

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra parazitologie

Bakalářská práce



## **Jednohostitelská Trypanosomatida**

Eva Suková  
Praha, letní semestr 2007

Školitel: RNDr. Jan Votýpka, PhD.

## Obsah

Úvod.....	2
Abstrakt.....	3
Literární přehled.....	4
1. Obecná charakteristika a životní cyklus jednohostitelských trypanosomatid.....	4
2. Historie objevů jednohostitelských trypanosomatid.....	5
3. Postupy využívané při determinaci rodů a druhů trypanosomatid.....	6
3.1 Morfologická stadia .....	6
3.2 Acidocalcisomy .....	10
3.3 Hostitelská specifita .....	11
3.4 Energetický metabolismus .....	12
3.5 Sérologie .....	14
3.6 Sexuální rozmnožování.....	14
3.7 Molekulárně-biologické metody.....	15
3.8 Klasická taxonomie versus molekulární fylogenetika .....	16
4. Endosymbiotické bakterie.....	18
5. Výskyt jednohostitelských trypanosomatid .....	20
5.1 Geografické rozšíření jednohostitelských trypanosomatid.....	20
5.2 Spektrum hostitelů jednohostitelských trypanosomatid .....	20
5.2.1 Hmyz.....	20
5.2.2 Ostatní bezobratlí .....	21
5.2.3 Rostliny jako hostitelé.....	21
5.2.4 Infekce obratlovců .....	22
6. Hostitelská specifita .....	23
7. Zástupci trypanosomatid.....	25
7.1 Rody jednohostitelské.....	25
7.2 Rody dvouhostitelské.....	28
Závěr .....	31
Použitá literatura .....	32

## Úvod

Řád Kinetoplastida zahrnuje mimo jiné i skupinu parazitických trypanosomatid s jednohostitelskými a dvouhostitelskými životními cykly. Na základě hostitelské specifity se trypanosomatida dělí na ekonomicky nevýznamné jednohostitelské parazity hmyzu a z hlediska humánní i veterinární medicíny významné vícehostitelské parazity, infikující obratlovce a rostliny. Nevhodně zvolená terminologie někdy označuje tyto skupiny jako nižší a vyšší trypanosomatida, avšak takové členění je ve světle současných výsledků fylogenetických studií neudržitelné, neboť nelze jednoznačně uvést, která ze skupin je primitivnější.

Trypanosomatida tvoří zajímavou skupinu protist, vyznačující se řadou molekulárně-biologických zvláštností, které v říši živých organismů nemají obdoby. Mezi tyto unikátní znaky patří například existence kinetoplastové DNA (kDNA), trans-splicing, atypické uspořádání některých částí genomu, polycistronický přepis genů či editace RNA. Výše zmíněné charakteristiky byly však zatím studovány převážně na trypanosomách a leishmaniích, ačkoliv největší diverzita trypanosomatid se nachází právě mezi jednohostitelskými taxony. Studium monoxenních zástupců by tedy mohlo přinést nejen prohloubení dosud získaných znalostí, ale také informace zcela nové.

Disproporce v počtu provedených výzkumů, zaměřených zejména na trypanosomy, leishmanie a fytomonády, vyplývá především z ekonomického dopadu parazitismu v oblasti medicíny, veterinárního lékařství a zemědělství. Podrobnější studie jednohostitelských skupin však mají také svůj význam, a proto by ani nepřilíš patogenní parazité hmyzu neměli být přehlíženi. Blízká fylogenetická příbuznost těchto dvou zdánlivě rozdílných skupin je známa již nyní a lze očekávat, že detailnější znalost monoxenních rodů by mohla napomoci k odhalení dalších souvislostí.

Tato práce shrnuje především dosavadní poznatky o monoxenních rodech. Ty se vyskytují zejména u tří řádů hmyzu: dvoukřídlých (Diptera), ploštic (Hemiptera) a blech (Siphonaptera). První dva zmíněné taxony hostitelů jsou poměrně častým předmětem výzkumů, zatímco o infekci blech jednohostitelskými kinetoplastidy existují pouze roztroušené záznamy a jejich diverzita, ani prevalence dosud nebyly komplexně zpracovány. V době, kdy se schyluje k úplné revizi taxonomie a k rozsáhlým změnám stávajícího systému trypanosomatid založeném na nových fylogenetických poznacích, by nové nálezy bleších trypanosomatid mohly přispět k objasnění skutečné diverzity těchto organismů. Vzhledem k tomu, že skupina Siphonaptera patří na území České republiky mezi relativně běžný řád hmyzu, cílem mé budoucí diplomové práce by mělo být zmapování výskytu, prevalence, hostitelské specifity a fylogenetického postavení trypanosomatid u blech.

## Abstrakt

Jednohostitelská trypanosomatida patří mezi méně probádané jednobuněčné organismy s kosmopolitním rozšířením. Podle některých odhadů jde o jednu z nejdíverzifikovanějších skupin v rámci taxonu Kinetoplastida. Na rozdíl od blízce příbuzných dvouhostitelských zástupců se nejedná o původce nebezpečných onemocnění, ale o nepříliš patogenní parazity hmyzu, případně dalších bezobratlých. Přenos probíhá pravděpodobně nejčastěji kontaminativní cestou, eventuálně kanibalismem. U většiny zástupců se předpokládá nižší hostitelská specifita. Determinace rodů se nyní opírá především o molekulárně-biologické metody v kombinaci s méně spolehlivými morfologickými kritérii. Fylogenetický systém trypanosomatid je v poslední době předmětem rozsáhlých rekonstrukcí.

Monoxenous trypanosomatids are less explored protists with the worldwide distribution. According to certain estimates, they are one of the most diverse groups within the taxon Kinetoplastida. In contrast to dixenous trypanosomatids, which are closely related to them, the monoxenous trypanosomatids are not agents of human or animal diseases, they are rather non-significant pathogens of insects and other invertebrates. The transmission is presumably done by contamination, or by cannibalism. Broad host specificity is supposed among the majority of them. The determination of different genera is assigned mainly by molecular biology methods and less reliable morphological criteria. Recently, the system of the trypanosomatids becomes the object of several phylogenetic studies and is under extensive reconstruction.

## Literární přehled

### 1. Obecná charakteristika a životní cyklus jednohostitelských trypanosomatid

Kinetoplastida jsou jednou z mnoha zajímavých skupin prvoků, které řadíme společně s blízkými příbuznými diplomidy a euglenidy pod excavátní kmen Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981) – jednu z prvních skupin dosud žijících eukaryot, u nichž se objevila mitochondrie. Ačkoliv klasifikace se na úrovni vyšších taxonomických jednotek podle různých autorů liší, samotný řád Kinetoplastida (Honigberg, 1963) – někdy zmiňovaný jako třída Kinetoplastea (Cavalier-Smith, 1981) – dělíme ve většině systémů na dvě čeledi. První z nich je čeleď Bodonidae, představovaná organismy převážně volně žijícími, nebo parazitujícími na bezobratlých či rybách, většinou s úzkou vazbou na vodní prostředí. Druhou větev, parazitickou čeleď Trypanosomatidae, obvykle dále dělíme dle životního cyklu na rody jednohostitelské (monoxenní), parazitující pouze na jednom (zpravidla hmyzím) hostiteli, a dvouhostitelské (dixenní) střídající dva hostitele. Z celkem jedenácti rodů čeledi Trypanosomatidae jsou pro zástupce živočišné říše včetně člověka patogenní dva dixenní rody (*Trypanosoma*, *Leishmania*), další rod (*Phytomonas*) je patogenní pro některé druhy rostlin. Diverzita, hostitelská specifita, fylogeneze a zeměpisné rozšíření jednohostitelských trypanosomatid jsou narozdíl od detailně prozkoumaných dvouhostitelských rodů (*Phytomonas*, *Trypanosoma* a *Leishmania*<sup>1</sup>) známy jen omezeně. Trypanosomatida patří společně s nematody a výtrusovci k hlavním skupinám parazitických eukaryot s velmi širokým spektrem hostitelů.

Charakteristickým znakem kinetoplastid, podle něhož jsou i pojmenováni, je jedna (zpravidla větvená) mitochondrie obsahující organelu kinetoplast. Kinetoplast se nachází v blízkosti kinetosomu na bázi bičíku, s nímž je propojen přes mitochondriální membránu. Má tvar disku a obsahuje tzv. kinetoplastovou DNA (kDNA) uspořádanou ve formě komplikované sítě propojených kroužků (Robinson a Gull, 1991; Lukeš a kol., 2002). V této síti lze nalézt 5 000 až 27 000 malých kroužků (minikroužky) o velikosti 0,46–2,5 kb (v závislosti na druhu), a 25 až 50 velkých kroužků (maxikroužky), z nichž každý má 20–38 kb. Maxikroužky se podobají mitochondriální DNA jiných eukaryot a mají homogenní nukleotidovou sekvenci. Obsahují geny nutné pro mitochondriální biogenezi, geny kódující mitochondriální rRNA a geny kódující podjednotky některých proteinů elektrontransportního řetězce a syntézy ATP. Nukleotidová sekvence minikroužků je naopak značně heterogenní a rychle se vyvíjí. Minikroužky jsou přepisovány do malých molekul tzv. guide RNA (gRNA), které slouží pro řízení inzercí a delecí molekul uridinu v transkriptech maxikroužků (Simpson a Shaw, 1989). Tento proces editace RNA, který opravuje chyby v genech maxikroužků, představuje alternativní prostředek k zacházení s genetickou informací jedinečný pro trypanosomatidy.

---

<sup>1</sup> K dvouhostitelským rodům se dále řadí i méně rozšířený rod *Endotrypanum*, který je blízký příbuzný leishmaniím

Kromě typické mitochondriální struktury mají kinetoplastida další specifické znaky: cytoskelet ze spirál subpelikulárních mikrotubulů probíhajících pod plasmatickou membránou a poměrně velkou, někdy značně prodlouženou flagelární kapsu, přes níž je uskutečňován transport látek do buňky i z ní. Flagelární kapsa je zřejmě jediným místem pro endocytózu a exocytózu makromolekul a pro tvorbu a vkládání nové membrány. Trypanosomatida vylučují do prostředí (mj. v závislosti na substrátu) různé druhy rozpustných enzymů, patrně právě přes flagelární kapsu. Těsně vedle ní se u některých jednohostitelských trypanosomatid (rody *Crithidia* a *Blastocrithidia*) může nacházet mikrotubuly lemovaný cytofarynx určený k příjmu potravy. Obecně je však fagotrofie u trypanosomatid vzácným jevem. Podél axonemy probíhá u některých zástupců mřížovitá paraxiální tyčinka s krátkým výběžkem, který ji připojuje k axonemálním mikrotubulům bičíku. V závislosti na druhu může být přítomná undulující membrána a někdy i nápadný glykokalix, či povrchový plášť, dobře viditelný v elektronovém mikroskopu. Dalšími unikátním znakem je uzavření enzymů glykolýzy do specifických organel zvaných glykosomy. Jde o modifikované peroxisomy, které umožňují výkonnější řízení glykolýzy, než dokáže tradiční eukaryotická buňka. Jejich další funkcí je fixace oxidu uhličitého, biosyntéza pyrimidinu, beta-oxidace mastných kyselin a syntéza etherových lipidů. Ojedinelý je také výskyt na vápník bohatých organel – tzv. acidocalcisomů, které se účastní homeostáze.

## 2. Historie objevů jednohostitelských trypanosomatid

Prvního bičíkovce v hmyzu, konkrétně ovádovi, zpozoroval nizozemský přírodovědec Anthony van Leeuwenhoek již v 17. století (cit. dle Wallace, 1966). Další záznam blíže neurčeného bičíkovce pochází z roku 1851 z mouchy domácí (Burnett, 1851; cit. dle Wallace, 1966). Roku 1853 objevil Leidy v mouše domácí pravděpodobně tentýž organismus jako Burnett a o tři roky později ho nazval *Bodo muscarum* (Leidy 1856). Kent roku 1880 přejmenoval tohoto bičíkovce na *Herpetomonas muscarum*, čímž ustanovil nový rod. Na základě literárních záznamů zároveň zavedl i rod *Leptomonas* (Kent 1880). Do rodu *Herpetomonas* však chybně zařadil bičíkovce z krve krysy, který byl později určen jako *Trypanosoma* (cit. dle McGhee a Cosgrove, 1980). V taxonomii skupiny tak postupně došlo k mnoha dalším zmatkům zaviněným vzájemnou podobností mezi rody a nedostatečnou znalostí hostitelské specifity. Nutno přiznat, že tento zmatek trvá v jisté míře dodnes.

Mezi lety 1902 až 1904 Léger zveřejnil četné popisy trypanosomatid z různých zástupců dvoukřídlých a navrhl rodové jméno *Crithidia*. Roku 1907 otiskl Novy a kol. jednu z do té doby nejmodernějších prací. Poprvé zde byla využita metoda kultivace k izolování dvou odlišných rodů trypanosomatid z komářího hostitele. Ve stejnou dobu zveřejnil Patton (1907) sérii podrobných studií bičíkovců z širokého spektra hmyzu. Popsal mnoho typů stádií v rámci životního cyklu, nicméně mnohdy se místo několika forem jednoho organismu

jednalo o zástupce různých druhů. Během následujících třiceti let se objevila řada dalších popisů nových druhů a debat na téma taxonomie této skupiny. Hlavním zájmem bylo vyřešení samostatnosti rodů *Leptomonas* a *Herpetomonas* a odlišení jednohostitelských zástupců s vektorovými stádii od dvouhostitelských trypanosomatid (cit. dle Wallace, 1966).

Roku 1926 vydal Wenyon vyčerpávající souhrn dosavadních poznatků. Zvýšený zájem o lékařsky významné zástupce přispěl k odlišení jednohostitelských kinetoplastid od stadií trypanosom a leishmanií. Další soubornou studii s přepracováním taxonomie jednotlivých skupin, avšak bez rodu *Phytomonas*, zveřejnil roku 1966 Wallace. Základní taxonomický systém trypanosomatidů tedy vznikl v 60. letech. Cenným zdrojem informací o jednohostitelských trypanosomatidech je i Wallaceovo dílo z roku 1979 a Vickermanův a Prestonův přehled biologie kinetoplastid (1974). Roku 1983 Wallace a kol. zveřejnil souhrn metod použitelných k determinaci trypanosomatid a vytvořil návod k popisu nových druhů.

Zájem o jednohostitelská trypanosomatida také podpořila představa jejich uplatnění ve srovnávacích studiích s patogeny obratlovců i možnost jejich využití při testování účinných chemoterapeutik (Bacchi a kol., 1969). Význam této skupiny parazitů vyzdvihlo i jejich využívání v biologických zkouškách sloučenin, jako zdrojů enzymů pro biochemické a klinické výzkumy a v diagnóze některých onemocnění (Crowe a Kushner, 1977). Nedávno doložená možná nákaza lidí podnítila přehodnocení role jednohostitelských trypanosomatid jako možných parazitů obratlovců (podrobněji viz kap. 5.2.4)

### **3. Postupy využívané při determinaci rodů a druhů trypanosomatid**

Trypanosomatida jsou běžní, celosvětově rozšíření parazité s poměrně vysokou prevalencí u svých hostitelů. I přes skutečnost, že jsou tyto organismy předmětem častých nálezů, dosud neexistují jednoznačná kritéria pro správné taxonomické zařazení. Determinace a správné fylogenetické zařazení těchto bičíkovců tak zůstává i nadále problematické.

#### **3.1 Morfologická stadia**

Klasická taxonomie je založená na poměrně malém počtu pozorovatelných charakteristik. Základem pro určení trypanosomatid je morfologie. Během svého životního cyklu vytvářejí jednotlivé druhy a rody různé morfologické formy. Dříve byla jednotlivá stadia pojmenovávána podle rodu, kterému se podobali nejvíce jako např. leishmaniové, leptomonádové, herpetomonádové aj. Dnes je nomenklatura odvozená od topologických vztahů organel, případně od tvaru buňky, rozvoje bičíku, či tvaru flagelární kapsy.

