within the parasitic kinetoplastids, *Parasitology Research*, 80, 672–679.
- Borghesan, T. C., Ferreira, R. C., Takata, C. S. A., Campaner, M., Borda, C. C., Paiva, F., Milder, R. V., Teixeira, M. M. G., and Camargo, E. P. (2013). Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea,

- Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies, *Protist*, 164, 129–152.
- Branche, C. (2006).** Conserved and specific functions of axoneme components in trypanosome motility, *Journal of Cell Science*, 119, 3443–3455.
- Brenner, R. J. (2002).** COCKROACHES (Blattaria), in: *Medical and Veterinary Entomology*, Academic Press, San Diego, 29–44.
- Breunig, A., König, H., Brugerolle, G., Vickerman, K., and Hertel, H. (1993).** Isolation and ultrastructural features of a new strain of *Dimastigella trypaniformis* Sandon 1928 (Bodonina, Kinetoplastida) and comparison with a previously isolated strain, *European Journal of Protistology*, 29, 416–424.
- Briscoe, M. S. (1971).** A survey of the protozoan fauna of the cockroach *Blaberus craniifer*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 17, 291 pp.
- Brooker, B. E. (1970).** Desmosomes and hemidesmosomes in the flagellate *Crithidia fasciculata*, *Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria: 1948)*, 105, 155–166.
- Brooker, B. E. (1971a).** The fine structure of *Crithidia fasciculata* with special reference to the organelles involved in the ingestion and digestion of protein, *Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria: 1948)*, 116, 532–563.
- Brooker, B. E. (1971b).** Flagellar attachment and detachment of *Crithidia fasciculata* to the gut wall of *Anopheles gambiae*, *Protoplasma*, 73, 191–202.
- Brooks, A. S. (1978).** Ultrastructure of the flagellar attachment site in three species of trypanosomatids, *Transactions of the American Microscopical Society*, 97, 287–296.
- Brown, M. J. F., Schmid-Hempel, R., and Schmid-Hempel, P. (2003).** Strong context-dependent virulence in a host-parasite system: reconciling genetic evidence with theory, *Journal of Animal Ecology*, 72, 994–1002.
- Brugerolle, G., Silva-Neto, I. D., Pellens, R., and Grandcolas, P. (2003).** Electron microscopic identification of the intestinal protozoan flagellates of the xylophagous cockroach *Parasphaeria boleiriana* from Brazil, *Parasitology Research*, 90, 249–256.
- Brum, F. L., Catta-Preta, C. M. C., de Souza, W., Schenkman, S., Elias, M. C., and Motta, M. C. M. (2014).** Structural characterization of the cell division cycle in *Strigomonas culicis*, an endosymbiont-bearing trypanosomatid, *Microscopy and Microanalysis*, 20, 228–237.
- Cameron, S. L., Lo, N., Bourguignon, T., Svenson, G. J., and Evans, T. A. (2012).** A mitochondrial genome phylogeny of termites (Blattodea: Termitidae): Robust support for interfamilial relationships and molecular synapomorphies define major clades, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65, 163–173.
- Cardinal, S., and Danforth, B. N. (2011).** The antiquity and evolutionary history of social behavior in bees, *PLoS ONE*, 6, e21086.
- Carvalho, A. L. M., and Deane, M. P. (1974).** Trypanosomatidae isolated from *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae), with a discussion on flagellates of insectivorous bugs, *The Journal of Protozoology*, 21, 5–8.
- Catarino, L. M., Serrano, M. G., Cavazzana, M., Almeida, M. L., Kaneshina, E. K., Campaner, M., Jankevicius, J. V., Teixeira, M. M. G., and Itow-Jankevicius, S. (2001).** Classification of trypanosomatids from fruits and seeds using morphological, biochemical and molecular markers revealed several genera among fruit isolates, *FEMS Microbiology Letters*, 201, 65–72.



- Cavalier-Smith, T. (1981).** Eukaryote kingdoms: seven or nine?, *Bio Systems*, 14, 461–481.
- Cazorla Perfetti, D., Morales, P., and Navas, M. P. (2015).** Aislamiento de parásitos intestinales en la cucaracha americana (*Periplaneta americana*) en Coro, estado Falcón, Venezuela, *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 184-193.
- Céza, V., Pánek, T., Smejkalová, P., and Čepička, I. (2015).** Molecular and morphological diversity of the genus *Hypotrichomonas* (Parabasalia: Hypotrichomonadida), with descriptions of six new species, *European Journal of Protistology*, 51, 158–172.
- Chandler, J. A., and James, P. M. (2013).** Discovery of trypanosomatid parasites in globally distributed *Drosophila* species, *PLoS ONE*, 8, e61937.
- Clark, et al. (2007).** Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny, *Nature*, 450, 203–218.
- Clark, T. B., Kellen, W. R., Lindegren, J. E., and Smith, T. A. (1964).** The transmission of *Crithidia fasciculata* Leger 1902 in *Culiseta incidens* (Thomson)\*, *The Journal of Protozoology*, 11, 400–402.
- Clayton, C., Häusler, T., and Blattner, J. (1995).** Protein trafficking in kinetoplastid protozoa, *Microbiological Reviews*, 59, 325–344.
- Cochran, D. G., and Scheme, W. H. O. C. D. P. and C. D. W. P. E. (1999).** Cockroaches: their biology, distribution and control, *Geneva: World Health Organization*, 35–39.
- Cornwell, P. B. (1968).** The cockroach: A laboratory insect and an industrial pest, *Hutchinson*, Rentokil library, 391 pp.
- Cruden, D. L., and Markovetz, A. J. (1984).** Microbial aspects of the cockroach hindgut, *Archives of Microbiology*, 138, 131–139.
- Cruden, D. L., and Markovetz, A. J. (1987).** Microbial Ecology of the Cockroach Gut, *Annual Review of Microbiology*, 41, 617–643.
