

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Diplomová práce

2023

Bc. Natália Farmadin

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Mikrobiómy krvsajúcich členovcov z púštnych oblastí Spojených štátov amerických

Diplomová práca

Bc. Natália Farmadin

Školiteľka: doc. RNDr. Eva Nováková, Ph.D.

České Budějovice 2023

Farmadin, N., 2023: **Mikrobiómy krvsajúcich členovcov z púštnych oblastí Spojených štátov amerických.** [Microbiomes of blood-feeding arthropods from american deserts. Mgr. Thesis, in Slovak.] – 41 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

My diploma thesis aims to understand the content of microbiomes in several North American *Triatoma* species as the important vectors of Chagas disease. In particular, I attempted to trace sources of bacterial taxa found in their microbiome profiles. I investigated both ecological and evolutionary background. This included microbiomes of sympatric populations of soft ticks, *Ornithodoros turicata*, and related assassin bug species, as well as the microbiome of the vertebrate nest (as the natural environment for these arthropods). The results presented in my thesis suggest that both *Triatomas* and ticks share some bacteria and acquire these from three possible sources: microbiome of the vertebrate nest, vertebrate skin microbiome, and pathogens circulating in vertebrate blood. Regardless the apparent influx of the host and nest derived bacteria, microbiomes of different *Triatoma* species remain species specific.

Prehlásenie:

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 13.4.2023

.....
Podpis

Pod'akovanie:

V prvom rade by som chcela poďakovať mojej školiteľke doc. RNDr. Eve Novákové, Ph.D. za cenné poznatky, rady a pripomienky, ktorými mi bola nápomocná pri písaní mojej diplomovej práce. Taktiež by som jej chcela poďakovať za umožnenie účasti na zbere jedincov v teréne v Spojených štátoch amerických. Ďalej by som chcela poďakovať celému tímu nášho laboratória za spoluprácu a pomoc.

Obsah:

1. Mikrobióm členovcov	1
1.1 Modelové organizmy.....	3
1.1.1 Mäkké kliešte <i>Ornithodoros turicata</i>	3
1.1.1.1 Životný cyklus mäkkých kliešťov	4
1.1.1.2 Patogény prenášané mäkkými kliešťami.....	4
1.1.1.3 Mikrobióm <i>O. Turicata</i>	6
1.1.2 <i>Hemiptera: Reduviidae</i>	6
1.1.2.1 <i>Triatominae</i>	7
1.1.2.1.1 Chagasova nemoc.....	9
1.1.2.1.2 Mikrobióm triatom	9
2. Ciele	11
3. Materiály a metódy.....	12
3.1 Materiál	12
3.2 Izolácia DNA a určenie druhov.....	13
3.3 Amplikonové sekvenovanie	14
3.4 Analýza dát.....	15
4. Výsledky.....	17
4.1 Mikrobióm kliešťa <i>Ornithodoros turicata</i>	17
4.2 Mikrobióm triatom	18
4.3 Určenie primárneho hostiteľa kliešťa <i>O. turicata</i> a triatom.....	20
4.4 Mikrobióm dravých ploštíc čeľade <i>Reduviidae</i>	21
4.5 Mikrobióm prostredia.....	23
4.6 Analýza podobnosti mikrobiómov na fylogenetickom pozadí hostiteľa	25
4.7 Fylogenetická analýza vybraných OTUs	25
5. Diskusia.....	27
6. Záver.....	31
7. Zoznam použitej literatúry	32

1. Mikrobióm členovcov

Mikrobióm je spoločenstvo mikroorganizmov ko-existujúcich so svojím hostiteľom a zahŕňa baktérie, vírusy, prvoky a jednobunečné huby (Sonenshine a Stewart 2021). Mikrobiálne osídlenie ovplyvňuje fyziologické procesy svojho hostiteľa ako trávenie, výživu, obranu proti patogénom, imunitu a môže mu prinášať rôzne výhody (Serrato-Salas a Gendrin 2022). Dôležitosť mikrobiómu členovcov sa dostáva čoraz viac do povedomia verejnosti a jeho poznanie sa zlepšuje vďaka dostupnosti sekvenčných metód ako Next generation sequencing (Sonenshine a Stewart 2021). V minulosti sa používali výhradne kultivačné metódy, ktoré náš pohľad do diverzity mikrobiómu značne obmedzovali. Bežne používanou metódou je dnes amplikonová analýza 16S rRNA génu, ktorá poskytuje kompletnú informáciu o mikrobiómovom profile (Yun et al. 2014). Mikrobióm zahŕňa hlavne baktérie, ktoré so svojím hostiteľom vytvárajú symbiotické vzťahy rôznej povahy a dôležitosti. Počas evolúcie sa niektoré z nich adaptovali na stabilné prostredie hostiteľského organizmu a stali sa z nich obligátne symbionti. Obligátne symbionti (primárny) sú typicky baktérie s redukovaným genómom, plne závislé na hostiteľovi a pre jeho prežitie majú zásadný vplyv. Fakultatívne symbionti (sekundárny) sú evolučne mladší, hostiteľ na nich nie je priamo závislý, symbióza s takýmito baktériami môže zvyšovať fitness hostiteľa, či odolnosť voči prostrediu. Za určitých podmienok môžu mať vzťahy s fakultatívnymi symbiontmi pre hostiteľa aj negatívny vplyv (baktérie narušujúce pomery pohlavia a ovplyvňujúce štruktúru hostiteľskej populácie) (Gottlieb et al. 2015, Salcedo-Porras et al. 2020).