Mezi tradičně uváděné měřitelné charakteristiky patří délka buňky (bez volného bičíku), její šířka v nejširším místě, délka a šířka jádra, vzdálenost jádra od předního konce, průměr kinetoplastu a jeho vzdálenost od předního konce a délka volného bičíku. Původní způsob měření délky těla včetně bičíku byl opuštěn, neboť shrnuje dvě informace do

jednoho údaje, nehledě na diametrální rozdíly v délce bičíku mezi různými jedinci stejného druhu.

Pozici jádra udává tzv. nukleární index (NI), což je poměr vzdálenosti středu jádra od zadního konce těla (PN) ku vzdálenosti středu jádra k přednímu konci těla (NA). Kinetoplastový index je dán poměrem PN/KN, kde KN udává vzdálenost kinetoplastu a jádra. Při popisu jednohostitelských trypanosomatid je měřeno (narozdíl od krevních stadií trypanosom) co nejvíce jedinců, protože pozice jejich vnitřních organel mohou být velmi proměnlivé.

Podle výše uvedených znaků mohou být rozlišena stadia trypomastigotní, amastigotní, promastigotní, choanomastigotní, epimastigotní, paramastigotní, opisthomastigotní a endomastigotní (viz Obr 1). Následující popis jednotlivých typů buněk vychází z děl „Foundations of parasitology“ (Roberts a Janovy, 2005) a „The illustrated guide to the Protozoa“ (řád Kinetoplastea, Vickerman, 2000). Konkrétní výskyt daných forem u jednotlivých rodů trypanosomatid je shrnut v příložené tabulce (Tab 1.)

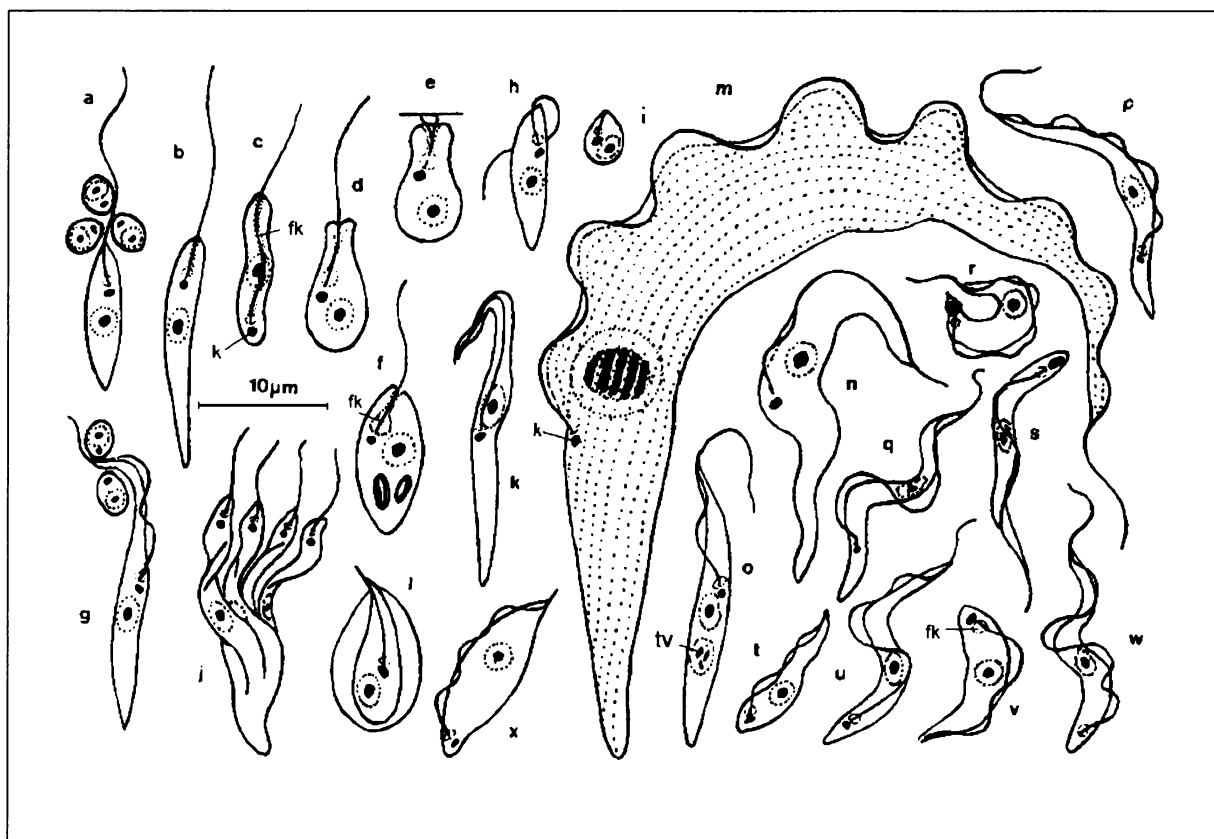
**Trypomastigot** má kinetoplast a kinetosom umístěny posteriorně, až za jádrem. Bičík je přichycen podél povrchu těla (čímž vytváří undulující membránu) a anteriorně vybíhá ve volnou část. Druhý kinetosom (bez bičíku) se obvykle nachází poblíž kinetosomu nesoucího bičík. Flagelární kapsa je umístěna při bázi bičíku. Sférický **amastigot** má bičík tak krátký, že část vyčnívající z flagelární kapsy není téměř pozorovatelná. Prodloužené tělo **promastigotního** stadia naopak nese dopředu vyčnívající bičík. Jeho kinetosom a kinetoplast se nacházejí před jádrem, v anteriorní části těla. Pokud se bičík vynořuje skrz široký límečkovitý výběžek, jedná se o **choanomastigota**. **Epimastigotní** forma má kinetoplast a kinetosom opět umístěny mezi jádrem a anteriorním koncem (jako je tomu u amastigota, choanomastigota a promastigota), případně vedle jádra, přičemž část bičíku vytváří podél přední poloviny těla undulující membránu, druhá část volně vybíhá dopředu. Dalšími formami jsou paramastigot a opisthomastigot. U **paramastigotů** se kinetosom a kinetoplast nachází vedle jádra, u **opisthomastigotů** jsou tyto orgány lokalizovány posteriorně za jádrem. Tyto formy postrádají undulující membránu; flagelární kapsa se táhne skrz celé tělo a otevírá se na anteriorním konci. Konečně existují i stadia **endomastigotní**, u kterých je flagelární kapsa protažena k zadnímu konci těla, kde se dále rozděluje dopředu k jádru, s bázi bičíku a kinetoplastem ležícími vedle jádra. Kromě těchto forem trypanosomatidů se u některých druhů objevují cysty (někdy označované jako pseudocysty), které mívají kulatý tvar a hladkou pevnou stěnu. Může však docházet k jejich záměně s amastigoty.

Za různých okolností se může chování buňky lišit. Proto bývají v některých pracích rozlišovány ještě poměrně krátké, široké a přichycené formy zvané haptomonády a protáhlejší, aktivní a nepřichycené nektomonády. K přeměně z jedné formy na druhou



dochází rychle a pravděpodobně je tato změna řízena spíše vnějšími životními podmínkami než naprogramováním v rámci životního cyklu (Wallace a kol., 1983).

U trypanosomatid z hmyzu se často objevuje morfologická heterogenita, která pravděpodobně vychází z vnitřní pleomorfie organismů, ale může být způsobena i smíšenou infekcí. Takový případ byl zaznamenán např. u *Leptomonas podlipaevi*. V hostiteli i v kultuře (a to i dvakrát klonované) byly pozorovány dva typy promastigotů – jeden s typicky protáhlým tělem a dopředu směřujícím dlouhým bičíkem, a druhý oválného tvaru s krátkým či sotva vyčnívajícím bičíkem. Molekulárně-biologické analýzy potvrdily, že se jedná o tentýž organismus schopný morfologické diferenciaci (Yurchenko a kol., 2006b). Podobná heterogenita, zahrnující dokonce tři zcela odlišná stadia, byla pozorována u doposud nepopsaného druhu rodu *Herpetomonas* sp. (Zídková, osobní sdělení). Faktory spouštějící tento proces nám zatím nejsou známe, víme pouze, že v kulturách s omezenými podmínkami (agarové plotny) se vyskytují kratší typy, zatímco buňky s okamžitým přístupem k živinám a kyslíku jsou často delšího typu. Kultivací mohou být indukovány signifikantní morfologické změny buněk izolovaných z hmyzu a populace *in vivo* a *in vitro* se mohou zdatelně odlišovat. U druhu *Sergeia podlipaevi* například dochází v porovnání se stádiem v hmyzu ke zdvojnásobení délky buněk po kultivaci v umělém mediu (Svobodová a kol., 2007). Výzkumy buněčných morfotypů v hostiteli jednoznačně prokázaly, že morfologické popisy jsou sice důležité, ale pro správnou klasifikaci zdaleka nedostačují. Formy trypanosomatid v jednom hostiteli mohou být značně variabilní. Takový nález může znamenat smíšenou infekci, právě tak jako výskyt různých morfologických stadií jednoho druhu parazita. Kromě toho jsou dané morfotypy značně ovlivněny vlivy vnějšího prostředí i samotnou kultivací. Vzhledem k tomu, že morfologické rozdíly byly v minulosti hlavním taxonomickým kritériem, je bohužel platnost mnoha dříve popsáných druhů sporná, stejně tak jako řazení jednotlivých druhů do příslušných rodů (Podlipaev a kol., 2004b; Svobodová a kol., 2007; Yurchenko a kol., 2007).



**Obr 1.** Jednotlivá morfologická stadia trypanosomatid (dle Vickerman, 1990)

AM: amastigot; EM: epimastigot; CHM: choanomastigot; OPM: opistomastigot; PM: promastigot; TPM: trypomastigot; fk: flagelární kapsa; k: kinetoplast

(a) *Leptomonas oncopelti* PM, s přisedlými cystami; (b) *Herpetomonas muscarum* PM; (c) *H. muscarum* OPM; (d) *Crithidia fasciculata* CHM, nektomonáda; (e) *C. fasciculata* CHM, haptomonáda; (f) *C. oncopelti* CHM, buňka s endosymbionty; (g) *Blastocrithidia familiaris* EPM, 2 cysty; (h) *Leishmania major* PM; (i) *L. major* AM; (j) *Phytomonas elmassiani* PM, dělící se stádium z latexu rostlin; (k) *Rhynchoidomonas drosophilae* TPM; (l) *Endotrypanum schaudinni* EPM, z krvinek lenochoda; (m) *Trypanosoma grayi* TPM, z krve krokodýla; (n) *T. cyclops* TPM, z krve makaka; (o) *T. cyclops* EPM, s pigmentovanou trávicí vakuolou (tv); (p) *T. musculi* TPM, z krve myši; (q) *T. rangeli* TPM, z krve člověka; (r) *T. dionisii* TPM, z krve netopýra; (s) *T. vivax* TPM, z krve dobytka; (t) *T. congolense* TPM, z krve dobytka; (u) *T. brucei* TPM, štíhlá krevní forma; (v) *T. brucei* TPM, krátká, zavalitá krevní forma; (w) *T. evansi* TPM, diskinetoplastie, z krve velblouda; (x) *T. suis* TPM, z krve prasete

**Tab 1.** Přehled hostitelské specifity, počtu druhů a typů buněk u jednotlivých rodů jednohostitelských trypanosomatid. Zpracováno dle: Podlipaev (1990); Vickerman (2000); Svobodová a kol. (2007), internetové databáze (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=96332>)

Rod	Morfologická stadia (v pořadí dle četnosti výskytu)	Hostitel (v abecedním pořadí)	Počet pojmenovaných druhů
<i>Blastocrithidia</i>	epimastigot, amastigot, cysta	Acari, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Siphonaptera	39
<i>Crithidia</i>	choanomastigot, epimastigot	Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Orthoptera, Trichoptera	35
<i>Herpetomonas</i>	promastigot, opisthomastigot, paramastigot, (epimastigot)	Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera	16
<i>Leptomonas</i>	promastigot, endomastigot cysta	Blattodea, Ciliata, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Nematoda, Siphonaptera	69
<i>Rhynchoidomonas</i>	trypomastigot, epimastigot, amastigot	Diptera, Lepidoptera	7
<i>Sergeia</i>	promastigot	Diptera (Ceratopogonidae)	1
<i>Wallaceina</i>	endomastigot, promastigot	Hemiptera (Nabidae, Miridae)	3

### 3.2 Acidocalcisomy

Poměrně nově popsanou organelou, použitelnou případně i při determinaci trypanosomatid, jsou acidocalcisomy, organely bohaté na vápník a podílející se na iontové homeostázi. Poprvé byly popsány u druhu *Trypanosoma brucei* (Vercesi a kol., 1994). Jak se ukázalo později, vyskytují se i u jiných prvoků včetně skupiny *Apicomplexa* a dalších zástupců čeledi Trypanosomatidae (Docampo a Moreno, 1999).

Acidocalcisomy různých trypanosomatid zaujímají v průměru 1–3 % objemu buňky. Obsahují stejné prvky, avšak v závislosti na druhu se liší v jejich relativních koncentracích. Zástupci trypanosomatid se shodují v základním složení obsažených prvků, tj. železa, kyslíku, sodíku, hořčíku, fosforu, vápníku a zinku, ale jejich relativní koncentrace se mezi jednotlivými druhy liší. Na základě semikvantitativních analýz (Miranda a kol., 2004) byly rozlišeny čtyři odlišné typy acidocalcisomů: (a) s vysokým obsahem vápníku, (b) s hojností železa, (c) s převažujícím zastoupením zinku a (d) se zvýšenou koncentrací všech tří kationtů. Nejnápadnějším rysem je tedy kvantitativně odlišné složení prvků mezi různými zástupci, např. acidocalcisomy *B. culicis* obsahují více železa než vápníku a zinku, u *H. angulsteri* je naopak hlavní složkou vápník. Fosfor je v acidocalcisomech skladován především ve formě pyrofosfátu (PPi) a krátkých i dlouhých řetězců polyfosfátů (polyP), na

které se vážou kationty. Železo je přítomné vždy, ačkoliv u *C. deanei* a *H. muscarum* jen v nízkých koncentracích. Pouze nepatrný díl částic přítomných v acidocalcosomech je mobilní, většina je vázaná.

Jak prokázaly morfometrické analýzy (Miranda a kol., 2004), počet, průměr i celkový objem organel se mezi druhy liší. Obecně platí, že čím je organel v buňce méně, tím bývají větší. Acidocalcisy *H. angulsteri* mají čtyřikrát větší objem než acidocalcisy u stejně velkých buněk druhu *B. culicis*. Tento nepoměr je kompenzován čtyřikrát větším počtem organel u *B. culicis*. Zatím však není jasné, zdali jsou mezidruhové rozdíly v počtu, objemu a složení acidocalcisomů podmíněné růstovými podmínkami, nebo druhově specifickými mechanismy příjmu iontů.

Většina doposud studovaných parazitů ze skupiny Trypanosomatidae obsahuje kulovité acidocalcisy rozmístěné po celé buňce. V případě některých druhů rodu *Herpetomonas* jsou acidocalcisy situované ve středu buňky u jádra, u *B. culicis* se vyskytují v laterální oblasti flagelární kapsy, v blízkosti endosymbionta. Ve velikosti a uspořádání elektrondenzního obsahu acidocalcisomů byly zjištěny pouze nepatrné rozdíly.

Jednou z funkcí přisuzovaných acidocalcisomům je úloha v adaptaci na různé podmínky okolního prostředí (pH, teplota, dostupnost iontů). Protože se různí parazité během života setkávají s různými podmínkami v hostitelích (hmyz, rostliny, savci), kvantitativní rozdíly mezi buňkami izolátů mohou také odrážet různé kationtové nároky.

