

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Dynamika mikrobiomů nejvýznamnějších
přenašečů *T. cruzi* na území Spojených
Států Amerických (podčeleď Triatominae).**

Diplomová práce

Bc. Veronika Škočová

Školitel: doc. RNDr. Eva Nováková, PhD.

Školitel specialista: Giampiero Batani, PhD.

České Budějovice 2019

Škochová, V., 2019: Dynamika mikrobiomů nejvýznamnějších přenašečů *T. cruzi* na území Spojených Států Amerických (podčeleď Triatominae). [Microbiome dynamics of *T. cruzi* vectors in the US (subfamily Triatominae). Mgr. Thesis, in Czech.] – 61 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: Microbiome dynamics of *T. cruzi* vectors was in general studied on two different groups of samples. Firstly, I focused on laboratory colonies of *Rhodnius prolixus* and their microbiome dynamics throughout the post feeding period. Secondly, microbiome dynamics and possible *T. cruzi* effect on microbiome were surveyed on samples originating from natural populations of 5 *Triatoma* species native to Arizona and Texas.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 11. prosince 2019

Bc. Veronika Škochová

Poděkování

Největší poděkování, nejen za vedení při psaní diplomové práce, ale za vše, co mě naučila, veškeré rady a pomoc během celého mého působení v naší laboratoři, patří mé školitelce Evě Novákové. Dále bych ráda poděkovala našim postdoktorandům Anbuovi Poosakkannu a Giampieru Batani za trpělivost a spolupráci. Také nesmím zapomenout na Jana Zimu, který se mnou taktéž spolupracoval, a díky kterému je v naší laboratoři vše, co je potřeba, a na Romana Hrdličku, který se stará o laboratorní kolonie triatomínů.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Podčeleď Triatominae	1
1.2	<i>Trypanosoma cruzi</i> a Chagasova choroba	4
1.3	Symbióza	7
1.3.1	Obecná fakta o symbióze	7
1.3.2	Symbióza u podčeledi Triatominae	10
2	Cíle práce	14
3	Materiál a metody	15
3.1	Vzorky	15
3.2	Pitva a izolace DNA	15
3.2.1	Laboratorní chov České Budějovice	15
3.2.2	Hnízda krysa druhu <i>Neotoma albigula</i>	16
3.3	Zmapování dynamiky mikrobiomu v závislosti na sání hostitele a vizualizace změn mikrobiomu pomocí metody FISH	17
3.3.1	High throughput amplikonové sekvenování	17
3.3.2	qPCR	17
3.3.3	Metoda FISH	18
3.3.3.1	Fixace a kryosekce	19
3.3.3.2	Hybridizace a promývání	19
3.3.3.3	Mikroskopie	20
3.4	Posouzení vývoje mikrobiomu v ontogenezi hostitele u volně žijících triatominů	21
3.5	Diagnostika <i>Trypanosoma cruzi</i> u volně žijících severoamerických triatominů a posouzení vlivu parazita na mikrobiomový profil u vybraných druhů triatominů	22
3.5.1	PCR a gelová elektroforéza	22
3.5.2	Bioinformatické analýzy	23
4	Výsledky	24
4.1	Zmapování dynamiky mikrobiomu v závislosti na sání hostitele a vizualizace změn mikrobiomu pomocí metody FISH	24
4.2	Posouzení vývoje mikrobiomu v ontogenezi hostitele u volně žijících triatominů	27
4.3	Diagnostika <i>Trypanosoma cruzi</i> u volně žijících severoamerických triatominů a posouzení vlivu parazita na mikrobiomový profil u vybraných druhů triatominů	30
5	Diskuze	33
5.1	Zmapování dynamiky mikrobiomu v závislosti na sání hostitele a vizualizace změn mikrobiomu pomocí metody FISH	33
5.2	Posouzení vývoje mikrobiomu v ontogenezi hostitele u volně žijících triatominů	34

5.3 Diagnostika <i>Trypanosoma cruzi</i> u volně žijících severoamerických triatominů a posouzení vlivu parazita na mikrobiomový profil u vybraných druhů triatominů.....	36
6 Závěr.....	41
7 Seznam použité literatury.....	42
8 Přílohy	54

Předmluva

Podčeleď Triatominae zahrnuje zástupce krevsajícího hmyzu s velkým epidemiologickým významem. Patří sem celkem šest kmenů, nejvýznamnější jsou však dva, a to Rhodniini a Triatomini. Triatomy jsou výhradními přenašeči jednobuněčného parazita *Trypanosoma cruzi*, původce Chagasovy choroby. Ta byla ještě nedávno problémem především v oblastech Jižní a Střední Ameriky, které byly hlavními endemickými oblastmi. Dnes se ale tato choroba značně rozšířila i do dalších zemí. Kromě států Severní Ameriky a Mexika se dnes Chagasova choroba, jinak také Americká trypanosomiáza, často vyskytuje i na dalších kontinentech. Jednou ze zemí zásadně ohrožených importovanými případy Chagasovy choroby je např. Španělsko, kde se odhady incidence pohybují v rozmezí desítek až jednoho sta tisíc. Hlavním problémem je rozsáhlá migrace obyvatelstva, a také mezinárodní turismus. Migrace přispěla k vysoké incidenci onemocnění i v USA, kde jsou však i původní severoamerické druhy triatom s potenciálem pro přenos *T. cruzi*. Proto se zde začíná zvyšovat počet případů autochtonních nálezů. Z dosavadních výzkumů je patrné, že parazit *T. cruzi* a mikrobiom jeho hostitele se navzájem ovlivňují. Studium hostitelova mikrobiomu má tedy velký význam. Dosud byla provedena řada výzkumů specializujících se na mikrobiomy ploštic podčeledi Triatominae, nicméně většina těchto prací se zabývala plošticemi z oblastí Latinské Ameriky nebo Mexika. Proto se tato diplomová práce snaží o vzhled do mikrobiomů právě severoamerických triatominů. Obecně je tématem řešeným v této diplomové práci komplexní pohled na systém vektor – mikrobiom a parazit. Základní informace o vektorech, tedy plošticích podčeledi Triatominae, jsou v kapitole 1.1. Kapitola 1.2 přináší informace o parazitu *T. cruzi* a s ním související Chagasově chorobě. Mikrobiomem, jako poměrně recentním konceptem symbiózy, se podrobněji zabývá kapitola 1.3.

1 Úvod

1.1 Podčeleď Triatominae

Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) jsou krevsajícím hmyzem s hemimetabolickou (nedokonalou) přeměnou. Jejich vývoj zahrnuje pět stádií larev (tzv. instarů), šestým stádiem je dospělec. Jak dospělci, tak všechna larvální stádia obou pohlaví (Bern et al., 2011) se živí výhradně krví obratlovců (Schofield, 2000; Panzera et al., 2010; Rassi Jr. et al., 2010; Sandoval et al., 2010; Otálora-Luna et al., 2015; Rodríguez-Ruano et al., 2018; Vieira et al., 2018). Sání krve podmiňuje nejen vývoj larválních stádií, ale i fertilitu dospělých samic. Podčeleď se obvykle dělí do 5 kmenů a 15 rodů, které zahrnují kolem 140 druhů (Schofield & Galvao, 2009; Panzera et al., 2010; Otálora-Luna et al., 2015). Většina druhů Triatominae se vyskytuje výhradně v Novém světě. Jen několik druhů bylo zřejmě importováno mimo Americký kontinent. Toto tvrzení se opírá o výsledky analýzy kombinující morfologické, ekologické, geografické, behaviorální i molekulární charakteristiky triatom, podle kterých podčeleď Triatominae pochází původně z oblasti mezi Severní Amerikou a středním Mexikem (Hypša et al., 2002). Mezi druhy s odlišným geografickým rozšířením patří druh *T. rubrofasciata*. Ten obývá přístavy v tropických a subtropických oblastech Nového i Starého světa. V oblasti od jihovýchodní Asie po Novou Guineu a sever Austrálie byl popsán komplex *rubrofasciata*, který zahrnuje 6 příbuzných druhů (Schofield & Galvao, 2009; Otálora-Luna et al., 2015). Zvláštním případem je rod *Linshcosteus* se 6 druhy, které se vyskytují výhradně na území Indie a jsou zde údajně původní (Hypša et al., 2002). Ač je druhová diverzita triatom soustředěna na území Jižní a Střední Ameriky, tato práce se zabývá méně známými druhy původními pro Severoamerický kontinent. Na území Spojených států Amerických se vyskytuje celkem 11 druhů triatom, a to druhy *Triatoma gerstaeckeri*, *T. incrassata*, *T. indictiva*, *T. lecticularia*, *T. neotomae*, *T. protracta*, *T. recurva*, *T. rubida*, *T. rubrofasciata*, *T. sanguisuga*, a *Paratriatoma hirsuta*. Z nich se nejčastěji vyskytuje pět druhů, konkrétně druhy *Triatoma sanguisuga*, *Triatoma lecticularia*, *Triatoma protracta*, *Triatoma rubida* a *Triatoma indictiva*. Druhová diverzita přes státy USA je popsána v Tab. I.

Tab. I: Druhová diverzita rodu *Triatoma* ve Spojených státech Amerických (syntéza zdrojů: Pippin, 1968; Bern et al., 2011; Wozniak et al., 2015; Klotz et al., 2016; Flores et al., 2017; Schmidt et al., 2019; Beatty et al., 2018; Behrens-Bradley et al., 2019).

Druh	Stát
<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Texas, Nové Mexiko
<i>Triatoma recurva</i>	Arizona
<i>Triatoma rubida</i>	Arizona, Kalifornie, Texas, Nové Mexiko
<i>Triatoma protracta</i>	Kalifornie, Nevada, Utah, Arizona, Colorado, Nové Mexiko, Texas
<i>Triatoma incrassata</i>	Arizona
<i>Triatoma indictiva</i>	Texas, Nové Mexiko, Arizona
<i>Triatoma lecticularia</i>	Nové Mexiko, Texas, Kansas, Missouri, Tennessee, Florida, Georgie, Jižní Karolína
<i>Triatoma neotomae</i>	Texas
<i>Triatoma rubrofasciata</i>	Florida
<i>Triatoma sanguisuga</i>	Texas, Oklahoma, Kansas, Missouri, Arkansas, Louisiana, Illinois, Indiana, Ohio, Pensylvánie, Kentucky, Virginie, Tennessee, Severní Karolína, Mississippi, Alabama, Georgie, Jižní Karolína, Florida
<i>Paratriatoma hirsuta</i>	Kalifornie, Nevada, Arizona

Jednotlivé druhy se mezi sebou navzájem liší nejen rozšířením, ale i vektorovou kapacitou a morfologií těla. Jelikož jde o sající hmyz, mají obecně zástupci Hemiptera různě modifikované ústní a trávící ústrojí, včetně složení slin. Triatominae se podle dosavadních výzkumů nejspíše vyvinuli z dravých zástupců skupiny Reduviidae (Schofield, 2000; Otálora-Luna et al., 2015). V porovnání s dnes známými dravými plošticemi došlo během vývoje triatom k několika zásadním behaviorálním, morfologickým a fyziologickým změnám (Otálora-Luna et al., 2015). Ústní ústrojí původních dravců umožňující snazší průnik tvrdým exoskeletem kořisti (Otálora-Luna et al., 2015) je obecně robustní, silně chitinizované a často zahnuté. Oproti tomu ústní ústrojí krevsajících forem hmyzu je štíhlé a podlouhlé. Draví zástupci rovněž využívají silnou toxicitu svých slin k rychlé immobilizaci kořisti, zatímco Triatominae mají sliny méně agresivní (Schofield, 2000). Pro obligátní hematofágy, jako jsou právě Triatominae, jsou rovněž důležité modifikace týkající se přímo trávících pochodů. Krev je velice bohatý zdroj různých živin, ale je vysoce alkalická a většina proteinů zůstává uzavřena uvnitř krevních buněk. V tomto ohledu je pro Triatominae velice důležitý hemolysin, který krevní buňky naruší, a také následná acidifikace potravy umožňující její stravení (Schofield, 2000).

Zástupci podčeledi Triatominae jsou vektory *Trypanosomy cruzi*, která je původcem Chagasovy choroby (jinak také Americké trypanosomiázy) (Garcia et al., 2016; Vallejo et al., 2009; Otálora-Luna et al., 2015). Toto onemocnění nezasahuje jen endemické oblasti Jižní a Střední Ameriky, ale i další země světa, do kterých je často importováno (Haberland et al., 2013; Botoni et al., 2013; Keenan et al., 2013; Dandapani et al., 2014; Pérez-Molina & Molina, 2018; Miranda-Schaeubinger et al., 2019). Zatímco v 70. letech minulého století směřoval pohyb infikovaných migrantů z Jižní a Střední Ameriky hlavně do Spojených států Amerických, recentním cílem migrujícího obyvatelstva je Evropa, a to především Španělsko. V EU byla u původně latinskoamerických obyvatel zjištěna prevalence Chagasovy choroby 4,2%. (Antinori et al., 2018). Ve Španělsku se podle dostupných informací počet potenciálně infikovaných obyvatel *Trypanosomou cruzi* pohybuje mezi 37 000 – 122 000 (Monge-Maillo et al., 2009). Neméně důležitou lokalitou je rovněž Itálie, kde byla naposledy uváděna alarmující prevalence této choroby u migrantů z Latinské Ameriky 9,6 % (Antinori et al., 2018, viz níže).

V endemických oblastech jsou z epidemiologického hlediska nejvýznamnější dva kmeny podčeledi Triatominae, Rhodniini a Triatomini (Vallejo et al., 2009), kterými se tato diplomová práce zabývá. V sylvatickém cyklu *T. cruzi* triatomy osidlují hnízda volně žijících obratlovců. Nejvýznamnějšími rezervoáry pro infekci *T. cruzi* jsou vačice, pásovcí a hlodavci. Volně žijící živočichové se však mohou běžně vyskytovat i v blízkosti lidských obydlí. Především netopýři, divoká prasata a divoké kozy propojují sylvatický cyklus *T. cruzi* s cyklem synantropním (tj. zahrnujícím člověka a domestikovaná zvířata). V oblastech Spojených států Amerických propojují oba cykly především krysy druhu *Neotoma albigula*, z jejichž hnízd pochází většina vzorků analyzovaných v této práci. V synantropním cyklu jsou pak nejvýznamnějšími hostiteli s velkým epidemiologickým významem psi, kočky, ale také domestikovaná morčata. U psů, kteří jsou označováni za vůbec nejdůležitější rezervoárové hostitele synantropního cyklu (Ramírez et al., 2013), byly dokonce popsány všechny z dosud definovaných linií *T. cruzi* (DTU viz níže, Gürtler & Cardinal, 2015). Tato studie z roku 2015 ukázala, že zmíněné druhy živočichů, pokud jsou infikovaní *T. cruzi*, jsou velmi infekční. Jako zdroj nákazy fungují tito živočichové v různých ekoregionech i ekotypch. Takový fenomén se nevyskytuje u žádných jiných domestikovaných zvířat.

T. cruzi mohou přenášet obě pohlaví Triatominae (ať už larvy nebo dospělci). Čím je larva vyššího instaru nebo čím je dospělec starší, tím vyšší je pravděpodobně i míra jejich promořenosti parazitem (Rassi Jr. et al., 2010; Bern et al., 2011). Infekce se z triatom

na obratlovce přenáší po nasátí krve s jeho výkaly (Vieira et al., 2018; Waltmann et al., 2019). Někteří zástupci Triatominae defekují během přestávky v sání, jiné druhy defekují bezprostředně po sání (Bern et al., 2011). Trus infikovaný trypanosomou se poté dostává do krevního řečiště obratlovce nejčastěji mechanicky (během škrábání). Mezi hlavní druhy, které kolonizují lidská obydlí a hrají tak velice významnou roli v epidemiologii Chagasovy choroby v Latinské Americe, patří druhy *Triatoma infestans* (Argentina, Brazílie, Chile, Paraguay, Uruguay), *Rhodnius prolixus* (Kolumbie, El Salvador, Guatemala, jižní Mexiko, Venezuela), *Triatoma dimidiata* (Kolumbie, Guatemala, Panama, severní Peru, Mexiko), *Panstrongylus megistus* (Argentina, Brazílie, Paraguay, Uruguay), a *Triatoma brasiliensis* (severovýchod Brazílie) (Rassi Jr. et al., 2010; Bern et al., 2011). V USA kolonizují lidská obydlí druhy *Triatoma rubida* (Arizona), *Triatoma recurva* (především jih Arizony) (Klotz et al., 2016), *Triatoma gerstaeckeri*, *Triatoma sanguisuga* a *Triatoma lecticularia* (všechny Texas) (Kjos et al., 2009).

1.2 *Trypanosoma cruzi* a Chagasova choroba

Trypanosoma cruzi je parazitický prvok patřící do skupiny Kinetoplastida a rodiny Trypanosomatidae (Garcia et al., 2016; Bern et al., 2011). Jde o parazita s komplexním životním cyklem, který zahrnuje cirkulaci mezi člověkem, vektorem, sylvatickým (volně žijícím) rezervoárem, případně domestikovaným zvířetem (Garcia et al., 2016). Je původcem Chagasovy choroby, která byla dříve považována v neendemických oblastech (Severní Amerika, státy Evropy a další) za chorobu importovanou. Dnes se ale ukazuje, že i na území Severní Ameriky lze prokázat autochtonní nákazy, které nebyly importovány, ale pochází přímo od severoamerických triatom (Beatty et al., 2018; Behrens-Bradley et al., 2019). Odhadovaný počet nemocných se uvádí ve velkém rozpětí, od 5 až do 18 milionů lidí (Miranda-Schaeubinger et al., 2019), a to hlavně ve Střední a Jižní Americe (Keenan et al., 2013). Každoročně pak na Chagasovu chorobu umírá asi 12 – 40 000 lidí (Miranda-Schaeubinger et al., 2019). *T. cruzi* patří mezi nejméně prostudované organismy, což může být způsobeno jednak její genetickou komplexitou (Peng et al., 2015), jednak neochotou farmaceutických firem podpořit výzkum, který je z hlediska zisku neperspektivní.

Analýzy založené na zkoumání isoenzymů, rRNA, mini-exonů a dalších markerů, ukázaly významnou diversitu mezi zástupci *T. cruzi*. Na základě těchto poznatků byly *T. cruzi* rozděleny do dvou geneticky velice odlišných skupin (Tc1 a Tc2). Přesto, že Chagasovu chorobu způsobují trypanosomy z obou skupin, Tc2 se objevuje hlavně

u domestikovaných hostitelů, zatímco linie Tc1 napadá především volně žijící živočichy (El-Sayed et al., 2005; Garcia et al., 2016). Na základě genotypové i fenotypové variability jsou linie *T. cruzi* rozděleny do několika dalších skupin. Nejčastěji se používá rozdělení do šesti tzv. „Discrete Typing Units“ (DTUs), v jejichž rámci pak existují skupiny označované TcI - TcVI (Bern et al., 2011; Schijman et al., 2011; Haberland et al., 2013; Gumiel et al., 2015; Pérez-Molina & Molina, 2018; Miranda-Schaeubinger et al., 2019). Z hlediska genetické diversity tedy *T. cruzi* patří mezi heterogenní druhy (Rassi Jr. et al., 2010; Bern et al., 2011; Pérez-Molina & Molina, 2018). Heterogenita je studována na různých úrovních a může být důvodem nejen různých klinických příznaků Chagasovy choroby, ale i rozdílné geografické morbidity a mortality (Rassi Jr. et al., 2010).

Chagasova choroba může probíhat jako akutní nebo chronické onemocnění (Botoni et al., 2013; Haberland et al., 2013; Dandapani et al., 2014; Moncayo & Silveira, 2017; Pérez-Molina & Molina, 2018; Miranda-Schaeubinger et al., 2019). Dle výsledků některých výzkumů se zdá, že v případě chronické formy onemocnění lze podle konkrétního symptomu určit jednotlivé DTUs *Trypanosomy cruzi* (Poveda et al., 2014). Linie *T. cruzi* I je spojována především s výskytem kardiomyopatie, linie *T. cruzi* II, V a VI pak kromě kardiomyopatie hlavně s chorobami trávicího traktu (Mantilla et al., 2010; Zingales, 2018). Existují ale i studie, které toto tvrzení vyvrací (Del Puerto et al., 2010; Messenger et al., 2015). Akutní fáze je většinou asymptomatická, případné klinické příznaky se objevují jeden až dva týdny od sání ploštice. Patří mezi ně dlouhodobá horečka, nevolnost, únava, bolest hlavy a celého těla, zvětšení lymfatických uzlin a hepatosplenomegalie, případně subkutánní edém (Rassi Jr. et al., 2010; Haberland et al., 2013; Dandapani et al., 2014; Pérez-Molina & Molina, 2018; Miranda-Schaeubinger et al., 2019). Chronická forma této nemoci se postupně vyvíjí u asi 30 – 40 % pacientů s akutní formou infekce, a to během 10 – 30 let od počáteční infekce (Schmunis & Yadon, 2010; Rassi Jr. et al., 2010; Haberland et al., 2013; Pérez-Molina & Molina, 2018). Nejčastěji jde o srdeční onemocnění nebo onemocnění trávicího traktu (Rassi Jr. et al., 2010; Haberland et al., 2013; Dandapani et al., 2014; Miranda-Schaeubinger et al., 2019), vzácně se objevuje polyneuropatie a mrtvice (Pérez-Molina & Molina, 2018).

Léčba tohoto onemocnění je velice složitá. Jejím cílem je odstranění klinických příznaků (Rassi Jr. et al., 2010). Zatím existují pouze dva účinné léky, a to benznidazol a nifurtimox (Rassi Jr. et al., 2010; Bern et al., 2011; Haberland et al., 2013; Botoni et al., 2013; Dandapani et al., 2014; Pérez-Molina & Molina, 2018). Jejich nevýhodou ovšem je, že mají

řadu vedlejších účinků (Keenan et al., 2013; Dandapani et al., 2014) a nejednoznačné výsledky při léčbě chronického stádia choroby. Navíc nejsou vhodné pro těhotné a kojící ženy (Keenan et al., 2013; Pérez-Molina & Molina, 2018). Určitou nadějí by mohly být dva analogy látky fenarimol, které vykazovaly schopnost léčit Chagasovu chorobu při experimentech prováděných na myších (Keenan et al., 2013). Od roku 1991 se výskyt Chagasovy choroby snížil díky screeningu dárců krve, nicméně podle PAHO (The Pan American Health Organisation) se každoročně stále nově nakazí asi 60 000 lidí (Dias et al., 2002; Bern et al., 2011). Podle WHO jde o jednu z 13 nejméně zanedbávaných tropických nemocí (Rassi Jr. et al., 2010; Pérez-Molina & Molina, 2018). S ohledem na tyto skutečnosti a neexistenci účinné vakcíny je velice důležitá prevence. Ta spočívá především ve snaze vyhnout se kontaktu s plošticemi podčeledi Triatominae, a také v kontrolování krve, která se využívá při transfuzích (Dias et al., 2002; Rassi Jr. et al., 2010; Pérez-Molina & Molina, 2018).