U krvsajúcich členovcov sú hlavne dôležité obligátne symbiotické baktérie produkujúce esenciálne látky, ktoré sa v krvi nenachádzajú ako B vitamíny. (Narasimhan et al. 2021, Salcedo-Porras et al. 2020, Serrato-Salas a Gendrin 2022). Vzťah krvsajúcich členovcov (ako prenášačov savčích patogénov) s mikrobiómom má však dôležitý presah práve na vzťah s prenášaným patogénom. Mikrobióm vektora je vnímaný ako prostredie v ktorom patogén žije, rozmnožuje sa a môže hrať významnú úlohu v jeho prenose. Znalosť mikrobiómu, vrátane jeho diverzity, vývoja a faktorov ktoré môžu profil konkrétneho vektora ovplyvňovať je tak zásadný pre chápanie epidemiológie patogéna (Sonenshine a Stewart 2021).

Medzi najpreštudovanejšie patria mikrobiómy komárov, v ktorých dominuje relatívne malý počet bakteriálnych táx. Zloženie mikrobiómu väčšiny preštudovaných druhov je ovplyvnené prostredím, životnou fázou a pohlavím jedinca. Mikrobiómy rodov *Anopheles*, *Aedes* a *Culex* ako najdôležitejšie patogén-prenášajúce vektory sú predmetom desiatok štúdií (Duguma et al.

2015, Scolari et al. 2019, Tainchum et al. 2020). Baktérie mikrobiómu komárov interagujú s patogénmi, ako sú patogénny prvoci rodu *Plasmodium*, môžu uľahčovať alebo inhibovať ich množenie. Odstránenie baktérii, ktoré podporujú vývoj patogéna by mohlo blokovať jeho prenos (Aželytè et al. 2022). Príkladom baktérie podporujúcich množenie vektora je *Asaia bogorensis*, ktorá mení pH črevného prostredia v prospech gametogenézy *Plasmodium berghei* (Wang et al. 2021). Podobne vysoká relatívna abundancia baktérii zo skupiny *Enterobacteriaceae* koreluje so zvýšeným množením *Plasmodium falciparum* u *Anopheles gambiae* (Boissière et al. 2012). Nástroje k priamej manipulácii s mikrobiómom sú stále limitované, ak chceme odstrániť iba jednu bakteriálnu taxu bez ovplyvnenia iných. Alternatívou je manipulácia mikrobiómom dosiahnutá protilátkami obsiahnutými z hostiteľa a vyvinutými očkovaním (Aželytè et al. 2022). Napríklad na zníženie množstva baktérii *Enterobacteriaceae* sa používa vakcína obsahujúca baktériu *Escherichia coli*. (Mateos-Hernández et al. 2021). Vakcína obsahujúca *E. coli* bola použitá na imunizáciu vtákov, na ktorých sali komári *Culex quinquefasciatus* a spôsobila zníženie počtu oocyst *Plasmodium relictum*, ktoré zapríčiňuje maláriu vtákov (Aželytè et al. 2022). Ďalšou stratégiou ako ovplyvniť mikrobióm komárov je za pomoci baktérie *Wolbachie*, ktorá je vďaka cytoplazmatickej inkompatibilite schopná propagácie v hostiteľskej populácii a niektoré jej línie rovno blokujú prenos arbovírusov. Prenáša sa na potomstvo vertikálne, čo uľahčuje jej množenie v populácii. U komárov *Aedes aegypti*, ktoré sú primárnym vektorom pre vírus Ziky a Dengue nie je *Wolbachia* bežne zastúpenou bakteriálnou taxou. V už úspešne uplatnenej stratégii blokovaníu prenosu vírusov bola *Wolbachia* umelo introdukovaná do komárov *A. aegypti* na začiatku ich životného cyklu mikroinjekciou do vajíčok (Hugo et al. 2022). Kontrola vektora cez jeho mikrobióm je v súčasnej dobe jedinou účinnou metódou proti šíreniu vírusov Ziky a Dengue, pretože neexistuje očkovanie ani liečba týchto vírusov (Bian et al. 2010, Hugo et al. 2022).