Jednohostitelská trypanosomatida představují vhodný model pro srovnávací studie složení acidocalcisomů, protože mohou být kultivováni za shodných podmínek, a tím je možno odhalit, zda složení, počet i objem organel je závislý na druhových charakteristikách, nebo spíše na podmínkách během růstu. Studie Mirandy a kol. (2004), ve které byly použity shodné kultivační podmínky, ukazuje spíše na první variantu.

### 3.3 Hostitelská specifita

V minulosti byl při definování rodů kladen důraz na taxonomické zařazení hostitele a především na skutečnost, zda životní cyklus zahrnuje jednoho, nebo dva hostitele. Otázka hostitelské specifity nebyla nikdy zcela jednoznačně zodpovězena. Obecně však existovala spíše představa vysoké hostitelské specifity, která se projevila četnými popisy druhů na základě jejich nálezu v nových hostitelích. Názor „co hostitel, to nový druh“ byl postupně nahrazen představou euryxenního charakteru většiny jednohostitelských zástupců (podrobněji viz kap. 6).

Pravidla pro rozeznávání a popis zejména monoxenních trypanosomatid vytvořil r. 1983 Wallace a kol. Shrnul dosavadní postupy a navrhl využití dalších technik, které by odhalily biochemické, nutriční, ultrastrukturní a další rozdíly. Tento nástin byl skutečně uplatněn v pozdějších výzkumech zaměřených na identifikaci a popis nových druhů. Společně s tradičními morfologickými metodami popisu se postupně objevilo i mnoho

dalších alternativ. Vzhledem k tomu, že některá trypanosomatida se, jako jedna z mála skupin prvoků, poměrně snadno množí na axenickém mediu pevné či kapalné povahy, bylo této vlastnosti využito jako nástroje k odlišení druhů. První studie se objevily již ve dvacátých letech (Nöller, 1917; Nieschulz, 1922, 1924; cit. dle Podlipaev a Naumov, 2000) a jsou aktuální ještě dnes (Podlipaev a Naumov, 2000). Stejně tak jako u bakteriálních kolonií, je i u kolonií kinetoplastid na agarových plotnách sledována především jejich velikost, hustota buněk a polymorfismus ve tvaru. V případě některých charakteristických fenotypů, např. u *Leptomonas peterhoffi* se při dlouhodobých kultivacích ukázalo, že jde o dědičný znak (Podlipaev, 1985).

Dalším užívaným kritériem je růst, respektive rychlost množení organismů v kultuře a jejich odpověď na okolní podmínky, tj. teplotní rozpětí a teplotní optimum, pH a osmolarita. Bylo popsáno několik termofilních forem, které rostou při 37 °C (Roitman a kol., 1977) a několik, které vyžadují, či tolerují nízké pH (McGhee a kol., 1969).

### 3.4 Energetický metabolismus

Metabolismus trypanosomatidů se projevuje v množství biochemických a morfologických zvláštností. Tak jako u dalších parazitických prvoků, se změna vnějších podmínek odráží na alternativních cestách energetického metabolismu. U *Herpetomonas roitmani* byly pozorovány změny na úrovni ultrastruktury i metabolických drah v závislosti na zdroji uhlíku. V přítomnosti prolinu se u bičíkovic objevilo více lipidových inkluzí, rozsáhlejší mitochondrie s větším počtem krist, zvýšená aktivita cytochrom c reductázy a také se zvýšil počet promastigotů v kultuře. Buňky metabolizující glukózu vykazovaly více glykosomů, preferenčně umístěných poblíž endosymbiontů, a vyšší aktivitu hexokinázy (Faria-e-Silva a kol., 2000).

Organismy mohou být rozlišovány i podle látek, které vyžadují k růstu. K určení těchto látek je zapotřebí definovaného media, v němž může být vynechána daná složka. Tato metoda je vhodná k určení rodů, které vyžadují v mediu některé esenciální látky, a k odhalení symbiontů. Dosud známé druhy obsahující symbionty nevyžadují hem (Chang a Trager, 1974). Další potřebné látky, o nichž se ví, že jsou zajišťovány symbionty, jsou puriny, osm aminokyselin, pyridoxin, riboflavin, pantothenát a ornitinkarbamoyltransferáza (Camargo a Freymüller, 1977; Mundim a Roitman, 1977; Alfieri a Camargo, 1982).

Společným znakem mnoha trypanosomatid je schopnost využívat jako zdroj energie cukry i aminokyseliny, což jim umožňuje kolonizovat různé hostitele. Všestrannost ve využití substrátů je bezpochyby nesmírnou výhodou např. u krevsajících hostitelů, jejichž natrávený střevní obsah je zdrojem velkého množství aminokyselin. Jednohostitelská trypanosomatida využívají široké spektrum cukrů, žádný z nich přitom není vyžadován esenciálně. V rychlosti a míře využití různých cukrů existují rozdíly. Takřka všechny druhy zužitkovávají fruktózu, glukózu, galaktózu, manózu, sacharózu a rafinózu, proto by testy na

tyto cukry nebyly vhodné k taxonomickým charakteristikám. K těm, které prozrazují rozdíly, patří mannitol, ribóza, xylóza, laktóza, maltóza, glycerol, dulcitol, eritrol a arabinóza. K otestování jejich využití slouží zjištění spotřeby cukru a kyslíku a rychlost růstu (přehled viz Wallace a kol., 1983).

Vzájemné rozdíly ve využití aminokyselin a dalších dusíkatých sloučenin jsou pouze nepatrné. K rozlišení rodové příslušnosti mohou sloužit rozdíly v nárocích na arginin, citrulin a ornithin (Camargo a kol., 1978; Figueiredo a kol., 1978; Yoshida a kol., 1978b). Arginin je obecně požadován všemi trypanosomatidy, přičemž u všech testovaných druhů crithidií může být nahrazen citrulinem, zatímco u některých druhů rodu *Herpetomonas* může daný požadavek splnit arginin, citrulin, nebo ornithin. U rodu *Leptomonas* nemůže být arginin zastoupen žádnou jinou aminokyselinou.

Obsah lipidů podléhá rozdílům v závislosti na mediu a podmínkách kultivace. U rodů *Crithidia* a *Leptomonas* je zastoupení lipidů kvalitativně podobné a k odlišení nových rodů je tedy pravděpodobně nevhodné. K vyřešení taxonomické příslušnosti by naopak mohl přispět výskyt cyklopropanových mastných kyselin u některých zástupců, zvláště u rodu *Herpetomonas* (Fish a kol., 1981).

Jedinými exkrečními produkty, o kterých zatím víme, že mají jistý taxonomický význam pro identifikaci rodů, jsou amoniak a močovina, jejichž produkce souvisí s výskytem určitých enzymů ornithin-argininového cyklu. Rod *Herpetomonas* vylučuje pouze amoniak, rod *Crithidia* může vyměšovat buď amoniak, nebo močovinu, podle toho, zda medium obsahuje arginin či citrulin. Rod *Leptomonas* exkretuje močovinu, a některé druhy také amoniak (Yoshida a Camargo, 1978).

Trypanosomatida mohou být srovnáváni i z hlediska rozdílů v proteolytické aktivitě. Proteinázy hrají důležitou roli zejména v patogenitě dvouhostitelských trypanosomatid. U většiny zástupců čeledi byly detekovány dvě kategorie proteináz, a to metaloproteinázy a cysteinproteinázy. Tyto enzymy měly odlišné pH optimum: zatímco aktivita metaloproteináz zůstávala v širokém rozpětí stupnice pH neměnná, pro aktivitu cysteinproteináz bylo optimální kyselé pH (Branquinha a kol., 1994).

Jinou metodou pro zařazení do rodu je určení přítomnosti či nepřítomnosti ornithin-arginin metabolických enzymů. Všechna testovaná jednohostitelská trypanosomatida mají citrulinhydrolázu. *Leptomonas* dále obsahuje pouze arginázu a *Crithidia* arginázu a arginosukcinátlyázu. *Herpetomonas* vlastní arginindeiminázu, a některé druhy mají ornithinkarbamoyltransferázu. Žádný druh rodu *Herpetomonas* nemá arginázu a žádný druh rodu *Crithidia* neobsahuje arginindeiminázu a ureázu (Camargo a kol., 1978; Figueiredo a kol., 1978; Yoshida a kol., 1978b).

Úspěšně užívanou metodou k vytváření a odlišení skupin různé taxonomické úrovně je charakterizace pomocí isoenzymů, respektive jejich odlišné pohyblivosti v elektrickém poli, a to zvláště v případě isoenzymů souvisejících s metabolismem cukrů. Ve studii z r. 1979

(De Lima a kol.) byla metoda aplikována na *Blastocrithidia culicis*, *Crithidia deanei*, *C. fasciculata*, *Herpetomonas samuelpessoai*, *Leptomonas seymouri* a *Leishmania tarentolae* s využitím šesti enzymů: jablečného enzymu (ME), glukosa-6-fosfátdehydrogenázy (G6PD), aspartátaminotransferázy (ASAT), alaninaminotransferázy (ALAT), fosfoglukomtázy (PGM) a glukosafosfátisomerázy (GPI).

U 14 izolátů (*Trypanosoma cruzi* a 13 monoxenních trypanosomatid) byly srovnány povrchové proteiny po radio-jodizaci a elektroforéze (Camargo a kol., 1982) a jejich vzorce byly odlišné pro každý druh. Metoda by mohla být používána ke srovnávání nových izolátů s jinými kulturami.

### 3.5 Sérologie

V minulosti proběhlo několik vážných pokusů použít pro identifikaci a klasifikaci jednohostitelských trypanosomatidů sérologické metody. Noguchi (1926) použil aglutinaci, ale uplatnil spíše primitivní metody a velmi nízká ředění. McGhee a spolupracovníci (McGhee a Hanson, 1963b; McGhee a kol., 1969) aplikací stejné metody zjistili, že organismy izolované z dipter odpovídaly jako jedna skupina a organismy z hemipter jako druhá. Toho je možné využít při určování zdroje kultur nejistého původu, např. bičíkovců z dravého hmyzu jako jsou ploštice, kteří mohou pocházet z kořisti. Pro detailnější taxonomické studie je však využití metod založených na serologii značně diskutabilní.

### 3.6 Sexuální rozmnožování

Předpokládá se, že zástupci čeledi Trypanosomatidae jsou převážně asexuální, čímž je bohužel znemožněno využití reprodukční bariéry pro determinaci druhů. Běžné sexuální rozmnožování, odehrávající se ve vektorovi, bylo zjištěno pouze u *Trypanosoma brucei* (Jenni a kol., 1986). Sexuální reprodukce u *T. cruzi* (Gaunt a kol., 2003) a u zástupců rodu *Leishmania* (Belli a kol., 1994; Banuls a kol., 1997) je spíše výjimečnou záležitostí a často pro ni svědčí pouze nepřímé důkazy. U *Crithidia fasciculata* byl pozorován poměrně hojný výskyt mutantních jedinců rezistentních k různým jedům, avšak výměna genetické informace u tohoto, ani u jiných druhů jednohostitelských trypanosomatid, prokázána nebyla (Votýpka a kol., 2001). Jak uvedl Hamilton a kol. (1990), sex se vyvinul jako obranný mechanismus proti parazitům. Antiparazitární mechanismy neustále zastarávají a hostitel, který chce odolat parazitární nákaze, musí neustále obměňovat kombinace genů na základě sexuálního rozmnožování. Trypanosomatida, která příliš netrpí bakteriálními ani virovými nákazami by v souladu s touto teorií byli od sexuálního procesu oproštěni. Zdroje genetické variability však mohou být jiného původu, např. podle laboratorních experimentů dokáží trypanosomatida přijmout cizí DNA (Hughes a Simpson, 1986).

### 3.7 Molekulárně-biologické metody

Počet chromozomů, využívaný u jiných taxonomických skupin, pravděpodobně není v případě trypanosomatid vhodným kritériem. K popisu *Herpetomonas sarcophagae* (pravděpodobně se jedná o synonymum k *Herpetomonas muscarum*) jej použil např. Prowazek, 1904 (cit. dle Wallace a kol., 1983). Chromosomy trypanosomatidů jsou však malé a mitotické útvary jsou vzácné a nepříliš dobře rozlišitelné obvyklými barvicími technikami. K určení počtu a velikosti chromozomů je možné použít pulsní elektroforézu PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis). Vymezením karyotypu je tato metoda vhodná pro odlišení kmenů, nikoliv však druhů (Romeiro a kol., 2000).

Genotyp a samotná DNA mohou být studovány buď přímo (chemickými a fyzikálními metodami), nebo nepřímo z fenotypu organismu v podobě výše zmíněných metod. Kinetoplastová DNA je díky své poměrně malé molekulové hmotnosti velmi vhodná pro metodu genetické identifikace („fingerprinting“) fragmentací restrikčními endonukleázami a následnou elektroforézou produktů. Při této metodě vykazuje každý druh své charakteristické schéma, avšak různé kmeny stejného druhu vykazují totožné schéma (Camargo a kol., 1982). K odlišení druhů lze použít také metody RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) založené na amplifikaci nesespecifických úseků genomové DNA pomocí krátkých primerů s náhodnou sekvencí (využití této metody viz např. Svobodová a kol., 2007).

Relativně jednoduchým nástrojem k identifikaci druhů či příbuzných skupin je analýza velikosti kDNA minikroužků a velikosti kinetoplastu. Brandao a kol. (2000) na základě těchto odlišností rozčlenil 15 druhů choanomastigotních trypanosomatidů do čtyř větví. Uvedená data se shodují i s výsledky jiné molekulární studie, kdy byla srovnávána velikost linearizovaných minikroužků u různých druhů trypanosom (Lukeš a Votýpka, 2000).

Veškeré další metody jsou již založeny na sekvenování příslušných úseků DNA (SL RNA, SSU rRNA, gGAPDH a dalších). V rámci zjištění vztahů uvnitř jednotlivých rodů je od r. 1993 (Fernandes a kol.) s využitím PCR (Polymerase Chain Reaction) zaměřena pozornost na tzv. splice leader (SL) úsek DNA. Tyto úseky jsou specifické pro kinetoplastida a podílejí se na „transplicingu“. Analýza SL RNA byla v poslední době např. zvolena k odhalení biodiverzity trypanosomatidů u kostarických ploštic (Westenberger a kol., 2004; Yurchenko a kol., 2006b). Analýza SL RNA genových repetitív přímo ze vzorků pitvaných ploštic skýtá hned několik výhod (a) je vhodná pro organismy, které je obtížné či nemožné kultivovat, (b) předchází kultivaci způsobené homogenizací smíšených infekcí, (c) vystačí si s malým množstvím genetického materiálu, přičemž umožňuje amplifikaci DNA přímo ze vzorků získaných z hostitelů a (d) cílový gen se nevyskytuje v hmyzích či obratlovčích hostitelích. Soubor genů SL RNA o mnoha kopiích (tzv. mini-exon donor RNA) tak představuje jednu z nejužitečnějších metod, nevýhodou je však poměrně malá velikost tohoto úseku. Vysoce konzervovaná oblast exonové sekvence umožňuje účinnou a



přesnou amplifikací z širokého spektra druhů. Ze získaných sekvencí lze organismy předběžně třídit do taxonomických skupin. Exony obsahují specifické nukleotidy, které mohou představovat diagnostické znaky pro určité druhy, skupiny druhů, či rodů (Sturm a kol., 1995). Mírně nestálý intron se hodí pro rozlišení blízce příbuzných druhů, zatímco hypervariabilní, extrémně dlouhá a rychle se vyvíjející mezigenová oblast zajišťuje nejjemnější úroveň rozlišení mezi jednotlivými populacemi.

Analýza SSU rRNA či analýza genů kódujících proteiny nezajišťuje (vzhledem k pomalé divergenci sekvencí) dostatečné rozlišení blízce příbuzných druhů, hodí se však pro studium evoluce v širším časovém měřítku, tedy pro zařazení do rodu či skupin druhů. K rozeznání blízce příbuzných druhů či kmenů (často vzniklých klonální selekcí) je naopak vhodná rychle se vyvíjející mezigenová oblast SL RNA repetice (Podlipaev a kol., 2004a; Westenberger a kol., 2004). Dalšími potenciálně užitečnými molekulárními „markery“ pro analýzu na úrovni druhů, poddruhů a kmenů jsou ribosomální mezigenové oblasti, tzv. ITS (Da Silva a kol., 2004), případně mikrosatelity (Jamjoom a kol., 2002).