T. cruzi je sterkorální parazit, k jehož přenosu na hostitele dochází skrze kontakt výkalů vektoru s hostitelskou krví (Nouvellet et al., 2013). Životní cyklus *T. cruzi* začíná v bezobratlém vektoru – ploštici Triatominae, který infekci získává během sání na infikovaném savčím hostiteli (Garcia et al., 2016; Bern et al., 2011). Ve střevě Triatominae pak dochází po několika dnech k přeměně trypomastigota (v některých případech přes stádium zvané spheromastigot) na epimastigota, hlavní replikační stádium *Trypanosomy cruzi* ve vektoru. Po replikaci následně migruje do zadní části střeva, kde dochází k jeho přeměně na infekční formu metacyklického trypomastigota (v procesu zvaném metacyklogeneze) (Garcia et al., 2016; Haberland et al., 2013). Ta probíhá téměř výhradně pouze v oblasti rekta, a to po přichycení na rektální stěnu. Metacyklický trypomastigot je z těla vektoru vylučován spolu se stolicí (Garcia et al., 2016; Bern et al., 2011). Jak už bylo zmíněno, Triatominae střídají sání a defekaci. Tímto způsobem se metacyklický trypomastigot dostává přes ránu nebo mukozní sliznici do těla savčího hostitele, kde invaduje do různých buněk. Může napadnout v podstatě jakoukoli buňku v těle (Torrecilhas et al., 2008; Haberland et al., 2013). V cytoplasmě se trypomastigot diferencuje na intracelulárního amastigota, který se replikuje, a to po dobu čtyř až pěti dní. Ke konci této periody dochází k jeho přeměně opět na trypomastigota, který se následně dostává do krevního řečiště. Cirkulující trypomastigot je poté schopen infikovat nové buňky, čímž dochází k šíření infekce (Bern et al., 2011; Haberland et al., 2013).

Ve střevě triatom je *T. cruzi* ovlivňována a pravděpodobně i regulována biochemickými i fyziologickými faktory. Na dynamiku jejího vývoje a také na přeměnu do dalšího stádia

působí různé látky související s trávením, jako hemolytický faktor, peptidy odvozené od α -D-globinu nebo lektiny (Azambuja et al., 2005; Garcia et al., 2016). Hustota populace parazita a procentuální zastoupení jednotlivých stádií v konečniku jsou pak ovlivněny potravou vektoru obecně. Dále mohou mít na vývoj *T. cruzi* negativní vliv také humorální složky imunitního systému vektoru (např. molekuly defensinu). Významnou roli hrají také reaktivní kyslíkové radikály a oxid dusnatý (Garcia et al., 2016). V neposlední řadě je parazit v prostředí střeva konfrontován s mikrobiomem. Obecně je známo, že symbiotické bakterie mohou ovlivnit vývoj vektorem přenášených parazitů - patogenů, a některé jsou schopny patogena i zničit. Příkladem u podčeledi Triatominae může být bakterie *Serratia marcescens*, která produkuje látku prodigiosin. Ta je schopna *T. cruzi* zahubit (Azambuja et al., 2005). Kromě prodigiosinu produkuje tato bakterie i další toxické látky, které mají antiparazitární účinky, jako např. cytotoxickou metalloproteázu, hemolysin, hemaglutinin nebo antibiotika. Jejich konkrétní účinky však ještě nebyly zcela prokázány (Azambuja et al., 2005). Především Gramm negativní bakterie, které se vyskytují ve střevě krevsajícího hmyzu, mají potenciál pro modulaci kompetence daného vektoru. Interakce hostitele, jeho mikrobiomu a přenášených patogenů je proto v posledních letech často řešeným tématem.

1.3 Symbióza

1.3.1 Obecná fakta o symbióze

Termín symbióza byl definován německým mykologem Antonem De Bary jako „společné soužití různých nebo různě pojmenovaných organismů“. Obecně jde o blízkou spolupráci mezi dvěma nebo více různými organismy (Kikuchi et al., 2008; Prado & Zucchi, 2012). V současné biologii je často symbióza synonymem mutualismu (Margulis & Fester, 1991), vztahu prospěšného pro všechny zúčastněné organismy. Symbióza ale zahrnuje i komenzalismus (soužití dvou organismů, kdy jeden z dvojice ze společného soužití profituje, zatímco druhý není nijak ovlivněn) a parazitismus (jeden parazituje na druhém). Parazité způsobují infekční onemocnění, která mají na hostitele negativní vliv a mohou končit i smrtí (Rio et al., 2004; Kikuchi et al., 2008; Sachs et al., 2011; Berasategui et al., 2016). Obecně ale nelze termíny mutualismus a parazitismus striktně oddělit. Některé bakterie se mohou v různých hostitelích a podmínkách chovat jako mutualisté i jako paraziti (Akman et al., 2002).

Symbióza mezi bakteriemi a eukaryoty je zprostředkována pomocí přenosů malých molekul, které jsou nezbytné pro růst a život symbiotických partnerů. Symbiotické vztahy s bakteriemi vytváří široká škála organismů, přes rostliny a živočichy, až po hmyz. Ten je nejpočetnější skupinou, u které je možné symbiotické mikroorganismy nalézt (Kikuchi et al., 2007; Prado & Zucchi, 2012). Předpokládá se, že je využívá 20 – 50 % zástupců hmyzu (Kuechler et al., 2011). Bakteriální symbionti jsou, stejně jako jakékoli jiné bakterie, Archea, viry i jednobuněčná eukaryota, součástí mikrobiomu. Mikrobiom představuje obecný pojem pro všechny mikroorganismy asociované s hostitelem. U bezobratlých živočichů, a to zvláště u hmyzu, vykazuje velkou diversitu (Moran et al., 2005). Obecně je mutualistický vztah mezi bakteriemi a hmyzem považován za fenomén, který přispívá k úspěšnosti a ekologické diverzitě této skupiny (Beard et al., 2002; Kuechler et al., 2011; Feldhaar, 2011; Weiss et al., 2012).

Pokud jde o bakteriální symbionty obecně, lze říci, že jde o nesourodou, ekologicky i evolučně diverzifikovanou skupinu. Zatímco někteří symbionti nejsou schopni žít a rozmnožovat se bez hostitele, jiní si zachovávají základní životní funkce nezávisle na hostiteli (Sachs et al., 2011). Dále se liší jejich lokalizace v hostitelské tkáni, kdy mohou obývat Malpighiho trubice, lumen střeva, střevní stěnu, reprodukční orgány nebo intracelulární prostor. V případě intracelulárního prostoru pak jde o tzv. endosymbionty. Někteří z nich se shlukují ve specializovaných buňkách bakteriocytech nebo v orgánových strukturách vznikajících z bakteriocytů, zvaných bakteriomy (nebo také mycetomy) (Schofield, 2000; Wernegreen 2002; Moran et al., 2005; Rio et al., 2004; Kikuchi et al., 2008; Oliver et al., 2010; Sachs et al., 2011; Kuechler et al., 2011; Rio et al., 2016; Husnik, 2018). Rozdílný je i způsob přenosu symbiontů v populaci hostitele. Jedná se o vertikální nebo horizontální přenos, možná je i jejich kombinace. Vertikálním přenosem je přenos z matky na potomstvo. Ten může probíhat transovariálně nebo přes kontaminovaná vajíčka. Horizontální pak představuje přenosy v rámci populace, mezi populacemi stejného druhu nebo mezi nepříbuznými populacemi. Mechanismem tohoto přenosu může být koprofágie, společné sání na hostiteli nebo zisk symbiontů z vnějšího prostředí (Kikuchi et al., 2008; Bright & Bulgheresi, 2010; Webster, 2014; Salem et al., 2015). V závislosti na jejich vztahu s hostitelem lze symbionty klasifikovat do dvou ekologicky odlišných skupin, a to na obligátní a fakultativní symbionty (Kikuchi et al., 2007; Feldhaar, 2011; Prado & Zucchi, 2012).

Obligátní (primární) endosymbionti jsou intracelulární symbionti, kteří jsou pro hmyz nezbytně důležití, co se týče jeho přežití a rozmnožování (např. Rio, et al., 2004;

Kikuchi et al., 2008; Kuechler et al., 2011; Prado & Zucchi, 2012; Rio et al., 2016; Sterkel et al., 2017; Jiménez-Cortés et al., 2018). Poskytují svému hostiteli celou škálu různých výhod. Jde např. o doplňování živin, které jsou v potravě hostitele zastoupeny v minimálním množství (Akman et al., 2002; Moran et al., 2005; Rio et al., 2004; Kikuchi et al., 2008; Sachs et al., 2011; Prado & Zucchi, 2012; Berasategui et al., 2016; Sterkel et al., 2017). Hostiteli dodávají hlavně esenciální aminokyseliny, vitamíny a tuky. Důležité živiny chybí především organismům s jednostrannou stravou, jako je krevsající (hematofágní) nebo fytofágní hmyz (Douglas, 1998; Wernegreen, 2002; Beard et al., 2002; Rio et al., 2004; Oliver et al., 2010; Kuechler et al., 2011; Berasategui et al., 2016; Sterkel et al., 2017). Dalšími příklady poskytovaných výhod je udržení správných funkcí imunitního systému (Weiss et al., 2012; Sterkel et al., 2017), produkce antibiotik (Sachs et al., 2011; Waltmann et al., 2019) nebo také resistance vůči patogenům (Oliveira et al., 2018). Obligátní symbionti se přenášejí vertikálně z matky na potomstvo (tzv. transovariální přenos) a vyvíjejí se s hostitelem miliony let. Jejich počet v hostitelských tkáních bývá extrémně vysoký (Moran et al., 2005; Kikuchi et al., 2008; Oliver et al., 2010; Feldhaar, 2011; Weiss et al., 2012; Prado & Zucchi, 2012; Jiménez-Cortés et al., 2018). V hostiteli obývají zmíněné bakteriomy (Prado & Zucchi, 2012; Husnik, 2018), které lze u různého hmyzu nalézt v jiných strukturách. Příkladem jsou zástupci rodiny Hippoboscidae, u kterých se symbionti nachází ve střevních buňkách, dále zástupci rodiny Nycteribiidae, ve kterých symbionti obývají mléčné žlázy (Wilkinson et al., 2016). Příkladem hostitele, který nevytváří bakteriomy, ale pouze specializované symbiotické buňky, tzv. bakteriocyty, jsou mšice (Moran & Telang, 1998). Mimo specializované buňky, případně orgány hostitele, nejsou schopni obligátní symbionti přežít a není je proto možné kultivovat (Wernegreen, 2002; Rio et al., 2004; Kikuchi et al., 2008; Kuechler et al., 2011).

Odlišnou ekologickou kategorií představují fakultativní (sekundární) symbionti, jejichž vztah k hostiteli není jasně vymezen. Kromě přenosu z matky na potomstvo se na nového hostitele mohou přenášet i horizontálně, a to jak v rámci druhu, tak i mezidruhově (Kikuchi et al., 2007; Oliver et al., 2010; Kikuchi, 2009; Feldhaar, 2011; Prado & Zucchi, 2012; Jiménez-Cortés et al., 2018). Pro hostitele nejsou životně důležití (Wernegreen, 2002; Oliver et al., 2010; Kikuchi, 2009; Prado & Zucchi, 2012). Jejich vliv na fitness hostitele se může lišit v závislosti na různých ekologických podmínkách (Oliver et al., 2010; Kikuchi, 2009). To znamená, že pro hostitele mohou být prospěšní i škodliví (Feldhaar, 2011; Prado & Zucchi, 2012). Pozitivní vliv spočívá ve zvyšování odolnosti hostitele vůči tepelnému stresu, patogenům nebo vůči parazitům. Jakousi evoluční

pojistku pak představuje jejich schopnost kompenzovat ztráty primárních symbiontů (Kikuchi, 2009; Feldhaar, 2011; Prado & Zucchi, 2012). Negativně mohou naopak ovlivnit růst, reprodukci nebo délku života hostitele (Prado & Zucchi, 2012). Oproti primárním se sekundární symbionti většinou neshlukují v žádném orgánu, ale obývají různé tkáně, případně hemolymfu hostitele (Moran et al., 2005; Oliver et al., 2010; Kikuchi, 2009; Prado & Zucchi, 2012; Jiménez-Cortés et al., 2018). Zatímco obligátní symbionti jsou lokalizováni intracelulárně, fakultativní symbionty lze najít vně i uvnitř hostitelských buněk (Kikuchi, 2009; Prado & Zucchi, 2012; Husnik 2018), např. v heamocoelu, tukovém tělese, svalech, nervové tkáni nebo střevě (Feldhaar, 2011). Vzhledem k jejich nepřímé závislosti na hostiteli je možné většinu fakultativních symbiontů kultivovat (Kikuchi et al., 2008).

Symbióza funguje u mnohobuněčných organismů už asi 2 miliardy let. Přesto dosud není jasné, jak konkrétní vztahy mezi organismy vznikají nebo proč vznikají jen mezi některými z nich (Henry et al., 2015). Nicméně je známo, že mutualisté vzhledem k evoluci hrají velice významnou roli v životě hmyzu. Nejen, že ovlivňují jeho diverzitu (Kikuchi, 2009), ale také mu umožňují rozšířit ekologickou niku o oblasti, které by hmyz jinak nebyl schopen využívat (Feldhaar, 2011; Berasategui et al., 2016).

1.3.2 Symbióza u podčeledi Triatominae

Triatominae nemají oproti jinému krevsajícím hmyzu primární symbionty, ale mnohem dynamičtější symbiozu s celými bakteriálními společenstvy (mikrobiomem) (Schofield, 2000; Otálora-Luna et al., 2015). Tato společenstva se nachází volně v lumen střeva a pro triatomy mají velký význam (Schofield, 2000; Rodríguez et al., 2011; Husnik 2018). Jsou součástí mikrobiomu, který je kromě symbiotických bakterií tvořen všemi mikroorganismy vyskytujícími se v těle triatom. Poprvé symbiotické bakterie triatom popsal Duncan v roce 1926 (Duncan, 1926). Ve své práci se zabýval druhem *Rhodnius prolixus*, u jehož zástupců našel ve všech případech Gramm pozitivní bakterii rodu *Bacillus* (Vallejo et al., 2009).

O mikrobiomech podčeledi Triatominae jako takové je známo několik základních faktů. Jejich množství v intestinálním traktu koresponduje jednak s larválním stádiem, jednak s dobou, která uplynula od posledního nasátí (Eichler & Schaub, 2002; Waltmann et al., 2019). Je známo, že množství symbiontů se po nakrmení zvyšuje (Eichler & Schaub, 2002; Sterkel et al., 2017). Z dospělců se symbionti přenáší na potomstvo koprofágií (požíráním výkalů) (Beard et al., 2001; Eichler & Schaub, 2002; Pachebat et al., 2013; Husnik 2018; Lopez-Ordóñez et al., 2018) nebo během vzájemného

sání (Schofield, 2000). Výjimkou je symbiont *Arsenophonus triatominarum*, který se pravděpodobně přenáší vertikálně přes vajíčko (Wilkes et al., 2012).

Složení mikrobiomu je ovlivněno mnoha faktory. Předně platí, že složení bakteriální populace střeva se liší mezi volně žijícími zástupci a zástupci chovanými v laboratorním prostředí (Waltmann et al., 2019). Mezi významné faktory ovlivňující charakteristiky mikrobiomu rovněž patří dominantní zdroj potravy (Sterkel et al., 2017; Husnik, 2018; Dumonteil et al., 2018; Waltmann et al., 2019), stádium vývoje, nebo druhová příslušnost hostitele (Rodríguez-Ruano et al., 2018; Waltmann et al., 2019). Některé studie, provedené na druhu *Triatoma sordida*, také poukazují na rozdíly závislé na funkčních částech střeva, které bakterie osidlují. Rozdílné mikrobiomové profily z předního, středního a zadního střeva byly popsány u nymf *Triatoma sordida* prvního až čtvrtého stádia (Oliveira et al., 2018; Vieira et al., 2018). V porovnání s ostatním hmyzem je diverzita mikrobiomů triatom, ve smyslu bohatosti společenstva v hostiteli, malá (Lopez-Ordonez et al., 2018; Rodríguez-Ruano et al., 2018). Mikrobiomy triatom jsou tvořeny jen několika dominantními druhy bakterií (Monteon et al., 2018). Při pohledu na diversitní rozdíly mezi pohlavími je v případě druhu *Triatoma dimidiata* vidět, že mikrobiom samic vykazuje v porovnání se samečkami větší diversitu, a to na úrovni bakteriálních řádů (Dumonteil et al., 2018). Zvýšení diversity u *T. cruzi* infikovaných triatom bylo prokázáno u řady druhů, např. *Triatoma protracta* (Rodríguez-Ruano et al., 2018), *Triatoma dimidiata* (Orantes et al., 2018) a také *Rhodnius prolixus*, *T. infestans*, *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis* a *T. sherlocki* (Díaz et al., 2016). Složení mikrobiomu může být ovlivněno i rozdílným geografickým rozšířením hostitelů. U druhu *Triatoma dimidiata* byly popsány rozdílné mikrobiomové profily jedinců korelující s jejich odlišným místem výskytu (Orantes et al., 2018).

Symbionti triatomám poskytují celou řadu výhod. Jsou důležití pro jejich správný růst a vývoj. Jedinci, kteří nejsou kolonizováni symbionty, mají vyšší mortalitu, často ve vývoji nedosáhnou dospělosti a nedokončí svůj pohlavní vývoj (Beard et al., 2001; Rio et al., 2004; Kikuchi et al., 2008; Lopez-Ordonez et al., 2018; Oliveira et al., 2018). Symbionti mají především nutriční význam (Schofield, 2000; Vallejo et al., 2009; Sterkel et al., 2017; Lopez-Ordonez et al., 2018). Konkrétně je nutné zmínit bakterii *Rhodococcus rhodnii*, která se podílí na dodávání nutričně důležitých živin v chudé stravě triatom. Pravděpodobně jde o dodávání vitamínů skupiny B (Beard et al., 2002; Kikuchi et al., 2008; Vallejo et al., 2009; Pachebat et al., 2013; Tobias, 2016; Husnik 2018; Jiménez-Cortés et al., 2018; Oliveira et al., 2018). Za zmínku stojí také sekundární symbiont *Arsenophonus*

triatominarum. Původně byl znám především jako intracelulární fakultativní symbiont, přesto ale byla prokázána jeho vysoká koncentrace i v lumen střeva, a to u druhů *Triatoma protracta* a *Triatoma sanguisuga* (Rodríguez-Ruano et al., 2018). Poprvé byla tato bakterie popsána u druhu *Triatoma infestans*, u kterého představuje právě sekundárního symbionta. *A. triatominarum* se u *T. infestans* vyskytuje v hemolymfě, srdci, slinných žlázách, nervovém gangliu, viscerálních svalech, varlatech nebo vaječnicích (Hypša & Dale, 1997; Hypša et al., 2002). Kromě *Triatoma infestans* byl *A. triatominarum* nalezen u dalších 17 druhů Triatominae (Šorfová et al., 2008). Symbionti rodu *Arsenophonus* jsou známí z mnoha jiných hostitelů, např. parazitických vosiček, klíšťat, molic, mšic, parazitických much, mravenců, včel, vší, a dokonce dvou druhů rostlin (Dale et al., 2006; Nováková et al., 2009). Zajímavostí je, že zástupci rodu *Arsenophonus* vykazují široké ekologické spektrum. Jde o diverzifikovanou skupinu, ve které se někteří zástupci chovají jako symbionti, jiní naopak fungují jako paraziti (Nováková et al., 2009). V případě symbiontů pak může jít jak o symbionty obligátní, tak i fakultativní (Wilkes et al., 2012). Zatímco několik členů tohoto rodu má na svého hostitele zásadní vliv, jak pozitivní v případě nutričních mutualistů, tak negativní (narušují reprodukci), podobný fenomén nebyl u *A. triatominarum* prokázán (Wilkes et al., 2012; Rodríguez-Ruano et al., 2018). Zůstává tedy otázkou, proč je tento symbiont stále součástí hostitelských mikrobiomů.

Symbionti jsou významní i z epidemiologického hlediska. Hrají klíčovou roli v udržení homeostázy a správné funkce imunitního systému hostitele (Sterkel et al., 2017; Jiménez-Cortés et al., 2018; Waltmann et al., 2019). Navíc mají také vliv na hostitelem přenášené patogeny. Ovlivňují hostitelovu schopnost patogeny získávat, udržovat i přenášet, a to nejen v případě podčeledi Triatominae, ale i u dalších vektorů, jako jsou komáři, muchničky nebo například klíšťata (Da Mota et al., 2012; Díaz et al., 2016; Jiménez-Cortés et al., 2018; Oliveira et al., 2018; Husnik, 2018; Waltmann et al., 2019). S patogeny mohou symbionti soupeřit přímo, a to o zdroje ve střevech, nebo nepřímo indukcí hostitelovy antiparazitární aktivity (Díaz et al., 2016). Samy symbiotické bakterie mohou produkovat mnoho látek (hydrolytické enzymy, peptidy, vitamíny, kofaktory a antimikrobiální faktory), které se podílí na inhibici patogenů (Da Mota et al., 2012). V mikrobiomech triatom, konkrétně v laboratorních koloniích druhu *Rhodnius prolixus*, byla například identifikována bakterie *Serratia marcescens* s antitrypanosomální aktivitou (Azambuja et al., 2005; Rodríguez et al., 2011; Carels et al., 2017; Jiménez-Cortés et al., 2018; Waltmann et al., 2019). Tato bakterie je schopna ničit různé strainy *Trypanosomy cruzi* (Da Mota et al., 2012; Díaz et al., 2016).

Interakce mikrobiomu a hostitelem přenášených patogenů je vzájemná. I patogeny jsou schopné, ať již přímou nebo nepřímou cestou, ovlivňovat hostitelův mikrobiom. Kromě zástupců podčeledi Triatominae jsou tyto interakce známy také např. u komárů (Guégan et al., 2018). Dosud provedené výzkumy u triatom ukázaly, že přítomnost *T. cruzi* v různých druzích souvisí se zvýšenou mikrobiální diverzitou (Díaz et al., 2016; Rodríguez-Ruano et al., 2018; Orantes et al., 2018). V neposlední řadě je známo, že interakce uvnitř mikrobiomu často vedou k výměnám genetické informace, a to všemi směry. Jde o výměnu genů mezi mikroorganismy existujícími společně v jednom hostiteli, o přenos informace z mikroorganismu na hostitele anebo o přenos informace z hostitele na mikroorganismus. Všechny tyto interakce mají zásadní význam ve veterinárním i medicínském prostředí a jejich studium může být přínosné v otázce přenosu genů resistance a eliminace chorob přenášených právě krevsajícím hmyzem (Husnik, 2018).