Pomerne dobre preskúmanou oblasťou je i mikrobióm tvrdých kliešťov, ako vektorov rôznych patogénov (borrélie, bebézie, a iné) (Markowicz et al. 2021). Mikrobióm tvrdých kliešťov obsahuje dôležitých endosymbiontov *Rickettsia*, *Francisella*, *Coxiella*, ktorý produkujú potrebné živiny pre svojho hostiteľa (Bonnet et al. 2017) a obsahujú aj baktérie ovplyvňujúce prenos patogéna. Napríklad u kliešťa *Amblyomma americanum* prítomnosť *Coxiella*-like symbiontov môže potencionálne ovplyvňovať prenos pôvodcu ehrlichiozy (*Ehrlichia chaffeensis*) (Klyachko et al. 2007). Mikrobiómom mäkkých kliešťov, ktorí sú tiež vektorom rôznych patogénov sa zaoberalo iba pár publikácii, ktoré výhradne popisujú bakteriálne taxy obsiahnuté v mikrobióme.

Čoraz viac štúdií sa zaoberá popisovaním bakteriálnych tax krvsajúcich členovcov, vrátane triatom. Mikrobiómy krvsajúcich členovcov sú druhovo špecifické a dokonca dokážeme identifikovať faktory ovplyvňujúce mikrobióm ako fylogenetické vzťahy, geografický pôvod alebo vývojové štádium (Sonenshine a Stewart 2021, Brown et al. 2020). Zatiaľ ale nie je známe ako sa baktérie do mikrobiómu dostávajú a častokrát ani ich konkrétny vplyv na hostiteľa. U niektorých krvsajúcich členovcov sa potvrdili interakcie medzi baktériami mikrobiómu a prenosom patogéna, u komárov dokonca došlo k manipulácii mikrobiómu a k nájdeniu spôsobu zníženia prenosu patogéna ako je zmienené vyššie. V tejto práci sme zvolili širší ekologický rámec a študujeme mikrobiómy triatom na bezprostrednom pozadí ich prirodzeného stanovišťa, kde sa symparicky vyskytujú ich dravé príbuzné ploštice čeľade *Reduviidae* a ďalší krvsajúci vektor, *O. turicata*. Tiež analyzujeme prostredie a primárneho hostiteľa u krvsajúcich členovcov.

1.1 Modelové organizmy

1.1.1 Mäkké kliešte *Ornithodoros turicata*

Argasidae tzv. mäkké kliešte a *Ixodidae* tzv. tvrdé kliešte sú dve skupiny kliešťov, ktoré sa odlišujú biologickými vlastnosťami a morfológiou. Zaraďujú sa medzi hematofágy a ektoparazity, krv sajú predovšetkým na cicavcoch, ale aj vtákoch či plazoch. Medzi 193 druhov mäkkých kliešťov sa zaraďuje druh *Ornithodoros turicata*, ktorým sa zaoberám v tejto diplomovej práci. (Manzano-Román et al., 2012).

Mäkké kliešte obývajú teplé oblasti, predovšetkým púšte, polopúšte a savany (stepi a prérie) (Capinera 2008). Mäkké kliešte druhu *Ornithodoros turicata* nachádzajú v Latinskej Amerike a na juhu Spojených štátov amerických. V Spojených štátoch amerických sa mäkké kliešte druhu *Ornithodoros turicata* vyskytujú v trópoch a subtrópoch, konkrétne bol ich výskyt zaznamenaný v štátoch: Arizona, California, Colorado, Florida, Kansas, Nové Mexiko, Oklahoma, Texas a Utah. Zatiaľ čo populáciu Texasu a ďalších západných štátov neoddeľujú žiadne geografické bariéry, populácia *O. turicata* na Floride je geograficky izolovaná od ostatných. (Donaldson et al. 2016). V Mexiku boli kliešte *O. turicata* nájdené v štátoch Chihuahua, Coahuila a Durango (Barraza-Guerrero et al. 2020; Krishnavajhala et al. 2021).