K dalším metodám, využívaným zejména při fylogenetických studiích, patří analýza genů pro glykosomální glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázu (gGAPDH) (např. Yurchenko a kol., 2006a, b; Svobodová a kol., 2007), enzym katalyzující oxidativní fosforylaci glycerinaldehyd-3-fosfátu (GAP) na 1,3-bisfosfoglycerát (BPG). Pro fylogenetické účely jsou uplatňovány také analýzy genů pro „heat shock“ proteiny o velikosti 70 kDa a 90 kDa (HSP70, HSP 90) (např. Simpson a kol., 2004), které zastávají funkci chaperonů a chrání buňku před stresem.

### 3.8 Klasická taxonomie versus molekulární fylogenetika

V současné době jsou pro účely taxonomických i fylogenetických analýz využívány především techniky molekulární biologie (sekvenace z 18S neboli SSU rRNA, 5S rRNA, SL RNA a genů pro gGAPDH, analýza genů kódujících heat shock proteiny HSP90 a HSP70), dále postupy imunologické (nepřímá fluorescence, lektinová aglutinace), biochemické (charakterizace isoenzymů za využití elektroforézy, multilokusová enzymová elektroforéza, složení povrchových polysacharidů, sialidáz a proteolytických enzymů), postupy sledující výživu, růst aj. K popisu morfologie a ultrastruktury slouží světelná a elektronová mikroskopie. Některé z uvedených metod postačují k rozlišení mezi liniemi a druhy, jiné jsou vhodné pro rodové zařazení.

Kombinace moderních metod s tradičními morfologickými popisy a průzkumem ultrastruktury (doplňené o složení acidokalcisomů, přítomnost endosymbiontů atd.) dnes umožňuje lepší srovnání a zařazení druhů, nicméně na mnoha taxonomických úrovních stále ještě existují značné nejasnosti způsobené nejednoznačností morfologických stadií či smíšenými infekcemi. Taxonomie této skupiny tak zůstává stále nedostatečně zpracována. Příkladem mohou být i kultury určené v různých laboratořích jako *Crithidia oncopelti*. O

jedné takové se však později zjistilo, že jde o shodně pojmenované izoláty lišící se sekvencí SSU rRNA (Du a Chang, 1994), tudíž je pravděpodobné, že jako *C. oncopelti* byly označeny rozdílné organismy.

Podle nejnovějších studií (Yurchenko a kol., 2007) se ukazuje, že současná definice rodu na základě morfologických stádií je neudržitelná. Dokladem jsou tři nové druhy jednohostitelských trypanosomatid, izolovaných z neotropických ploštic, které byly podle charakteristického promastigotního stadia předběžně přiřazeny k rodu *Leptomonas* (*L. acus*, *L. tarcoles*, *L. bifurcata*). Fylogenetické analýzy genů pro GAPDH a SSU rRNA však ukázaly, že tyto bičíkovci jsou nejbližší příbuzní druhům rodu *Crithidia*. Klasifikace trypanosomatid z hlediska morfologických charakteristik se tedy jeví jako zavádějící a vzhledem k značným neshodám s výsledky fylogenetických studií by měla být opuštěna.

Taxonomie monogenetických trypanosomatid je nyní ve stavu neustálých změn. Molekulárně sekvenční techniky radikálně přetváří dosavadní náhled na fylogenezi těchto organismů. Nejstarší linii po bodonidech představují africké trypanosomy, následované ostatními druhy trypanosom, dále rody *Blastocrithidia*, *Herpetomonas* a *Phytomonas*, přičemž *Leptomonas*, *Crithidia*, *Leishmania* a *Endotrypanum* tvoří korunu evolučního stromu (shrnul Vickerman, 1994). Podle těchto výsledků tedy dvouhostitelští parazité nemají stejného společného předka. Linie rodu *Trypanosoma* je evolučně nejstarší a pochází patrně přímo z původního trypanosomatida, zatímco linie rodu *Leishmania* a *Endotrypanum* se oddělily až později od jednohostitelských rodů.

Zatímco v některých případech se výsledky studií shodly s morfologicky založenými popisy, v mnoha případech se zároveň posílily existující pochybnosti o dosavadním rodovém rozdělení. Mezi některými zástupci různých rodů jsou na základě molekulárních dat postupně odhalovány hlubší paralely, než mezi členy domněle stejných rodů a od absolutní důvěry v tradiční charakteristiky těchto rodů je postupně upouštěno. Fylogenetické analýzy poukazují na polyfylii nejméně čtyř tradičně popisovaných rodů (*Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia*) (Hollar a kol., 1998; Merzlyak a kol., 2001; Yurchenko a kol., 2006b; Svobodová a kol., 2007). Postupem času byly vytvořeny čtyři hlavní větve nižších trypanosomatidů: „*Phytomonas*“, „*Herpetomonas*“, „pomalu se vyvíjející“ a „zástupci obsahující endosymbionty“. Do endosymbiontické větve byly zařazeny druhy r. *Crithidia* s výjimkou *C. fasciculata*, která reprezentuje rod *Crithidia* na SSU stromě (Du a Chang, 1994; Hollar a kol., 1998). Další linie se objevují s postupnou izolací nových druhů.

S nově objevenými trypanosomatidy se hroubí dokonce i rozdíly mezi jednohostitelskými a dvouhostitelskými rody. Názorným příkladem je nedávno izolovaný *Leptomonas costaricensis*, nejbližší známý příbuzný rodu *Leishmania*, který by mohl napomoci k objasnění přechodu trypanosomatid na dvouhostitelský životní cyklus (Yurchenko a kol., 2006a). Podobně i monoxenní trypanosomatida získaná z rostlinných

izolátů ohrožují výsadní postavení rostlinného parazita, které doposud náleželo rodu *Phytomonas* (Catarino a kol., 2001; Momen, 2001).

#### 4. Endosymbiotické bakterie

Některé druhy trypanosomatid hostí ve svých buňkách endosymbiotické bakterie. Tyto organismy byly nejdříve považovány za specifické organely, popsané jako diplosomy (Novy a kol., 1907; cit. dle De Souza a Motta, 1999), a následně jako bipolární tělíška (Newton a Horne, 1957; cit. dle De Souza a Motta, 1999). K přehodnocení názoru došlo poté, co byla v „organelách“ zjištěna bakteriální DNA a také v souvislosti s vymizením těchto „organel“ po přidání antibiotik do kultivačního media.

Endosymbionti obvykle dosahují délky 1,3–2,3  $\mu\text{m}$  a šířky 0,3–1,0  $\mu\text{m}$ . Nachází se nejčastěji poblíž jádra hostitelské buňky některých monoxenních trypanosomatid, a to zpravidla v počtu jedné bakterie (De Souza a Motta, 1999). Je zajímavé, že dixenní rody *Trypanosoma*, *Leishmania* a *Phytomonas* nehostí žádné symbionty. V případě těchto tří rodů se pravděpodobně jedná o jediné monofyletické skupiny, zatímco monoxenní rody představují skupiny polyfyletické nebo parafyletické (shrnul Simpson a kol., 2006).

Symbionti se množí synchronně se svým hostitelem. Po skončení mitózy tak každá dceřinná buňka obsahuje jednu symbiotickou bakterii. Transmisní elektronovou mikroskopií bylo zjištěno, že endosymbionti jsou obklopeni dvěma membránami. Pro výskyt ekvivalentů buněčné stěny či peptidoglykanové vrstvy doposud nemáme žádné morfologické důkazy, ale je pravděpodobné, že podobná struktura existuje alespoň v redukovaném stavu. Matrix endosymbiontů obsahuje dvě výrazné oblasti: elektrondenzní část s ribosomy a část elektronpropustnou, obsahující vlákna DNA (Chang a Trager, 1974; Mundim a Roitman, 1977; Soares a De Souza, 1988; cit. dle De Souza a Motta, 1999).

U druhů *Crithidia deanei*, *C. oncopelti* a *Blastocrithidia culicis* byly nalezeny v jednom hostitelském organismu 1–3 symbiotické buňky. Mezi symbionty těchto druhů byla zjištěna velmi podobná morfologie. Studie Du a Changa (1994) ukázala na analogii endosymbiontů crithidií s endosymbionty druhu *Blastocrithidia culicis* a jejich příbuznost s beta proteobakteriemi rodu *Bordetella*.

Dosavadní výzkumy ukazují, že přítomnost endosymbiontů vyvolává u trypanosomatid změny morfologického i biochemického rázu. Jednou z nich je větší počet periferních mitochondriálních větví. Ty jsou v některých případech připevněné k buněčnému povrchu a vytěsňují tak subpelikulární mikrotubuly. Nerovnoměrné rozmístění subpelikulárních mikrotubulů pod povrchem hostitelské buňky lze pak pozorovat i v elektronovém mikroskopu. Další odlišností u druhů se symbionty je absence paraflagelární tyče. Důvodem by mohlo být inhibiční působení endosymbiontů na expresi genů kódujících proteiny, z nichž je tato struktura vystavěna (Freymüller a Camargo, 1981). Mezi symbiotickými a aposymbiotickými druhy existují i rozdíly v uspořádání sítě kDNA. Vlákna kDNA tvoří

v přítomnosti endosymbiontů obvyklou kompaktní diskovitou strukturu, ale objemnější a více rozvolněnou síť vyplňující téměř celou kinetoplastovou kapsuli.

Výskyt endosymbiontů má vliv i na metabolismus trypanosomatidů. Buňky trypanosomatid nejsou schopné syntetizovat tetrapyroly, a proto musí být kultivační media obohacena o hemin, hematin či hemoglobin. Jak potvrdil již Lwoff u *C. oncopelti* (1937; cit. dle De Souza a Motta, 1999), zástupci hostící symbionty hemin nevyžadují. Vysvětlením tohoto faktu by byl nálezní uroporfyrinogensyntázy I, která však zatím nebyla prokázána. Dnes je k detekci izolátů obsahujících symbionty běžně užívána schopnost trypanosomatidů růst v chemicky definovaném mediu (např. neobsahujícím hemin). Dalšími látkami, které nemusí být přítomny v mediu, jsou ornitin, arginin, citrulin, isoleucin, valin a leucin. Endosymbionté totiž obsahují acetylnitrosylázu, threonindeaminázu a snad také ornitintraskarbamoylázu (Camargo a Freymüller, 1977; Galinari a Camargo, 1978; Alfieri a Camargo, 1982). Tato pozorování potvrzují domněnku, že některé, pro trypanosomatida důležité, metabolity jsou syntetizovány právě endosymbionty. Studie druhu *C. deanei* (Motta a kol., 1997) vypovídají o úzkém biochemickém propojení endosymbionta s glykosomy hostitele. Tyto bakteriální mikroorganismy mají pravděpodobně nefunkční dýchací řetězec a využívají část ATP vyprodukovanou hostitelskou mitochondrií a glykosomem.

Přítomnost endosymbiontů možná souvisí i s charakterem životního cyklu u hostitelské buňky. U druhu *Herpetomonas roitmani*, kde byli endosymbionti eliminováni aplikací chloramphenicolu, se významně zvýšil proces přeměny promastigotů na opisthomastigoty (Faria-e-Silva a kol., 1994).

V neposlední řadě je výskyt endosymbiontů spojen i s fylogenetickým postavením jednohostitelských druhů trypanosomatid. Současné studie ukazují některé rody jako parafyletické skupiny, neboť symbiotické a asymbiotické druhy v rámci příslušného rodu tvoří i přes větší podobnost buněk odlišné větve (Du a Chang, 1994; Hollar a kol., 1998).

Uměle vytvořené aposymbiotické kmeny trypanosomatid, tj. kmeny „přeléčené“ antibiotiky, nabízejí možnost studia vlivu endosymbiontů na hostitele. Tyto metody však vnesly do celé záležitosti ještě větší chaos. Ačkoliv morfologické charakteristiky antibiotiky léčených jedinců by se měly shodovat s charakteristikami typickými pro jedince bez symbiontů (paraflagelární tyč, subpelikulární mikrotubuly po celém obvodu, kompaktní kinetoplast), u experimentů s druhy *C. deanei*, *C. oncopelti* a *B. culicis* tomu bylo právě naopak. Přestože tyto kmeny zbavené symbiontů byly drženy v kultuře po několik let, jejich morfologie byla totožná s původními rodičovskými kmeny. Jestliže jsou ale morfologické změny způsobené výlučně endosymbionty, nemělo by k tomuto jevu dojít. Vysvětlením by mohl být vliv dlouhotrvající endosymbiózy na genetickou mašinérii a následné změny na fenotypové úrovni, které nelze zvrátit pouhým odstraněním symbionta. Nemůže být vyloučena ani možnost, že odlišná morfologie buněk existovala ještě před jejich osídlením endosymbionty a vlastnictví právě takových znaků mohlo způsobit větší náchylnost k tomuto

osídlení. Tato hypotéza by byla ve shodě s fylogenetickým postavením symbiontních zástupců, kteří vytvářejí samostatnou větev, oddělenou od všech ostatních (tedy asymbiontních) zástupců jednohostitelských trypanosomatid.

## 5. Výskyt jednohostitelských trypanosomatid

Doposud bylo popsáno na 550 druhů hmyzu, sloužících jednohostitelským trypanosomatidům za hostitele (shrnutí Podlipaev, 2001). Odhaduje se však, že z více než milionu známých druhů hmyzu bylo parazitologie studováno maximálně 2500 druhů, tedy pouze nepatrná část, navíc z omezeného počtu lokalit (Podlipaev, 2000). Zatímco u řádů Hemiptera a Diptera bylo objeveno přibližně 300 druhů monoxenních trypanosomatid, u sedmi dalších řádů hmyzu bylo popsáno pouze několik (cca 20) nejistých či sporadických nálezů (Podlipaev, 1990). Teixeira a kol. (2000) odhadli, že z celkového počtu 23 tisíc druhů ploštic bylo na přítomnost trypanosomatid studováno pouze 500 až 600 druhů. Celkově bylo popsáno více než 300 druhů hmyzích trypanosomatid (Podlipaev, 1990), mezi nimiž se však nachází mnoho sporných a synonymních popisů. I přesto se ale předpokládá, že celkový počet druhů jednohostitelských trypanosomatid bude o několik řádů vyšší.

### 5.1 Geografické rozšíření jednohostitelských trypanosomatid

Hranice výskytu jednohostitelských trypanosomatid sahají až k polárnímu kruhu a tyto parazity byli nalezeni i v pouštích a horách ve výšce 3500 m n. m. S výjimkou Antarktidy se jednohostitelská trypanosomatida vyskytují celosvětově, avšak ne všude proběhl detailnější výzkum jejich diverzity. Mezi nejvíce probádaná území v současné době patří oblast Střední a Jižní Ameriky (např. studie od Maslova, Lukeše, Yurchenka ad.) a oblast bývalého Sovětského svazu, tj. dnešního Ruska a nových samostatných států ve střední Asii (např. studie od Podlipaeva, Frolova ad.). Naopak velmi málo je známo o trypanosomatidech z hmyzu vyskytujícího se v tak rozsáhlých oblastech jako je jihovýchodní Asie a Japonsko, Austrálie či Afrika.

### 5.2 Spektrum hostitelů jednohostitelských trypanosomatid

Hostitelská specifita monoxenních trypanosomatid není doposud dostatečně prostudována. Dřívější názor „co hostitel, to nový druh parazita“ je postupně nahrazován spíše představou širší hostitelské specifiky. K dalšímu objasnění této problematiky by mohly přispět také experimentální infekce, avšak v současné době jsou takové pokusy spíše vzácností.