- Cunha, N. L., De Souza, W., and Hassón-Voloch, A. (1984).** Isolation of the flagellum and characterization of the paraxial structure of *Herpetomonas megaseliae*, *Journal of Submicroscopic Cytology*, 16, 705–713.
- Daggett, P. M., Dollahon, N., and Janovy, J. (1972).** *Herpetomonas megaseliae* sp. n. (Protozoa: Trypanosomatidae) from *Megaselia scalaris* (Loew, 1866) Schmitz, 1929 (Diptera: Phoridae), *The Journal of Parasitology*, 58, 946–949.
- D'Avila-Levy, C. M., VolotãO, A. C. C., Araújo, F. M., De Jesus, J. B., Motta, M. C. M., Vermelho, A. B., Santos, A. L. S., and Branquinha, M. H. (2009).** *Bodo* sp., a free-living flagellate, expresses divergent proteolytic activities from the closely related parasitic Trypanosomatids, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56, 454–458.
- Dias, F. de A., Vasconcellos, L. R. da C., Romeiro, A., Attias, M., Souto-Padrón, T. C., and Lopes, A. H. (2014).** Transovum transmission of Trypanosomatid cysts in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*, *PLoS ONE*, 9, e108746.
- Dick, C. W., and Patterson, B. D. (2007).** Against all odds: Explaining high host specificity in dispersal-prone parasites, *International Journal for Parasitology*, 37, 871–876.
- Djernæs, M., Klass, K.-D., and Eggleton, P. (2015).** Identifying possible sister groups of Cryptocercidae+Isoptera: A combined molecular and morphological phylogeny of Dictyoptera, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 84, 284–303.
- Djernæs, M., Klass, K.-D., Picker, M. D., and Damgaard, J. (2012).** Phylogeny of cockroaches (Insecta, Dictyoptera, Blattodea), with placement of aberrant taxa and exploration of out-group sampling, *Systematic Entomology*, 37, 65–83.

- Dolezel, D., Jirků, M., Maslov, D. A., and Lukes, J. (2000).** Phylogeny of the bodonid flagellates (Kinetoplastida) based on small-subunit rRNA gene sequences, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 Pt 5, 1943–1951.
- Dostálová, A., and Volf, P. (2012).** Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview, *Parasites & Vectors*, 5, 276.
- Drbohlav, J. J. (1925).** Studies on the relation of insect *Herpetomonad* and *Crithidial* flagellates to leishmaniasis. II. The specificity of the various insect flagellates for certain hosts, as indicated by cross infection experiments, *American Journal of Epidemiology*, 5, 599–610.
- Durrer, S., and Schmid-Hempel, P. (1994).** Shared use of flowers leads to horizontal pathogen transmission, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 258, 299–302.
- Duží, I. (2007).** Ptačí blechy jako hostitelé jedno a vícehostitelských trypanosomatid, *Diplomová práce PřF UK, Katedra parazitologie*, 124 pp.
- Erler, S., Popp, M., Wolf, S., and Lattorff, H. M. G. (2012).** Sex, horizontal transmission, and multiple hosts prevent local adaptation of *Crithidia bombi*, a parasite of bumblebees (*Bombus* spp.): Sex, Horizontal Transmission, and Multiple Hosts, *Ecology and Evolution*, 2, 930–940.
- Fampa, P., Corrêa-da-Silva, M. S., Lima, D. C., Oliveira, S. M., Motta, M. C. M., and Saraiva, E. M. (2003).** Interaction of insect trypanosomatids with mosquitoes, sand fly and the respective insect cell lines, *International Journal for Parasitology*, 33, 1019–1026.
- Farina, M., Attias, M., Souto-Padron, T., and De Souza, W. (1986).** Further studies on the organization of the paraxial rod of trypanosomatids, *The Journal of Protozoology*, 33, 552–557.
- Fernández, M., Martínez, D. M., Tantaleán, M., and Martínez, R. (2001).** Parásitos presentes en *Periplaneta americana* Linnaeus “cucaracha doméstica” de la ciudad de Ica, *Revista Peruana de Biología*, 8, 105–113.
- Flegontov, P., Butenko, A., Firsov, S., Kraeva, N., Eliáš, M., Field, M. C., Filatov, D., Flegontova, O., Gerasimov, E. S., Hlaváčová, J., Ishemgulova, A., Jackson, A. P., Kelly, S., Kostygov, A. Y., Logacheva, M. D., Maslov, D. A., Opperdoes, F. R., O’Reilly, A., Sádlová, J., Ševčíková, T., Venkatesh, D., Vlček, Č., Volf, P., Jan Votýpka, Záhonová, K., Yurchenko, V., and Lukeš, J. (2016).** Genome of *Leptomonas pyrrhocoris*: a high-quality reference for monoxenous trypanosomatids and new insights into evolution of *Leishmania*, *Scientific Reports*, 6, 23704.
- Flegontov, P., Votýpka, J., Skalický, T., Logacheva, M. D., Penin, A. A., Tanifuji, G., Onodera, N. T., Kondrashov, A. S., Volf, P., Archibald, J. M., and Lukeš, J. (2013).** *Paratrypanosoma* is a novel early-branching trypanosomatid, *Current Biology*, 23, 1787–1793.
- Fokin, S. I., Schrallhammer, M., Chiellini, C., Verni, F., and Petroni, G. (2014).** Free-living ciliates as potential reservoirs for eukaryotic parasites: occurrence of a trypanosomatid in the macronucleus of *Euplotes encysticus*, *Parasites & Vectors*, 7, 203.
- Fotedar, R., Shriniwas, U. B., and Verma, A. (1991).** Cockroaches (*Blattella germanica*) as carriers of microorganisms of medical importance in hospitals, *Epidemiology and Infection*, 107, 181–187.