Znalosti současné vědy o triatomách jako holobiontu, tedy komplexním systému hostitel – mikrobiom – *T. cruzi*, jejíž vývoj probíhá v mikrobiomu vlastním prostředí střeva, jsou stále velice omezené a svým rozsahem zásadně kontrastují s detailními znalostmi vztahu hostitel – parazit, míněno obratlovec – *T. cruzi*. S ohledem na zásadní epidemiologický význam triatom je však důležité komplexitě vztahů v hmyzím vektoru plně porozumět. Proto se touto problematikou moje diplomová práce zabývá a v budoucnu by ji měla být věnována značná pozornost.

2 Cíle práce

V této diplomové práci se budu zajímat o mikrobiomy ploštic podčeledi Triatominae. Kromě jejich dynamiky v závislosti na sání hostitele bude sledován i jejich vývoj vzhledem k ontogenezi hostitele. Dále se práce bude zabývat také tím, jak jsou mikrobiomy ovlivněny přítomností parazita *T. cruzi*. Konkrétně mám za cíl následující:

1. Zmapování dynamiky mikrobiomu v závislosti na sání hostitele a vizualizace změn mikrobiomu pomocí metody FISH.
2. Posouzení vývoje mikrobiomu v ontogenezi hostitele u volně žijících triatominů.
3. Diagnostika *Trypanosoma cruzi* u volně žijících severoamerických triatominů a posouzení vlivu parazita na mikrobiomový profil u vybraných druhů triatominů.

3 Materiál a metody

3.1 Vzoroky

Analyzované vzorky pocházely ze dvou různých zdrojů. Prvním zdrojem byly vlastní chovy, konkrétně laboratorní kolonie Katedry parazitologie na Přírodovědecké fakultě JU v Českých Budějovicích. Šlo o 74 vzorků střev získaných ze 74 jedinců druhu *Rhodnius prolixus*. Druhým zdrojem vzorků byla hnízda volně žijících kryš druhu *Neotoma albigula*, a to ve státech Arizona a Texas. Vzorky byly sbírány vedoucí naší laboratoře v 8 lokalitách. Z těchto oblastí pochází 271 vzorků. Přehled vzorků z USA shrnuje Tabulka P2 v sekci Přílohy.

3.2 Pitva a izolace DNA

3.2.1 Laboratorní chov České Budějovice

K posouzení dynamiky mikrobiomu v závislosti na sání hostitele byli využiti jedinci z vlastního chovu. Z chovu bylo vybráno celkem 74 dospělých jedinců samčího pohlaví druhu *Rhodnius prolixus*. Z nich bylo 25 vzorků zpracováno pro high throughput amplikonové sekvenování a qPCR, dalších 28 pro ověřovací qPCR analýzy a zbylých 21 vzorků bylo analyzováno pomocí metody FISH.

Pro potřeby high throughput amplikonového sekvenování a qPCR bylo postupně 25 jedincům vždy v určitý den po nasátí (konkrétně 3., 5., 7., 10. a 15. den, každý interval vždy 5 jedincům) vypitváno střevo, ze kterého poté byla vyizolována DNA. Jelikož v průběhu trávení nasáté krve byl předpokládán určitý vývoj mikrobiomu, byla navržena časová řada (tedy určité intervaly odběru střev), díky níž bylo možné dynamiku mikrobiomu v závislosti na trávení nasáté krve sledovat. Pitva probíhala s využitím stereomikroskopu, a to na Petriho misce s PBS (phosphate-buffered saline). Vypitváno bylo celé střevo, které bylo poté umístěno do prázdné zkumavky a uchováno při -80°C až do následné izolace DNA. Ta byla prováděna po získání všech potřebných vzorků s využitím Blood & Tissue Kitu. Všechny kroky probíhaly podle návodu výrobce (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen), s výjimkou eluce, která proběhla pouze do 70 µl AE pufru.

Zbylých 49 vzorků bylo získáno ze 49 jedinců a zpracováno pro potřeby analýzy pomocí další qPCR a FISH. Pitva v tomto případě probíhala v 7 časových intervalech, v každém intervalu byly získány 4 vzorky pro qPCR a 3 pro FISH (Tab. II). Počet intervalů byl v tomto případě zvýšen kvůli snaze zachytit co nejpřesněji dynamiku mikrobiomu, a to s mnohem přesnějším kvantifikačním přístupem, tj. qPCR. Pro potřeby qPCR pitva probíhala pod stereomikroskopem na prázdné Petriho misce. Pitvou bylo získáno celé střevo, které bylo následně přemístěno do zkumavky s obsahem pufru ATL. Ze získaných vzorků byla dále izolována DNA s využitím DNA microKitu (Qiagen), a to podle návodu od výrobce. Pro metodu FISH byla pitva prováděna opět pod stereomikroskopem na prázdné Petriho misce, a to následujícím způsobem: jedinci byly odstraněny končetiny a křídla, dále hlava a kutikula z dorzální strany těla. Zbylé tkáně včetně střeva byly vloženy do zkumavek s 4% paraformaldehydem a fixovány přes noc v +4°C. Druhý den byl paraformaldehyd vyměněn za roztok 2% peroxidu vodíku rozpuštěného v etanolu, který snižuje autofluorescenci tkání. Následně byly vzorky opět uchovány v +4°C do dalšího zpracování, přičemž roztok peroxidu byl každý týden měněn.

Tab. II: Časové intervaly pitev a počty získaných vzorků pro qPCR a FISH.

Den po nasátí	Počet vzorků (qPCR)	Počet vzorků (FISH)
Čtvrtý	4	3
Sedmý	4	3
Desátý	4	3
Třináctý	4	3
Osmnáctý	4	3
Dvacátý třetí	4	3
Dvacátý osmý	4	3

3.2.2 Hnízda krysu druhu *Neotoma albigula*

Vzorky pocházející z hnízd krysu druhu *Neotoma albigula* byly sbírané živé a uchovávané pro přepravu do naší laboratoře ve 100% etanolu. Střevo nebyla pitvána, jelikož jsme v mikrobiomových profilech ze střev a celých abdomenů neprokázali statisticky signifikantní rozdíly (Rodríguez-Ruano et al., 2018). DNA byla tudíž izolována z celých abdomenů pomocí Blood & Tissue Kitu pracovníkem naší laboratoře Janem Zimou.

3.3 Zmapování dynamiky mikrobiomu v závislosti na sání hostitele a vizualizace změn mikrobiomu pomocí metody FISH

3.3.1 High throughput amplikonové sekvenování

Pro 25 vzorků *R. prolixus* byly vytvořeny 16S rRNA amplikonové knihovny dle protokolu EMP (Earth Microbiome Project, <http://www.earthmicrobiome.org>). V sekvenovaném runu bylo celkem 5 negativních kontrol, ve kterých se osekvenovalo průměrně $169 \pm 145,9$ readů. OTU, které byly nalezeny ve dvou a více negativních kontrolách, byly z datasetu odstraněny, tj. celkem 15 potenciálně kontaminačních OTU. Dále byly jako pozitivní kontrola osekvenovány také 3 vzorky se známým mikrobiomovým profilem. Při porovnání s daty z runu zpracovaného během mé bakalářské práce bylo zjištěno, že profily dříve osekvenovaných vzorků odpovídají profilům těchto pozitivních kontrol. Průměrný počet readů zpracovaných vzorků *Rhodnius prolixus* byl $7225,1 \pm 5646,3$. Několik vzorků se nepodařilo dostatečně osekvenovat a nízký počet získaných readů neumožnil další analýzy (počty readů: 701, 23, 116, 38 a 170). Z celkového počtu 25 vzorků v datasetu bylo 5 odstraněno (3 vzorky pitvané 15. den po nasátí a 2 vzorky pitvané 10. den po nasátí). Vzhledem k této skutečnosti byla pro následné analýzy data pro 10. a 15. den po nasátí sloučena do jednoho časového intervalu.

3.3.2 qPCR

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce byla využita k přesnějšímu posouzení změn mikrobiomu v průběhu trávení nasáté krve u jedinců druhu *Rhodnius prolixus* z vlastního chovu. Tato metoda byla provedena na dvou skupinách vzorků, poprvé s 25 vzorky, podruhé s 28 vzorky a upravenými časovými intervaly pitev (Tab. II). Amplifikace pro set 25 vzorků s dostupnými amplikonovými daty (Obr. 1) však neposkytla věrohodné výsledky. Standardní odchylky u Ct hodnot pro amplifikaci 3 sledovaných bakterií byly extrémně vysoké. Všechny vzorky byly zpracovány jako technický duplikát, přičemž každý jeden vzorek v biologickém triplikátu (dohromady tedy každý vzorek 6x). Reakce byla míchána do objemu 20 μ l následujícím způsobem: 10 μ l iQ Supermix (Bio Rad, 2x koncentrovaný, 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8,4, 0,4 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 50 U/ml iTaq DNA polymeráza, 6 mM MgCl₂, stabilizátory); 0,8 μ l forward primeru (10 μ M); 0,8 μ l reverse primeru (10 μ M); 0,4 μ l próby (10 μ M); 7 μ l vody a 1 μ l DNA. Celkem byly v každé reakci použity 4 próby (navrženy Marií Jaloveckou pomocí programu Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>, Tab. III)) značené odlišnými fluorochromy a 4 sety primerů

(viz. Tab. IV). Hodnoty Ct, vyjadřující hodnotu cyklu, ve kterém byla detekována fluorescence, byly zpracovány s využitím delta delta Ct metody. Následně byl sestrojen graf s výsledky (Obr. 3). Analýza byla zaměřena na relativní zastoupení 3 sledovaných bakterií.

Tab. III: Přehled prób použitých při qPCR.

Organismus	Próba	Sekvence (5' - 3')
<i>Rhodnius prolixus</i>	FAM-BHQ1	AATTGTTCCCATGAACGAG
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cy5-BHQ2	GCGGCTCTCTGGTCTGTAAC
<i>Arsenophonus</i>	HEX-BHQ1	TGGGGAGCAAACAGGATTAG
<i>Bacillus</i>	TxRed-BHQ2	GAATTATTGGGCGTAAAGCG

Tab. IV: Přehled primerů použitých při qPCR.

Organismus	Primer	Sekvence (5' - 3')
<i>Rhodnius prolixus</i>	pro 18S F	TCCTTCGTGCTAGGAATTGG
	pro 18S R	GTACAAAGGGCAGGGACGTA
<i>Enterococcus faecalis</i>	pro 16S F	CCATGTGTAGCGGTGAAATG
	pro 16S R	CGGAAACCCTCCAACACTT
<i>Arsenophonus</i>	pro 16S F	CCATGTGTAGCGGTGAAATG
	pro 16S R	GACATCGTTTACAGCGTGGA
<i>Bacillus</i>	pro 16S F	ACGTAGGTGGCAAGCGTTAT
	pro 16S R	TCTCCCAGTTTCCAATGACC

3.3.3 Metoda FISH

Fluorescenční in situ hybridizace byla taktéž využita ke sledování dynamiky mikrobiomu v průběhu trávení nasáté krve. Zpracováno bylo celkem 21 vzorků získaných z 21 jedinců druhu *Rhodnius prolixus*. Použité reagentie, jejich seznam a detailní informace popisuje Tab. P1 v sekci Přílohy. Po získání vzorků (popsáno výše) probíhala metoda podle následujícího schématu.

3.3.3.1 Fixace a kryosekce

Vzorky byly přemístěny z 2% peroxidu do směsi 15% sacharózy a O. C. T. embedding media (namíchano v poměru 35:10). V této směsi byly fixovány přes noc při 4°C. Následně byly vzorky fixovány v sérii směsí, které vznikly smícháním stejných reagensů v následujících poměrech: 15:10 (fixace 2 hod) a 15:30 (fixace 2 hod). Poté byly vzorky na 2 hodiny přeneseny do 100% O. C. T. embedding media. Fixace ve všech případech probíhala při pokojové teplotě. Dále byly vzorky rychle zamrazeny ponořením do tekutého dusíku na asi 15 s a uchovány v -80°C až do krájení řezů. Pomocí kryostatu LEICA CM 1850 UV byly při teplotě -20°C získány řezy o tloušťce 6 μm. Řezy byly přeneseny na sklíčko pokryté poly-L-lysinem, na kterém byly následně vysušeny při 44°C po dobu 15 min. Sklíčka byla uchována při 4°C do dalšího zpracování.

3.3.3.2 Hybridizace a promývání

Za účelem dehydratace tkání byla sklíčka s řezy promyta ve 3 sériích vodného roztoku etanolu (postupně 50%, 80% a 96% etanol), a to vždy po dobu 3 min. Poté byly řezy ponechány při laboratorní teplotě do vyschnutí a následně hybridizovány ve vlhké komůrce při teplotě 46°C po dobu dvou hodin. Hybridizační pufr (Tab. V) obsahoval 4 fluorescenční próby (Sigma Aldrich, Tab. VI) o koncentraci 2,5 ng/μl, z nichž 1 byla využita jako negativní kontrola. Konkrétně byly použity próby Cy3 a TexasRed (navrženy postdoktorandem Giampierem Batanim) specifické pro 2 rody bakterií, *Arsenophonus* a *Enterococcus*, a také univerzální próba EUB338 hybridizující s bakteriální 16S rRNA.

Tab. V: Příprava hybridizačního pufru.

Reagencie	Množství	Výsledná koncentrace v hybridizačním pufru
5M NaCl	360 μl	900 mM
1M Tris/HCl	40 μl	20 mM
Formamid	600 μl	30%
Destilovaná voda	do celk. 2 ml	
10% SDS	2 μl	0,01%

Tab. VI: Seznam použitých fluorescenčních prób a další informace.

Próba	Označení	Zacílení	Sekvence (5' - 3')
Cyanine 5 (Cy5)	EUB338	všechny bakterie	GCTGCCTCCCGTAGGAGT
Cyanine 3 (Cy3)	Ec50	<i>Enterococcus</i>	TCAGACTTAAGAAACCGCCT
TexasRed	As307	<i>Arsenophonus</i>	TCCGGAGGCCACAGTTCTAGA
Cyanine 5 (Cy5)	NONEUB338	NA	ACTCCTACGGGAGGCAGC

Po 2 hodinách byl každý vzorek omyt cca 1 ml vychlazené vody. Následně na každý bylo napipetováno asi 100 μ l promývacího pufru (množství opět záleželo na velikosti vzorku), ve kterém byla poté sklíčka se vzorky inkubována při 48°C po dobu 25 min. Pufř byl připraven podle návodu popsaného v Tabulce VII.

Tab. VII: Příprava promývacího pufru.

Reagencie	Množství	Výsledná koncentrace v promývacím pufru
5M NaCl	1020 μ l	0,112 M
1M Tris/HCl	1 ml	20 mM
0,5M EDTA	500 μ l	5 mM
Destilovaná voda	do celk. 50 ml	
10% SDS	50 μ l	0,01%

3.3.3.3 Mikroskopie

Sklíčka se vzorky byla osušena a následně byl každý vzorek inkubován po dobu 10 min v cca 100 μ l DAPI roztoku (koncentrace 1 ng/ μ l; množství závislé na velikosti vzorku). Sklíčka se vzorky byla překryta krycími sklíčky se 120 μ l roztoku Mowiol media a uchována ve 4°C až do mikroskopování. Fluorescenční signály byly sledovány pod konfokálním skenovacím mikroskopem (FLUOVIEW FV3000, Olympus, Japan). Byly sledovány 4 světelné kanály zároveň, přičemž nastavení filtrů bylo upraveno tak, aby bylo dosaženo maximálního signálu z každého fluorochromu (pro jednotlivé próby tedy následující poměry maximální excitace/emise v nm: DAPI 356/459, Cy3 553/565, TexasRed 595/613, Cy5 645/663). Pro hloubkovou vizualizaci střevní tkáně bylo použito vždy minimálně 30 optických vrstev na jeden scan. Po prozkoumání více oblastí z každého vzorku byly získány obrazy o nejméně třech barvách, a to při zvětšení x100 a x630. Získané obrazy byly zpracovány s pomocí ImageJ distribution Fiji.

3.4 Posouzení vývoje mikrobiomu v ontogenezi hostitele u volně žijících triatominů

K posouzení vývoje mikrobiomu v ontogenezi hostitele u volně žijících triatominů byly využity pouze jedinci negativní na přítomnost *T. cruzi*. Data byla přibližně stejné kvality jako v případě vzorků *Rhodnius prolixus*, přičemž průměrný počet readů činil $6900,2 \pm 7282,7$. Mikrobiomový profil byl analyzován nezávisle na druhu jednak přes jednotlivé instary, jednak přes dvě skupiny, do kterých byly instary na základě dříve publikovaných výsledků (Rodriguez-Ruano et al., 2018) rozděleny (1. skupina instary L1, L2 a L3; 2. skupina instary L4, L5 a L6 označující dospělé). Dále byl vývoj mikrobiomu sledován podrobněji u vybraných druhů, tj. *Triatoma protracta*, *Triatoma rubida* a *Triatoma lecticularia*. K analýze byla využita amplikonová data pro 16S rRNA gen zpracovaná následujícím způsobem. Nejprve byla pomocí programu USEARCH (<http://www.drive5.com/usearch/>) zkontrolována kvalita hrubých dat, která byla následně trimována. Ready byly zpracovány opět v programu USEARCH několika skripty následujícím způsobem: nejprve proběhlo demultiplexování, poté došlo ke spárování koncových readů. Dále byly odstraněny primery a získané sekvence byly filtrovány na konečnou délku 410bp. Dataset byl klastrován a ze sekvencí byla vytvořena databáze reprezentativních sekvencí. K reprezentativnímu setu databáze byly přiřazeny demultiplexované sekvence a byla získána OTU tabulka. Za použití blast algoritmu a databáze SILVA byla k jednotlivým OTU přidána taxonomie. Nakonec byl využit program Qiime (<http://qiime.org/>), pomocí kterého byly odstraněny mitochondriální a chloroplastové OTU, a také OTU s extrémně nízkým počtem readů.

Dále byly získány biomové soubory pro jednotlivé analyzované druhy, případě sety triatominů. K tomuto účelu byl použit program Qiime a příkaz „filter_samples_from_otu_table.py“. Získané biomy byly dále analyzovány v R studiu (<https://rstudio.com/>) s využitím modulu `vegan` (<https://www.rdocumentation.org/packages/vegan/versions/2.4-2/topics/vegan-package>). Konkrétně byly vypočteny indexy diverzity (Shannonův index a prostá bohatost společenstva označená jako Richness) a provedeny klastrovačí analýzy (NMDS - mnohorozměrné nemetrické škálování), a to na celkovém počtu 127 vzorků (79 vzorků *T. rubida*, 34 vzorků *T. protracta* a 14 vzorků *T. lecticularia*). Ke statistickému zhodnocení rozdílů v indexech diversity byl použit Kruskal Wallis test. Podobnosti mikrobiálních profilů stanovené na základě Bray-Curtis distancí byly statisticky zhodnoceny pomocí funkce `adonis` (<https://www.rdocumentation.org/packages/vegan/versions/2.4-2/topics/adonis>).

Ke grafickému zobrazení výsledků byl použit modul ggplot (<https://rstudio.com/wp-content/uploads/2015/03/ggplot2-cheatsheet.pdf>).

3.5 Diagnostika *Trypanosoma cruzi* u volně žijících severoamerických triatominů a posouzení vlivu parazita na mikrobiomový profil u vybraných druhů triatominů

3.5.1 PCR a gelová elektroforéza

Přítomnost parazita *Trypanosoma cruzi* ve vzorcích volně žijících severoamerických triatom byla zjišťována pomocí polymerázové řetězové reakce. Screening byl prováděn na 271 vzorcích, a to dvoukolově se třemi sety primerů (Tab. VIII). Každá dvojice primerů amplifikuje jiný produkt ve smyslu odlišných DTUs *T. cruzi*. Dvojice TCZ1, TCZ2 amplifikuje všechny známé DTUs na základě amplifikace opakujícího se úseku DNA o velikosti 188 bp, tj. mikrosatelitního regionu nukleární DNA (Eloy & Lucheis, 2012). Dvojice ME, TC1 slouží k amplifikaci *T. cruzi* type 1 (tudíž DTU TcI), dvojice ME, TC2 k amplifikaci *T. cruzi* type 2 (tudíž DTUs TcII-VI). Obě dvojice jsou specifické konkrétně pro mini-exon gene *T. cruzi* (Gumiel et al., 2015). PCR byla míchána vždy do objemu 25 μ l, a to následujícím způsobem: 12,5 μ l Combi PPP Master Mixu (Top-Bio, 2x koncentrovaný); 0,5 μ l forward primeru (10 nmol); 0,5 μ l reverse primeru (10 nmol); 10,5 μ l vody a 1 μ l DNA. Reakce probíhala v přístroji Mastercycler (Eppendorf). Teploty pro nasedání primerů byly následující: dvojice ME, TC1 \rightarrow 57°C, dvojice ME, TC2 \rightarrow 51°C, dvojice TCZ1, TCZ2 \rightarrow 57°C. Vzniklé fragmenty DNA byly poté rozděleny na 2% agarózovém gelu s přidavkem fluorescenčního barviva GelRed (10 000X in water, Biotium). Použitý Combi PPP Master Mix již obsahuje barviva a aditiva, díky čemuž nebylo nutné přidávat k PCR produktům žádné další látky. Do gelu bylo nanášeno 5 μ l PCR produktu. Přibližná velikost fragmentů byla určena podle 100 bp Plus DNA Ladderu (Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific). Vizualizace výsledků s pomocí UV záření proběhla s využitím zařízení UVITEC a programu Alliance. Sekvenční shoda PCR produktů s lokusy *T. cruzi* byla ověřena u třech vybraných produktů pro každou dvojici primerů pomocí Sanger sekvenace a následné BLAST analýzy.

Tab. VIII: Sekvence primerů (Gumiel et al., 2015).