1.1.1.1 Životný cyklus mäkkých kliešťov

Životný cyklus mäkkých kliešťov je závislý na miernom poklese teplôt, ktoré dosahujú pri kolonizácii zastrešených mikrohabitatov. Tieto mikrohabitaty môžu byť hniezda alebo nory cicavcov, ktorý sú pre kliešte potencionálnymi hostiteľmi a vytvárajú správnu teplotu a vlhkosť prostredia pre dokončenie ich vývoja. Mäkké kliešte sa vyvíjajú z vajíčka, cez larvu a niekoľko nymfálnych štádií (2-8) po dospelého jedinca. Na prechod medzi vývojovými štádiami a ku kladeniu vajíčok dospelé samičky potrebujú aspoň raz sať krv stavovca ako hostiteľa (Dworkin et al. 2013, Vial 2020). Samička po príjme potravy nakladie 50-200 vajíčok, celkovo za život samička nakladie približne 1200 vajíčok. (Capinera 2008). Mäkké kliešte sa vyznačujú dlhovekosťou a i s dlhými prestávkami medzi príjmom potravy sa môžu dožiť až 25 rokov, v priemere sa kliešte druhu *Ornithodoros turicata* dožívajú asi 10 rokov (Bissett et al. 2018, Vial 2020). V laboratórnych podmienkach sa kliešť druhu *Ornithodoros tholozani* prežil bez príjmu potravy 10 rokov. U niektorých mäkkých kliešťov sa objavuje homoparazitizmus. Obvykle nymfy a samci, ktorí neprijali žiadnu potravu sajú na nasatých starších nymfách a samiciach, ktoré to bez následkov prežijú (Capinera 2008). Fyziologicky si mäkké kliešte vyvinuli adaptácie na rýchly príjem potravy, konkrétne pri saní krvi je im nápomocný rozťahujúci sa tegument a vylučovanie iontov a vody cez koxálne žľazy. Vylučovanie koxálnymi žľazami môžu využiť niektoré patogény. Napríklad borrélie sú exkretované aj do koxálnej tekutiny a môžu zapríčiniť prenos spirochét z kliešťa na kliešťa (Vial 2020).

1.1.1.2 Patogény prenášané mäkkými kliešťami druhu *O. turicata*

Mäkké kliešte sú medicínsky a veterinárne významné, pretože pôsobia ako vektory pre množstvo ľudských a zvieracích patogénov. *Ornithodoros turicata* je vektorom pre tick-borne relapsing fever (TBRF) a potenciálnym vektorom African swine fever virus (ASFV) (Golnar et al. 2019; Krishnavajhala et al. 2021). Človek prisatie kliešťa väčšinou necíti, po jeho odpadnutí, ale často pociťuje svrbenie a je možný vznik vredu v mieste sania alebo môže nastať alergická reakcia (Capinera 2008).

Pôvodcom TBRF je spirochéta *Borrelia turicatae* a vektorom je kliešť *Ornithodoros turicata*. Spirochéty prirodzene prechádzajú medzi krvou hostiteľa a vektorom. Hostiteľ sa nakazí takmer ihneď (do niekoľkých sekúnd) po prisatí infikovaným kliešťom (Boyle et al. 2014; Jakab et al. 2022). Kliešte sajú na hostiteľoch, ktorý oddychujú v svojich hniezdach a to prevažne v noci. Vertikálny prenos spirochét (transovariálny prenos) z matky na potomstvo je veľmi vzácny, takže larvy pri prvom saní krvi nebývajú nakazené spirochétami. Ak sa kliešť

raz stane infekčný, zostáva infekčný po celý život cez všetky vývojové štádiá (transštadiálny prenos). Spirochéty po nakazení kliešťa zostávajú v slinných žľazách, to umožňuje rýchly prechod spirochét do ďalšieho hostiteľa. (Dworkin et al. 2013).

TBRF je charakterizovaná opakujúcimi sa horúčkami s nešpecifickými príznakmi ako bolesť hlavy, svalov, kĺbov, triaška či brušné ťažkosti (Dworkin et al. 2013). Kvôli týmto nešpecifickým príznakom je diagnóza často zameňovaná. K diagnostike sa využíva rozter krvi pacienta, kde môžu byť mikroskopicky viditeľné spirochéty a molekulárne metódy. Z molekulárnych metód sa využíva qPCR so špecifickými primerami a próbami pre *B. turicatae glpQ* gén, či imunoblotting, kde sa porovnáva sérum pacienta voči proteínovému lyzátu *B. turicatae* a rBipA (recombinant *Borrelia* immunogenic protein A). U kliešťov sa na zisťovanie pozitívnej infekcie boréliami používa sekvenovanie flagellinu B (*flaB*), 16S rRNA a DNA gyrázy B (*gyrB*) génov. Nákaza je spojovaná s turistikou, s prieskumníkmi jaskýň, migrantami a personálom armády. Najst' prisateľo kliešťa je pomerne vzácne, vďaka rýchlemu príjmu potravy týchto kliešťov a malej veľkosti kliešťov, hlavne u nedospelých instarov kliešťov (Bissett et al. 2018).

ASFV zostáva ako globálna hrozba pre chovy prasíat, vyskytuje od centrálnej Európy po Áziu a nedávno sa objavil na Dominikánskej republike a Haity (Gladue a Borca 2022). Potenciálnym vektorom v Spojených štátoch amerických sú mäkké kliešte *Ornithodoros coriaceus*, *Ornithodoros turicata*, a *Ornithodoros puertoricensis*. V USA existujú potencionalny hostelia pre ASFV, konkrétne domáce prasa (*Sus scrofa domesticus*) a divé prasa (*Sus scrofa*) (Golnar et al. 2019).