#### 5.2.1 Hmyz

Většině jednohostitelských trypanosomatid slouží za hostitele zástupci řádů Diptera (dvoukřídli) a Hemiptera (ploštice). Poměrně hojně je mezi hostiteli zastoupen také řád Siphonaptera (blechy). Několik málo druhů můžeme sporadicky nalézt i mezi zástupci řádů

Anoplura (vši)<sup>2</sup>, Blattodea (švábi), Coleoptera (brouci), Homoptera (stejnokřídli), Hymenoptera (blanokřídli), Lepidoptera (motýli), Mecoptera (srpice), Orthoptera (rovnokřídli) a Trichoptera (chrostíci) (Podlipaev, 1990). Nápadným znakem sdíleným některými hostiteli je bodavé ústní ústrojí, které by mohlo souviset s usnadněním přenosu parazitů, eventuálně by mohlo hrát roli v evoluční historii vývoje jednohostitelských a dvouhostitelských zástupců. Dominantně infikované řády hmyzu (Diptera, Hemiptera, Siphonaptera) patří k fylogeneticky vyspělým skupinám a podobně i dvouhostitelský *Phytomonas* byl zaznamenán u nejvyspělejších řádů rostlin. Tyto skutečnosti by mohli naznačovat, že k radiaci a speciaci trypanosomatid došlo až v poměrně nedávné historii. Dané téma bude podrobněji probráno v kapitole 6.

### 5.2.2 Ostatní bezobratlí

Jak ukazují některé záznamy, hmyz nemusí být nutně jediným hostitelem monoxenních trypanosomatid. Existují i neobvyklé nálezy rodu *Blastocrithidia* v klíšťatech, a rodu *Leptomonas* v mořském nematodovi a v makronukleu trepky. Některé z těchto zpráv ovšem nejsou zcela spolehlivé. Záznamy o *Blastocrithidia haemaphysalidis* (Patton a Strickland, 1908; cit. dle Podlipaev, 1990) a *B. hyalommae* (O'Farrel, 1913; cit. dle Podlipaev, 1990) pochází ze začátku 20. století. Ačkoliv jsou tyto práce dodnes citovány, k dalšímu záchytu blastocrithidií u klíšťat již nedošlo. Jedním z možných vysvětlení by mohla být např. záměna s trypanosomou, kterou klíště nasálo společně s krví hostitele.

Také v případě *Leptomonas buetshlii* (Kent, 1880) z nematoda *Tobrillus* (syn. *Trilobus*) *gracilis* se jedná o jediný záznam z tohoto hostitele, který se od té doby nepodařilo zopakovat. Ze zveřejněného popisu se navíc nedá s určitostí usuzovat na příslušnost k trypanosomatidům. Později byl u zmíněného nematoda nalezen bičíkatý příslušník čeledi Euglenidae (Nicoli a kol., 1971; cit. dle Podlipaev, 2000), nicméně skutečnost, zda byl tento organismus identický s jedincem, kterého popsál Kent, již bohužel nelze zpětně ověřit.

Narozdíl od předcházejících dvou případů jsou ciliární trypanosomatida poměrně dobře zdokumentována. *Leptomonas ciliatorum* infikuje makronukleus nálevníka *Paraholosticha sterkii* a prodělává zde celý životní cyklus (Görtz a Dieckmann, 1987). V makronukleu trepky *Paramecium trichium*, ale i v dalších nálevnicích (*Euplotes*, *P. caudatum*) byl nalezen *Leptomonas karyophilus* (Gillies a Hanson, 1963).

### 5.2.3 Rostliny jako hostitelé

Trypanosomatida běžně napadají i zástupce rostlinné říše. Na základě preference hostitelské tkáně mohou být rostlinní bičíkovci rozděleni do čtyř skupin: (a) **laktikola**, tj. parazité žijící v latexu různých čeledí rostlin s mléčnicemi, (b) **floemikola** zahrnující bičíkovce preferující

---

<sup>2</sup> Výskyt jednohostitelských trypanosomatid rodu *Leptomonas* u vši však uvádí pouze Podlipaev (1990) a vzhledem k nejasné problematice přenosu se jedná o značně nejistou informaci

cévy floemu palem, případně kávovníků ad., (c) **fruktikola**, kam patří bičíkovci nalézání v ovocné šťávě a semenech některých rostlinných čeledí, a (d) **florikola** čili bičíkovce v květech rostlin (zatím zjištěno jen u dvou druhů). První bičíkaté prvoky popsal u rostlin tvořících latex roku 1909 Lafont (cit. dle Catarino a kol., 2001). Dnes již dobře známý dvouhostitelský rod *Phytomonas*, přenášený fytofágním hmyzem (obvykle plošticemi), však není jediným zástupcem rostlinných bičíkovců. U rostlin byli objeveni i promastigoti jednohostitelských trypanosomatid r. *Crithidia*, *Herpetomonas* a *Leptomonas*. Jak se zdá, tyto infekce jsou mnohem častější, než se dříve předpokládalo (Catarino a kol., 2001). Při experimentální infekci semen kukuřice a plodů rajčat (Cavazzana a kol., 1998) různými rody trypanosomatid bylo dosaženo dlouhotrvající nákazy s intenzivním množením prvoků. Vzhledem k tomu, že byly postiženy pouze plody a semena, nelze zde hovořit o trvalé infekci rostlinného hostitele. Je však pravděpodobné, že nakažené plody jsou náchylnější k sekundárním infekcím a životaschopnost semen a zrn je snížena. Jak také ukazuje tato studie, přenos monoxenních trypanosomatid by mohl být uskutečňován fytofágním hmyzem. Taková skutečnost by u příslušných zástupců výše zmíněných rodů nepřímo ukazovala na možnost heteroxenního cyklu analogického s dixenním cyklem rodu *Phytomonas*. Na druhé straně je možné, že jde pouze o způsob přenosu z hmyzu na hmyz. Rostlinné plody mohou sloužit jako dočasný zdroj nákazy jednohostitelskými trypanosomatidy pro hmyzí hostitele, např. fytofágní ploštice. Podobný scénář přenosu byl navržen u *Crithidia bombi* (Ruiz-González a Brown, 2006). „Rezervoárem“ jsou v tomto případě květy, kde mohou bičíkovci pasivně čekat v podobě pseudocyst na nasátí hostitelem. Právě způsob přenosu monoxenních trypanosomatid zůstává u většiny zástupců jednohostitelských trypanosomatid stále neobjasněn. U většiny skupin se předpokládá kontaminační cesta pozřením stadií pocházejících z výkalů hostitele (Wallace, 1966; Tieszen a Molyneux, 1989), u některých druhů izolovaných z ploštic pak i kanibalismus (Schaub a kol., 1989). Přenos prostřednictvím potravy (plodů, semen a sladké šťávy květů) by pak mohl být dalším způsobem šíření jednohostitelských trypanosomatid v populacích hostitelů.

#### 5.2.4 Infekce obratlovců

Permanentní výskyt specializovaných monoxenních bičíkovců u obratlovců zatím prokázán nebyl, objevilo se však několik případů náhodného výskytu. Do této kategorie jednohostitelských trypanosomatid spadají neznámí bičíkovci izolovaní ze sleziny egyptských kryš a z potulných psů pocházejících ze stejné lokality (Morsy a kol., 1988)<sup>3</sup>. Možná nákaza člověka jednohostitelskými trypanosomatidy je diskutabilní, nicméně několik studií z poměrně nedávné doby přináší pozoruhodné výsledky. První zmínka se týká pacienta nakaženého virem HIV z Francouzských Antil, u něž se vyvinul difúzní kutánní

<sup>3</sup> Při analýzách SL RNA a 5S rRNA se ukázalo, že tyto bičíkovci jsou blízce příbuzní bičíkovcům rodu *Herpetomonas* (Podlipaev a kol., 2004a)

syndrom podobný leishmanióze s mnoha amastigoty v kožních nodulech. Nalezení parazitů se v isoenzymových charakteristikách neshodovali s rodem *Leishmania* ani *Trypanosoma* (Dedet a kol., 1995). O tři roky později byl ve stejné oblasti (ostrov Martinik) zaznamenán druhý případ imunokompetentního pacienta, u kterého se objevila lokalizovaná kutánní léze pravého očního víčka (Boisseau-Garsaud a kol., 2000). Pomocí biochemických metod a pozorování ultrastruktury byli parazité určeni jako blíže nespecifikovaní zástupci jednohostitelských trypanosomatid (Dedet a kol., 1995; Boisseau-Garsaud a kol., 2000). Další analýzy isoenzymových profilů izolovaných kmenů však naznačily, že se jednalo spíše o odlišné formy leishmanií (Noyes a kol., 2002).

Experimentální patogenitu parazitů izolovaných z obou výše uvedených případů studovali na myším modelu Garin a kol. (2001). Ověřili, že parazité jsou schopni růstu a množení *in vitro* v makrofázích odvozených z kostní dřeně. U myší infikovaných *in vivo* prokázaly oba kmeny trypanosomatid schopnost infekce, visceralizace a diseminace v podkolenních a mesenterických lymfatických uzlinách, játrech, slezině a dokonce i v mozku. Nákaza byla hostitelem tolerovaná a neprojevil se žádné klinické příznaky, ani výrazné změny v tkáních. Oba kmeny vyvolaly u myší silnou humorální odpověď proti antigenům parazitů. Zajímavé je, že stejně jako u leishmaniózy (Ghalib a kol., 1993) nebyly aktivovány T lymfocyty.

Jak se zdá, nižší trypanosomatida se ukazují jako možní oportunističtí parazité u jedinců s oslabeným imunitním systémem (Dedet a Pratlong, 2000). U HIV infikovaných pacientů by mohli tyto (za normálních okolností nepatogenní) parazité vyvolat klinický obraz podobný leishmanióze. Dokázaly to i další záznamy neobvyklého parazita podobného leishmanii u HIV pozitivního pacienta se symptomy leishmaniózy (Jimenez a kol., 1996) a u HIV pozitivního Brazilce, u nějž se projevil syndrom podobný viscerální leishmanióze. V kostní dřeni brazilského pacienta byla nalezena amastigotní stadia, přiřazená na základě analýz kDNA k druhu *Leptomonas pulexsimulantis* (Pacheco a kol., 1998). U těchto případů se podařila *in vitro* kultivace promastigotů, avšak infekce *in vivo* úspěšná nebyla. Predispozici k nákaze by tedy mohly být defekty imunitního systému. Vzhledem k podobné manifestaci nákazy jako u rodu *Leishmania* je možné, že v minulosti i současnosti došlo k řadě dalších záměn těchto organismů. Eventuální nákaza monoxenními trypanosomatidy by proto neměla být podceňována a vzorky parazitů z lézí pacientů by měli být podrobeny důkladnému prozkoumání za využití např. enzymatických nebo molekulárně-biologických charakteristik.

## 6. Hostitelská specifita

Mnoho jednohostitelských trypanosomatid bylo pojmenováno podle hostitele, v němž byli nalezeni. To vedlo k obecnému přijetí a rozšíření domněnky, že jsou tyto parazité úzce vázány na své hostitele, a pro každý druh hmyzu je typický jiný druh parazita. Ačkoliv byla



myšlenka vysoké hostitelské specifity obecně přijímána, přesto bylo učiněno několik pokusů tuto hypotézu experimentálně ověřit.

Při experimentálních nálezích hmyzu bičíkovci, pocházejícími z jiného druhu hmyzu, bylo překvapivě zjištěno, že hostitelská specifita se projevuje spíše na úrovni čeledi či ještě vyššího taxonu než na úrovni druhu. McGhee a Hanson (1963a) objevili, že kultury bičíkovců z různých hemipter mohou v laboratorních podmínkách infikovat i *Oncopeltus fasciatus*, nicméně nákaza se nepřenáší na potomky. Podobný případ byl doložen i u nákazy *Drosophila melanogaster* blastocritidii z *Drosophila robusta* (McGhee, 1970). Krátkodobou experimentální infekcí druhem *Sergeia podlipaevi* (s incidencí vyšší u samic či omezenou pouze na samice) se podařilo prokázat mezi podrody tiplíků *Oecacta* a *Monoculicoides* (Svobodová a kol., 2007). Nízký stupeň hostitelské specifity a velkou schopnost fyziologického přizpůsobení usnadňující osídlení širšího spektra hostitelů, potvrdil i Podlipaev (2000). Úspěšně provedená experimentální infekce však neznamená, že parazit široké spektrum hostitelů v přirozených podmínkách skutečně využívá a úzká hostitelská vazba může být dána ekologií a etologií hostitele, spíše než jeho fyziologickými charakteristikami.

Úzká vazba na hostitelský druh se podle dosavadních studií vyskytuje spíše zřídka, a často to bývá u málo početných druhů hostitelů. Ilustrativním příkladem je *Wallaceina brevicula* získaná z dospělé ploštice *Nabis brevis* přezimujícího pod sněhem (Frolov a Malysheva, 1989).

Zdá se tedy, že různé druhy hmyzu, dokonce z různých řádů, mohou hostit velmi podobné, či stejné parazity. Také možnost dočasného přežívání „cizího“ parazita v nespecifickém hostiteli nemůže být zcela vyloučena. Carvalho a Deane (1974) zaznamenali, že některá trypanosomatida (*Herpetomonas muscarum*, *Crithidia luciliae*) získaní z ploštice *Zelus leucogrammus*, se u této ploštice vyskytují pouze sporadicky. Jakmile hmyz nemá přístup k nakažené kořisti, vyhytnou. Na základě tohoto faktu se domnívají, že jde o původní parazity much, které *Zelus* loví. Zjistit, zda se jedná či nejedná o bičíkovce, jenž se u hostitele vyskytují specificky, je experimentálně téměř nemožné. Počet studií zaměřených na hostitelskou specifitu jednohostitelských trypanosomatid je pro jakékoliv obecnější konstatování stále příliš nízký. Ekologické studie zaměřené na hostitelskou specifitu pak chybí zcela.

Zajímavým faktem je absence monoxenních trypanosomatid u dvoukřídlých čeledi Phlebotominae hostících rod *Leishmania*. Výjimku tvoří nejasný nález *Crithidia* sp. v rodu *Phlebotomus*, potvrzený i experimentální nákazou *C. fasciculata* a dále nález *Leptomonas* sp. izolovaného z r. *Lutzomyia* (Sousa a kol., 1998). Naopak absenci monoxenních trypanosomatid u glosin (přenašečů trypanosom) lze poměrně snadno vysvětlit vzhledem k jejich životnímu cyklu s adenotrofní viviparií, který neumožňuje nákazu jinak, než během sání krve.

Jednohostitelská trypanosomatida se ve stupních své hostitelské specifity do značné míry liší. Většina je zřejmě euryxenní a může se objevit v mnoha hostitelích. Například u plošnice *Salda littoralis*, žijící pod naplaveným materiálem horní přílivové zóny Bílého moře za podmínek vysoké salinity, byl objeven bičíkovec *Leptomonas rigidus*, zprvu považovaný za vysoce hostitelsky specifický druh (Podlipaev, 1985). Při pozdějších výzkumech byl však stejný leptomonádní bičíkovec nalezen i u příbuzného druhu *Saldula pallipes*, jediné další plošnice omezené na tento unikátní biotop<sup>4</sup> (Kostygov a kol., 2004). Někteří zástupci jednohostitelských trypanosomatid jsou naopak stenoxenní a v přírodních podmínkách infikují jen jednoho či několik málo vzájemně příbuzných druhů hostitelů, jako je tomu v případě nedávno popsáného druhu *Sergeia podlipaevi*. Tento parazit byl nalezen pouze u dvou druhů tiplíků: *Culicoides festivipennis* a *C. truncorum* (Svobodová a kol., 2007).

Jeden druh hmyzího hostitele však může být zároveň nakažen i více druhy trypanosomatid. U ploštic *Salda littoralis* byl tak kromě výše zmíněné leptomonády objeven také endomastigotní bičíkovec označený jako *Wallaceina* sp. Wsd. (Kostygov a kol., 2004).

## 7. Zástupci trypanosomatid

V současné době je popsáno sedm jednohostitelských rodů (*Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Rhynchoidomonas*, *Wallaceina*, *Sergeia*) a čtyři rody dvouhostitelské (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Phytomonas*).