Primer	Sekvence (5' - 3')
ME – F	TACCAATATAGTACAGAAACTG
TC1 – R	ACACTTTCTGTGGCGCTGATCG
TC2 – R	TTGCTCGCACACTCGGCTGCAT
TCZ1 – F	CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT
TCZ2 – R	CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG

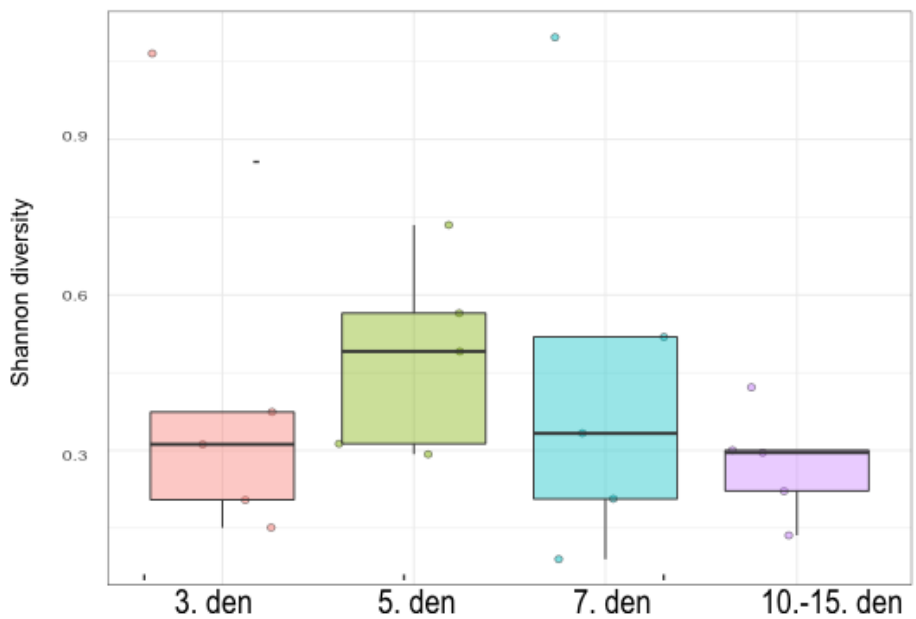
3.5.2 Bioinformatické analýzy

Dataset umožnil analyzovat rozdíly mikrobiomových profilů u *T. cruzi* pozitivních a *T. cruzi* negativních jedinců 4 druhů triatom. Analýzy byly provedeny na celkovém počtu 129 vzorků, z nichž 39 bylo pozitivních a 90 negativních, a odpovídaly analýzám použitým při studiu mikrobiomových profilů triatomů během ontogeneze. Pro statistické zhodnocení rozdílů v prevalencích *T. cruzi* mezi druhy, lokalitami a biomy byl proveden jednoduchý statistický test četností, „Fisher exact test“ (<https://www.socscistatistics.com/tests/fisher/default2.aspx>). Konkrétně byly statisticky vyhodnoceny četnosti pozitivních a negativních jedinců mezi druhy triatomů z Arizony (*T. rubida* a *T. protracta*), mezi druhy pocházejícími z Texasu (*T. gerstaeckeri* a *T. sanguisuga*), dále mezi skupinami triatom ze dvou států (Arizona a Texas) a mezi vzorky pocházejícími z měst nebo jejich okolí (tj. lokality „Air Force Basis“ a University of Arizona Desert Station) a vzorky vzdálenými od lidských aglomerací (tj. lokality Chaparral Wildlife Management Area a Las Cienegas National Conservation Area).

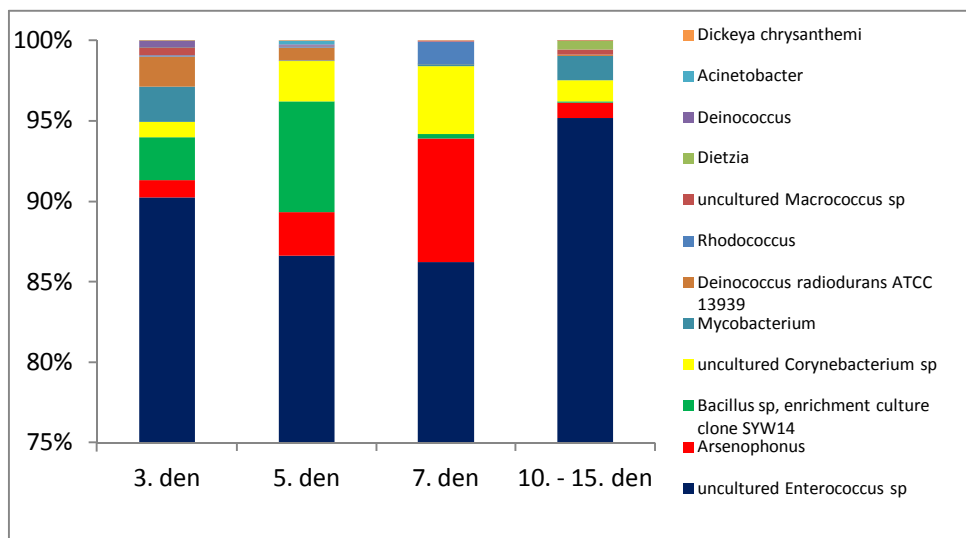
4 Výsledky

4.1 Zmapování dynamiky mikrobiomu v závislosti na sání hostitele a vizualizace změn mikrobiomu pomocí metody FISH

Mapování dynamiky mikrobiomu proběhlo v zásadě třemi způsoby. První vhléd do dynamiky mikrobiomu mi umožnila amplikonová data. Na nich je možné do určité míry bakterie mikrobiomu kvantifikovat na základě počtu readů pro jednotlivá OTU. Mezi 3. a 5. dnem po sání se diverzita i abundance jednotlivých OTU, které popisuje Shannonův index, zvyšují. Poté následuje sestupný trend směrem k 15. dni po sání (Obr. 1). Rozdíly diverzity mezi jednotlivými časovými intervaly nebyly vzhledem k nízkému počtu analyzovaných vzorků statisticky hodnoceny. Nejdominantnější rody bakterií vyskytující se napříč zkoumanými vzorky byly rody *Enterococcus*, *Arsenophonus* a *Bacillus* (Obr. 2). Proto byly následné analýzy zaměřeny právě na tyto bakteriální rody.

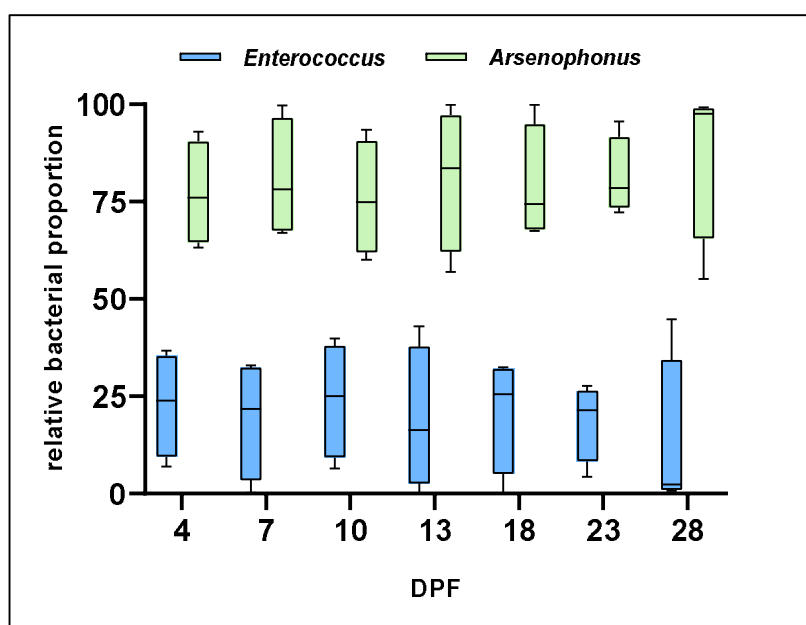


Obr. 1: Shannonův index diversity v průběhu trávení nasáté krve u dospělých samců *Rhodnius prolixus*.



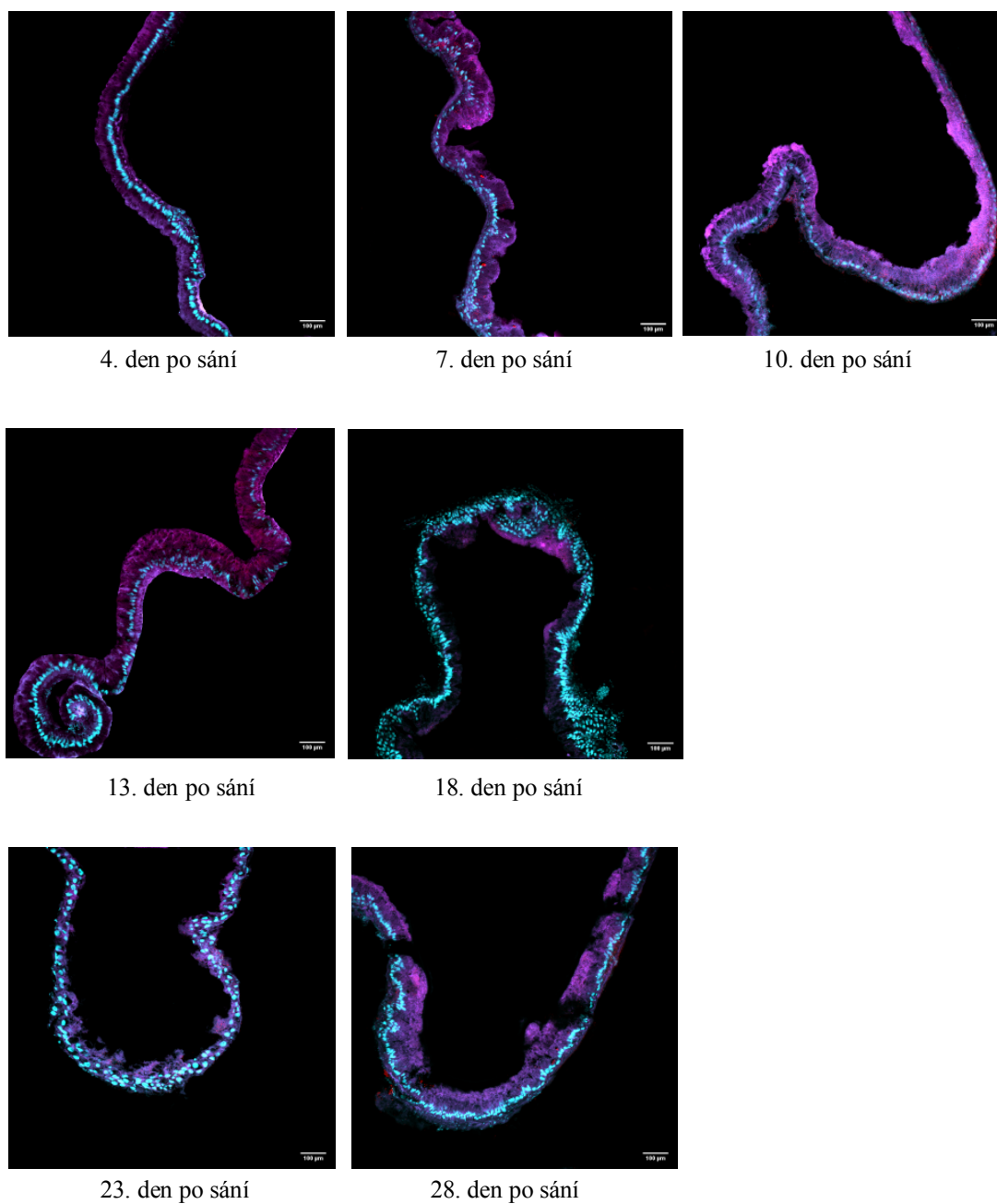
Obr. 2: Mikrobiomové profily v průběhu trávení nasáté krve u dospělých samečů *Rhodnius prolixus*.

Pro přesnější kvantifikaci dynamiky dominantních bakterií v mikrobiomu, tj. *Arsenophonus*, *Enterococcus* a *Bacillus*, v průběhu trávení krve byla použita qPCR. Amplifikace prvního setu vzorků neposkytla věrohodné informace, ve výsledcích byly extrémní odchylky a výsledky tudíž nelze interpretovat. V případě druhého setu jsem se podílela na přípravě vzorků, finální analýza byla provedena postdoktorandem z naší laboratoře Giampierem Batanim. Na těchto výsledcích (Obr. 3) je patrné, že u samčích zástupců *Rhodnius prolixus* nebyla u dvou sledovaných bakterií prokázána nijak zásadní dynamika mikrobiomu, v případě třetí sledované bakterie rodu *Bacillus* qPCR nefungovala.

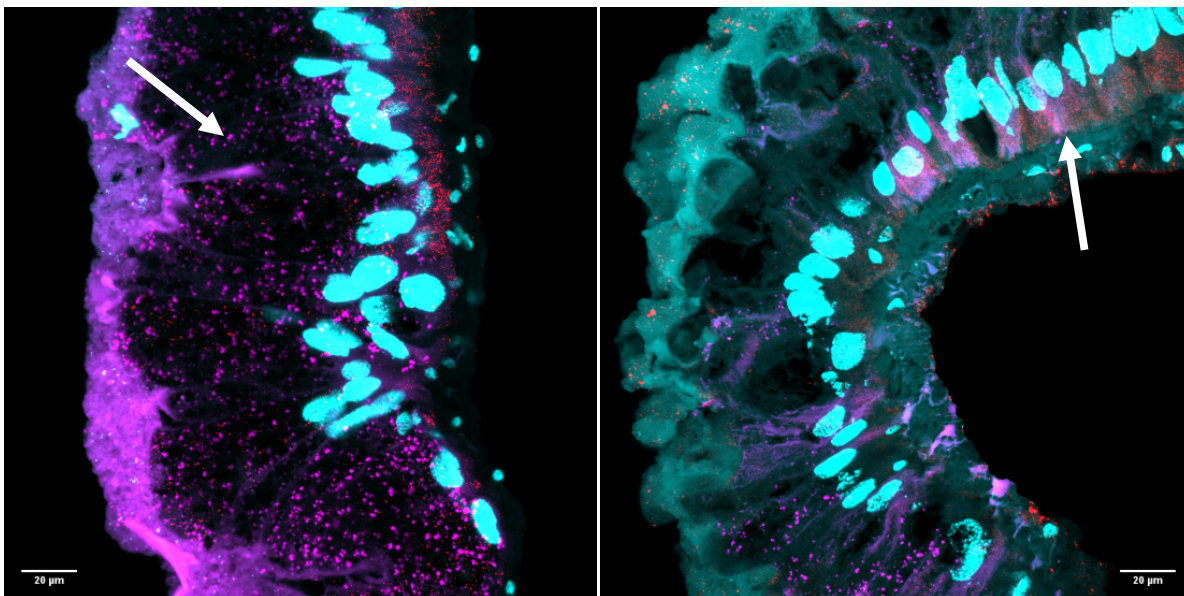


Obr. 3: Výsledky qPCR pro samčí jedince druhu *Rhodnius prolixus*. DPF označují jednotlivé dny po nasátí krve. Svislá osa grafu představuje relativní množství bakterií daného rodu.

Další informace o přesné lokalizaci těchto dvou bakterií a jejich dynamice v mikrobiomu byly získány s využitím metody FISH. Výsledky mapující jednotlivé dny po sání (Obr. 4) naznačují minimální dynamiku dvou sledovaných bakterií během trávení krve. Identifikují však rod *Arsenophonus* jako dominantní napříč celým experimentem a umožňují bližší lokalizaci bakterií *Arsenophonus* a *Enterococcus*. Zatímco *Arsenophonus* se vyskytuje extracelulárně volně v lumen střeva, *Enterococcus* se jeví jako intracelulární symbiont (Obr. 5).



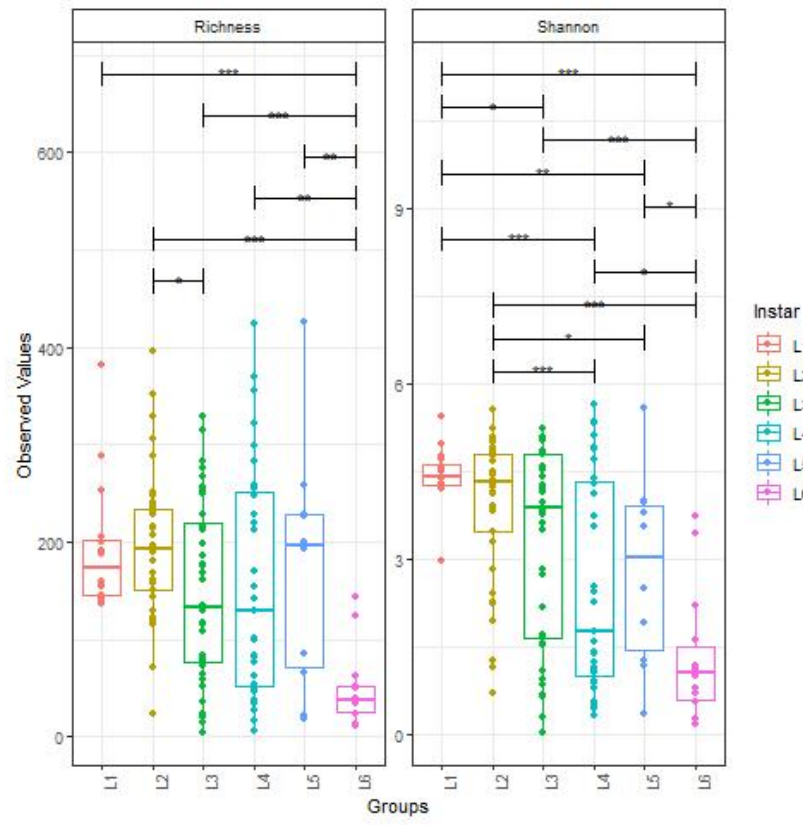
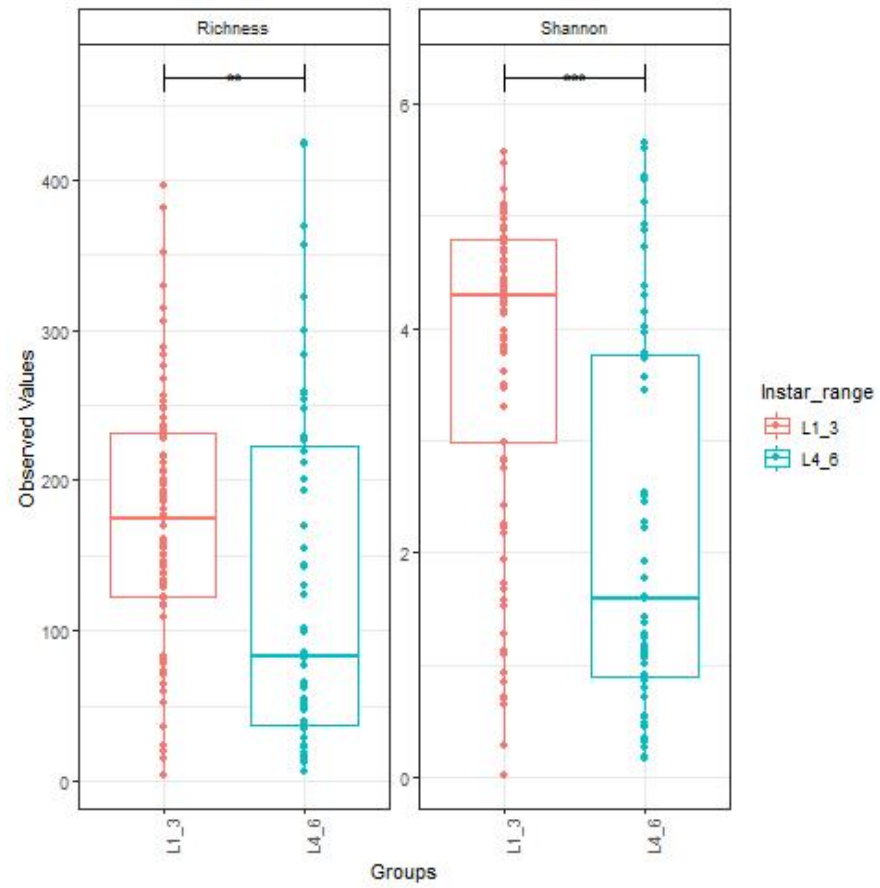
Obr. 4: Fotky z konfokálního mikroskopu ilustrující při zvětšení x100 dynamiku dvou sledovaných bakterií *Arsenophonus* (purpurová) a *Enterococcus* (červená) během trávení nasáté krve při 7 různých časových intervalech.

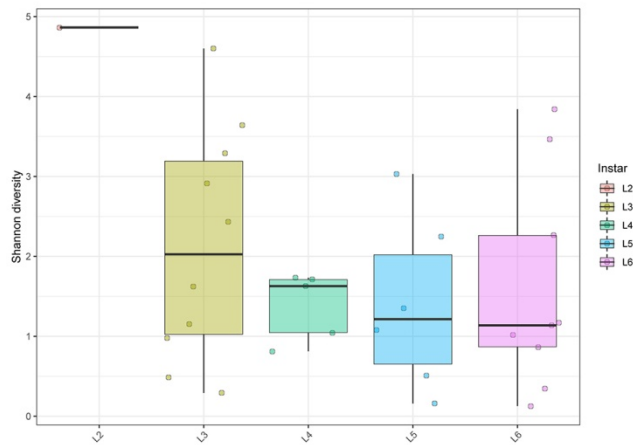
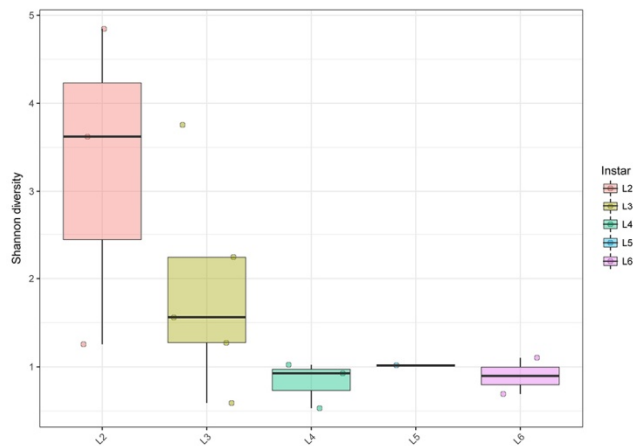
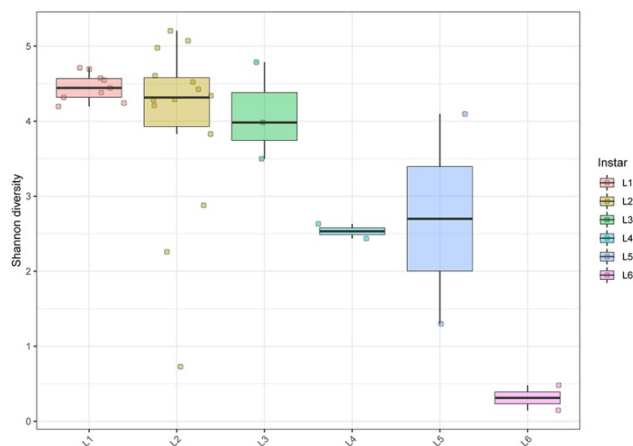


Obr. 5: Lokalizace 2 sledovaných bakterií *Arsenophonus* (purpurová) a *Enterococcus* (červená) pomocí metody FISH a konfokální mikroskopie.

4.2 Posouzení vývoje mikrobiomu v ontogenezi hostitele u volně žijících triatominů

Vývoj mikrobiomu v ontogenezi hostitele u volně žijících triatominů byl vyhodnocen na základě dvou indexů diverzity, tj. prosté bohatosti mikrobiomu „Richness“ a Shannonově indexu. V případě analýzy přes jednotlivé instary nezávisle na druhu byl patrný statisticky signifikantní pokles diverzity, jak pro Shannonův index, tak v případě Richness (Obr. 6). Počet druhů bakterií a i jejich zastoupení během ontogeneze klesá. Stejně výsledky přinesly analýzy jednotlivých druhů, a to v případě všech zkoumaných druhů (*Triatoma rubida*, *Triatoma lecticularia* a *Triatoma protracta*) (Obr. 6). Mikrobiomové profily jednotlivých instarů jsou dostupné v sekci Přílohy pro druhy *T. rubida* (Obr. P1), *T. lecticularia* (Obr. P2) a *T. protracta* (Obr. P3). I zde je patrný trend poklesu diverzity směrem od instaru L1 až po instar L6 (dospělece). Druhům *T. rubida* a *T. lecticularia* dominovala bakterie rodu *Dietzia*, druhu *T. protracta* pak bakterie rodu *Proteiniphilum*. Významným rodem, vyskytujícím se u všech třech zmíněných druhů triatominů, byl také bakteriální rod *Mycobacterium*.