- Frankl, A., Mari, M., and Reggiori, F. (2015).** Electron microscopy for ultrastructural analysis and protein localization in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbial Cell*, 2, 412–428.

- Freytmüller, E., and Camargo, E. P. (1981).** Ultrastructural differences between species of trypanosomatids with and without endosymbionts, *The Journal of Protozoology*, 28, 175–182.
- Fridberg, A., Buchanan, K. T., and Engman, D. M. (2007).** Flagellar membrane trafficking in kinetoplastids, *Parasitology Research*, 100, 205–212.
- Frolov, A. O., Malysheva, M. N., Ganyukova, A. I., Yurchenko, V., and Kostygov, A. Y. (2017).** Life cycle of *Blastocrithidia papi* sp. n. (Kinetoplastea, Trypanosomatidae) in *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae), *European Journal of Protistology*, 57, 85–98.
- Gadelha, C., Wickstead, B., de Souza, W., Gull, K., and Cunha-e-Silva, N. (2005).** Cryptic paraflagellar rod in endosymbiont-containing kinetoplastid Protozoa, *Eukaryotic Cell*, 4, 516–525.
- Gibbs, A. J. (1947).** Observations on *Leptomonas ctenocephali* (Fantham, 1912), *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 40, 495–500.
- Gibbs, A. J. (1950).** *Crithidia familiaris* n.sp. in *Cenaesus carnifex* Fabr. (Hemiptera), *Parasitology*, 40, 322–327.
- Gillies, C., and Hanson, E. D. (1963).** A new species of *Leptomonas* parasitizing the macronucleus of *Paramecium trichium*, *The Journal of Protozoology*, 10, 467–473.
- Gluezn, E., Hoog, J. L., Smith, A. E., Dawe, H. R., Shaw, M. K., and Gull, K. (2010).** Beyond 9+0: noncanonical axoneme structures characterize sensory cilia from protists to humans, *The FASEB Journal*, 24, 3117–3121.
- Goertz, D., Solter, L. F., and Linde, A. (2007).** Horizontal and vertical transmission of a *Nosema* sp. (Microsporidia) from *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae), *Journal of Invertebrate Pathology*, 95, 9–16.
- Gorbunov, P. S. (1987).** Endoparasitic flagellates of the genus *Crithidia* (Trypanosomatidae, Zoomastigophora) from the alimentary canal of bumblebees, *Zoologicheskii Zhurnal*, 66, 1775–1780.
- Görtz, H.-D., and Dieckmann, J. (1987).** *Leptomonas ciliatorum* n. sp. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Macronucleus of a Hypotrichous Ciliate, *The Journal of Protozoology*, 34, 259–263.
- Hamilton, P. B., Stevens, J. R., Gaunt, M. W., Gidley, J., and Gibson, W. C. (2004).** Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA, *International Journal for Parasitology*, 34, 1393–1404.
- Hamilton, P. T., Votýpka, J., Dostálová, A., Yurchenko, V., Bird, N. H., Lukeš, J., Lemaitre, B., and Perlman, S. J. (2015).** Infection dynamics and immune response in a newly described *Drosophila*-trypanosomatid association, *mBio*, 6, e01356-15.
- Hamu, H., Debalke, S., Zemene, E., Birlie, B., Mekonnen, Z., and Yewhalaw, D. (2014).** Isolation of intestinal parasites of public health importance from Cockroaches (*Blattella germanica*) in Jimma town, Southwestern Ethiopia, *Journal of Parasitology Research*, 2014, 1–5.
- Hanson, W. L., and McGhee, R. B. (1963).** Experimental infection of the hemipteron *Oncopeltus fasciatus* with trypanosomatidae isolated from other Hosts\*, *The Journal of Protozoology*, 10, 233–238.
- Hanson, W. L., McGhee, R. B., and DeBOE, J. H. (1968).** Experimental infection of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* with Trypanosomatidae of the genera *Crithidia* and *Blastocrithidia*, *The Journal of Protozoology*, 15, 346–349.

- von der Heyden, S., Chao, E. E., Vickerman, K., and Cavalier-Smith, T. (2004).** Ribosomal RNA phylogeny of bodonid and diplomonid flagellates and the evolution of euglenozoa, *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51, 402–416.
- Hoare, C. A. (1923).** A note on the specific name of the herpetomonad of the house-fly, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 17, 403–406.
- Hollar, L., Lukeš, J., and Maslov, D. A. (1998).** Monophyly of endosymbiont containing trypanosomatids: phylogeny versus taxonomy, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45, 293–297.
- Honigberg, B. M. (1963).** A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. In progress in protozoology, Edited by Ludvik J., Lom J. & Vavra J, *New York: Academic Press.*, 68–69.
- Höög, J. L., Bouchet-Marquis, C., McIntosh, J. R., Hoenger, A., and Gull, K. (2012).** Cryo-electron tomography and 3-D analysis of the intact flagellum in *Trypanosoma brucei*, *Journal of Structural Biology*, 178, 189–198.
- Hoyte, H. M. D. (1961).** The protozoa occurring in the hind-gut of cockroaches. I. Responses to changes in environment, *Parasitology*, 51, 415–436.
- Hyams, J. S. (1982).** The *Euglena* paraflagellar rod: structure, relationship to other flagellar components and preliminary biochemical characterization, *Journal of Cell Science*, 55, 199–210.
- Inward, D., Beccaloni, G., and Eggleton, P. (2007).** Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches, *Biology Letters*, 3, 331–335.
- Janovy, J., Lee, K. W., and Brumbaugh, J. A. (1974).** The differentiation of *Herpetomonas megaseliae*: ultrastructural observations, *The Journal of Protozoology*, 21, 53–59.
- Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Pham, V. M., Kumar, S., Lawyer, P. G., Turco, S. J., Barillas-Mury, C., Sacks, D. L., and Valenzuela, J. G. (2004).** A role for insect galectins in parasite survival, *Cell*, 119, 329–341.
- Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D., and Barratt, J. (2017).** The evolution of trypanosomatid taxonomy, *Parasites & Vectors*, 10, 287..
- Kinfu, A., and Erko, B. (2008).** Cockroaches as carriers of human intestinal parasites in two localities in Ethiopia, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102, 1143–1147.
- Klass, K. D., and Meier, R. (2006).** A phylogenetic analysis of Dictyoptera (Insecta) based on morphological characters, *Entomologische Abhandlungen*, 3–50.
- Klepetková, H. (2010).** Ekologie a diverzita jednohostitelských trypanosomatid u ploštic na území ČR, *Diplomová práce PŘF UK, Katedra parazitologie*, 130 pp.
- Kocarek, P., Holusa, J., and Vidlicka, L. (1999).** Check-list of Blattaria, Mantodea, Orthoptera and Dermaptera of the Czech and Slovak Republics, *Articulata*, 14, 177–184.
- Kočárek, P., Holuša, J., and Vidlička, L. 'ubomir. (2005).** Blattaria, Mantodea Orthoptera & Dermaptera: of the Czech and Slovak Republics : České a Slovenské republiky, *Zlín : Kabourek, 2005*, 1st ed., 348 pp.
- Kopanic, R. J., and Schal, C. (1999).** Coprophagy facilitates horizontal transmission of bait among Cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae), *Environmental Entomology*, 28, 431–438.
- Kostygov, A. Y., Dobáková, E., Grybchuk-Ieremenko, A., Váhala, D., Maslov, D. A., Votýpka, J., Lukeš, J., and Yurchenko, V. (2016).** Novel trypanosomatid-bacterium association: evolution of endosymbiosis in action, *mBio*, 7, e01985-15.

- Kostygov, A. Y., Grybchuk-Ieremenko, A., Malysheva, M. N., Frolov, A. O., and Yurchenko, V. (2014).** Molecular revision of the genus *Wallaceina*, *Protist*, 165, 594–604.
- Kostygov, A. Y., and Yurchenko, V. (2017).** Revised classification of the subfamily Leishmaniinae (Trypanosomatidae), *Folia Parasitologica*, 64.
- Kozminsky, E., Kraeva, N., Ishemgulova, A., Dobáková, E., Lukeš, J., Kment, P., Yurchenko, V., Votýpka, J., and Maslov, D. A. (2015).** Host-specificity of monoxenous trypanosomatids: Statistical analysis of the distribution and transmission patterns of the parasites from neotropical Heteroptera, *Protist*, 166, 551–568.
- Krishnamurthy, R., and Sultana, T. (1978).** A new species of the genus *Polymastix bütschli*, 1884 from an insect *Polyphaga indica* in India, *Archiv für Protistenkunde*, 120, 301–303.
- Lacomble, S., Vaughan, S., Gadelha, C., Morphew, M. K., Shaw, M. K., McIntosh, J. R., and Gull, K. (2009).** Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography, *Journal of Cell Science*, 122, 1081–1090.
- Lalpotu, P. A. (1980).** Studies on ciliates of the genus *Nyctotherus* Leidy, 1849 I. Parasites of Orthoptera, *Archiv für Protistenkunde*, 123, 31–43.
- Langridge, D. F., and McGhee, R. B. (1967).** *Crithidia mellificae* n. sp. an acidophilic Trypanosomatid of the honey bee *Apis mellifera*, *The Journal of Protozoology*, 14, 485–487.
- Leoncini, I., and Rivault, C. (2005).** Could species segregation be a consequence of aggregation processes? Example of *Periplaneta americana* (L.) and *P. fuliginosa* (Serville)., *Ethology*, 111, 527–540.
- d’Avila-Levy, C. M., Boucinha, C., Kostygov, A., Santos, H. L. C., Morelli, K. A., Grybchuk-Ieremenko, A., Duval, L., Votýpka, J., Yurchenko, V., Grellier, P., and Lukeš, J. (2015).** Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, 956–965.
- Linder, J. C., and Staehelin, L. A. (1977).** Plasma membrane specializations in a trypanosomatid flagellate, *Journal of Ultrastructure Research*, 60, 246–262.
- Lo, N., Bandi, C., Watanabe, H., Nalepa, C., and Beninati, T. (2003).** Evidence for cocladogenesis between diverse Dictyopteran lineages and their intracellular endosymbionts, *Molecular Biology and Evolution*, 20, 907–913.
- Lo, N., Engel, M. S., Cameron, S., Nalepa, C. A., Tokuda, G., Grimaldi, D., Kitade, O., Krishna, K., Klass, K.-D., Maekawa, K., Miura, T., and Thompson, G. J. (2007).** Save Isoptera: A comment on Inward et al., *Biology Letters*, 3, 562–563.
- Lo, N., Tokuda, G., Watanabe, H., Rose, H., Slaytor, M., Maekawa, K., Bandi, C., and Noda, H. (2000).** Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches, *Current Biology*, 10, 801–804.
- Lucas, C. L. T. (1927).** Two new species of amoeba found in cockroaches: with notes on the cysts of *Nyctotherus ovalis* Leidy, *Parasitology*, 19, 223–235.
- Lukeš, J., Guilbride, D. L., Votýpka, J., Zíková, A., Benne, R., and Englund, P. T. (2002).** Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure, *Eukaryotic Cell*, 1, 495–502.
- Lukeš, J., Jirků, M., Doležel, D., Kral’ová, I., Hollar, L., and Maslov, D. A. (1997).** Analysis of ribosomal RNA genes suggests that Trypanosomes are monophyletic, *Journal of Molecular Evolution*, 44, 521–527.