### 7.1 Rody jednohostitelské

Monoxenní zástupci jsou jakožto lékařsky a veterinárně nevýznamní parazité hmyzu méně probádanou skupinou. Nejhojnějším rodem co do počtu druhů je **Leptomonas** (Kent 1880), u něhož existuje přibližně 100 popsáných zástupců (Wallace, 1966; Podlipaev, 1990). Během životního cyklu převládají promastigoti, mohou se objevit i endomastigoti a cysty. Přenos může probíhat přes amastigotovi podobnou cystu, nebo dokonce prostřednictvím bičíkatých stadií, která mohou přežívat až tři dny ve vodě (Takata a kol., 1996). *Leptomonas* parazituje především u hmyzu (Hemiptera, Diptera, Hymenoptera, Blattoidea, Lepidoptera, Siphonaptera), kde zpravidla osidluje střevo a přidružené orgány. Vzácně byl tento rod nalezen i v nematodech, rostlinách a v nálevnicích (viz 5.2.2 a 5.2.3). Zatím nejlépe jsou popsány životní cykly u bleších zástupců *Leptomonas ctenocephali* z blechy *Ctenocephalides canis* (Molyneux a kol., 1981) a *L. pulexsimulantis* z blechy *Pulex simulans* (Beard a kol., 1989), dále *L. oncopelti* z plošnice *Oncopeltus fasciatus* sající mízu (McGhee a Hanson, 1962), a konečně i u ciliátního parazita *L. ciliatorum* (Görtz a Dieckmann, 1987). Mezi jednotlivými druhy existuje značná heterogenita. Jeden z mála patogenních druhů (*L. bombycis*) byl zaznamenán u housenky bource morušového (Abe, 1980). Promastigoti tohoto druhu se množí v lumen střední části střeva a v hemocoelu, kde

---

<sup>4</sup> Alternativním vysvětlením je infekce predátorské plošnice *Salda* při krmení na nakaženém druhu *Saldula*.

se encystují. Zdá se, že k encystaci dochází po fúzi dvou promastigotů, jejichž kinetoplasty a jádra splynuly (Sousa, 1994). To by nasvědčovalo přítomnosti sexuality u tohoto druhu. Taxon *Leptomonas* je pravděpodobně polyfyletický (Merzlyak a kol., 2001) a měl by být zrevidován. Podlipaev (1990) odhaduje, že z 69 popsáných druhů rodu *Leptomonas* se dá jen 15 popisů považovat za spolehlivé.

**Herpetomonas** (Kent 1880) prochází ve svém životním cyklu stadii paramastigota, opisthomastigota a snad i epimastigota. Dominantní formou je však promastigot. Rod *Herpetomonas* je parazitem především řádu Diptera, eventuálně dalších skupin hmyzu, ale byl izolován i z rostlin. Wallace (1966) uvádí typický znak – protažení posteriorního konce do jemné špičky. Z enzymů ornithinového cyklu je vždy přítomná arginindeimináza a chybí argináza. Typovým organismem je *Herpetomonas muscarum* (Leidy 1856) Kent 1881, z mouchy domácí a dalších much. Tímto jménem byly původně označeny dva různé organismy, a proto došlo k přehodnocení na poddruhy *H. muscarum muscarum* a *H. m. ingenoplastis* (Rogers a Wallace, 1971). První z nich postrádá bakteriální symbionty a vlastní kinetoplast typu A, tj. masa kDNA je kompaktní a oddělená od mitochondriálního opouzdrěného obalu. *H. m. ingenoplastis* naopak má bakteriální symbionty a kinetoplast typu B, tj. kDNA je volně sbalena a zcela vyplňuje rozsáhlé hruškovité pouzdro mitochondrie, přičemž širší část hmoty kDNA je v přední části. Kinetoplast typu B je častý u trypanosomatidů obsahujících symbionty. Oba poddruhy obývají lumen středního střeva a koncové střevo much, ale zatímco *H. m. muscarum* projevuje tradiční aerobní respiraci a má mitochondrie s kristami, mitochondrie *H. m. ingenoplastis* kristy nemají a dýchání je fakultativně anaerobní (Coombs, 1988; cit. dle Vickerman, 2000). Zdá se tedy, že tyto dva organismy představují zcela odlišné druhy a zařazení do poddruhů je nevhodné. *Herpetomonas* je zřejmě dalším nepřírozeným taxonem (Teixeira a kol., 1997). Některé druhy obsahují endosymbionty, jiné jsou blízce příbuzné s fytoomonádovými kmeny izolovanými z rostlin. Stadium opisthomastigota, které je pro tento rod charakteristické, vzniká ve stacionárních fázích kultur, při kultivaci za vyšší teploty, než je optimální, za zvýšeného pH nebo osmolality, či za přítomnosti močoviny nebo hydroxymočoviny (shrnutí Vickerman, 2000). Tato stadia se obvykle nedělí, ale mezi abundatními opisthomastigoty *H. roitmani* v čerstvých kulturách se dělení objevilo (Faria-e-Silva a kol., 1996). U některých zástupců však stadium opisthomastigota chybí (Podlipaev a kol., 2004b).

Pro rod **Crithidia** (Léger 1902) je nejtypičtější choanomastigotní forma tvaru zrna ječmene, s velkým bočním kinetoplastem poblíž jádra, a to ve fázi nektomonády i haptomonády. Ústí široké nálevkovité flagelární kapsy zabírá většinu prostoru „seříznutého“ anteriorního konce. Parazituje u řádů Diptera, Hemiptera, Trichoptera a Hymenoptera, kde buňky bývají často nakupené u střevní stěny. Rod *Crithidia* však byl nalezen i u rostlin (Catarino a kol., 2001). Obsahuje arginázu a arginosukcinátlyázu, nemá arginindeiminázu. Vyžaduje buď arginin, nebo citrulin. Typovým druhem je *C. fasciculata* (Léger 1902)

z *Anopheles maculipennis* a dalších komárů. Nektomonády jsou 6–8  $\mu\text{m}$  dlouhé, haptomonády, které mohou pokrývat stěnu rektální ampule, dosahují délky pouze 3–4  $\mu\text{m}$  (Brooker, 1971). Crithidie je snadné vykultivovat. Jsou-li získány ze smíšené infekce, často přerůstají jiná trypanosomatida. Na základě nutričních požadavků bylo popsáno několik poddruhů *C. fasciculata* a *C. luciliae* z bzučivkovitých (Calliphoridae) a mouchovitých (Muscidae). Zmíněné dva druhy jsou hojně využívány v experimentálních studiích. V tomto směru je oblíbená i *C. oncopelti*, symbionty nesoucí laboratorní linie nejistého původu, pravděpodobně odvozená z plošnice *Oncopeltus fasciatus*. Stejně jako ostatní trypanosomatida se symbionty, nevyžaduje hemin a roste v relativně jednoduchých médiích. Ačkoliv většina crithidií je nepatogenní, o *C. bombi* je známo, že reguluje velikost populací čmeláků (Durrer a Schmid-Hempel, 1994); k přenosu parazitů dochází při sdílení zdrojů nektaru a pylu. *Crithidia* je pravděpodobně nejstudovanějším rodem jednohostitelských zástupců a většina odborníků se shoduje na tom, že jde o uměle vytvořený taxon. Druh *C. deanei* je monofyletický s trypanosomatidy jiných rodů obsahujícími endosymbionty (Hollar a kol., 1998). Pro tuto linii byl navržen nový rod *Angomonas* (Sousa a Corte-Real, 1991). U *C. oncopelti* je situace o něco složitější, neboť existují nejméně dva různé organismy sdílející toto jméno (Du a Chang, 1994). Clark (1997) a Brandao a kol. (2000) navrhli pro tohoto parazita obnovení rodu *Strigomonas*, zatímco Hollar a kol. (1998) prokázali blízký vztah mezi izoláty tohoto druhu a druhů rodu *Blastocrithidia* obsahujícími endosymbionty.

**Blastocrithidia** (Laird 1959) se vyskytuje ve formě charakteristických epimastigotů ve fázi nektomonády i haptomonády. Podobně jako u rodu *Leptomonas*, mohou být u některých rodů vytvářeny amastigotům podobné cysty. Parazitují u řádů Diptera, Hemiptera (zvláště u bruslařek čeledi Gerridae), Siphonaptera, eventuálně Hymenoptera. Obvykle se nachází ve střevě, příležitostně i ve slinných žlázách. U některých druhů byl zaznamenán transovariální přenos bičíkoviců, stejně jako kontaminativní přenos koprofágií, dravý hmyz se může infikovat ze své kořisti. *Blastocrithidia* je další polyfyletickou skupinou. Typovým druhem je *Blastocrithidia gerridis* (Patton 1908) Laird 1959, dlouhá 18–23  $\mu\text{m}$  z bruslařky *Gerris fossarum* a dalších ploštic čeledi Gerridae a Veliidae, kde může pokrývat vnitřní vrstvu střeva haptomonádovými formami. Tento druh neobsahující endosymbionty, stejně jako některé další druhy rodu, lze z dlouhodobého hlediska kultivovat velmi obtížně. *Blastocrithidia culicis*, druh nesoucí symbionty, který údajně nevytváří haptomonády v komářími hostiteli, je naopak snadno kultivovatelný. Jedním z nejdůležitějších a nejstudovanějších druhů je *B. triatoma*, která rovněž tvoří bičíkaté cysty. Je patogenní pro ploštic *Triatoma infestans* (mj. vektora Chagasovy choroby způsobované *Trypanosoma cruzi*) a může být dobrým kandidátem pro případnou biologickou kontrolu těchto ploštic. Jak se zdá, schopnost vyvolat onemocnění závisí na interakci parazita s mycetomy hostitelského hmyzu (Schaub, 1994).

U rodu **Rhynchoidomonas** (Patton 1910) převažuje v životním cyklu stadium trypomastigota, které postrádá nápadnou undulující membránu. Jsou vytvářeni i epimastigoti a amastigoti. *Rhynchoidomonas* parazituje u řádů Diptera a Lepidoptera, často v malpighických trubcích a ve střevě. Jde o málo prozkoumaný rod. Ze sedmi pojmenovaných druhů nebyl (od roku 1935) žádný kultivován a pouze jeden byl podrobněji studován – *R. operophtherae* z můry *Operophthera brumata* (Page a kol., 1986). Jeho trypomastigoti mají volný bičík, o němž se dříve myslelo, že je u tohoto rodu nepřítomný. Typový druh, *R. luciliae* z malpighických trubic různých bzučivkovitých i moučovitých můžů dosahovat délky až 50  $\mu\text{m}$ . *Drosophila* spp. hostí dva z popsáných druhů (*R. drosophilae* a *R. roubaudi*).

**Wallaceina** – bývalý rod *Proteomonas* (Podlipaev, Frolov a Kolesnikov 1990) – se vyskytuje jako endomastigotní a promastigotní (či choanomastigotní) forma. Parazituje u řádů Hemiptera a Diptera. Tento rod lze rozpoznat podle ústupu báze bičíku a kinetoplastu za jádro či vedle něj. Bičík se zdánlivě vynořuje z tělního lemu, ale ve skutečnosti vystupuje ze stočené flagelární kapsy. Na základě tohoto znaku přesunul Podlipaev a kol. (1990) dva bývalé druhy crithidií izolované z ploštic do rodu *Proteomonas*, ale ukázalo se, že toto jméno je již obsazené kryptomonádním bičíkovcem *Proteomonas* Hill a Weetherbee (1986). Proto se autoři rozhodli změnit rodové jméno na *Wallaceina* na památku F. G. Wallace. Typovým druhem je *W. inconstans* ze střeva *Calocoris sexguttatus*. U druhu *Herpetomonas mariadeanei* (Yoshida a kol., 1978a) z mouchy *Muscina stabulans* se také objevují endomastigoti, a proto by měl být převeden do tohoto rodu. Endomastigoti mohou představovat speciální druh přenosného stadia odolného vůči vysychání (Frolov a Malysheva, 1992; cit. dle Vickerman, 2000).

**Sergeia** (Svobodová a kol. 2007) je nově nalezeným rodem, ustanoveným na základě fylogenetického postavení, morfologie a druhu hostitele. Typovým druhem je *Sergeia podlipaevi*, izolovaná z trávicího traktu a malpighických trubic tiplíků rodu *Culicoides*. Vyskytuje se ve formě promastigotů, neobsahuje endosymbionty a jejím specifickým znakem je přítomnost paraflagelární tyče už v periflagelární kapse.

## 7.2 Rody dvouhostitelské

**Leishmania** (Ross 1903, emend. Saf'janova 1982) se množí v jednojaderných fagocytech savců a ve střevním lumen flebotomů (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). V savcích se nachází intracelulární amastigoti, ve vektorech volní či přichycení promastigoti (a paramastigoti). K přenosu dochází bodnutím, infekční metacykličti promastigoti se dostávají do savčí kůže díky leishmanií indukovanému defektnímu pumpování krve z přední části trávicí trubice. K parazitovaným řádům savců patří primáti, hlodavci, šelmy, chudozubí, damani a vačnatci. Rod *Leishmania* se podle hostitele a výskytu amastigotů dělí do tří poddruhů: *Leishmania*, *Sauroleishmania* a *Viannia*. V poslední době se také objevuje dělení

rodu na (a) *Euleishmania* (zahrnující podrody *Leishmania*, *Viannia* a *Sauroleishmania*) a (b) *Paraleishmania* (obsahující neotropické druhy leishmanií a zástupce rodu *Endotrypanum*) (Croan a kol., 1997; Cupolillo a kol., 2000). Typovým druhem je *Leishmania donovani* (Laveran a Mesnil 1903) Ross 1903, původce viscerální leishmaniózy (kala azar) u lidí. Amastigotní stadia žijí v lysosomech makrofágů jater, sleziny a kostní dřeně. Svou průměrnou velikostí 2–3  $\mu\text{m}$  se řadí mezi nejmenší známá eukaryota. Stejně jako u dalších starosvětských druhů leishmanií, slouží jako vektor rod *Phlebotomus*, zatímco u novosvětských druhů je *Leishmania* přenášena rodem *Lutzomyia*. Otázka starosvětského či novosvětského původu leishmanií dosud nebyla jednoznačně objasněna, nicméně se předpokládá spíše novosvětský původ. Fylogenetická spřízněnost leishmanií s leptomonádami (Yurchenko a kol., 2006a) však podporuje hypotézu přechodu k dvouhostitelskému způsobu života, následovanou rozpadem kontinentů a osamostatněním neotropických a starosvětských linií.

**Endotrypanum** (Mesnil a Brimont 1908) zaujímá stadia trypomastigotů a epimastigotů uvnitř erytrocytů chudozubých savců a stadia promastigotů a amastigotů ve flebotomech. Typovým druhem je *Endotrypanum schaudini* (Mesnil a Brimont 1908) z lenochoda *Choleopus didactylus*, ale vyskytuje se i u brazilského lenochoda *Bradypus*. Druhý druh, *E. monterogei* (Shaw 1969), popsáný ze stejného hostitele, se zdá být svou charakteristikou isoenzymů, sérologie a hustoty DNA identický s předešlým druhem (Croft a kol., 1980). Tento rod představuje jediného trypanosomatida žijícího uvnitř erytrocytů. I přes svou morfologickou podobnost s trypanosomami naznačuje sekvenace genu pro SSU rRNA, že se jedná o rod blízkce příbuzný leishmanii podrodu *Viannia*, se kterou sdílí vektora (*Lutzomyia* spp.) i chudozubého hostitele. Vzájemná podobnost těchto dvou promastigotů mohla vést k chybné identifikaci parazitů při pozorování vektorů leishmaniózy (Christensen a Herrer, 1979). *Endotrypanum* má homolog povrchové proteázy (gp69) nalezené u všech leishmanií a u některých jednohostitelských trypanosomatidů, avšak ne u trypanosom. Dále vlastní povrchově zakotvené enzymy sialidázu a trans-sialidázu, které nejdříve odstraňují zbytky kyseliny sialové z hostitelských glykokonjugátů, aby je poté přenesly na povrch parazita. Tyto děje jsou důležité pro vstup do nefagocytární buňky u *Trypanosoma cruzi*. Leishmanie tyto enzymy nemají a neoplývají ani schopností proniknout do nefagocytující buňky (Medina-Acosta a kol., 1994). Validita rodu *Endotrypanum* je pochybná. V poslední době se ukazuje, že se spíše jedná o skupinu spadající do větve paraleishmanií (Cupolillo a kol., 2000).