A**B**

C**D****E**

Obr. 6: Výsledky analýz popisujících vývoj mikrobiomu u volně žijících triatomínů. Shannonův index diversity a prostá bohatost mikrobiomu „Richness“ přes jednotlivé instary nezávisle na druhu (A) a přes instary rozdělené do 2 skupin nezávisle na druhu (B). L6 označuje dospělé, hvězdičky významnost signifikantních rozdílů vždy mezi dvěma instary (hladina významnosti pro $* \leq 0,05$, pro $** = \leq 0,01$, pro $*** = \leq 0,001$, na základě Kruskal Wallis testu). C: Shannonův index diversity pro druh *Triatoma protracta*. D: Shannonův index diversity pro druh *Triatoma lecticularia*. E: Shannonův index diversity pro druh *Triatoma rubida*.

4.3 Diagnostika *Trypanosoma cruzi* u volně žijících severoamerických triatominů a posouzení vlivu parazita na mikrobiomový profil u vybraných druhů triatominů

Přítomnost parazita *Trypanosoma cruzi* byla zjišťována u celkového počtu 271 vzorků. K tomuto účelu byly využity 3 sady primerů. Z celkového počtu vzorků bylo pozitivních 52 (19,2%), negativních 214 (79%). U 5 vzorků (1,8%) pak nebylo možné determinovat infekční status, jelikož se vyskytla kontroverze mezi jednotlivými skupinami primerů. Bližší pohled na pozitivní vzorky umožnil určit také DTUs *T. cruzi*. Infekci *T. cruzi* skupiny 1 (Tc1) vykazovalo 18 vzorků (25%), 6 vzorků (13,9%) infekci *T. cruzi* skupiny 2 (Tc2), smíšenou infekci pak 28 vzorků (61,1%).

Kromě souhrnného pohledu na prevalenci *T. cruzi* byly zkoumány také prevalence v závislosti na lokalitě, a také v závislosti na druhu triatominů. Výsledky shrnují tabulky IX a X. Na základě Fisher exact testu jsem zjistila, že prevalence u druhů *T. sanguisuga* a *T. gerstaeckeri* v Texasu nebyly signifikantně odlišné (hodnota Fisher exact testu $p = 0.4011$, $p < 0,01$), porovnáním prevalence u vzorků pocházejících z Arizony druhů *T. protracta* a *T. rubida* byly zjištěny taktéž nesignifikantní rozdíly (hodnota Fisher exact testu $p = 0.8201$, $p < 0,01$). V závislosti na lokalitě jsem zkoumala rozdíly mezi prevalence vzorků z Arizony a Texasu, opět s výsledkem nesignifikantního rozdílu (hodnota Fisher exact testu $p = 0,0313$, $p < 0,01$). Jako poslední jsem porovnávala prevalence vzorků pocházejících z měst nebo jejich okolí (tj. vzorky z lokalit Air Force Basis v blízkosti města San Antonio a University of Arizona Desert Station v Tucsonu) s prevalence vzorků pocházejících z lokalit vzdálených od lidských aglomerací (Chaparral Wildlife Management Area, Las Cienegas National Conservation Area, San Pedro Riparian National Conservation Area). Zde byl patrný signifikantní rozdíl (hodnota Fisher exact testu $p = 0,0003$, $p < 0,01$).

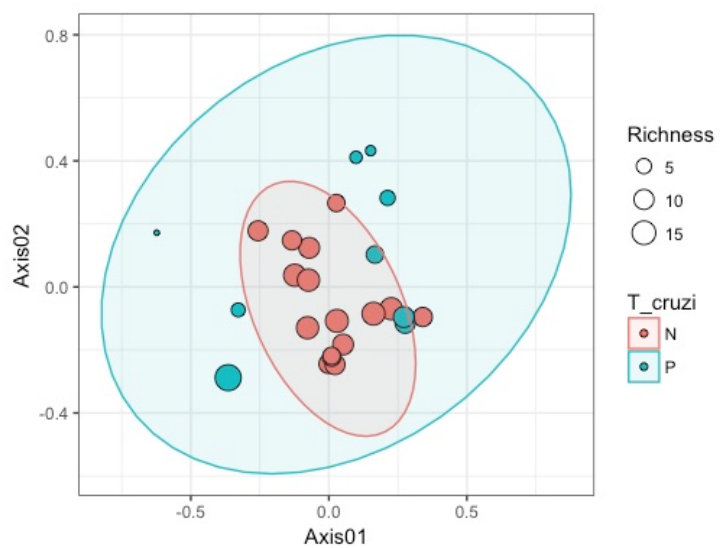
Tab. IX: Přehled vzorků pozitivních (P), negativních (N) a kontroverzních (?) na přítomnost parazita *Trypanosoma cruzi* v závislosti na lokalitě.

Lokalita	P	N	?
Las Cienegas National Conservation Area (AZ)	2 (3%)	64 (95,5%)	1 (1,5%)
University of Arizona Desert Station, Tucson (AZ)	26 (23,2%)	86 (76,8%)	0
Air Force Basis, San Antonio (TX)	16 (36,4%)	27 (61,4%)	1 (2,2%)
Chaparral Wildlife Management Area (TX)	8 (17%)	36 (76,6%)	3 (6,4%)
San Pedro Riparian National Conservation Area (AZ)	0	1 (100%)	0
Celkový počet vzorků: 271			

Tab. X: Souhrn vzorků pozitivních (P), negativních (N) a kontroverzních (?) na přítomnost parazita *Trypanosoma cruzi* v závislosti na druzích triatomínů.

Druh	P	N	?
<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	10 (22,7%)	32 (72,8%)	2 (4,5%)
<i>Triatoma lecticularia</i>	5 (22,7%)	15 (68,2%)	2 (9,1%)
<i>Triatoma protracta</i>	7 (14,3%)	42 (85,7%)	0
<i>Triatoma recurva</i>	0	1 (100%)	0
<i>Triatoma rubida</i>	21 (16,7%)	104 (82,5%)	1 (0,8%)
<i>Triatoma sanguisuga</i>	9 (36%)	16 (64%)	0
<i>Triatoma</i> sp.	0	4 (100%)	0
Celkový počet vzorků: 271			

Dále byl posuzován vliv přítomnosti parazita *Trypanosoma cruzi* na mikrobiom volně žijících jedinců triatomínů. Analýzy Shannon, Richness a NMDS byly provedeny u druhů *Triatoma sanguisuga*, *Triatoma lecticularia*, *Triatoma rubida* a *Triatoma protracta*. Z uvedených druhů byly zjištěny signifikantní rozdíly mezi mikrobiomy *T. cruzi* pozitivních a *T. cruzi* negativních vzorků pouze u druhu *Triatoma sanguisuga* (adonis: P = 0,006; Obr. 7). Kruskal Wallis testy hodnocené na hladině významnosti 99% neprokázaly signifikantní rozdíly mezi indexy diverzity u mikrobiomů *T. cruzi* pozitivních a *T. cruzi* negativních vzorků u žádného z uvedených druhů (viz. sekce Přílohy, Obr. P4, Obr. P5, Obr. P6, Obr. P7 a Obr. P8).



Obr. 7: NMDS analýza volně žijících jedinců druhu *Triatoma sanguisuga*, která ukazuje signifikantní rozdíly mezi *T. cruzi* pozitivními a *T. cruzi* negativními mikrobiomy na hladině významnosti 99% ($P = 0,006$; $R^2 = 0,115$).

5 Diskuze

5.1 Zmapování dynamiky mikrobiomu v závislosti na sání hostitele a vizualizace změn mikrobiomu pomocí metody FISH

Mikrobiomy laboratorních kolonií triatom, kterým dominuje jen jeden nebo několik málo druhů bakterií, vykazují menší diverzitu, než mikrobiomy volně žijících jedinců (Díaz et al., 2016). Tento fakt je připisován relativně sterilnímu prostředí laboratorních chovů a uniformní potravě pocházející pouze z jednoho zdroje, často jde o beraní krev. Volně žijící triatomini, oproti laboratorně chovaným, mohou sát na více různých hostitelích a v širším kontextu interagovat s okolním prostředím. Do mikrobiomu triatom tak mohou za běžných podmínek vstupovat další druhy bakterií. Příkladem může být druh *Triatoma infestans*, jehož mikrobiomy volně žijících jedinců a jedinců z laboratorních kolonií studoval Waltmann et al. Zatímco mikrobiomu laboratorních kolonií dominovaly 3 bakteriální rody, 84,5% mikrobiomu volně žijících jedinců bylo tvořeno 22 bakteriálními rody (Waltmann et al., 2019). Stejný trend byl patrný i v případě mnou zpracovaných vzorků z laboratorních kolonií triatom druhu *Rhodnius prolixus*, u kterých dominovaly 3 bakteriální rody. Tento počet dobře koreluje s publikovanými výsledky, kdy se počet dominujících rodů bakterií u jedinců z laboratorních kolonií pohybuje mezi 1 – 6 (Da Mota et al., 2012; Rodríguez-Ruano et al., 2018).

Na modelové kolonii *R. prolixus* s jednoduchým mikrobiomem byla sledována dynamika bakterií v průběhu trávení krve, a to v 5 různých časových intervalech. Mezi 3. a 5. dnem po sání se zvyšovala abundance i diverzita mikrobiomu. Hostitel v tomto období zřejmě získává z krve dostatečné množství železa a bílkovin (Díaz et al., 2016), které jsou dostupné i pro střevní mikrobiom a umožňují proliferaci bakterií. Směrem k 15. dni po sání naopak diverzita i abundance klesaly. Dominujícími bakteriemi byly v průběhu celého experimentu bakterie rodu *Enterococcus*, *Arsenophonus* a *Bacillus*. Při pohledu na jejich dynamiku bylo patrné, že zastoupení bakterie rodu *Enterococcus* mezi 3. a 5. dnem po sání klesalo, do 7. dne se v zásadě neměnilo a mezi 7., 10. a 15. dnem docházelo ke zvýšení. Dynamika v případě bakterie rodu *Arsenophonus* se nepatrně lišila. Zastoupení této bakterie v mikrobiomu bylo 3. den v porovnání s 5. dnem po sání menší, přičemž 7. den bylo nejvyšší. Mezi 10. a 15. dnem se zastoupení opět snižovalo. Bakteriální rod *Bacillus* vykazoval v mikrobiomu, oproti předchozím dvěma zmíněným rodům, nejdynamičtější změny. Jeho zastoupení 3. den po sání bylo nižší než 5. den, kdy se množství této bakterie významně zvýšilo, nicméně od 7. až k 15. dni po sání bylo zastoupení této bakterie velice

nízké. Důležité je však zmínit, že tato data byla získána na základě amplikonového sekvenování, v němž může docházet k preferenční amplifikaci více zastoupené DNA. Data lze tudíž kvantifikovat jen přibližně. Nicméně stejný trend ve smyslu snižování abundance i diverzity mikrobiomu v průběhu trávení nasáté krve u ploštic Triatominae uvádí studie od Daniele Castro a kolektivu (Castro et al., 2012). Zde však byly analyzovány vzorky *Trypanosoma cruzi* pozitivních jedinců, což mohlo ovlivnit dynamiku mikrobiomu a zjištěné výsledky.

Dynamice mikrobiomu v souvislosti s trávením nasáté krve u hematofágních vektorů nebyla doposud věnována velká pozornost. Studií na obdobné téma bylo provedeno jen několik. Příkladem může být výzkum prováděný na volně žijících klíšťatech druhu *Haemaphysalis tibetensis*, který se ale nevěnuje střevnímu mikrobiomu. Dynamika symbiotických bakterií byla v tomto případě sledována ve vaječnicích a Malpighiho trubicích hostitele (Wang et al., 2017). Obdobně zaměřena je i práce Fishera et. al z roku 2018 zabývající se dynamikou bakterie *Wolbachia* sp. v gonádách u 2 odlišných genetických linií štěnic druhu *Cimex lectularius* (Fisher et al., 2018).

5.2 Posouzení vývoje mikrobiomu v ontogenezi hostitele u volně žijících triatominů

Vývoj mikrobiomu volně žijících triatominů v průběhu ontogeneze byl na volně žijících populacích zkoumán vůbec poprvé, a to u tří druhů triatominů, tj. *T. rubida*, *T. protracta* a *T. lecticularia*. Jak v analýzách nezohledňujících druhovou příslušnost hostitele, tak v případě jednotlivých druhů, vykazoval mikrobiom v pokročilejších stádiích vývoje snižující se diverzitu bakterií. U zástupců podčeledi Triatominae byl vývoj mikrobiomu v závislosti na ontogenetickém vývoji dosud studován pouze na laboratorních koloniích. Druh *Rhodnius prolixus* vykazoval statisticky signifikantní rozdíly mezi mikrobiomy vajíčka, prvních čtyř instarů, pátého instaru a dospělého, přičemž se snižovala relativní abundance hlavních rodů bakterií směrem od vajíčka až k dospělému (Rodríguez-Ruano et al., 2018). Mé výsledky tedy potvrzují, že dynamika, která byla popsána v mé předchozí práci u těchto laboratorních kolonií, není artefaktem laboratorních chovů, nýbrž přesvědčivým patternem v biologii volně žijících druhů. Statisticky signifikantní rozdíly ve složení mikrobiomu byly u mých vzorků zjištěny mezi instary L1 a L6, L1 a L5, L1 a L4, L1 a L3, L2 a L3, L2 a L5, L2 a L6, L3 a L6, L4 a L6, L5 a L6, a také mezi dvěma skupinami mladších (L1 – L3) a starších instarů (L4 – L6 instarů, viz. kapitola Metody). Pro jednotlivé

druhy pak statistická zhodnocení nebyla provedena kvůli nízkému počtu vzorků jednotlivých instarů.

Pattern ve smyslu klesající diverzity mikrobiomu byl popsán také u dalších zástupců hmyzu. Práce několika autorů z roku 2012 popisuje podobný trend také u vzdáleně příbuzných fytofágních ploštice druhu *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae), který se používá jako modelový organismus pro fyziologické a endokrinologické výzkumy. Podobně jako Triatominae se tyto ploštice vyvíjí přes 5 larválních stádií a jejich střevo osidluje jednoduchý mikrobiom (Sudakaran et al., 2012). Ve zmíněné studii vykazoval mikrobiom ploštice druhu *Pyrrhocoris apterus* poměrně velkou dynamiku. Bakteriální diverzita byla u vajíčka a prvních dvou instarů vysoká, zároveň však relativní zastoupení bakteriálních taxonů mezi vajíčkem a druhým instarem klesalo. Další larvální stádia měla mikrobiom co do taxonomického zastoupení více konzistentní s nižší diverzitou, přičemž u dospělých jedinců bylo detekováno pouze 6 dominantních rodů bakterií (Sudakaran et al., 2012). U dospělých jedinců volně žijících triatominů analyzovaných v této práci je diverzita mikrobiomu ještě nižší, často omezená na jeden bakteriální rod.

Vzorkům druhů *T. rubida* a *T. lecticularia* dominovala bakterie rodu *Dietzia*, v případě druhu *T. protracta* představoval dominantní bakterii rod *Proteiniphilum*. Tyto rody bakterií dominovaly převážně u dospělých jedinců, přičemž mikrobiom u prvních instarů vykazoval poměrně velkou diverzitu. Zajímavostí je, že bakterie rodu *Dietzia*, dominující u vyšších instarů a dospělých jedinců triatominů druhů *T. rubida* a *T. lecticularia*, nebyla u prvních instarů *T. rubida* detekována. Jelikož jsou tyto bakterie oportunními patogeny, triatomini ji teoreticky mohou získat během sání krve na nakaženém hostiteli, případně z okolního prostředí (Koerner et al., 2009). Bakterie rodu *Dietzia* obecně patří mezi často se vyskytující bakterie v mikrobiomu triatominů a pravděpodobně v něm má velký funkční význam (Waltmann et al., 2019). Kromě svých vzorků byla tato bakterie detekována také u volně žijících zástupců druhu *Triatoma maculata*, u kterých nepředstavovala nejdominantnější rod, nicméně patřila mezi pět bakteriálních rodů s nejvyšším zastoupením v mikrobiomu (Montoya-Parras et al., 2018). Podobně byl její výskyt zaznamenán i u volně žijících jedinců druhu *Triatoma infestans* (Waltmann et al., 2019). Výskyt rodu *Dietzia* byl zaznamenán nejen u triatominů, ale také u dalšího hematofágního hmyzu, jako jsou komáři a mouchy tsetse (Malele et al., 2018; Yadav et al., 2018).

Bakterie rodu *Proteiniphilum* byla detekována u volně žijících triatom druhu *T. protracta* kromě mé práce také v naší předchozí studii z roku 2018. V té představovala taktéž

dominující taxon, a to nejen u triatominů druhu *T. protracta*, ale také u druhu *T. sanguisuga* (Rodríguez-Ruano et al., 2018). Jiné výzkumy však zatím přítomnost této bakterie v mikrobiomu triatominů nezmiňují.

Dalším významným bakteriálním rodem co do počtu readů, který byl detekován u mnou analyzovaných vzorků, je rod *Mycobacterium*. Rod *Mycobacterium* představoval druhou bakterii s nejvyšším zastoupením v mikrobiomu u všech tří zkoumaných druhů volně žijících triatominů, tj. *T. rubida*, *T. protracta* a *T. lecticularia*. V naší studii z roku 2018 jsme popsali jeho přítomnost v mikrobiomu taktéž u volně žijících jedinců druhu *T. protracta* (Rodríguez-Ruano et al., 2018). Ukazuje se, že plošnice podčeledi Triatominae jsou potenciálním vektorem *M. leprae* a teoreticky tak mohou přispívat k přenosu lepry. Studie provedená na triatominích druhu *Rhodnius prolixus* totiž prokázala přítomnost bakterie druhu *M. leprae* ve výkalech těchto triatominů (Da Silva Neumann et al., 2016). Bakterie stejného rodu byly detekovány i v mikrobiomech dalších krevsajících vektorů, například klíšťat a komárů (Wallace et al., 2010; Yadav et al., 2015; Budachetri et al., 2016).

5.3 Diagnostika *Trypanosoma cruzi* u volně žijících severoamerických triatominů a posouzení vlivu parazita na mikrobiomový profil u vybraných druhů triatominů

Celková prevalence *T. cruzi* u volně žijících severoamerických triatominů byla zjišťována u celkem 6 druhů, tj. *Triatoma gerstaeckeri*, *Triatoma lecticularia*, *Triatoma protracta*, *Triatoma recurva*, *Triatoma rubida* a *Triatoma sanguisuga* a čtyř jedinců, u kterých se nepodařilo na základě molekulárních dat druh určit. Zjištěná prevalence u všech analyzovaných vzorků se rovnala 19,2%. Signifikantně vyšší prevalenci *T. cruzi* vykazovali jedinci, kteří pocházeli z lidských obydlí a lokalit v těsné blízkosti měst nebo míst s vysokou koncentrací rezervoárových hostitelů *T. cruzi*. Z těchto hostitelů mají velký význam domestikovaná zvířata, především psi. Ač jsou porovnávány jen dvě lokality v Texasu a Arizoně, zdá se, že antropogenní cyklus nelze v těchto státech podceňovat. Triatomy v tomto cyklu vykazují signifikantně vyšší prevalence *T. cruzi* a představují tak riziko pro obyvatele Tucsonu a San Antonia. Vzorky pocházející z lokalit vzdálených od lidských aglomerací, tj. Chaparral Wildlife Management Area (vzdálený 182 km od San Antonia) a Las Cienegas National Conservation Area (vzdálená 98 km od Tucsonu) vykazovaly signifikantně nižší prevalenci *T. cruzi*.

Z hlediska geografické distribuce byla nejvyšší prevalence (36,4%) v lokalitě „Air Force Basis“, tedy ve vojenských leteckých základnách ležících v aglomeraci San Antonio, která je s 1,5 miliony obyvateli druhým nejlidnatějším městem Texasu. Air Force Basis jsou letecké základny a výcviková střediska americké armády s poměrně velkou rozlohou. Kromě armádních psů, kteří se zde chovají a jsou obecně významnými rezervoárovými hostiteli *T. cruzi*, se v této lokalitě vyskytují i další volně žijící rezervoárová zvířata. Tento fakt pravděpodobně přispívá vysoké prevalenci *T. cruzi*. Prevalence *T. cruzi* v těchto leteckých základnách byla studována také v práci několika autorů z roku 2012. Zaznamenaná prevalence u celkového počtu 140 triatomů byla o něco nižší, než mnou stanovená, a to 16% (McPhatter et al., 2012). Pozdější studie z roku 2017 popisuje na stejné lokalitě jak prevalenci *T. cruzi* u triatomů, tak výskyt infekce u armádních psů. U dospělých jedinců triatomů udává prevalenci téměř shodnou s mými výsledky, tj. 43% (22% u larválních stádií), a 8% testovaných psů pozitivních na specifické *T. cruzi* protilátky (Webber et al., 2017). V širším geografickém měřítku se *T. cruzi* screeningem u celkem 68 jedinců triatomů zabývala také studie z roku 2016 zaměřená na lidská obydlí na venkově centrálního, jižního a severovýchodního Texasu. Výsledky uvádí v porovnání s mým zjištěním i s dříve publikovanými daty podstatně vyšší prevalenci 63%, a to nezávisle na druhové příslušnosti triatomů (Gorchakov et al., 2016).

Druhá nejvyšší prevalence (23,2%) byla v mých datech detekována v lokalitě University of Arizona Desert Station, která leží v západní části půlmilionového města Tucson ve střední Arizoně. Jak na příkladech z oblastí Texasu, tak na mých výsledcích z Arizony je patrné, že nejen vysoká koncentrace rezervoárových hostitelů, ale také blízkost lidských obydlí vede ke zvýšené prevalenci *Trypanosomy cruzi* u triatomů. Toto tvrzení také potvrzují následující studie. Téměř shodná prevalence byla publikována v práci Beattyho et al., z roku 2018. U 128 jedinců triatomů druhu *T. rubida* pocházejících ze zoologické zahrady v Tucsonu byla popsána prevalence *T. cruzi* 25% (Beatty et al., 2018). Dále bylo analyzováno 164 vzorků z lidských obydlí nebo jejich okolí v Tucsonu, u nichž byla zaznamenána opět vysoká prevalence *T. cruzi* 41,5% (Reisenman et al., 2010). V přírodovědném muzeu Arizona-Sonora Desert Museum v Tucsonu byla zjištěna prevalence 26,2% u 145 jedinců triatomů.