ASFV je vírus z čeľade *Asfarviridae*, je to jediný známy DNA arbovírus, ktorý spôsobuje závažné infekčné ochorenie s takmer 100% smrtnosťou. Zatiaľ neexistuje vakcína na tento vírus a jeho eliminácia spočíva v karanténe a eliminácii počtu nakazených zvierat. Vírus sa primárne šíri vektorom, teda kliešťom rodu *Ornithodoros*. Ak sa kliešť stane vektorom pre ASFV zostáva ním do konca života. ASFV vírus prenáša medzi kliešťami sexuálne z infikovaného samčeka na samičku, ale aj transovariálne zo samičky na potomstvo a transštadiálne medzi jednotlivými štádiami v životnom cykle (Gaudreault et al. 2020). K včasnej diagnostike sa používa PCR pre vysokú špecifitu a senzitivitu detekcie ASFV vírusu u domácich aj divokých prasíat a kliešťov (Zhaoyao et al. 2022).

1.1.1.3 Mikrobióm *O. turicata*

Mikrobióm kliešťov obsahuje endosymbiontov a patogény, ktorý tvoria komplexný dynamický ekosystém, v ktorom medzi sebou koexistujú. Endosymbionti majú benefičné role pre svojho hostiteľa konkrétne pre kondíciu, vývoj, reprodukciu, imunitu, výživu a obranu proti stresu z prostredia. Patogény využívajú svojho hostiteľa k ďalšiemu prenosu. Mikrobiómom trvdých kliešťov sa zaoberajú stovky štúdií, mäkké kliešte i kvôli svojmu menšiemu epidemiologickému významu zostávajú zabudnuté. Existuje jedna štúdia o mikrobiome mäkkého kliešťa *O. turicata* z Mexika, druhá štúdia je o laboratórnej kolónii z Floridy a zameriava sa na fylogenetický pôvod *Occidentie* (Barraza-Guerrero et al. 2020, Liu et al. 2022). Mikrobióm kliešťov *O. turicata* od Barraza-Guerrero et al. 2020, bol skúmaný kvôli ich hrozbe pre púštne korytnačky *Gopherus flavomarginatus*, pre ktoré sú potencionálnou hrozbou v prenose patogénov. Medzi najpočetnejšie taxy ich mikrobiómu patria: *Midichloria* (51.13%), *Coxiella* (13.25%), *Streptomyces* (5.08%), *Nocardioidea* (5.06%), *Anaplasma* (4.29%), *Clostridium* (2.19%). Potencionálne patogény púštnych korytnačiek konkrétne *Mycoplasma*, *Pasteurella testudinis*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis*, *Coxiella burnetii*, *Anaplasma phagocytophilum*, a *Neorhlichia* boli detekované v mikrobiome *O. turicata* v malom množstve (Barraza-Guerrero et al. 2020). V publikácii od Liu et al. 2022 u laboratórnej kolónii *O. turicata* bol v mikrobióme detekovaný potencionálny endosymbiont *Occidentia* z čeľade *Rickettsiaceae*, baktérie z *Rickettsiaceae* sú známe ako endosymbionti u iných kliešťov, ale tento potencionálny symbiont sa rovnako ako iné baktérie z *Rickettsiaceae* sa v mexickej populácii nevyskytli.

1.1.2 Hemiptera: Reduviidae

Zástupcovia čeľade *Reduviidae* sú jedným z najúspešnejších predátorov na základe ich počtu druhov (~6,800 druhov) a obývania rôznych ekosystémov (Hwang a Weirauch 2012). Najčastejšie však obývajú teplé prostredie, vyhľadávajú úkryty či hniezda stavovcov, ale radi obývajú aj miesta pod kameňmi či v kôre spadnutých stromov. Väčšina jedincov tejto čeľade je tmavej farby (čiernej a hnedej) so znakmi červenej alebo oranžovej, ale niektorí jedinci sú svetle vyfarbení ako napríklad *Zelus longipes* s veľkou prevahou oranžovej (Capinera 2008, Kalsi a Seal 2011). Pre ploštice čeľade *Reduviidae* je typický predĺžený tvar hlavy s priečnou ryhou za zloženými očami a segmentovaný proboscis. Dospelý jedinci sú okrídlený a ich nohy sú prispôsobené k lovu pomocou chĺpkov a často i lepivého sekrétu pre lepšie uchopenie a znehybnenie koristi (Capinera 2008). Po uchopení koristi do nej zabodnú proboscis a obeť paralyzujú peptidovými neurotoxínmi v slinách a usmrta ju. Tieto sliny tiež umožnia likviditu

orgánov a následné vysatie telných tekutín (Walker et al. 2017). Obeť týchto dravých ploštíc môže byť väčšia než oni sami, napríklad druh *Stenolemus* sa špecializuje na pavúkov (Soley 2016). Pri love a tiež úniku pred nepriateľmi používajú ploštice maskovacie mechanizmy, niektoré nymfy (*Cetherinae*, *Salyavatinae*, *Triatominae*) sa maskujú čiastočkami pôdy alebo zvyškami uhynutého hmyzu (Capinera 2008, Ruxton a Stevens 2015).