**Trypanosoma** (Gruby 1843) tráví část svého životního cyklu v krvi obratlovců a část v trávicí soustavě pijavek či členovců. Stadia trypomastigotů a epimastigotů jsou běžná téměř ve všech životních cyklech, amastigoti jsou méně častí a promastigoti jsou vázaní zejména na přenašeče. Trypomastigot žijící v krvi je společný všem druhům obratlovcích hostitelů. Vnitrobuněčná stadia, tj. obvykle amastigoti, se objevují jen v některých životních

cyklech, zejména jako dělicí se stadia ve tkáních obratlovců. Epimastigoti se mohou nacházet v trávicím traktu vektorů i v tkáni obratlovců. Trypanosomy se na základě vývojových i morfologických kritérií někdy dělí do dvou skupin: (a) Salivaria neboli parazité vyvíjející se v přední části trávicího traktu hmyzu, a (b) Stercoraria tj. trypanosomy vyvíjející se v zadní části střeva hmyzu. Toto dělení je však relevantní pouze pro lékařsky významné zástupce a pro velmi široké spektrum zvířecích trypanosom je prakticky nepoužitelné. Typovým druhem je *Trypanosoma rotatorium* (Mayer 1843), pijavkami přenášená trypanosoma žab. Trypanosomy jsou krevními parazity všech tříd obratlovců. Druhy parazitující žraloky, kostnaté ryby, některé obojživelníky a želvy jsou přenášeny pijavkami. Vývojový cyklus končí vytvářením metacyklických stadií, které migrují do pochvy chobotku pijavek. Trypanosomy terestrických poikilotermů, ptáků a savců jsou přenášeny hematofágními členovci, výjimečně obratlovci (upíry). Existují i sekundárně monoxenní trypanosomy adaptované na pohlavní přenos mezi obratlovčími hostiteli (*T. equiperdum* u koňů). Většina současných studií ukazuje, že rod *Trypanosoma* je monofyletický (Lukeš a kol., 1997; Wright a kol., 1999; Simpson a kol., 2004, 2006). Studie molekulárních sekvencí a částečně i studie 18S rRNA naznačují, že tento rod představuje přibližně polovinu veškeré diverzity trypanosomatid. Ze 700 popsáných druhů trypanosomatid jich cca 500 náleží do rodu *Trypanosoma*. Uvnitř tohoto rozmanitého rodu bylo zjištěno několik dobře definovaných monofyletických větví jako je např. skupina *T. brucei* nebo skupina rybích trypanosom (Stevens a Gibson, 1999).

**Phytomonas** (Donovan 1909) střídá rostlinné hostitele a fytofágní členovce, zejména ploštice sající mizu. Cyklický vývoj parazita probíhá v ploštici – poté, co se přemění v mesenteronu vektora, migrují bičíkovci do slinných žláz přes hemocoel, odkud se přenášejí na rostliny. Během tohoto cyklu zůstává parazit ve formě promastigota. Charakteristickým znakem rodu je stočené tělo. Ačkoliv byli zaznamenáni i amastigoti, jejich role v cyklu není jasná. Typovým druhem je *Phytomonas davidi* (Lafont 1909) (15–20 μm) z latexu *Euphorbia pilulifera*, přenášený plošticí *Stenocephalus agilis*. Z pohledu rostlinných patologů se fytonomády dělí na parazity rostlin tvořících latex (Euphorbiaceae, Asclepiadaceae, Apocynaceae, Cecropiaceae, Asteraceae, Moraceae, Urticaceae a Sapotaceae), přenášených přes ploštice čeledi Coreidae a Lygeidae. S výjimkou *P. francai* z manioku tyto druhy nezpůsobují chřadnutí rostliny. Zástupci žijící v sítkovicích floemu (Arecaceae, Rubiaceae a Zingiberaceae) a přenášení plošticí rodu *Lincus*, jsou silně patogenní a napadeným rostlinám způsobují závažné až smrtelné onemocnění. Zablokováním sítkovic pravděpodobně zamezí transportu fotoasimilátů. Parazité omezení na ovoce a semena rostlin (Anacardiaceae, Oxalidaceae, Passifloraceae, Punicaceae, Rosaceae, Rutaceae, Solanaceae a Poaceae) nejsou schopni života v jiných částech rostliny a škoda v podobě vyblednutí či částečné destrukce tkání se proto vztahuje jen k plodu. Zatímco trypanosomatida parazitující v latexu a floemu patří mezi dvouhostitelský rod *Phytomonas*, mezi zástupci parazitující plody a semena

mohou být i příslušníci jednohostitelských rodů. Oplodí či semenný míšek mohou sloužit jako místo vývoje nejen pro rod *Phytomonas*, ale také rod *Leptomonas* a další hmyzí trypanosomatida (Conchon a kol., 1989). Frolov a Malysheva (1993, cit. dle Vickerman, 2000) popsali promastigotního parazita ze střeva a slinných žláz dravé ploštice *Troilus luridus* jako *Phytomonas nordicus*. Přenos z jedné ploštice na druhou se uskutečňuje kontaminativně přes výkaly, ale také přes sliny, když nenakažené ploštice sají současně s nakaženými hemolymfy ze stejné dvoukřídlé larvy. V životním cyklu tohoto druhu rodu *Phytomonas* se tedy neuplatňuje rostlinný hostitel.

Rod *Phytomonas* byl nedávno přezkoumán Camargem (1999). Tradičně byl považován za uměle vytvořený taxon obsahující veškerá trypanosomatida izolovaná z rostlin. Teprve nedávno byla charakterizovaná monofyletická skupina trypanosomatid omezených na floem. Jednoznačné identifikaci této skupiny nicméně brání přítomnost jednohostitelských trypanosomatid dalších rodů jako *Herpetomonas* a *Leptomonas* v rostlinných tkáních a zejména pak plodech, které od monofyletické skupiny fytonomád nelze morfologicky odlišit. Obtížná kultivace *in vitro* navíc brzdí také identifikaci na základě biochemických technik (Teixeira a kol., 2000)

## Závěr

Jednohostitelská trypanosomatida jsou celosvětově rozšíření parazité, kteří se vyskytují ve velké škále hostitelů. Jejich přenos, stejně jako hostitelská specifita a fylogenetické postavení, nejsou dosud dostatečně objasněny. Jedním z důvodů je značná disproporce ve studiu monoxenních a heteroxenních zástupců ve prospěch dvouhostitelských rodů napadajících člověka a ekonomicky důležité hostitelské organismy. Přitom je docela dobře možné, že hlavní druhová a případně i rodová diverzita trypanosomatid se nachází právě u jednohostitelských zástupců. Jednohostitelská kinetoplastida mohou být proto využita jako vhodná modelová skupina pro studium diverzity, koevoluce a ekologických interakcí. Symbiotický systém u některých zástupců může sloužit jako užitečný model k obecnému studiu původu nových organel i vztahů mezi endosymbiontem a hostitelskou buňkou, a zároveň být nápomocný při fylogenetické analýze vztahů mezi trypanosomatidy.



## Použitá literatura

- Abe, Y. (1980). On the encystation of *Leptomonas* sp. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), a parasite of the silkworm, *Bombyx mori* Linnaeus. *The Journal of Protozoology*, 22: 372–374
- Alfieri, S. C. & Camargo, E. P. (1982). Trypanosomatidae: isoleucine requirement and threonine deaminase in species with and without endosymbionts. *Experimental Parasitology*, 53: 371–380
- Bacchi, C. J., Ciaccio, E. I. & Coren, L. E. (1969). Effects of some antitumor agents on growth and glycolytic enzymes of the flagellate *Crithidia*. *Journal of Bacteriology*, 98: 23–28
- Banuls, A. L., Guerrini, F., Le Pont, F., Barrera, C., Espinel, I., Guderian, R., Echeverria, R. & Tibayrenc, M. (1997). Evidence for hybridization by multilocus enzym electrophoresis and random amplified polymorphic DNA between *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis/guyanensis* in Ecuador. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44: 408–411
- Beard, C. B., Butler, J. F. & Greiner, E. C. (1989). In vitro growth characterisation and host-parasite relationship of *Leptomonas pulexsimulatis* n. sp., a trypanosomatid flagellate of the flea, *Pulex simulans*. *The Journal of Parasitology*, 75: 658–668
- Belli, A. A., Miles, M. A. & Kelly, J. M. (1994). A putative *Leishmania panamensis/Leishmania braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Parasitology*, 109: 435–442
- Boisseau-Garsaud, A. M., Cales-Quist, D., Deshois, N., Jouanelle, J., Jouanelle, A., Pratlong, F. & Dedet, J. P. (2000). A new case of cutaneous infection by a presumed monoxenous trypanosomatid in the island of Martinique (French West Indies). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94: 51–52
- Brandao, A. A., Miranda, A., Degraeve, W. M. & Sousa, M. A. (2000). The heterogeneity of choanomastigote-shaped trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implication. *Parasitology Research*, 86: 809–812
- Branquinha, M. H., Vermelho, A. B., Goldenberg, S. & Bonaldo, M. C. (1994). Characterization of proteinases in trypanosomatids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27: 495–499
- Brooker, B. E. (1971). Flagellar attachment and detachment of *Crithidia fasciculata* in the gut wall of *Anopheles gambiae*. *Protoplasma*, 73: 191–202
- Camargo, E. P. & Freymüller, E. (1977). Endosymbiont as supplier of ornithine carbamoyl transferase in a trypanosomatid. *Nature*, 270: 52–53
- Camargo, E. P., Coelho, J. A., Moraes, G. & Figueiredo, E. N. (1978). *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. and *Leptomonas* spp.: enzymes of ornithine-arginine metabolism. *Experimental Parasitology*, 46: 141–144
- Camargo, E. P., Mattei, D. M., Barbieri, C. L. & Morel, C. M. (1982). Electrophoretic analysis of endonuclease-generated fragments of k-DNA, of esterase isoenzymes and of surface proteins as aids in species identification of insect trypanosomatids. *The Journal of Protozoology*, 29: 251–258
- Carvalho, A. L. M. & 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 Jr., M., Almeida, M. L., Kaneshina, E. K., Campaner, M., Jankevicius, J. V., Teixeira, M. M. G. & 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
- Cavazzana Jr., M., Batistoti, M., Romao, C., Takimoto, C. A., Baccan, C. G., Jankevicius, J. V., Ogatta, S. F. Y., Yang, A. V. & Jankevicius, I. S. (1998). Experimental infection of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and maize (*Zea mays*) with trypanosomatids isolated from insects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 115
- Clark, C. G. (1997). Riboprinting: a tool for the study of genetic diversity in microorganisms. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44: 277–283
- Conchon, I., Campaner, M., Sbravate, C. & Camargo, E. P. (1989). Trypanosomatids other than *Phytomonas* spp. isolated and cultured from fruit. *The Journal of Protozoology*, 26: 412–414
- Croan, D. G., Morrison, D. A. & Ellis, J. T. (1997). Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 89: 149–159
- Croft, S., Chance, M. L. & Gardiner, P. J. (1980). Ultrastructural and biochemical characterisation of stocks of *Endotrypanum*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 74: 584–589
- Crowe, W. & Kushner, I. (1977). An immunofluorescent method using *Crithidia luciliae* to detect antibodies to double stranded DNA. *Arthritis and Rheumatism*, 20: 811–814
- Cupolillo, E., Medina-Acosta, E., Noyes, H., Momen, H. & Grimaldi Jr., G. (2000). A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today*, 16: 142–144
- Da Silva, F. M., Noyes, H., Campaner, M., Junqueira, A. C., Coura, J. R., Anez, N., Shaw, J. J., Stevens, J. R. & Teixeira, M. M. (2004). Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*, 122: 549–561
- Dedet, J. P., Roche, B., Pratlong, F., Cales-Quist, D., Jouannelle, J., Benichou, J. C. & Huerre, M. (1995). Diffuse cutaneous infection caused by a presumed monoxenous trypanosomatid in a patient infected with HIV. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89: 644–646
- Dedet, J. P. & Pratlong, F. (2000). *Leishmania*, *Trypanosoma* and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47: 37–39
- De Lima, V. M. Q. G., Roitman, I. & Kilgour, V. (1979). Five trypanosomatid species of insects distinguished by isoenzymes. *The Journal of Protozoology*, 26: 648–652
- De Souza, W. & Motta, M. C. M. (1999). Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. *FEMS Microbiology Letters*, 173: 1–8
- Docampo, R. & Moreno, S. N. (1999). Acidocalcisome: A novel  $\text{Ca}^{2+}$  storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitology Today*, 15: 443–448

- Du, Y. & Chang, K. P. (1994). Phylogenetic heterogeneity of three *Crithidia* spp. vs. *Crithidia fasciculata*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 66: 171–174
- Durrer, S. & Schmid-Hempel, P. (1994). Shared use of flowers leads to horizontal pathogen transmission. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B-Biological Sciences*, 258: 299–302
- Faria-e-Silva, P. M., Fiorini, J. E., Soares, M. J., Alviano, C. S., De Souza, W. & Angluster, J. (1994). Membrane-associated polysaccharides composition, nutritional requirements and cell differentiation in *Herpetomonas roitmani*: influence of the endosymbiont. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41: 55–59
- Faria-e-Silva, P. M., Soares, M. J. & De Souza, W. (1996). Proliferative opisthomonad forms in *Herpetomonas roitmani* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Parasitology Research*, 82: 125–129
- Faria-e-Silva, P. M., Attias, M. & De Souza, W. (2000). Biochemical and ultrastructural changes in *Herpetomonas roitmani* related to the energy metabolism. *Biology of the Cell*, 92: 39–47
- Fernandes, O., Degraeve, W. & Campbell, D. A. (1993). The mini-exon gene: a molecular marker for *Endotrypanum schaudinni*. *Parasitology*, 107: 219–224
- Figueiredo, E. N., Yoshida, N., Roitman, C. & Camargo, E. P. (1978). Enzymes of the ornithine-arginine metabolism of trypanosomatids of the genus *Crithidia*. *The Journal of Protozoology*, 25: 546–549
- Fish, W. R., Holz Jr., G. G., Beach, D. H., Owen, E. & Anekwe, G. E. (1981). The cyclopropane fatty acid of trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 3: 103–115
- Freymüller, E. & Camargo, E. P. (1981). Ultrastructural differences between species of trypanosomatids with and without endosymbionts. *The Journal of Protozoology*, 28: 175–182
- Frolov, A. O. & Malysheva, M. N. (1989). *Crithidai allae* sp. n. and *Crithidia brevicula* sp. n. (Protozoa, Trypanosomatidae) from the bug *Nabis brevis*. *Zoologicheskyyi Zhurnal (Russia)*, 68: 5–10 (v ruštině s anglickým shrnutím)
- Galinari, S. & Camargo, E. P. (1978). Trypanosomatid protozoa: survey of acetylornithinase and ornithine acetyltransferase. *Experimental Parasitology*, 46: 277–282
- Garin, Y. J. F., Sulahian, A., Méneceur, P., Pratlong, F., Prina, E., Gangneux, J. P., Dedet, J. P. & Derouin, F. (2001). Experimental pathogenicity of a presumed monoxenous trypanosomatid isolated from humans in a murine model. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48: 170–176
- Gaunt, M. W., Yeo, M., Frame, I. A., Stothard, J. R., Carrasco, H. J., Taylor, M. C., Mena, S. S., Veazey, P., Miles, G. A., Acosta, N., De Arias, A. R. & Miles, M. A. (2003). Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*, 27: 936–939
- Ghalib, H. W., Pluvezam, M. R., Skeiky, Y. A. W., Siddig, M., Hashim, F. A., El Hassam, A. M., Russo, D. M. & Reed, S. G. (1993). Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 92: 324–329
- Gillies, C. & Hanson, E. D. (1963). A new species of *Leptomonas* parasitizing the macronucleus of *Paramecium trichium*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 10: 467–473