Signifikantně nižší prevalence jsem zjistila v lokalitách, které byly naopak izolované od lidských aglomerací. První z nich je oblast Chaparral Wildlife Management Area nacházející se na samém jižním cípu Texasu, kde prevalence dosahovala 17%. Druhou lokalitou izolovanou od lidských obydlí byla lokalita Las Cienegas National Conservation

Area, ve které byla detekována prevalence 3%. Tato oblast leží jihovýchodně od Tucsonu na jihu Arizony.

Mé vzorky z Arizony pocházely z celkem čtyř různých oblastí, vzorky z Texasu pouze ze dvou, a to z centrální a jižní oblasti. Přesto je na nich, a také na diskutovaných výsledcích patrné, že Texas i Arizona jsou pravděpodobně jedny z nejvýznamnějších lokalit Spojených států, ve kterých je nezanedbatelné množství triatom pozitivní na přítomnost parazita *T. cruzi*.

Z hlediska druhové příslušnosti jsem se zabývala prevalencí *T. cruzi* u 6 druhů triatomů. Nejvyšší prevalenci 36% jsem detekovala u druhu *Triatoma sanguisuga*. Následovaly sestupně druhy *Triatoma lecticularia* a *Triatoma gerstaeckeri* (oba shodně 22,7%), *Triatoma rubida* (16,7%) a *Triatoma protracta* (14,3%).

Dostatečně reprezentativní počet vzorků byl v mé práci dostupný pouze pro tři druhy triatomů (*T. rubida*, *T. gerstaeckeri* a *T. protracta*), proto jsem se v diskuzi zaměřila především na prevalenci *T. cruzi* právě u nich. Druhem s nejvyšším počtem analyzovaných vzorků byl v mém setu druh *Triatoma rubida* (prevalence 16,7%). Velice podobnou prevalenci 14,1% zjistila skupina autorů u 64 analyzovaných vzorků sesbíraných obyvateli Texasu (Curtis-Robles et al., 2018). Práce z roku 1964 zmiňuje u tohoto druhu nižší prevalenci 7,5% zjištěnou u 524 analyzovaných vzorků, které byly získány, stejně jako vzorky pro mou diplomovou práci, z hnízd krys rodu *Neotoma* (Bice, 1964). Nízká prevalence zde mohla být ovlivněna jiným způsobem detekce *T. cruzi* infekce, jejíž přítomnost byla určována pouze na základě mikroskopie. Oproti tomu další studie založené na detekci pomocí PCR udávají vyšší hodnoty prevalence. Data z roku 2010 uvádí prevalenci 41 % u 164 vzorků (Reisenman et al., 2010), ještě vyšší prevalence 61,5% byla zaznamenána v Texasu. Zde je však nutné podotknout, že šlo o izolovanou lokatilu Indio Mountain Research Station a o menší počet vzorků (39 vzorků) (Buhaya et al., 2015). Nižší prevalenci 25% u druhu *T. rubida* pak uvádí práce z roku 2016, která pracovala se 125 vzorky získanými na území Arizony, konkrétně v Arizona-Sonora Desert Museum v Tucsonu (Klotz et al., 2013). Právě tuto prevalenci lze nejlépe porovnávat s mými daty z lokality University of Arizona Desert Station, jelikož tyto dvě lokality jsou od sebe vzdálené jen několik kilometrů vzdušnou čarou. Zmíněná prevalence 25% se velmi dobře shoduje s prevalencí 23,2%, kterou jsem zjistila u mých vzorků.

U druhu *T. gerstaeckeri* se zjištěná prevalence *T. cruzi* rovnala 22,7%. Další publikované studie uvádí hodnoty dvojnásobně převyšující mnou zjištěnou prevalenci, např. prevalenci

47,7% u 97 analyzovaných vzorků pocházejících z hnízd kryš rodu *Neotoma* (Pippin, 1968), stejně vysokou prevalenci 47,7% u 180 vzorků pocházejících z různých částí Texasu (Kjos et al., 2009) nebo 63,3% u 897 analyzovaných vzorků (Curtis-Robles et al., 2018). Třicet jedinců pocházejících z různých zdrojů, tj. z hnízd kryš rodu *Neotoma*, z hromad dřeva, a také z lidských obydlí, byly screenovány na přítomnost *T. cruzi* s výslednou prevalencí 68% (Aleman et al., 2017). Lokálně zvýšená prevalence 77,4% (San Benito, Texas) a úmrtí tří psů na Chagasovu chorobu byly zaznamenány u 31 jedinců *T. gerstaeckeri* pocházejících z pozemku majitele těchto psů (Beard et al., 2003). Alarmující prevalenci 100% detekovali autoři práce z roku 2017 u 16 vzorků pocházejících z chovatelských stanic psů (Curtis-Robles et al., 2017). Na těchto příkladech je opět patrná provázanost vysoké prevalence *T. cruzi* u triatominů s jejich výskytem v blízkosti vysoké koncentrace rezervoárových zvířat, zejména psů.

Třetím druhem, kterého díky většímu počtu vzorků v rámci mé diplomové práce v diskuzi zmiňuji, je druh *T. protracta* s prevalencí 14,3%. Prevalence zjištěné v jiných studiích jsou poměrně v rozporu jak s mými výsledky, tak spolu navzájem. Důvodem může být fakt, že studie nejsou systematické a lokálně zvýšené prevalence tak přispívají k výrazným rozdílům mezi publikovanými daty. Curtis-Robles a kolektiv udává u celkem 19 vzorků prevalenci 10,5% (Curtis-Robles et al., 2018). Naše předchozí studie z roku 2018 popisuje prevalenci 25% u 21 vzorků pocházejících ze tří severoamerických států (Escondido, Kalifornie; Tucson, Arizona a San Antonio, Texas; Rodríguez-Ruano et al., 2018). 97 vzorků z okolí lidských obydlí ve třech různých kalifornských regionech vykazovalo prevalence 34% (Escondido, n = 53) 20% (Los Angeles, n = 15) a 55,2% (Vallecito, n = 29) (Shender et al., 2016). I zde je patrné, že zvýšená prevalence *T. cruzi* má souvislost s výskytem infikovaných triatominů v blízkosti lidských obydlí.

Druh *T. sanguisuga* s prevalencí 36% nebyl v mé práci zastoupen dostatečným počtem vzorků. I přes jejich nízký počet tento druh zmiňuji z důvodu jeho významu v přenosu Chagasovy choroby. *T. sanguisuga* je často diskutována jako důležitý vektor tohoto onemocnění a pravděpodobně významně přispívá ke vzniku autochtonních nákaz ve Spojených státech. Publikovaná data uvádí u tohoto druhu vysoké hodnoty prevalence v rozmezí 40 – 60% (Dorn et al., 2007; Cesa et al., 2011; Waleckx et al., 2014; Gorchakov et al., 2016).

Vlastnosti mikrobiomu v závislosti na přítomnosti nebo absenci parazita *Trypanosoma cruzi* jsem zkoumala u čtyř druhů volně žijících triatominů, tj. druhů *T. lecticularia*,

T. rubida, *T. protracta* a *T. sanguisuga*. U analyzovaných jedinců druhů *T. lecticularia*, *T. rubida* a *T. protracta* byly rozdíly mezi *T. cruzi* pozitivními a *T. cruzi* negativními mikrobiomy nesignifikantní. Oproti tomu u druhu *T. sanguisuga* jsou na základě NMDS analýzy patrné signifikantní rozdíly. Vlivem přítomnosti parazita *T. cruzi* na mikrobiom u volně žijících populací druhů *T. brasiliensis* a *T. pseudomaculata* se zabýval Gumiel et al. v roce 2015. V této studii taktéž nebyl zaznamenán žádný posun ve složení mikrobiomu v případě přítomnosti *T. cruzi* infekce (Gumiel et al., 2015). Naopak signifikantně zvýšenou diverzitu mikrobiomu u volně žijících triatom druhu *T. protracta* jsem popsala ve své bakalářské práci. Zde jsem však pracovala s malou skupinou vzorků, což mohlo výslednou diverzitu ovlivnit. Zatímco Díaz et al., 2016, popisuje u laboratorních kolonií druhu *Rhodnius prolixus* obdobně signifikantní zvýšení diversity mikrobiomu, studie Daniele P. Castro et al. z roku 2012 uvádí, že přítomnost *T. cruzi* u laboratorních kolonií téhož druhu naopak způsobovala snížení počtu bakterií v mikrobiomu (Castro et al., 2012). Ač Díaz a kolektiv identifikoval přítomnost *T. cruzi* jako druhý nejdůležitější faktor ovlivňující mikrobiom triatomů (Díaz et al., 2016), vliv tohoto parazita na mikrobiom triatomů zůstává stále diskutabilní a měl by být i nadále předmětem zájmu.

6 Závěr

Moje práce přispěla k pochopení dynamiky mikrobiomů v závislosti na metabolismu hostitele, tedy postupném trávení nasáté krve. Přinesla také zcela nové poznatky o mikrobiomech volně žijících triatominů ve Spojených státech. Výsledky ukázaly na snižující se diverzitu mikrobiomu v průběhu ontogeneze nejméně třech druhů severoamerických triatom a potvrdily tak pattern, který jsem popsala již v bakalářské práci u laboratorních kolonií *R. prolixus*. Vliv přítomnosti parazita *Trypanosoma cruzi* na mikrobiom však zůstává stále diskutabilní. Signifikantní rozdíly ve složení mikrobiomu *T. cruzi* pozitivních a *T. cruzi* negativních jedinců byly zaznamenány pouze u jednoho ze čtyř studovaných druhů volně žijících triatominů.

7 Seznam použité literatury

- AKMAN, L., A. YAMASHITA, H. WATANABE, K. OSHIMA, T. SHIBA, M. HATTORI, S. AKSOY. Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tse-tse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nature Genetics*. 2002, **32**, 402 – 407.
- ALEMAN, A., T. GUERRA, T. J. MAIKIS, M. T. MILHOLLAND, I. CASTRO-ARELLANO, M. R. J. FORSTNER, D. HAHN. The prevalence of *Trypanosoma cruzi*, the Causal Agent of Chagas Disease, in Texas Rodent Populations. *EcoHealth*. 2017, **14**, 130 – 143.
- ANTINORI, S., L. GALIMBERTI, R. GRANDE, R. BIANCO, L. ORENI, L. TRAVERSI, D. RICABONI et al. Chagas disease knocks on our door: A cross-sectional study among Latin American immigrants in Milan, Italy. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018, **24** (12), e1340.
- AZAMBUJA, P., E. S. GARCIA, N. A. RATCLIFFE. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *TRENDS in Parasitology*. 2005, **21** (12), 568 – 572.
- BEARD, C. B., C. CORDON-ROSALES, R. V. DURVASULA. Bacterial Symbionts of the Triatominae and their potential use in control of Chagas disease Transmission. *Annual Review of Entomology*. 2002, **47**, 123 – 141.
- BEARD, C. B., E. M. DOTSON, P. M. PENNINGTON, S. EICHLER, C. CORDON-ROSALES, R. V. DURVASULA. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. *International Journal for Parasitology*. 2001, **31** (5 – 6), 621 – 627.
- BEARD, C. B., G. PYE, F. J. STEURER, R. RODRIGUEZ, R. CAMPMAN, A. T. PETERSON, J. RAMSEY et al. Chagas Disease in a Domestic Transmission Cycle in Southern Texas, USA. *Emerging Infectious Diseases*. 2003, **9** (1), 103.
- BEATTY, N. L., C. M. PEREZ-VELEZ, H. D. YAGLOM, S. CARSON, E. LIU, Z. I. KHALPEY, S. A. KLOTZ, S. P. ELLIOTT. Evidence of Likely Autochthonous Transmission of Chagas Disease in Arizona. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2018, **99** (6), 1534 – 1536.
- BEHRENS-BRADLEY, N., S. SMITH, N. L. BEATTY, M. LOVE, N. AHMAD, P. L. DORN, J. O. SCHMIDT, S. A. KLOTZ. Kissing Bugs Harboring *Trypanosoma cruzi*, Frequently Bite Residents of the US Southwest and Cause Severe Allergic Reactions, but not Chagas disease. *The American Journal of Medicine*. 2019, **9343** (19), 30551.

- BERASATEGUI, A., S. SHUKLA, H. SALEM, M. KALTENPOTH. Potential applications of insect symbionts in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, **100**, 1567 – 1577.
- BERN, C., S. KJOS, M. J. YABSLEY, S. P. MONTGOMERY. *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*. 2011, **24** (4), 655 – 681.
- BICE, D. E. The incidence of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma* of Tucson, Arizona. *Biology Theses*. 1964.
- BOTONI, F. A., A. L. P. RIBEIRO, C. C. MARINHO, M. M. O. LIMA, M. DO C. P. NUNES, M. O. C. ROCHA. Treatment of Chagas Cardiomyopathy. *BioMed Research International*. 2013, **2013**, 1155.
- BRIGHT, M. & S. BULGHERESI. A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature reviews Microbiology*. 2010, **8** (3), 218 – 230.
- BUDACHETRI, K., D. GAILLARD, J. WILLIAMS, N. MUKHERJEE, S. KARIM. A snapshot of the microbiome of *Amblyomma tuberculatum* ticks infesting the gopher tortoise, an endangered species. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2016, **7** (6), 1225 – 1229.
- BUHAYA, M. H., S. GALVAN, R. A. MALDONADO. Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines collected at Indio Mountains Research Station. *Acta Tropica*. 2015, **150**, 97 – 99.
- CARELS, N., M. GUMIEL, F. F. DA MOTA, C. J. DE CARVALHO MOREIRA, P. AZAMBUJA. A Metagenomic Analysis of Bacterial Microbiota in the Digestive Tract of Triatomines. *Bioinformatics and Biology Insights*. 2017, **11**, 1 – 19.
- CASTRO, D. P., C. S. MORAES, M. S. GONZALEZ, N. A. RATCLIFFE, P. AZAMBUJA, E. S. GARCIA. *Trypanosoma cruzi* Immune Response Modulation Decreases Microbiota in *Rhodnius prolixus* Gut and Is Crucial for Parasite Survival and Development. *PLoS ONE*. 2012, **7** (5), e36591.
- CESA, K., K. A. CAILLOUËT, P. L. DORN, D. M. WESSON. High *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) Prevalence in *Triatoma sanguisuga* (Hemiptera: Reduviidae) in Southeastern Louisiana. *Journal of Medical Entomology*. 2011, **48** (5), 1091 – 1094.
- CURTIS-ROBLES, R., L. D. AUCKLAND, K. F. SNOWDEN, G. L. HAMER, S. A. HAMER. Analysis of over 1500 triatomine vectors from across the US, predominantly Texas, for *Trypanosoma cruzi* infection and discrete typing units. *Infection, Genetics and Evolution*. 2018, **58**, 171 – 180.

CURTIS-ROBLES, R., K. F. SNOWDEN, B. DOMINGUEZ, L. DINGES, S. RODGERS, G. MAYS, S. A. HAMER. Epidemiology and Molecular Typing of *Trypanosoma cruzi* in Naturally-Infected Hound Dogs and Associated Triatomine Vectors in Texas, USA. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017, **11** (1), e0005298.

DA MOTA, F. F., L. P. MARINHO, C. J. DE CARVALHO MOREIRA, M. M. LIMA, C. B. MELLO, E. S. GARCIA, N. CARELS, P. AZAMBUJA. Cultivation-Independent Methods Reveal Differences among Bacterial Gut Microbiota in Triatomine Vectors of Chagas Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2012, **6** (5), e1631.

DALE, C., M. BEETON, C. HARBISON, T. JONES, M. PONTES. Isolation, Pure Culture, and Characterization of “*Candidatus Arsenophonus arthropodicus*,” an Intracellular Secondary Endosymbiont from the Hippoboscid Louse Fly *Pseudolynchia canariensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, **72** (4), 2997 – 3004.

DA SILVA NEUMANN, A., F. DE ALMEIDA DIAS, J. DA SILVA FERREIRA, A. N. B. FONTES, P. S. ROSA, R. E. MACEDO, J. H. OLIVEIRA et al. Experimental Infection of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae) with *Mycobacterium leprae* Indicates Potential for Leprosy Transmission. *PLoS ONE*. 2016, **11** (5), e0156037.

DANDAPANI, S., A. R. GERMAIN, I. JEWETT, S. LE QUEMENT, J.-C. MARIE, G. MUNCIPINTO, J. R. DUVALL. Diversity-Oriented Synthesis Yields a New Drug Lead for Treatment of Chagas Disease. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2014, **5**, 149 – 153.

DEL PUERTO, R., J. E. NISHIZAWA, M. KIKUCHI, N. IIHOSHI, Y. ROCA, C. AVILAS, A. GIANELLA et al. Lineage Analysis of Circulating *Trypanosoma cruzi* Parasites and Their Association with Clinical Forms of Chagas Disease in Bolivia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2010, **4** (5), e687.

DIAS, J. C. P., A. C. SILVEIRA, C. J. SCHOFIELD. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 2002, **97** (5), 603 – 612.

DÍAZ, S., B. VILLAVICENCIO, N. CORREIA, J. COSTA, K. L. HAAG. Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal. *Parasites & Vectors*. 2016, **9** (1), 636.

DORN, P. L., L. PERNICIARO, M. J. YABSLEY, D. M. ROELLIG, G. BALSAMO, J. DIAZ, D. WESSON. Autochthonous Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Louisiana. *Emerging Infectious Diseases*. 2007, **13** (4), 605 – 607.

DOUGLAS, A. E. Nutritional interactions in Insect-Microbial Symbioses: Aphids and Their Symbiotic Bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology*. 1998, **43**, 17 – 37.

- DUMONTEIL, E., M.-J. RAMIREZ-SIERRA, S. PÉREZ-CARRILLO, C. TEH-POOT, C. HERRERA, S. GOURBIÈRE, E. WALECKX. Detailed ecological associations of triatomines revealed by metabarcoding and next-generation sequencing: implications for triatomine behaviour and *Trypanosoma cruzi* transmission cycles. *Scientific Reports*. 2018, **8** (1), 4140.
- DUNCAN, J. T. On a bactericidal principle present in the alimentary canal of insects and arachnids. *Parasitology*. 1926, **18**, 238–252.
- EICHLER, S. & G. A. SCHAUB. Development of Symbionts in Triatomine Bugs and the Effects of Infections with Trypanosomatids. *Experimental Parasitology*. 2002, **100** (1), 17 – 27.
- ELOY, L. J. & S. B. LUCHEIS. Hemoculture and Polymerase Chain Reaction Using Primers TCZ1/TCZ2 for the Diagnosis of Canine and Feline Trypanosomiasis. *International Scholarly Research Network Veterinary Science*. 2012, **2012**, 5402.
- EL-SAYED, N. M., P. J. MYLER, D. C. BARTHOLOMEU, D. NILSSON, G. AGGARWAL, A.-N. TRAN, E. GHEDIN. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science*. 2005, **309** (5733), 409 – 415.
- FELDHAAR, H. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecological Entomology*. 2011, **36** (5), 533 – 543.
- FISHER, M. L., D. W. WATSON, J. A. OSBORNE, H. MOCHIZUKI, M. BREEN, C. SCHAL. Growth kinetics of endosymbiont *Wolbachia* in the common bed bug, *Cimex lectularius*. *Scientific Reports*. 2018, **8** (1), 11444.
- FLORES, A., C. VITEK, T. P. FERIA-ARROYO, B. L. FREDENSBORG. Temporal Variation in the Abundance and Timing of Daily Activity of Chagas Disease Vector *Triatoma gerstaeckeri* (Stal, 1859) in a Natural Habitat in the Lower Rio Grande Valley, South Texas. *Journal of Parasitology*. 2017, **103** (5), 574 – 578.
- GARCIA, A. R. M., A. DE PAULA ROCHA, C. C. MOREIRA, S. L. ROCHA, A. A. GUARNERI, S. L. ELLIOT. Screening of Fungi for Biological Control of a Triatomine Vector of Chagas Disease: Temperature and Trypanosome Infection as Factors. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016, **10** (11), e0005128.
- GORCHAKOV, R., L. P. TROSCLAIR, E. J. WOZNIAK, P. T. FERIA, M. N. GARCIA, S. M. GUNTER, K. O. MURRAY. *Trypanosoma cruzi* Infection Prevalence and Bloodmeal Analysis in Triatomine Vectors of Chagas Disease From Rural Peridomestic Locations in Texas, 2013 – 2014. *Journal of Medical Entomology*. 2016, **53** (4), 911 – 918.

- GUÉGAN, M., K. ZOUACHE, C. DÉMICHEL, G. MINARD, V. T. VAN, P. POTIER, P. MAVINGUI, C. V. MORO. The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *BioMed Central*. 2018, **6** (1), 49.
- GUMIEL, M., F. F. DA MOTA, V. DE SOUZA RIZZO, O. SARQUIS, D. P. DE CASTRO, M. M. LIMA, E. DE SOUZA GARCIA et al. Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods. *Parasites & Vectors*. 2015, **8** (1), 245.
- GÜRTLER, R. E. & M. V. CARDINAL. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 2015, **151**, 32 – 50.
- HABERLAND, A., S. G. M. SARAVIA, G. WALLUKAT, R. ZIEBIG, I. SCHIMKE. Chronic Chagas disease: from basics to laboratory medicine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2013, **51** (2), 271 – 294.
- HENRY, L. M., M. C. J. MAIDEN, J. FERRARI, H. C. J. GODFRAY. Insect life history and the evolution of bacterial mutualism. *Ecology Letters*. 2015, **18**, 516 – 525.
- HUSNIK, F. Host-symbiont-pathogen interactions in blood-feeding parasites: nutrition, immune cross-talk and gene exchange. *Parasitology*. 2018, **145** (10), 1294 – 1303.
- HYPŠA, V. & C. DALE. In Vitro Culture and Phylogenetic Analysis of “*Candidatus Arsenophonus triatominarum*” an Intracellular Bacterium from the Triatomine Bug, *Triatoma infestans*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1997, **47** (4), 1140 – 1144.
- HYPŠA, V., D. F. TIETZ, J. ZRZAVÝ, R. O. M. REGO, C. GALVAO, J. JURBERG. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2002, **23**, 447 – 457.
- JIMÉNEZ-CORTÉS, J. G., R. GARCÍA-CONTRERAS, M. I. BUCIO-TORRES, M. GABRERA-BRAVO, A. CÓRDOBA-AGUILAR, G. BENELLI, P. M. SALAZAR-SCHETTINO. Bacterial symbionts in human blood-feeding arthropods: Patterns, general mechanisms and effects of global ecological changes. *Acta Tropica*. 2018, **186**, 69 – 101.
- KEENAN, M., J. H. CHAPLIN, P. W. ALEXANDER, M. J. ABBOTT, W. M. BEST, A. KHONG, A. BOTERO et al. Two Analogues of Fenarimol Show Curative Activity in an Experimental Model of Chagas Disease. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2013, **56**, 10158 – 10170.