- Lukeš, J., Skalický, T., Týč, J., Votýpka, J., and Yurchenko, V. (2014).** Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 195, 115–122.
- Marín, C., Fabre, S., Sánchez-Moreno, M., and Dollet, M. (2007).** *Herpetomonas* spp. isolated from tomato fruits (*Lycopersicon esculentum*) in southern Spain, *Experimental Parasitology*, 116, 88–90.
- Martínez-Girón, R., and van Woerden, H. (2014).** Bronchopulmonary lophomoniasis: emerging disease or unsubstantiated legend?, *Parasites & Vectors*, 7, 284.
- Maruyama, T. (1982).** Fine structure of the longitudinal flagellum in *Ceratium tripos*, a marine dinoflagellate, *Journal of Cell Science*, 58, 109–123.
- Maslov, D. A., Lukes, J., Jirku, M., and 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, 197–205.
- Maslov, D. A., and Simpson, L. (1995).** Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa, *Parasitology Today*, 11, 30–32.
- Maslov, D. A., Votýpka, J., Yurchenko, V., and Lukeš, J. (2013).** Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed, *Trends in Parasitology*, 29, 43–52.
- Maslov, D. A., Westenberger, S. J., Xu, X., Campbell, D. A., and Sturm, N. R. (2007).** Discovery and barcoding by analysis of spliced leader RNA gene sequences of new isolates of Trypanosomatidae from Heteroptera in Costa Rica and Ecuador, *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 54, 57–65.
- McConville, M. J., Mullin, K. A., Ilgoutz, S. C., and Teasdale, R. D. (2002).** Secretory pathway of trypanosomatid parasites, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 122–154.
- McGhee, R. B., and Cosgrove, W. B. (1980).** Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae., *Microbiological Reviews*, 44, 140–173.
- McGhee, R. B., and Hanson, W. L. (1962).** Growth and Reproduction of *Leptomonas oncopelti* in the Milkweed Bug, *Oncopeltus fasciatus*, *The Journal of Protozoology*, 9, 488–493.
- Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S., and Sogin, M. L. (1988).** The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions, *Gene*, 71, 491–499.
- Meyer, H. (1968).** The fine structure of the flagellum and kinetoplast-chondriome of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in tissue culture, *The Journal of Protozoology*, 15, 614–621.
- Miller, M. E. A. (2015).** Review of the *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) species of Northeastern North America., *Ph.D. Thesis*, 472 pp.
- Molyneux, D. H. (1969).** The fine-structure of the epimastigote forms of *Trypanosoma lewisi* in the rectum of the flea, *Nosopsyllus fasciatus*, *Parasitology*, 59, 55–66.
- Molyneux, D. H., and Croft, S. L. (1980).** Studies on the ultrastructure of candidate “cysts” in *Leptomonas* species of Siphonaptera, *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 63, 233–239.
- Moreira, D. (2004).** An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea, *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 54, 1861–1875.
- Moreira-Leite, F. F., de Souza, W., and da Cunha-e-Silva, N. L. (1999).** Purification of the paraflagellar rod of the trypanosomatid *Herpetomonas megaseliae* and

- identification of some of its minor components, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 104, 131–140.
- Motta, M. C. M., Cava, A. M. S., Silva, P. M. F., Fiorini, J. E., Soares, M. J., and Souza, W. D. (1991).** Morphological and biochemical characterization of the trypanosomatids *Crithidia desouzai* and *Herpetomonas anglusteri*, *Canadian Journal of Zoology*, 69, 571–577.
- Murienne, J. (2009).** Molecular data confirm family status for the Tryonicus–Lauraesilpha group (Insecta: Blattodea: Tryonicidae), *Organisms Diversity & Evolution*, 9, 44–51.
- Noireau, F., Diosque, P., and Jansen, A. M. (2009).** *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts, *Veterinary Research*, 40, 26.
- Ogbadoyi, E. O., Robinson, D. R., and Gull, K. (2003).** A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in Trypanosomes, *Molecular Biology of the Cell*, 14, 1769–1779.
- Pai, H.-H., Ko, Y. C., and Chen, E. R. (2003).** Cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*) as potential mechanical disseminators of *Entamoeba histolytica*, *Acta Tropica*, 87, 355–359.
- Paulin, J. J., and McGhee, R. B. (1971).** An ultrastructural study of the trypanosomatid, *Phytomonas elmassiani*, from the milkweed, *Asclepias syriaca*, *The Journal of Parasitology*, 57, 1279.
- Pellens, R., D’Haese, C. A., Bellés, X., Piulachs, M.-D., Legendre, F., Wheeler, W. C., and Grandcolas, P. (2007).** The evolutionary transition from subsocial to eusocial behaviour in Dictyoptera: Phylogenetic evidence for modification of the “shift-independent-care” hypothesis with a new subsocial cockroach, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43, 616–626.
- Peng, P. L.-M., and Wallace, F. G. (1982).** The cysts of *Blastocrithidia triatoma* Cerisola et al., 1971, *The Journal of Protozoology*, 29, 464–467.
- Peregrine, P. C. (1974).** Host dietary changes and the hindgut fauna of cockroaches, *International Journal for Parasitology*, 4, 645–656.
- Pimenta, P. F., Saraiva, E. M., Rowton, E., Modi, G. B., Garraway, L. A., Beverley, S. M., Turco, S. J., and Sacks, D. L. (1994).** Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 9155–9159.
- Podlipaev, S. (2001).** The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears, *International Journal for Parasitology*, 31, 648–652.
- Podlipaev, S. A. (1990).** Catalogue of the world fauna of protozoa of the family Trypanosomatidae, *Proceedings of the Zoological Institute of the USSR Academy of Sciences*, 217, 1–178.
- Podlipaev, S. A. (2000).** Insect trypanosomatids: the need to know more, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 517–522.