Dravé ploštice čeľadi *Reduviidae* môžu napomáhať v biologickej kontrole niektorých škodcov, tým že zabíjajú viac obetí ako je potrebné pre ich prežitie a špecializujú sa na jeden druh obeť. Niektoré druhy lovia šváby a posteľné ploštice, iné napríklad rod *Zelus* sa môžu podieľať na regulácii škodcov na bavlně (Sahayaraj et al. 2020). Pre človeka môžu mať tieto ploštice aj negatívny dopad. Pri neopatrnom manipulovaní môže dôjsť k uhryznutiu, ktoré môže byť bolestivé a spôsobovať vážne alergické reakcie až anafylaktický šok (Anderson et al. 2015). Medicínsky významnejšie sú ale ploštice *Triatominae*, ktoré môžu prenášať Chagasovu nemoc (Vieira et al. 2018).

Podčeľaď *Triatominae* sa líši od ostatných podčeľadi *Reduviidae* zdrojom potravy, ako jediné sú *Triatominae* krvsajúce, ostatné druhy ploštíc sú dravé a živia sa hemolymfou ulovených bezstavovcov (Walker et al. 2017). *Triatominae* ako jediná krvsajúca podčeľaď si musela vytvoriť rôzne adaptácie oproti iným plošticiam čeľade *Reduviidae*, aby mohla efektívne využívať krv ako zdroj potravy. Predpokladáme, že medzi tieto adaptácie spadá aj rozdielne bakteriálne spoločenstvo v mikrobióme v porovnaní s dravými plošticami, ktoré súvisí s krvou ako potravou.

1.1.2.1 *Triatominae*

Triatomy sú jedinou krvsajúcou skupinou z čeľade *Reduviidae* zahrňujúcou asi 150 druhov, blízko príbuzných dravým plošticiam, z ktorých sa pravdepodobne vyvinuli. Na prechod z predátorského spôsobu života na hematofágiu museli triatomy prejsť morfológickými a inými modifikáciami (Monteiro et al. 2018). Predpokladáme, že jednou z modifikácií bola zmena v osídlení ich mikrobiómu, aby boli triatomy schopné efektívne využívať krv ako zdroj potravy. Ďalšou modifikáciou bola zmena zloženia slín, ktoré obsahujú enzýmy (antikoagulanty, apyrázy, agregáčné faktory krvných doštičiek, a iné) potrebné na príjem a trávenie krvi. Požitie krvi je dôležité pre dokončenie vývojových štádií počas životného cyklu a u dospelých jedincov je potrebné k reprodukci (kladeniu vajíčok). Z vajíčok triatom sa vyliahnu neokrídlené nymfy, ktoré sa vyvíjajú cez 5 instarov na okrídleného dospelého jedinca. Na prechod medzi jednotlivými štádiami je krv hostiteľa dôležitým faktorom a dĺžka života sa u triatom pohybuje

okolo jedného roku (Capinera 2008). Triatomy v Severnej Amerike sa považujú za známu hrozbu v prenose Chagasovej nemoci (Klotz et al. 2014).

Triatomy sú medicínsky významným vektorom pre prenos *Trypanosoma cruzi*, ktorá spôsobuje Chagasovu nemoc. V Spojených štátoch amerických je známych 11 druhov potenciónálnych prenášačov Chagasovej nemoci: *Triatoma gerstaeckeri*, *T. incassata*, *T. indictiva*, *T. lecticularia*, *T. neotomae*, *T. protracta*, *T. recurva*, *T. rubida*, *T. rubrofasciata*, *T. sanguisuga* a *Paratriatoma hirsuta*. Všetky okrem *T. rubrofasciata* a *T. sanguisuga* sú potenciónálnymi prenášačmi aj v Mexiku (Bern et al. 2011).

Triatoma sa nakazí *T. cruzi* saním na infekčnom hostiteľovi, častokrát je to hlodavec *Neotoma albigula*, ktorej hniezdo triatomy obývajú (Klotz et al. 2014). To potvrdzuje aj informácia, že v Tuscone skoro 50% testovaných *Neotoma* sp. bolo pozitívnych na prítomnosť *T. cruzi* (Klotz et al. 2021). Po nákuze triatomy *T. cruzi* sa infekčnosť neprenáša transovariálne na potomstvo, takže potomstvo sa musí nakaziť saním krvi na hostiteľovi. Triatomy sajú krv preferenčne v noci, asi 20-30 minút a nespôsobujú hostiteľovi pri saní žiadnu bolesť (Capinera 2008). Počas sania krvi na koži hostiteľa zanechávajú svoje infekčné exkrementy, z ktorých sa hostiteľ nakazí pri mechanickom poškodení kožnej bariéry napríklad škriabaním, kedy sa *T. cruzi* dostane do krvi hostiteľa (Bern et al. 2020, Vieira et al. 2018). Aj keď hostiteľom triatom sú prevažne voľne žijúce zvieratá, triatomy v súvislosti s prenosom *T. cruzi* sú hrozbou aj pre ľudí (Bern et al. 2020).