- KIKUCHI, Y., T. HOSOKAWA, T. FUKATSU. Diversity of Bacterial Symbiosis in Stinkbugs. *Microbial Ecology Research Trends*. 2008, 39 – 63.
- KIKUCHI, Y., T. HOSOKAWA, T. FUKATSU. Insect-Microbiome Mutualism without Vertical Transmission: a Stinkbug Acquires a Beneficial Gut Symbiont from the Environment Every Generation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, **73** (13), 4308 – 4316.
- KIKUCHI, Y. Endosymbiotic Bacteria in Insects: Their Diversity and Culturability. *Japanese Society of Microbial Ecology*. 2009, **24** (3), 0908180109-0908180109.
- KJOS, S. A., K. F. SNOWDEN, J. K. OLSON. Biogeography and *Trypanosoma cruzi* Infection Prevalence of Chagas Disease Vectors in Texas, USA. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*. 2009, **9** (1), 41 – 49.
- KLOTZ, S. A., F. M. SHIRAZI, K. BOESEN, N. L. BEATTY, P. L. DORN, S. SMITH, J. O SCHMIDT. Kissing Bug (*Triatoma* spp.) Intrusion into Homes: Troublesome Bites and Domiciliation. *Libertas Academica*. 2016, **10**, 45 – 49.
- KLOTZ, S. A., J. O SCHMIDT, P. L. DORN. *Trypanosoma cruzi* Carriage by *Triatoma rubida* and *Triatoma protracta* in a Zoological Park near Tucson, Arizona. *Journal of the Kansas Entomological Society*. 2013, **86** (4), 373 – 374.
- KOERNER, R. J., M. GOODFELLOW, A. L. JONES. The genus *Dietzia*: a new home for some known and emerging opportunist pathogens. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2009, **55** (3), 296 – 305.
- KUECHLER, S. M., K. DETTNER, S. KEHL. Characterization of an Obligate Intracellular Bacterium in the Midgut Epithelium of the Bulrush Bug *Chilacis typhae* (Heteroptera, Lygaeidae, Artheneinae). *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, **77** (9), 2869 – 2876.
- LOPEZ-ORDONEZ, T., C. A. FLORES-LOPÉZ, R. MONTEJO-LOPEZ, A. CRUZ-HERNANDEZ, E. E. CONNERS. Cultivable Bacterial Diversity in the Gut of the Chagas Disease Vector *Triatoma dimidiata*: Identification of Possible Bacterial Candidates for a Paratransgenesis Approach. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2018, **5**, 174.
- MALELE, I., H. NYINGILILI, E. LYARUU, M. TAUZIN, B. B. OLLIVIER, J.-L. CAYOL, M.-L. FARDEAU, A. GEIGER. Bacterial diversity obtained by culturable approaches in the gut of *Glossina pallidipes* population from a non sleeping sickness focus in Tanzania: preliminary results. *BMC Microbiology*. 2018, **18** (1), 164.

- MANTILLA, J. C., G. A. ZAFRA, A. M. MACEDO, C. I. GONZÁLES. Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. *Human Pathology*. 2010, **41**, 610 – 613.
- MARGULIS, L. & R. FESTER. Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis. *The MIT Press*. 1991.
- MCPHATTER, L., W. ROACHELL, F. MAHMOOD, L. HOFFMAN, N. LOCKWOOD, A. OSUNA, J. LOPEZ, M. DEBBOUN. Vector Surveillance to Determine Species Composition and Occurrence of *Trypanosoma cruzi* Infection at Three Military Installations in San Antonio, Texas. *The Army Medical Department Journal*. 2012, 12 – 21.
- MESSENGER, L. A., M. A. MILES, C. BERN. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2015, **13** (8), 995 – 1029.
- MIRANDA-SCHAEUBINGER, M., I. CHAKRAVARTI, K. C. F. LIDANI, Z. OMIDIAN, R. H. GILMAN. Systematic Review of the Epidemiology of Chagas Disease on the Americas: a Call for Standardized Reporting of Chagas Disease Prevalence. *Current Tropical Medicine Reports*. 2019, **6**, 23 – 34.
- MONCAYO, Á & A. C. SILVEIRA. Current epidemiological trends of Chagas Disease in Latin America and future challenges: epidemiology, surveillance, and health policies. *American Trypanosomiasis Chagas Disease (Second Edition)*. 2017, 59 – 88.
- MONGE-MAILLO, B., B. C. JIMÉNEZ, J. A. PÉREZ-MOLINA, F. NORMAN, M. NAVARRO, A. PÉREZ-AYALA, J. M. HERRERO et al. Imported Infectious Diseases in Mobile Populations, Spain. *Emerging Infectious Diseases*. 2009, **15** (11), 1745 – 1752.
- MONTEON, V., I. MAY-GIL, L. NUNEZ-OREZA, R. LOPEZ. Feces from wild *Triatoma dimidiata* induces local inflammation and specific immune response in a murine model. *Annals of Parasitology*. 2018, **64** (4), 367 – 377.
- MONTOYA-PORRAS, L. M., T.-C. OMAR, J. F. ALZATE, C. X. MORENO-HERRERA, G. E. CADAVID-RESTREPO. 16S rRNA gene amplicon sequencing reveals dominance of Actinobacteria in *Rhodnius pallescens* compared to *Triatoma maculata* midgut microbiota in natural populations of vector insects from Colombia. *Acta Tropica*. 2018, **178**, 327 – 332.
- MORAN, N. A., P. H. DEGNAN, S. R. SANTOS, H. E. DUNBAR, H. OCHMAN. The players in a mutualistic symbiosis: Insects, bacteria, viruses, and virulence genes. *PNAS*. 2005, **102** (47), 16919 – 16926.
- MORAN, N. A. & A. TELANG. Bacteriocyte-Associated Symbionts of Insects. *BioScience*. 1998, **48** (4), 295 – 304.

- NOUVELLET, P., E. DUMONTEIL, S. GOURBIERE. The Improbable Transmission of *Trypanosoma cruzi* to Human: The Missing Link in the Dynamics and Control of Chagas Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2013, **7** (11), e2505.
- NOVÁKOVÁ, E., V. HYPŠA, N. A. MORAN. *Arsenophonus*, an emerging clade of intracellular symbionts with a broad host distribution. *BMC Microbiology*. 2009, **9** (1), 143.
- OLIVEIRA, J. L., J. C. CURY, R. GURGEL-GONCALVES, A. C. BAHIA, F. A. MONTEIRO. Field-collected *Triatoma sordida* from central Brazil display high microbiota diversity that varies with regard to developmental stage and intestinal segmentation. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2018, **12** (8), e0006709.
- OLIVER, K. M., P. H. DEGNAN, G. R. BURKE, N. A. MORAN. Facultative Symbionts in Aphids and the Horizontal Transfer of Ecologically Important Traits. *Annual Review of Entomology*. 2010, **55**, 247 – 266.
- ORANTES, L. C., C. MONROY, P. L. DORN, L. STEVENS, D. M. RIZZO, L. MORRISSEY, J. P. HANLEY et al. Uncovering vector, parasite, blood meal and microbiome patterns from mixed-DNA specimens of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2018, **12** (10), e0006730.
- OTÁLORA-LUNA, F., A. J. PÉREZ-SÁNCHEZ, C. SANDOVAL, E. ALDANA. Evolution of hematophagous habit in Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). *Revista Chilena de Historia Natural*. 2015, **88** (1), 4.
- PANZERA, F., R. PÉREZ, Y. PANZERA, I. FERRANDIS, M. J. FERREIRO, L. CALLEROS. Cytogenetics and Genome Evolution in the Subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Cytogenetic and Genome Research*. 2010, **128** (1 – 3), 77 – 87.
- PACHEBAT, J. A., G. VAN KEULEN, M. M. A. WHITTEN, S. GIRDWOOD, T. DEL SOL, P. J. DYSON, P. D. FACEY. Draft Genome Sequence of *Rhodococcus rhodnii* Strain LMG5362, a Symbiont of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), the Principle Vector of *Trypanosoma cruzi*. *Genome Announcements*. 2013, **1** (3), e00329-13.
- PENG, D., S. P. KURUP, P. Y. YAO, T. A. MINNING. R. L. TARLETON. CRISPR-Cas9-Mediated Single-Gene and Gene Family Disruption in *Trypanosoma cruzi*. *mBio*. 2015, **6** (1), e02097-14.
- PÉREZ-MOLINA, J. A. & I. MOLINA. Chagas disease. *Lancet*. 2018, **391**, 82 – 94.
- PIPPIN, W. F. The biology and vector capability of *Triatoma sanguisuga* Texana Usinger and *Triatoma gerstaeckeri* (Stal) compared with *Rhodnius prolixus* (Stal) (Hemiptera: Triatominae). *Journal of Medical Entomology*. 1970, **7**, 30 – 45.

- POVEDA, C., M. FRESNO, N. GIRONES, O. A. MARTINS-FILHO, J. D. RAMÍREZ, J. SANTI-ROCCA, J. A. MARIN-NETO et al. Cytokine Profiling in Chagas Disease: Towards Understanding the Association with Infecting *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (A BENEFIT TRIAL Sub-Study). *PLoS ONE*. 2014, **9** (3), e91154.
- PRADO, S. S. & T. D. ZUCCHI. Host-Symbiont Interactions for Potentially Managing Heteropteran Pests. *Psyche: A Journal of Entomology*. 2012, **2012**, 269473.
- RAMÍREZ, J. D., B. TURRIAGO, G. TAPIA-CALLE, F. GUHL. Understanding the role of dogs (*Canis lupus familiaris*) in the transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Colombia. *Veterinary Parasitology*. 2013, **196**, 216 – 219.
- RASSI JR, A., A. RASSI, J. A. MARIN-NETO. Chagas disease. *The Lancet*. 2010, **375** (9723), 1388-1402.
- REISENMAN, C. E., G. LAWRENCE, P. G. GUERENSTEIN, T. GREGORY, E. DOTSON, J. G. HILDEBRAND. Infection of Kissing Bugs with *Trypanosoma cruzi*, Tucson, Arizona, USA. *Emerging Infectious Diseases*. 2010, **16** (3), 400 – 405.
- RIO, R. V. M., G. M. ATTARDO, B. L. WEISS. Grandeur Alliances: Symbiont Metabolic Integration and Obligate Arthropod Hematophagy. *Trends in Parasitology*. 2016, **32** (9), 739 – 749.
- RIO, R. V. M., Y. HU, S. AKSOY. Strategies of the home-team: symbioses exploited for vector-borne disease control. *TRENDS in Microbiology*. 2004, **12** (7), 325 – 336.
- RODRÍGUEZ, J., P. PAVÍA, M. MONTILLA, C. J. PUERTA. Identifying triatomine symbiont *Rhodococcus rhodnii* as intestinal bacteria from *Rhodnius ecuadoriensis* (Hemiptera: Reduviidae) laboratory insects. *International Journal of Tropical Insect Science*. 2011, **31** (1 – 2), 34 – 37.
- RODRÍGUEZ-RUANO, S. M., V. ŠKOCHOVÁ, R. O. M. REGO, J. O. SCHMIDT, W. ROACHELL, V. HYPŠA, E. NOVÁKOVÁ. Microbiomes of North American Triatominae: The Grounds for Chagas Disease Epidemiology. *Frontiers in Microbiology*. 2018, **9**, 1167.
- SACHS, J. L., R. G. SKOPHAMMER, J. U. REGUS. Evolutionary transitions in bacterial symbiosis. *PNAS*. 2011, **108**, 10800 – 10807.
- SALEM, H., L. FLOREZ, N. GERARDO, M. KALTENPOTH. An out-of-body experience: the extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects. *Proceedings B*. 2015, **282** (1804), 20142957.
- SANDOVAL, C. M., N. ORTIZ, D. JAIMES, E. LOROSA, C. GALVAO, O. RODRIGUEZ, J. V. SCORZA, R. GUTIÉRREZ. Feeding behaviour of *Belminus ferroae*

(Hemiptera: Reduviidae), a predaceous Triatominae colonizing rural houses in Norte de Santander, Colombia. *Medical and Veterinary Entomology*. 2010, **24**, 124 – 131.

SCHIJMAN, A. G., M. BISIO, L. ORELLANA, M. SUED, T. DUFFY, A. M. M. JARAMILLO, C. CURA et al. International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2011, **5** (1), e931.

SCHMIDT, J. O., P. L. DORN, S. A. KLOTZ. Second-Best is Better Than Nothing: Cockroaches as a Viable Food Source for the Kissing Bug *Triatoma recurva* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*. 2019, **56** (3), 651 – 655.

SCHMUNIS, G. A. & Z. E. YADON. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a World health problem. *Acta Tropica*. 2010, **115** (1 – 2), 14 – 21.

SCHOFIELD, C. J. Biosystematics and evolution of the Triatominae. *Cadernos de Saúde Pública*. 2000, **16**, 89 – 92.

SCHOFIELD, C. J. & C. GALVAO. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*. 2009, **110** (2 – 3), 88 – 100.

SHENDER, L. A., M. D. LEWIS, D. REJMANEK, J. A. K. MAZET. Molecular Diversity of *Trypanosoma cruzi* Detected in the Vector *Triatoma protracta* from California, USA. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016, **10** (1), e0004291.

STERKEL, M., J. H. M. OLIVEIRA, V. BOTTINO-ROJAS, G. O. PAIVA-SILVA, P. L. OLIVEIRA. The Dose Makes the Poison: Nutritional Overload Determines the Life Traits of Blood-Feeding Arthropods. *Trends in Parasitology*. 2017, **33** (8), 633 – 644.

SUDAKARAN, S., H. SALEM, C. KOST, M. KALTENPOTH. Geographical and ecological stability of the symbiotic mid-gut microbiota in European firebugs, *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Molecular Ecology*. 2012, **21**, 6134 – 6151.

ŠORFOVÁ, P., A. ŠKEŘÍKOVÁ, V. HYPŠA. An effect of 16S rRNA intergenic variability on coevolutionary analysis in symbiotic bacteria: Molecular phylogeny of *Arsenophonus triatominarum*. *Systematic and Applied Microbiology*. 2008, **31**, 88 – 100.

TOBIAS, N. J. Insect Vectors of Disease: Untapped Reservoirs for New Antimicrobials? *Frontiers in Microbiology*. 2016, **7**, 2085.

TORRECILHAS, A. C. T., R. R. TONELLI, W. R. PAVANELLI, J. S. DA SILVA, R. I. SCHUMACHER, W. DE SOUZA, N. C. SILVA et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes and Infection*. 2008, **11** (2009), 29 – 39.

VALLEJO, G. A., F. GUHL, G. A. SCHAUB. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. *Acta Tropica*. 2009, **110** (2 – 3), 137 – 147.

VIEIRA, C. B., Y. R. PRACA, K. L. DA SILVA BENTES, P. B. SANTIAGO, S. M. M. SILVA, G. DOS SANTOS SILVA, F. N. MOTTA et al. Triatomines: Trypanosomatids, Bacteria, and Viruses Potential Vectors? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018, **8**, 405.

WALECKX, E., J. SUAREZ, B. RICHARDS, P. L. DORN. *Triatoma sanguisuga* Blood Meals and Potential for Chagas Disease, Louisiana, USA. *Emerging Infectious Diseases*. 2014, **20** (12), 2141 – 2143.

WALLACE, J. R., M. C. GORDON, L. HARTSELL, L. MOSI, M. E. BENBOW, R. W. MERRITT, P. L. C. SMALL. Interaction of *Mycobacterium ulcerans* with Mosquito Species: Implications for Transmission and Trophic Relationships. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, **76** (18), 6215 – 6222.

WALTMANN, A., A. C. WILLCOX, S. BALASUBRAMANIAN, K. B. MAYORI, S. M. GUERRERO, R. S. S. SANCHEZ, J. ROACH et al. Hindgut microbiota in laboratory-reared and wild *Triatoma infestans*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2019, **13** (5), e0007383.

WANG, R., N. LI, J. LIU, T. LI, M. LIU, Z. YU, J. LIU. Symbiont dynamics of the Tibetan tick *Haemaphysalis tibetensis* (Acari: Ixodidae). *Parasites & Vectors*. 2017, **10** (1), 259.

WEBBER, B. J., M. T. PAWLAK, S. VALTIER, C. C. DANIELS, C. C. TULLY, E. J. WEBSTER, N. S. Cooperation, communication, and co-evolution: grand challenges in microbial symbiosis research. *Frontiers in Microbiology*. 2017, **5**, 164.

WEISS, B. L., M. MALTZ, S. AKSOY. Obligate Symbionts Activate Immune System Development in the Tsetse Fly. *The Journal of Immunology*. 2012, **188** (7), 3395 – 3403.

WERNEGREEN, J. J. Genome evolution in Bacterial endosymbionts of Insects. *Nature*. 2002, **3**, 850 – 861.

WILKES, T. E., O. DURON, A. C. DARBY, V. HYPŠA, E. NOVÁKOVÁ, G. D. D. HURST. The Genus *Arsenophonus*. *Manipulative Tenants: Bacteria Associated with Arthropods*. 2012, 226 – 241.

WILKINSON, D. A., O. DURON, C. CORDONIN, Y. GOMARD, B. RAMASINDRAZANA, P. MAVINGUI, S. M. GOODMAN, P. TORTOSA. The Bacteriome of Bat Flies (Nycteribiidae) from the Malagasy Region: a Community Shaped by Host Ecology, Bacterial Transmission Mode, and Host-Vector Specificity. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016, **82** (6), 1778 – 1788.

- WOZNIAK, E. J., G. LAWRENCE, R. GORCHAKOV, H. ALAMGIR, E. DOTSON, B. SISSEL, S. SARKAR. K. O. MURRAY. The Biology of the Triatomine bugs native to South Central Texas and assessment of the risk they pose for autochthonous Chagas disease exposure. *Journal of Parasitology*. 2015, **101** (5), 520 – 528.
- YADAV, K. K., K. CHANDEL, A. BORA, V. VEER. Isolation and characterization of *Dietzia maris* from midgut of *Aedes albopictus*: A suitable candidate for paratransgenesis. *International Journal of Mosquito Research*. 2015, **2** (4), 7 – 12.
- YADAV, K. K., A. NAGLOT, P. B. PATIL, S. S. BHAGYAWANT, V. VEER, P. S. RAJU. Role of *Dietzia maris* bacteria in larval development of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2018, **6** (2), 2937 – 2942.
- ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*. 2018, **184**, 38 – 52.

8 Přílohy

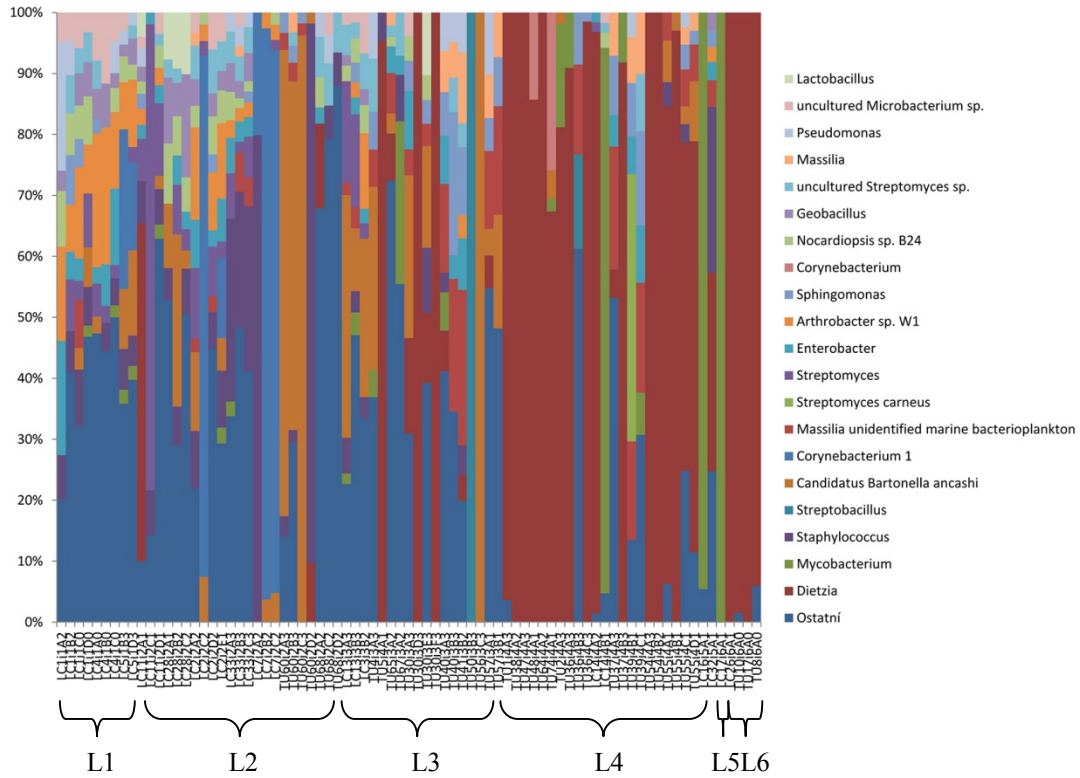
Tab. P1: Doplňující informace o reagentech použitých při fluorescenční in situ hybridizaci.