- Podlipaev, S. A., Sturm, N. R., Fiala, I., Fernandes, O., Westenberger, S. J., Dollet, M., Campbell, D. A., and Lukes, J. (2004).** Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leader RNA and 5S rRNA genes and intergenic regions, *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51, 283–290.
- Porter, A. (1909a).** The morphology and life-history of *Crithidia gerridis*, as found in the British water-bug, *Gerris paludum*, *Parasitology*, 2, 348–366.
- Porter, A. (1909b).** The Life-Cycle of *Herpetomonas jaculum* (Léger), parasitic in the alimentary tract of *Nepa cinerea*, *Parasitology*, 2, 367–391.

- Poulin, R., and Keeney, D. B. (2008).** Host specificity under molecular and experimental scrutiny, *Trends in Parasitology*, 24, 24–28.
- Preston, T. M. (1969).** The form and function of the cytostome-cytopharynx of the culture forms of the elasmobranch haemoflagellate *Trypanosoma raiiae* Laveran & Mesnil, *The Journal of Protozoology*, 16, 320–333.
- Reduth, D., and Schaub, G. A. (1988).** The ultrastructure of the cysts of *Blastocrithidia triatomae* Cerisola et al. 1971 (Trypanosomatidae): A freeze-fracture study, *Parasitology Research*, 74, 301–306.
- Robinson, D. R., and Gull, K. (1991).** Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle, *Nature*, 352, 731–733.
- Rogers, W. E., and Wallace, F. G. (1971).** Two new subspecies of *Herpetomonas muscarum* (Leidy, 1856) Kent, 1880, *The Journal of Protozoology*, 18, 645–649.
- Romeiro, A., Leal, L. H. M., de Souza, W., and Attias, M. (2003a).** Interaction of *Leptomonas wallacei* with the intestinal tract of its natural host *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae), *Journal of Invertebrate Pathology*, 82, 41–49.
- Romeiro, A., Saraiva, E. M. B., Souza, W., and Attias, M. (2003b).** *Leptomonas wallacei* shows distinct morphology and surface carbohydrates composition along the intestinal tract of its host *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae) and in axenic culture, *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50, 409–416.
- Roth, L. M., and Cohen, S. (1973).** Aggregation in Blattaria, *Annals of the Entomological Society of America*, 66, 1315–1323.
- Roth, L. M. (Louis M., and Willis, E. R. (1960).** The biotic associations of cockroaches, *Smithsonian Misc. Coll.*, 141, 470 pp.
- Ruiz-González, M. X., and Brown, M. J. F. (2006).** Honey bee and bumblebee trypanosomatids: specificity and potential for transmission, *Ecological Entomology*, 31, 616–622.
- Salehzadeh, A., Tavacol, P., and Mahjub, H. (2007).** Bacterial, fungal and parasitic contamination of cockroaches in public hospitals of Hamadan, Iran, *Journal of Vector Borne Diseases*, 44, 105–110.
- Santos, A. L. S., Abreu, C. M., Alviano, C. S., and Soares, R. M. A. (2005).** Use of proteolytic enzymes as an additional tool for trypanosomatid identification, *Parasitology*, 130, 79–88.
- Schaub, G. A. (1988).** Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between vectors of Chagas' disease, *Acta Tropica*, 45, 11–19.
- Schaub, G. A., and Böker, C. A. (1986).** Scanning electron microscopic studies of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) in the rectum of *Triatoma infestans* (Reduviidae), *The Journal of Protozoology*, 33, 266–270.
- Schaub, G. A., Böker, C. A., Jensen, C., and Reduth, D. (1989).** Cannibalism and coprophagy are modes of transmission of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) between Triatomines, *The Journal of Protozoology*, 36, 171–175.
- Schaub, G. A., and Jensen, C. (1990).** Developmental time and mortality of the reduviid bug *Triatoma infestans* with differential exposure to coprophagic infections with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae), *Journal of Invertebrate Pathology*, 55, 17–27.
- Schaub, G. A., Neukirchen, K., and Golecki, J. (1992).** Attachment of *Blastocrithidia triatomae* (trypanosomatidae) by flagellum and cell body in the midgut of the reduviid bug *Triatoma infestans*, *European Journal of Protistology*, 28, 322–328.



- Schaub, G. A., and Pretsch, M. (1981).** Ultrastructural studies on the excystment of *Blastocrithidia triatomae* (trypanosomatidae), *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75, 168–171.
- Schmid-Hempel, P. (1998).** Parasites in social insects, monographs in behavior and ecology, Princeton University Press, Princeton, 392 pp.
- Schmid-Hempel, R., and Tognazzo, M. (2010).** Molecular divergence defines two distinct lineages of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), parasites of bumblebees: *Crithidia bombi* lineages, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57, 337–345.
- Schmittner, S. M., and McGhee, R. B. (1970).** Host Specificity of various species of *Crithidia* Leger, *The Journal of Parasitology*, 56, 684.
- Schwarz, R. S., Bauchan, G. R., Murphy, C. A., Ravoet, J., de Graaf, D. C., and Evans, J. D. (2015).** Characterization of two species of trypanosomatidae from the honey bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, 1967 and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp., *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62, 567–583.
- Semans, F. M. (1943).** Protozoan parasites of the *Orthoptera*, with special reference to those of Ohio. IV, Classified list of the protozoan parasites of the Orthoptera of the world. Classes Mastigophora, Sarcodina, and Sp, 221–234.
- Sherwin, T., and Gull, K. (1989).** The cell division cycle of *Trypanosoma brucei brucei*: timing of event markers and cytoskeletal modulations, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 323, 573–588.
- Shykoff, J. A., and Schmid-Hempel, P. (1991).** Incidence and effects of four parasites in natural populations of bumble bees in Switzerland, *Apidologie*, 22, 117–125.