Na základe preferenčného habitatu triatom existujú 2 cykly prenosu *T. cruzi*: sylvatický a domestiký. Sylvatický cyklus zahŕňa voľne žijúce zvieratá, ktoré sa nakazia od vektorov (triatom) žijúcich v ich hniezdach. Avšak aj u tohto cyklu sú ohrození ľudia, ktorí žijú blízko potenciónálnych habitatov triatom, pretože triatomy sú často priťahované svetlom obydli, ktoré môžu sporadicky navštevovať. U domestikého cyklu sa triatomy plne prispôbili na život v ľudských obydliach. U tohto prípadu nákaza ľudí pochádza z prenosu od domácich zvierat. Vektory možno nájsť na stenách či slamených strechách obydli vo vidieckych oblastiach. Potenciálnou hrozbou sa stáva, že triatomy môžu tieto cykly striedať (Groom et al. 2017).

Dnes je medzi ľuďmi známe, že triatomy sú pôvodcom Chagasovej nemoci, a preto sa snažia eliminovať kontakt s nimi. Na boj proti triatomám sa ponúkajú pesticídy, na ktoré sa triatomy stávajú časom rezistentné (Santo-Orihuela et al. 2017). Ďalej ľudia používajú prírodné prostriedky ako niektoré druhy rastlín (*Salvia*, *Annona* a iné), ktoré môžu zvyšovať smrtnosť triatom, ale ich účinnosť nie je vysoká (do 50%). V boji proti triatomám je účinné odstrániť

a pravidelne čistiť z okolia ľudského obydľia potencionalne vhodné habitaty pre triatomy. To zahŕňa obydľia pre domáce zvieratá, hromady stavebného odpadu, dreva či slamy (Capinera 2008).

1.1.2.1.1 Chagasova nemoc

Chagasova nemoc postihuje vysoké percento ľudí v strednej a Južnej Amerike a je vysoko poddiagnostikovaná. Nediagnostika Chagasovej nemoci je nebezpečná s súvislosťou s chronickou kardiatickou formou nemoci, ktorá môže končiť náhlým zlyhaním srdca (Bern et al. 2020). Chagasovu nemoc objavil brazílsky doktor Carlos Chagas v roku 1909. Popísal, že za jej vznikom je prvok *Trypanosoma cruzi* a vektorom sú triatomy (Capinera 2008). Najčastejším prenosom Chagasovej nemoci je prenos pomocou vektora, ale sú možné aj iné spôsoby nákazy ako cez transfúziu, transplantáciu orgánov, z matky na dieťa, či z triatomami kontaminovanej potravy alebo vody (Groom et. al 2017).

Primárny rezervoár *T. cruzi* sa líši medzi západnou a východnou Amerikou. Na západe Ameriky sú najčastejšie infikované *T. cruzi* hlodavce rodu *Neotoma*, ale aj iné hlodavce, medvedíky čistotné, skunky a kojoty. Na východe Ameriky sú rezervoárom *T. cruzi* medvedíky čistotné, hmyzožravce, pásavce a skunky (Bern et. al 2011).

Chagasova nemoc sa delí na dve fázy: akútna a chronická. V akútnej fáze môže dochádzať k horúčke, zväčšeniu uzlín, hepatosplenomegálii, myokarditíde, ale často sa je táto fáza asymtomatická. Jedna tretina infikovaných si vyvinie chronickú Chagasovu nemoc (neurčitú, gastrickú alebo kardiatickú formu) v priebehu niekoľkých rokov či desaťročí (Bern et. al 2011, Groom et. al 2017). V akútnej fáze sú trypomastigoti detekovateľný v nekoagulovanej krvi mikroskopicky. Parazitémia sa znižuje asi po 90 dňoch po infikovaní a aj bez liečby prestáva byť mikroskopicky detekovateľná a je potrebné použitie PCR metódy (Bern et. al 2011). Na diagnostiku chronickej fáze nemoci sa využívajú sérologické metódy na zistenie protilátok IgG proti *T. cruzi*. Sú to konkrétne ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) a IFA (immunofluorescent-antibody assay). Ani jedna sérologická metóda nie je dostatočne citlivá a špecifická, preto sa k diagnostike chronickej fáze používajú 2 sérologické testy s rozdielnymi antigénmi (Forsyth et al. 2022). Nifurtimox a benznidazole sú jediné lieky s potvrdenou účinnosťou proti Chagasovej nemoci, majú ale veľa nežiadúcich účinkov (Bern et. al 2011).