Reagencie	Výrobce	Další informace	Koncentrace při FISH
Formaldehyd	Thermo Scientific	16% roztok (w/v), bez metanolu	4% v PBS (pH = 7,4)
PBS	Thermo Scientific	1 X, pH = 7,4	
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich	30% vodný roztok (w/w)	2% v etanolu
Etanol	Penta	96%	
Sacharoza	Sigma-Aldrich	≥ 99,5% (GC)	15% v H ₂ O
O. C. T. embedding medium	Sakura/Tissue-Tek		
NaCl	Sigma-Aldrich	BioXtra, ≥ 99,5% (AT)	5M v H ₂ O
Tris/HCl	Sigma-Aldrich	≥ 99% (titrimetric)	1M v H ₂ O (pH = 7,4)
EDTA	Sigma-Aldrich	ACS reagentie, 99,4-100,6%	0,5M v H ₂ O (pH = 8)
SDS	Sigma-Aldrich	≥ 98,5% (GC)	10% v H ₂ O
Formamid	Sigma-Aldrich		
H ₂ O	Sigma-Aldrich		
DAPI	Sigma-Aldrich		
Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich	M _w ~31 000	

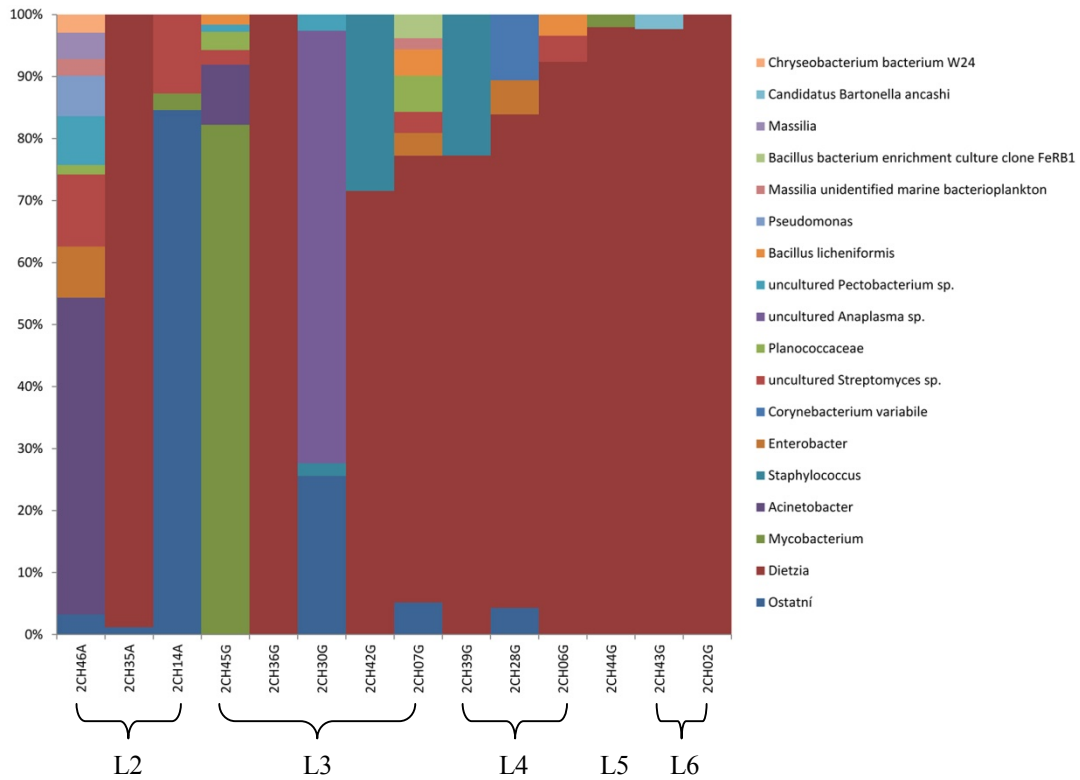
Tab. P2: Souhrn vzorků získaných z USA.

Druh	Instar	Počet vzorků	Stát	Počet vzorků	Lokalita	Počet vzorků	Celkový počet vzorků
<i>Triatoma rubida</i>	L1	16	Arizona	126	Las Cienegas National Conservation Area	44	126
	L2	27			University of Arizona Desert Station	82	
	L3	26					
	L4	28					
	L5	5					
	L6	24					
<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	L1	7	Texas	44	Air Force Basis	19	44
	L2	12			Chaparral Wildlife Management Area	25	
	L2-3	3					
	L3	10					
	L4	3					
	L5	5					
	L6	4					
<i>Triatoma lecticularia</i>	L1-2	1	Texas	22	Chaparral Wildlife Management Area	22	22
	L2	3					
	L3	6					
	L4	4					
	L5	2					
	L6	6					

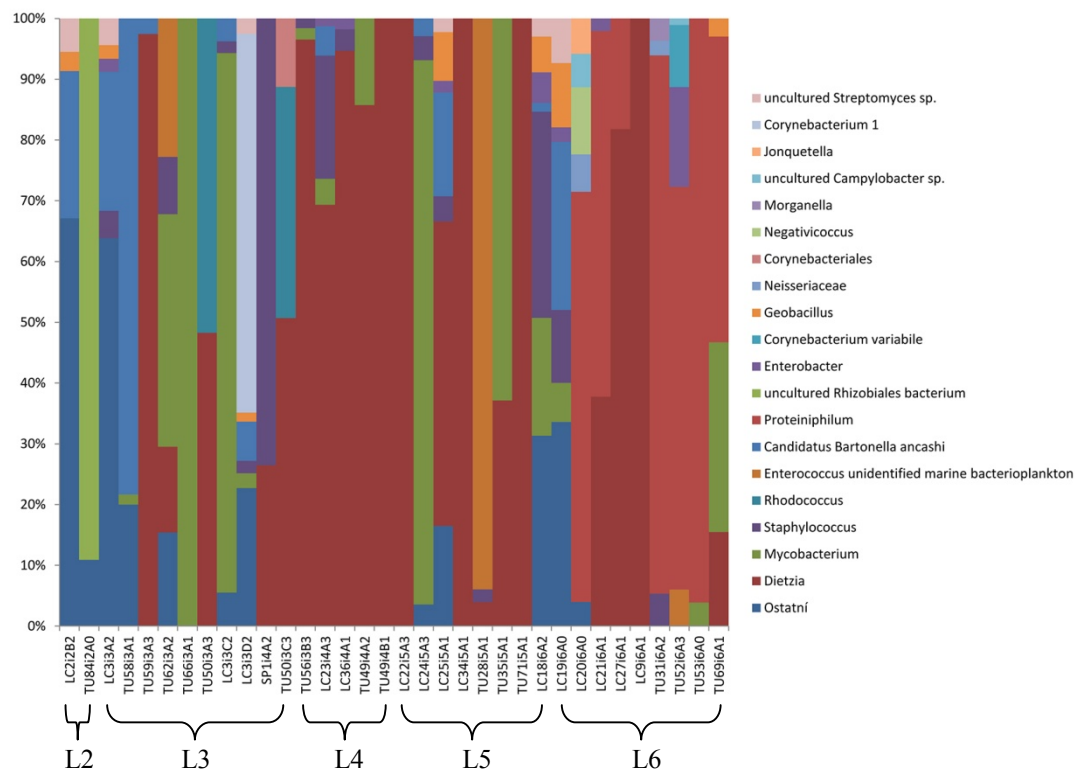
<i>Triatoma sanguisuga</i>	L2	1	Texas	25	Air Force Basis	25	25
	L3	5					
	L3-4	5					
	L4	5					
	L5	6					
	L6	3					
<i>Triatoma recurva</i>	L6	1	Arizona	1	University of Arizona Desert Station	1	1
<i>Triatoma protracta</i>	L1	1	Arizona	49	Las Cienegas National Conservation Area	21	49
	L2	4			University of Arizona Desert Station	27	
	L3	10			San Pedro Riparian National Conservation Area	1	
	L4	6					
	L5	13					
	L6	15					
<i>Triatoma sp.</i>	L1	1	Arizona	4	University of Arizona Desert Station	2	4
	L2	1			Las Cienegas National Conservation Area	2	
	L5	2					



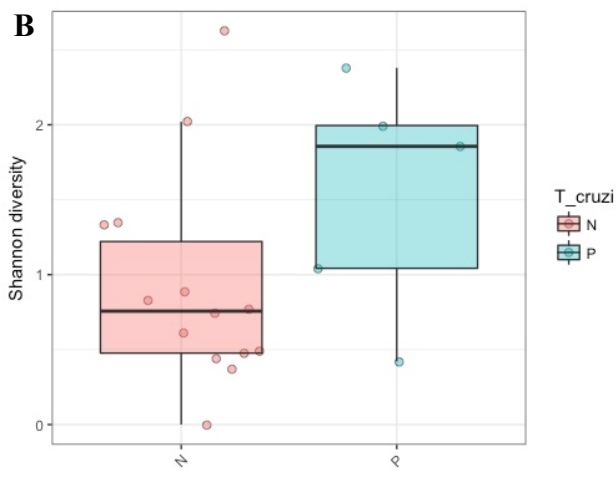
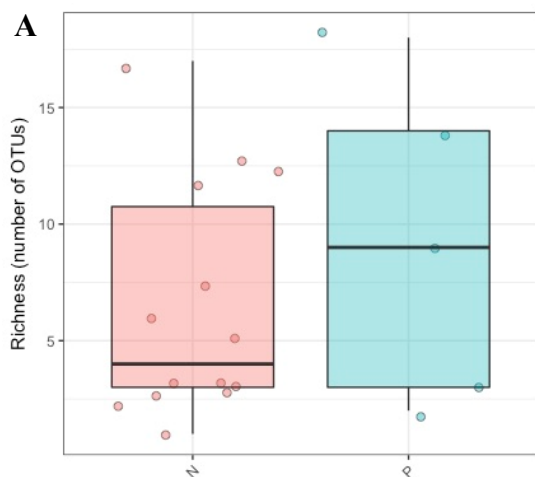
Obr. P1: Dynamika mikrobiomu v ontogenezi *Triatoma rubida*.

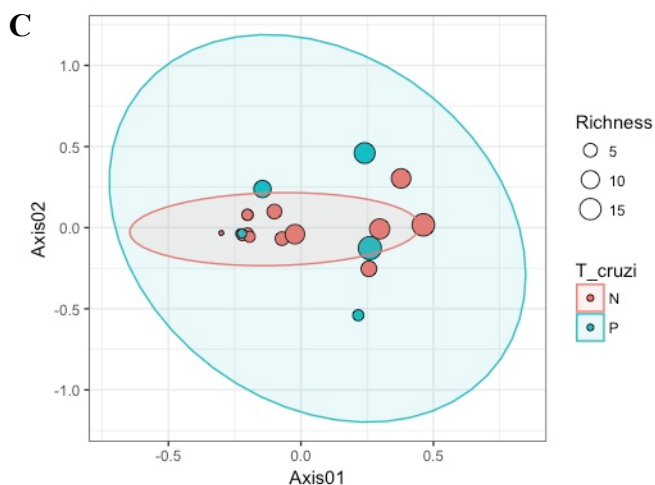


Obr. P2: Dynamika mikrobiomu v ontogenezi *Triatoma lecticularia*.

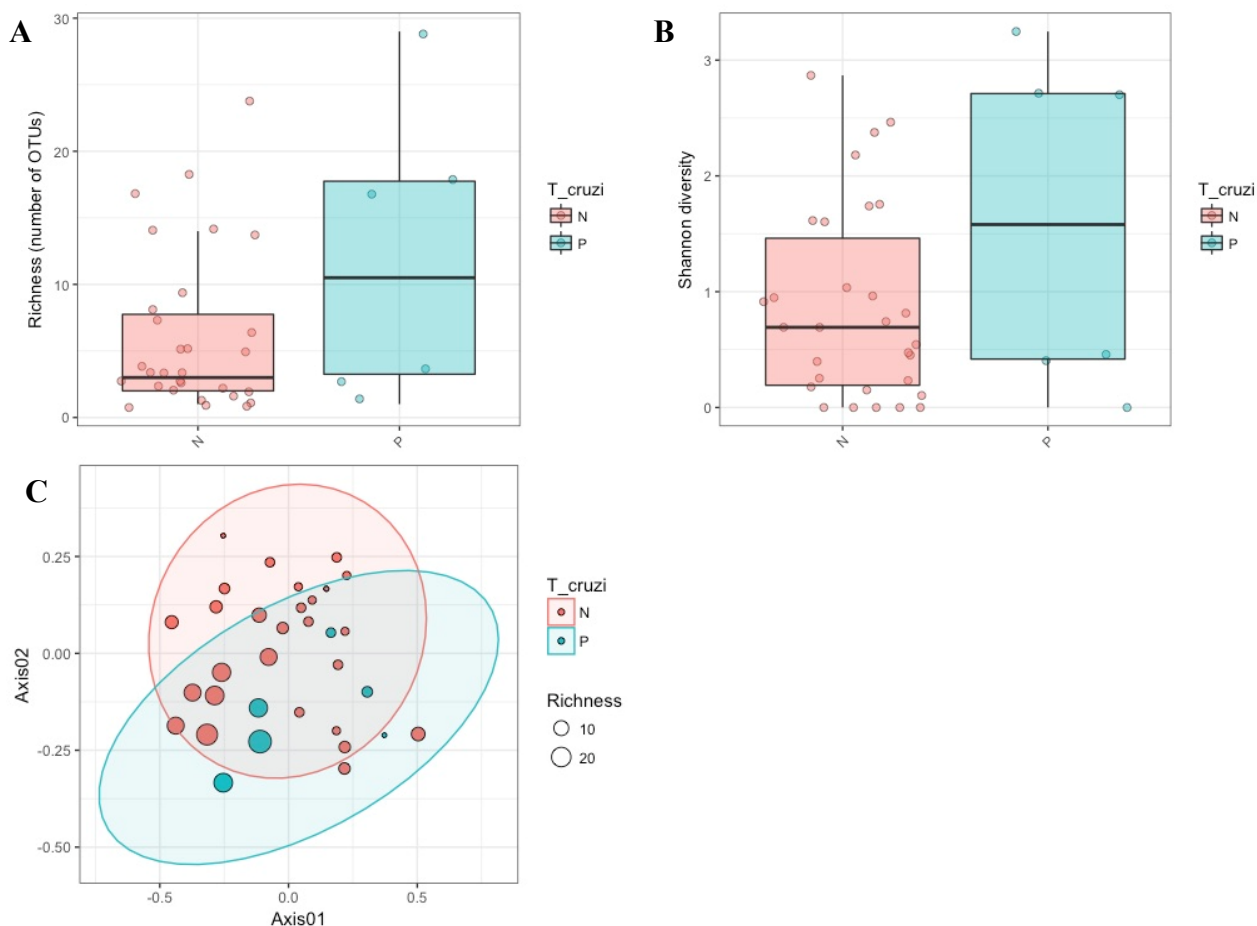


Obr. P3: Dynamika mikrobiomu v ontogenezi *Triatoma protracta*.

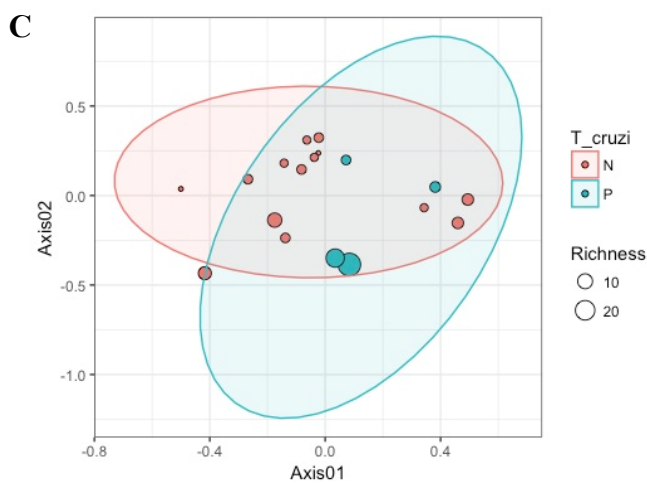
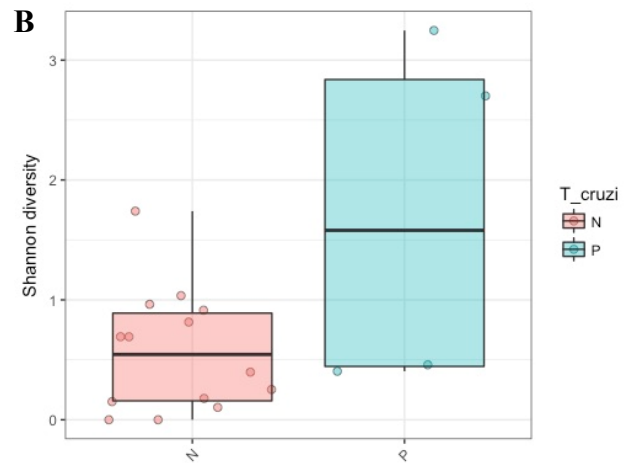
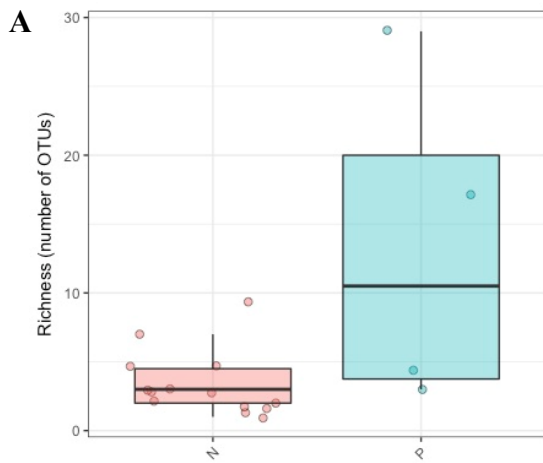




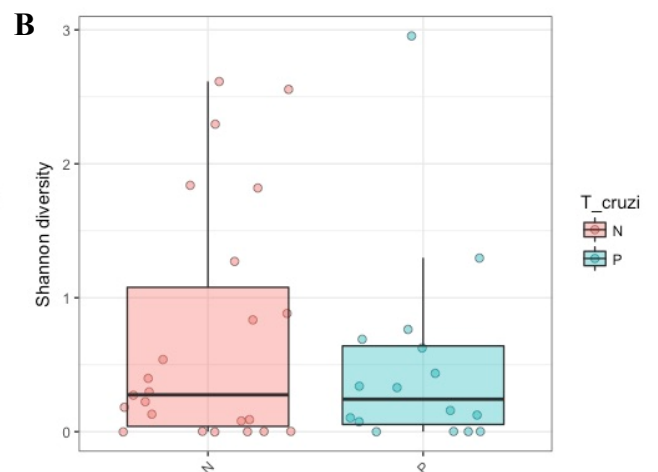
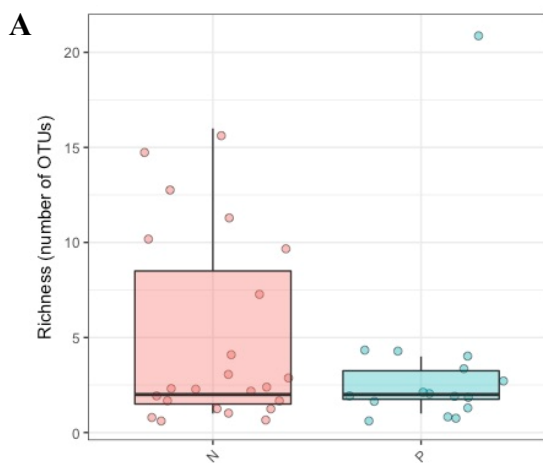
Obr. P4: Prostá bohatost mikrobiomu „Richness“ (A), Shannonův index diverziy (B) a NMDS analýza (C) pro volně žijící jedince druhu *T. lectularia*. Všechny analýzy ukazují nesignifikantní rozdíly mezi mikrobiomy *T. cruzi* negativních a *T. cruzi* pozitivních vzorků (NMDS analýza hodnocena na hladině významnosti 99%, $P = 0,13$).

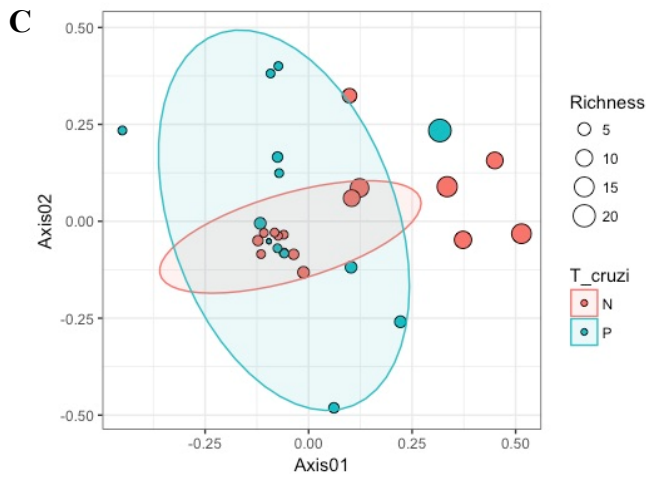


Obr. P5: Prostá bohatost mikrobiomu „Richness“ (A), Shannonův index diverziy (B) a NMDS analýza (C) pro volně žijící jedince získané z hnízd *Neotoma albigula* v Arizoně druhu *T. protracta*. Všechny analýzy ukazují nesignifikantní rozdíly mezi mikrobiomy *T. cruzi* negativních a *T. cruzi* pozitivních vzorků (NMDS analýza hodnocena na hladině významnosti 99%, $P = 0,092$).

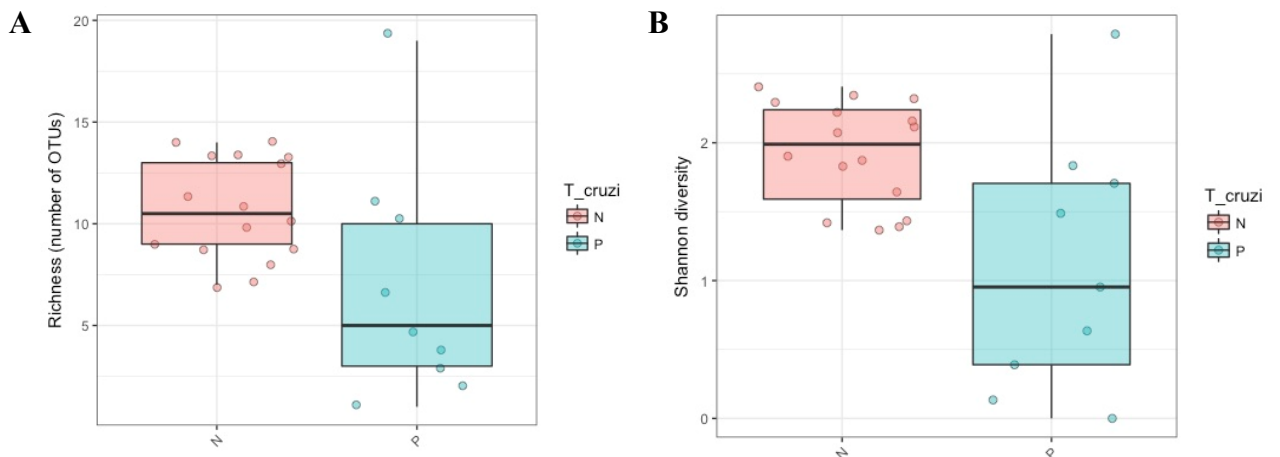


Obr. P6: Prostá bohatost mikrobiomu „Richness“ (A), Shannonův index diverziy (B) a NMDS analýza (C) pro volně žijící jedince získané z lokality University of Arizona Desert Station druhu *T. protracta*. Všechny analýzy ukazují nesignifikanční rozdíly mezi mikrobiomy *T. cruzi* negativních a *T. cruzi* pozitivních vzorků (NMDS analýza hodnocena na hladině významnosti 99%, $P = 0,354$).





Obr. P7: Prostá bohatost mikrobiomu „Richness“ (A), Shannonův index diverziy (B) a NMDS analýza (C) pro volně žijící jedince druhu *T. rubida*. Všechny analýzy ukazují nesignifikantní rozdíly mezi mikrobiomy *T. cruzi* negativních a *T. cruzi* pozitivních vzorků (NMDS analýza hodnocena na hladině významnosti 99%, $P = 0,043$).



Obr. P8: Prostá bohatost mikrobiomu „Richness“ (A) a Shannonův index diverziy (B) pro volně žijící jedince druhu *T. sanguisuga*. Obě analýzy ukazují nesignifikantní rozdíly mezi mikrobiomy *T. cruzi* negativních a *T. cruzi* pozitivních vzorků.