- Silva, P. M. F. E., Solé-Cava, A. M., Soares, M. J., Motta, M. C. M., Fiorini, J. E., and Souza, W. D. (1991).** *Herpetomonas roitmani* (Fiorini et al., 1989) N. Comb.: A trypanosomatid with a bacterium-like endosymbiont in the cytoplasm, *The Journal of Protozoology*, 38, 489–494.
- Simpson, A. G. B., Stevens, J. R., and Lukeš, J. (2006).** The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates, *Trends in Parasitology*, 22, 168–174.
- Skalický et al. (2017).** Extensive flagellar remodeling during the complex life cycle of *Paratrypanosoma*, a divergent trypanosomatid.
- Smirnoff, W. A., and Lipa, J. J. (1970).** *Herpetomonas swainei* sp. n., a new flagellate parasite of *Neodiprion swainei* (Hymenoptera: Tenthredinidae), *Journal of Invertebrate Pathology*, 16, 187–195.
- Solter, L. F. (2006).** Transmission as a predictor of ecological host specificity with a focus on vertical transmission of microsporidia, *Journal of Invertebrate Pathology*, 92, 132–140.
- de Souza, W. de. (2008).** Electron microscopy of trypanosomes: a historical view, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103, 313–325.
- de Souza, W., and Souto-Pradrón, T. (1980).** The paraxial structure of the flagellum of Trypanosomatidae, *The Journal of Parasitology*, 66, 229.
- Steinert, M., and Novikoff, A. B. (1960).** The existence of a cytostome and the occurrence of pinocytosis in the trypanosome, *Trypanosoma mega*, *The Journal of Cell Biology*, 8, 563–569.
- Suková, E. (2009).** Jednohostitelská trypanosomatida blech, *Diplomová práce PŘF UK, Katedra parazitologie*, 119 pp.
- Svobodová, M., Zidková, L., Čepička, I., Oborník, M., Lukeš, J., and Votýpka, J. (2007).** *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 423–432.

- Tabaru, Y., and Watanabe, Y. (2003).** Coprophagy, necrophagy and cannibalism of the smoky-brown cockroach, *Periplaneta fuliginosa*, in the laboratory condition, *Medical Entomology and Zoology*, 54, 353–359.
- Tatfeng, Y. M., Usuanlele, M. U., Orukpe, A., Digban, A. K., Okodua, M., Oviasogie, F., and Turay, A. A. (2005).** Mechanical transmission of pathogenic organisms: the role of cockroaches, *Journal of Vector Borne Diseases*, 42, 129–134.
- Teixeira, M. M. G., Borghesan, T. C., Ferreira, R. C., Santos, M. A., Takata, C. S. A., Campaner, M., Nunes, V. L. B., Milder, R. V., de Souza, W., and Camargo, E. P. (2011).** Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts, *Protist*, 162, 503–524.
- Tieszen, K. L., and Molyneux, D. H. (1989).** Transmission and ecology of trypanosomatid flagellates of water striders (Hemiptera: Gerridae), *The Journal of Protozoology*, 36, 519–523.
- Tsai, Y., and Cahill, K. M. (1970).** Parasites of the German cockroach (*Blattella germanica* L.) in New York City., *Journal of Parasitology*, 56, 375–377.
- Týč, J., Votýpka, J., Klepetková, H., Šuláková, H., Jirků, M., and Lukeš, J. (2013).** Growing diversity of trypanosomatid parasites of flies (Diptera: Brachycera): Frequent cosmopolitanism and moderate host specificity, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69, 255–264.
- Vandersea, M. W., Birkenheuer, A. J., Litaker, R. W., Vaden, S. L., Renschler, J. S., and Gookin, J. L. (2015).** Identification of *Parabodo caudatus* (class Kinetoplastea) in urine voided from a dog with hematuria, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 27, 117–120.
- Varadínová, Z., Stejskal, V., and Frynta, D. (2010).** Patterns of aggregation behaviour in six species of cockroach: comparing two experimental approaches, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 136, 184–190.
- Vickerman, K. (1962).** The mechanism of cyclical development in trypanosomes of the *Trypanosoma brucei* sub-group: An hypothesis based on ultrastructural observations, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 56, 487–495.
- Vickerman, K. (1969).** On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes, *Journal of Cell Science*, 5, 163–193.
- Vickerman, K. (1976).** Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. In: *Biology of the Kinetoplastida*, ed: Lumsden, W.H.R. and Evans, D.A., *Academic Press, London/New York/San Francisco*, 35–130.
- Vickerman, K. (1978).** The free-living trypanoplasms: descriptions of three species of the genus *Procryptobia* n.g., and redescription of *Dimastigella trypaniformis* Sandon, with notes on their relevance to the microscopical diagnosis of disease in man and animals, *Transactions of the American Microscopical Society*, 97, 485–502.
- Vickerman, K. (1994).** The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates, *International Journal for Parasitology*, 24, 1317–1331.
- Vickerman, K. (2000).** Order Kinetoplastea Honigberg, 1963. In: *An illustrated guide to the Protozoa*, ed: Lee, J. J., Leedale, G. F. and Bradbury, P., *Allen Press*, 1159–1185.
- Vidlička, L. 'ubomír. (2001).** Fauna Slovenska: Blattaria, Mantodea: (insecta: Orthopteroidea) = Šváby, modlivky, *Veda*, 171 pp.

- Volf, P., Benkova, I., Myskova, J., Sadlova, J., Campino, L., and Ravel, C. (2007).** Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids, *International Journal for Parasitology*, 37, 589–593.
- Votýpka, J., Klepetková, H., Jirků, M., Kment, P., and Lukeš, J. (2012).** Phylogenetic relationships of trypanosomatids parasitising true bugs (Insecta: Heteroptera) in sub-Saharan Africa, *International Journal for Parasitology*, 42, 489–500.