- Görtz, H. D. & Dieckmann, J. (1987). *Leptomonas ciliatorum* n. sp. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the macronucleus of a hypotrichous ciliate. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 34: 259–263
- Hamilton, W. D., Axelrod, R. & Tanese, R. (1990). Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 3566–3573
- Hollar, L., Lukeš, J. & Maslov, D. A. (1998). Monophyly of endosymbiont containing trypanosomatids: Phylogeny versus taxonomy. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45: 293–297
- Hughes, D. E. & Simpson, L. (1986). Introduction of plasmid DNA into the trypanosomatid protozoan *Crithidia fasciculata*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 83: 6058–6062
- Chang, K. P. & Trager, W. (1974). Nutritional significance of symbiotic bacteria in two species of hemoflagellates. *Science*, 183: 531–532
- Christensen, H. A. & Herrer, A. (1979). Susceptibility of sand flies (Diptera, Psychodidae) to Trypanosomatidae from two-toed sloths (Edentata: Bradypodidae). *Journal of Medical Entomology*, 16: 424–427
- Jamjoom, M. B., Ashford, R. W., Bates, P. A., Kemp, S. J. & Noyes, H. A. (2002). Towards a standard battery of microsatellite markers for the analysis of the *Leishmania donovani* complex. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 96: 265–270
- Jenni, L., Marti, S., Sweizer, J., Betschart, B., Le Page, R. W. F., Wells, J. M., Tait, A., Pandavoine, P., Pays, E. & Steinert, M. (1986). Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature*, 322: 173–175
- Jimenez, M. I., Lopez-Velez, R., Molina, R., Canavate, C. & Alvar, J. (1996). HIV co-infection with a currently non-pathogenic flagellate. *The Lancet*, 347: 264–265
- Kostygov, A. Y., Slisarenko, E. P., Merkulov, P. A. & Podlipaev, S. A. (2004). Genetic diversity of insect trypanosomatids from subarctic and North-West Russia revealed by UP-PCR typing. *Protistology*, 3: 257–264
- Leidy, J. (1853). A flora and fauna within living animals. *Smithsonian contributions to knowledge* 5: art. 2, 1–67
- Lukeš, J., Jirků, M., Doležel, D., Král'ová, I., Hollar, L. & Maslov, D. A. (1997). Analysis of ribosomal RNA genes suggests that trypanosomes are monophyletic. *Journal of Molecular Evolution*, 44: 521–527
- Lukeš, J. & Votýpka J. (2000). *Trypanosoma avium*: Novel features of the kinetoplast structure. *Experimental Parasitology*, 96: 178–181
- Lukeš, J., Guilbride, D. L., Votýpka, J., Ziková, A., Benne, R. & Englund, P. T. (2002). The kinetoplast DNA network: Evolution of an improbable structure. *Eukaryotic Cell*, 1: 495–502
- McGhee, R. B. & Hanson, W. L. (1962). Growth and reproduction of *Leptomonas oncopelti* in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *The Journal of Protozoology*, 9: 488–493
- McGhee, R. B. & Hanson, W. L. (1963a). Experimental infection of the hemipteron *Oncopeltus fasciatus* with Trypanosomatidae isolated from other hosts. *The Journal of Protozoology*, 10: 233–238
- McGhee, R. B. & Hanson, W. L. (1963b). The relationship of various crithidias as

- determined by serological reactions. *The Journal of Protozoology*, 10: 239–243
- McGhee, R. B., Hanson, W. L. & Schmittner, S. M. (1969). Isolation, cloning and determination of biologic characteristics of five new species of *Crithidia*. *The Journal of Protozoology*, 16: 514–520
- McGhee, R. B. (1970). The relation of contiguity of host and parasite life cycles to survival of species of Trypanosomatidae. *The Journal of Parasitology*, 56: 231–232
- McGhee, R. B. & Cosgrove, W. B. (1980). Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiological Reviews*, 44: 140–173
- Medina-Acosta, E., Paul, S., Tomlinson, S. & Pontes de Carvalho, L. C. (1994). Combined occurrence of trypanosome sialidase/transsialidase activities and leishmanial metalloproteinase gene homologs in *Endotrypanum* sp. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 64: 273–282
- Merzlyak, E., Yurchenko, V., Kolesnikov, A. A., Alexandrov, K., Podlipaev, S. A. & Maslov, D. A. (2001). Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48: 161–171
- Miranda, K., Docampo, R., Grillo, O. & De Souza, W. (2004). Acidocalcisomes of trypanosomatids have species-specific elemental composition. *Protist*, 155: 395–405
- Molyneux, D. H., Croft, S. L. & Lavin, D. R. (1981). Studies on the host-parasite relationships of *Leptomonas* species (Protozoa: Kinetoplastida) of Siphonaptera. *Journal of Natural History*, 15: 395–406
- Morsy, T. A., Schnur, L. F., Feinsod, F. M., Michael, S. A., Saah, A., Salama, M. M. & Wahba, M. M. (1988). The discovery and preliminary characterization of a novel trypanosomatid parasite from *Rattus norvegicus* and stray dogs from Alexandria, Egypt. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 82: 437–444
- Motta, M. C. M., Soares, M. J., Attias, M., Morgado, J., Passos-Lemos, A., Saad-Nehme, J., Meyer-Fernandes, J. R. & De Souza, W. (1997). Ultrastructural and biochemical analyses of the relationship of *Crithidia deanei* with its endosymbiont. *European Journal of Cell Biology*, 72: 370–377
- Mundim, M. H. & Roitman, I. (1977). Extra nutritional requirements of artificially aposymbiotic *Crithidia deanei*. *The Journal of Protozoology*, 24: 329–331
- Noguchi, H. (1926). Comparative studies of *Herpetomonas* and leishmanias. II. Differentiation of the organisms by serological reactions and fermentation tests. *The Journal of Experimental Medicine*, 44: 327–337
- Noyes, H., Pratlong, F., Chance, M., Ellis, J., Lanotte, G. & Dedet, J. P. (2002). A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique (French West Indies) is the most divergent member of the genus *Leishmania* s.s. *Parasitology*, 124: 17–24
- Pacheco, R. S., Marzochi, M., Pires, M., Brito, C. M., Madeira, M. F. & Barbosa-Santos, E. (1998). Parasite genotypically related to a monoxenous trypanosomatid of dog's flea causing opportunistic infection in HIV-positive patient. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 531–537
- Page, A. M., Canning, E. U., Barker, R. J. & Nicholas, J. P. (1986). A new species of *Rhynchoidomonas* Patton 1910 (Kinetoplastida, Trypanosomatina) from *Operophtera brumata* (Lepidoptera, Geometridae). *Systematic parasitology*, 8: 101–105

- Podlipaev, S. A. (1985). New species of lower trypanosomatids from Heteroptera families Gerridae and Nabidae: stages of their life cycles in nature and in the laboratory. *Proceedings of the Zoological Institute Leningrad*, 129: 35–47 (v ruštině s anglickým shrnutím)
- Podlipaev, S. A. (1990). Catalogue of world fauna of Trypanosomatidae (Protozoa). *Proceedings of the Zoological Institute Leningrad*, 144: 1–174
- Podlipaev, S. A. (2000). Insect trypanosomatids: the need to know more. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 517–522
- Podlipaev, S. A. & Naumov, A. D. (2000). Colonies of trypanosomatids on agar plates: the tool for differentiation of the species and isolates. *Protistology*, 1: 113–119
- Podlipaev, S. A. (2001). The more insect trypanosomatids under study – the more diverse Trypanosomatidae appears. *International Journal for Parasitology*, 31: 648–652
- Podlipaev, S. A., Sturm, N. R., Fiala, I., Fernandes, O., Westenberger, S. J., Dollet, M., Campbell, D. A. & Lukeš, J. (2004a). 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
- Podlipaev, S. A., Votýpka, J., Jirků, M., Svobodová, M. & Lukeš, J. (2004b). *Herpetomonas ztiplika* n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): a parasite of the blood-sucking biting midge *Culicoides kibunensis* Tokunaga, 1937 (Diptera: Ceratopogonidae). *The Journal of Parasitology*, 90: 342–347
- Roberts, L. S. & Janovy Jr., J. (2005). Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations of parasitology. Colin H. Wheatley, 7th edition: 61–88
- Robinson, D. R. & 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. & Wallace, F. G. (1971). Two new subspecies of *Herpetomonas muscarum* (Leidy 1856) Kent 1880. *The Journal of Protozoology*, 18: 645–649
- Roitman, I., Mundim, H. M., Azevedo, H. P. & Kitajima, E. W. (1977). Growth of *Crithidia* at high temperature, *Crithida hutneri* n. sp. and *C. luciliae thermophila* n. s. sp. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 24: 553–556
- Romeiro, A., Solé-Cava, A., Sousa, M. A., De Souza, W. & Attias, M. (2000). Ultrastructural and biochemical characterization of promastigote and cystic forms of *Leptomonas wallacei* n. sp. isolated from the intestine of its natural host *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47: 208–220
- Ruiz-González, M. X. & Brown, M. J. F. (2006). Honey bee and bumblebee trypanosomatids: specificity and potential for transmission. *Ecological Entomology*, 31: 616–622
- Schaub, G. A., Böker, C. A., Jensen, C. & Reduth, D. (1989). Cannibalism and coprophagy are modes of transmission of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) between Triatomines. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 36: 171–175
- Schaub, G. A. (1994). Pathogenicity of trypanosomatids on insects. *Parasitology Today*, 10: 463–468
- Simpson, L. & Shaw, L. (1989). RNA editing and the mitochondrial cryptogenes of kinetoplastid protozoa. *Cell*, 57: 355–366

- Simpson, A. G. B., Gill E. E., Callahan H. A., Litaker R. W. & Roger A. J. (2004). Early evolution within kinetoplastids (Euglenozoa), and the late emergence of trypanosomatids. *Protist*, 155: 407–422
- Simpson, A. G. B., Stevens, J. R. & Lukeš, J. (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitology*, 22:168–174
- Sousa, M. A. & Corte-Real, S. (1991). Postnuclear kinetoplast in chanomatiogotes of *Crithidia deanei* Carvalho, 1973. Proposal of a new genus. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 33: S8
- Sousa, M. A. (1994). Cell-to-cell interactions suggesting a sexual process in *Herpetomonas megaseliae* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Parasitology Research*, 80: 112–116
- Sousa, M. A., Barrett, T. V., Naiff, R. D., Branco, D. C. B., Sá-Xavier, C., Santos, S. M., Cysne, L. & Brandao, A. (1998). *Leptomonas* sp. isolated from the sandfly *Lutzomyia aurozai* (Diptera: Psychodidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 127
- Stevens, J. & Gibson, W. (1999). The evolution of pathogenic trypanosomes. *Cadernos de Saúde Pública*, 15: 673–684
- Sturm, N. R., Fernandes, O. & Campbell, D. A. (1995). The mini-exon genes of three *Phytomonas* isolates that differ in plant tissue tropism. *FEMS Microbiology Letters*, 130: 177–182
- Svobodová, M., Zídková, L., Čepička, I., Oborník, M., Lukeš, J. & 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
- Takata, C. S. A., Camargo, E. P. & Milder, R. V. (1996). Encystment and excystment of a trypanosomatid of the genus *Leptomonas*. *European Journal of Protistology*, 32: 90–95
- Teixeira, M. M. G., Takata, C. S. A., Conchon, I., Campaner, M. & Camargo, E. P. (1997). Ribosomal and kDNA markers distinguish two subgroups of *Herpetomonas* among old species and new trypanosomatids isolated from flies. *The Journal of Parasitology*, 83: 58–65
- Teixeira, M. M. G., Serrano, M. G. & Camargo, E. P. (2000). New data from old trypanosomatid preparations. *Parasitology Today*, 16: 261–263
- Tieszen, K. L. & Molyneux, D. H. (1989). Transmission and ecology of trypanosomatid flagellates of water striders (Hemiptera: Gerridae). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 36: 519–523
- Vercesi, A., Moreno, S. & Docampo, R. (1994).  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Journal*, 304: 227–233
- Vickerman, K. & Preston, T. M. (1974). Comparative biology of kinetoplastid flagellates. In: W. H. R. Lumsden & D. A. Evans (Eds.): *Biology of the Kinetoplastida*. Vol. 1. Academic Press. 35–130
- Vickerman, K. (1990). Phylum Zoomastigina: Class: Kinetoplastida. In: L. Margulis, J. O. Corliss, M. Melkonian & D. Chapman (Eds.): *Handbook of protoctista*. Jones & Bartlett. 200–210
- Vickerman, K. (1994). The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *International Journal for Parasitology*, 24: 1317–1331
- Vickerman, K. (2000). Order Kinetoplastea. In: J. J. Lee, G. F. Leedale & P. Bradbury

- (Eds.): The illustrated guide to the Protozoa. Vol. 2. Lawrence: Society of Protozoologists. 1159–1185
- Votýpka J., Ray D. S. & Lukeš J. (2001). *Crithidia fasciculata*: a test for genetic exchange. *Experimental Parasitology*, 99: 104–107
- Wallace, F. G. (1966). The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Experimental Parasitology*, 18: 124–193
- Wallace, F. G. (1979). Biology of the Kinetoplastida of arthropods. In: W. H. R. Lumsden, D. A. Evans (Eds.): *Biology of the Kinetoplastida*. Vol. 2. Academic Press. 213–240
- Wallace, F. G., Camargo, E. P., McGhee, R. B. & Roitman, I. (1983). Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. *The Journal of Protozoology*, 30: 308–313
- Wenyon, C. M. (1926). *Protozoology. A manual for medical men, veterinarians and zoologists*. 2 volumes. Bailliere, Tindall and Cox
- Westenberger, S. J., Sturm, N. R., Yanega, D., Podlipaev, S. A., Zeledón, R., Campbell, D. A. & Maslov, D. A. (2004). Trypanosomatid biodiversity in Costa Rica: genotyping of parasites from Heteroptera using the spliced leader RNA gene. *Parasitology*, 129: 537–547
- Wright, A. D., Li, S., Feng, S., Martin, D. S. & Lynn, D. H. (1999). Phylogenetic position of the kinetoplastids, *Cryptobia bullocki*, *Cryptobia catostomi*, and *Cryptobia salmositica* and monophyly of the genus *Trypanosoma* inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 15: 69–76
- Yoshida, N. & Camargo, E. P. (1978). Urotelism and ammonotelism in trypanosomatids. *Journal of Bacteriology*, 136: 1184–1186
- Yoshida, N., Freymüller, E. & Wallace, F. G. (1978a). *Herpetomonas mariadeanei* sp. n. (Protozoa, Trypanosomatidae) from *Muscina stabulans* (Fallen 1816) (Diptera, Muscidae). *The Journal of Protozoology*, 25: 421–425
- Yoshida, N., Jankevicius, J. V., Roitman, I. & Camargo, E. P. (1978b). Enzymes of the ornithine-arginine metabolism of trypanosomatids of the genus *Herpetomonas*. *The Journal of Protozoology*, 25: 550–555
- Yurchenko, V. Y., Lukeš, J., Jirků, M., Zeledón, R. & Maslov, D. A. (2006a). *Leptomonas costaricensis* sp. n. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae), a member of the novel phylogenetic group of insect trypanosomatids closely related to the genus *Leishmania*. *Parasitology*, 233: 537–546
- Yurchenko, V., Lukeš, J., Xing, X. & Maslov, D. A. (2006b). 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. Y., Lukeš, J., Tesařová, M., Jirků, M. & Maslov, D. A. (2007). Morphological discordance of the new trypanosomatid species phylogenetically associated with the genus *Crithidia*. *Protist*. In press