- Votýpka, J., Klepetková, H., Yurchenko, V. Y., Horák, A., Lukeš, J., and Maslov, D. A. (2012b).** Cosmopolitan Distribution of a Trypanosomatid *Leptomonas pyrrocoris*, *Protist*, 163, 616–631.
- Votýpka, J., Kostygov, A. Y., Kraeva, N., Grybchuk-Ieremenko, A., Tesařová, M., Grybchuk, D., Lukeš, J., and Yurchenko, V. (2014).** *Kentomonas* gen. n., a new genus of endosymbiont-containing Trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n., *Protist*, 165, 825–838.
- Votýpka, J., Maslov, D. A., Yurchenko, V., Jirků, M., Kment, P., Lun, Z.-R., and Lukeš, J. (2010).** Probing into the diversity of trypanosomatid flagellates parasitizing insect hosts in South-West China reveals both endemism and global dispersal, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 243–253.
- Votýpka, J., Rádrová, J., Skalický, T., Jirků, M., Jirsová, D., Mihalca, A. D., D'Amico, G., Petrželková, K. J., Modrý, D., and Lukeš, J. (2015).** A tsetse and tabanid fly survey of African great apes habitats reveals the presence of a novel trypanosome lineage but the absence of *Trypanosoma brucei*, *International Journal for Parasitology*, 45, 741–748.
- Votýpka, J., Suková, E., Kraeva, N., Ishengulova, A., Duží, I., Lukeš, J., and Yurchenko, V. (2013).** Diversity of trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasitizing fleas (insecta: Siphonaptera) and description of a new genus *Blechomonas* gen. n., *Protist*, 164, 763–781.
- Wallace, F. G. (1966).** The trypanosomatid parasites of insects and arachnids, *Experimental Parasitology*, 18, 124–193.
- Wallace, F. G., and Clark, T. B. (1959).** Flagellate Parasites of the Fly, *Phaenicia sericata* (Meigen), *The Journal of Protozoology*, 6, 58–61.
- Ware, J. L., Litman, J., Klass, K.-D., and Spearman, L. A. (2008).** Relationships among the major lineages of Dictyoptera: the effect of outgroup selection on dictyopteran tree topology, *Systematic Entomology*, 33, 429–450.
- Webster, P., and Russell, D. G. (1993).** The flagellar pocket of trypanosomatids, *Parasitology Today*, 9, 201–206.
- Weise, F., Stierhof, Y. D., Kühn, C., Wiese, M., and Overath, P. (2000).** Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells, *Journal of Cell Science*, 113 Pt 24, 4587–4603.
- Wenyon, C. M. (1926).** Protozoology: a manual for medical men, veterinarians and zoologists, *Bailliere, Tindall and Cox, London*, 382-397.
- Westenberger, S. J., Sturm, N. R., Yanega, D., Podlipaev, S. A., Zeledón, R., Campbell, D. A., and Maslov, D. A. (2004).** Trypanosomatid biodiversity in Costa Rica: genotyping of parasites from Heteroptera using the spliced leader RNA gene, *Parasitology*, 129, 537–547.
- Wheeler, R. J., Sunter, J. D., and Gull, K. (2016).** Flagellar pocket restructuring through the *Leishmania* life cycle involves a discrete flagellum attachment zone, *Journal of Cell Science*, 129, 854–867.

- Yoshida, N., Freymüller, E., and Wallace, F. G. (1978).** *Herpetomonas mariadeanei* sp. n. (Protozoa, Trypanosomatidae) from *Muscina stabulans* (Fallén, 1816) (Diptera, Muscidae)\*, *The Journal of Protozoology*, 25, 421–425.
- Yurchenko, V., Kostygov, A., Havlová, J., Grybchuk-Ieremenko, A., Ševčíková, T., Lukeš, J., Ševčík, J., and Votýpka, J. (2016).** Diversity of trypanosomatids in cockroaches and the description of *Herpetomonas tarakana* sp. n., *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63, 198–209.
- Yurchenko, V., Lukes, J., Xu, X., and Maslov, D. A. (2006).** An integrated morphological and molecular approach to a new species description in the Trypanosomatidae: the case of *Leptomonas podlipaevi* n. sp., a parasite of *Boisea rubrolineata* (Hemiptera: Rhopalidae), *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53, 103–111.
- Yurchenko, V., Votýpka, J., Tesarová, M., Klepetková, H., Kraeva, N., Jirků, M., and Lukes, J. (2014).** Ultrastructure and molecular phylogeny of four new species of monoxenous trypanosomatids from flies (Diptera: Brachycera) with redefinition of the genus *Wallaceina*, *Folia Parasitologica*, 61, 97–112.
- Yurchenko, V. Y., Lukeš, J., Jirků, M., and Maslov, D. A. (2009).** Selective recovery of the cultivation-prone components from mixed trypanosomatid infections: a case of several novel species isolated from Neotropical Heteroptera, *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 59, 893–909.
- Yurchenko, V. Y., Lukes, J., Tesarová, M., Jirků, M., and Maslov, D. A. (2008).** Morphological discordance of the new trypanosomatid species phylogenetically associated with the genus crithidia, *Protist*, 159, 99–114.
- Zanetti, A., Ferreira, R. C., Serrano, M. G., Takata, C. S. A., Campaner, M., Attias, M., de Souza, W., Teixeira, M. M. G., and Camargo, E. P. (2016).** *Phytomonas* (Euglenozoa: Trypanosomatidae): Phylogenetic analyses support infrageneric lineages and a new species transmitted to Solanaceae fruits by a pentatomid hemipteran, *European Journal of Protistology*, 56, 232–249.
- Zidkova, L., Cepicka, I., Votypka, J., and Svobodova, M. (2010).** *Herpetomonas trimorpha* sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of the biting midge *Culicoides truncorum* (Ceratopogonidae, Diptera), *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 60, 2236–2246.