1.1.2.1.2 Mikrobióm triatom

Práce na mikrobiómoch triatom sú početnejšie, ale často výhradne popisné, takže sa zatiaľ nevie veľa o pôvode baktérii, ktoré v mikrobióme nachádzame. Hlavné osídlenie baktérii u triatom sa nachádza v lumen čreva, existujú i baktérie, ktoré vstupujú do iných orgánov a hemolymfy, ale nie je známe, že by s nimi triatomy vytvárali vzťahy ako s primárnymi symbiontami, ani nemajú akékoľvek špecializované symbiotické orgány, ktoré sú pre iné hematofágne členovce typické (Beard et al. 2002). Pravdepodobným symbiontom iného hmyzu vrátane triatom môže byť *Arsenophonus*, ktorý bol niekoľkokrát detekovaný u triatom (Hypša a Dale 1997, Mann et al. 2020). Na mikrobióme čreva severoamerických triatom sa podieľalo niekoľko štúdií, ktoré prispeli k ich základnej charakterizácii. Vo všeobecnosti mikrobiom triatom ovplyvňujú základné faktory: ontogenéza, identita jedinca, pravdepodobne tiež prostredie a hostiteľ (Mann et al. 2020, Brown et al. 2020). Triatomy počas vývoja strácajú bakteriálnu diverzitu mikrobiómu, takže v dospelcov už väčšinou dominuje iba jedna bakteriálna taxa. Príkladom je *Dietzia*, ktorá je dominantnou taxou u dospelých jedincov druhov *T. rubida*, *T. protracta* a *T. lecticularia*, ale nenachádza sa u fylogeneticky vzdialenejších druhov *T. gerstaeckeri* a *T. sanguisuga*, to poukazuje na ovplyvnenie mikrobiómu druhom jedinca (Brown et al. 2020, Sonenshine a Stewart 2021).

Je tiež známe, že baktérie mikrobiómu triatom sú v priamom kontakte s patogénom *T. cruzi*, teda s ním môžu priamo (navzájom si kompetujú o zdroje živín), či nepriamo (imunologická odpoveď) interagovať pomocou rôznych mechanizmov. Dokonca bola zistená korelácia medzi nákazou *T. cruzi* a zvýšením diverzity mikrobiómu (Eberhard et al. 2022, Rodríguez-Ruano et al. 2018). Znalosť, či ovplyvňuje *T. cruzi* mikrobióm, môže napomôcť k prípadnému zabráneniu jej prenosu. Anti-trypanosomálna aktivita bola experimentálne zistená u baktérie *Serratia marcescens* u triatomy *Rhodnius prolixus*, kde mala negatívny dopad na prežitie a replikáciu *T. cruzi* (de Motta et al. 2018, Azambuja et al. 2004). K týmto manipuláciám mikrobiomu sa dostávame vďaka aplikačným teóriám a pokladaniu funkčných otázok na základe poznatkov o mikrobióme.

2. Ciele

- 1) Charakterizovať mikrobióm mäkkého kliešťa *Ornithodoros turicata*
- 2) Posúdiť možné konvergenzie medzi mikrobiómami mäkkého kliešťa *O. turicata*, triatomami a triatomám príbuznými dravými plošticiami
- 3) Zistiť možný vplyv prostredia na bakteriálne taxy v mikrobióme

3. Materiály a metódy

3.1 Materiál

Zameraním tejto štúdie bolo porovnanie mikrobiómov z dvoch hľadísk: fylogeneticky (triatomy a zákernice) na základe diéty (triatomy a mäkké kliešte) a v porovnaní s prostredím. Čo bol jeden z cieľov mojej diplomovej práce, okrem charakteristiky mikrobiómu mäkkého kliešťa druhu *Ornithodoros turicata*. Tento projekt sa skladal zo zberu vzoriek, izolácie DNA, určenia druhu vzoriek a bioinformatickej analýzy dát. Ja som sa k tomuto projektu pridala až pri bioinformatickej analýze dát. Na zbere, izolácii DNA a určení druhu som sa podieľala v roku 2022. Celkovo bolo nazbieraných 231 vzoriek počas 4 rokov (2017-2021) v Spojených štátoch amerických z hniezd hlodavca druhu *Neotoma albigula*, konkrétne z Arizony (n=164), Floridy (n=12), Georgii (n=10) a Texasu (n=45). Vzorky reprezentujú: triatomy v rôznych vývojových štádiách (n=110), dravé ploštice *Reduviidae* (n=37) a mäkké kliešte *Ornithodoros turicata* (n=84). Počty zozbieraných jedincov rozdelené podľa lokalít sú zobrazené v Tabuľke č.1. Pri každom jedincovi boli zaznamenané súradnice hniezda, z ktorého bol jedinec odobraný, dátum zberu, vývojové štádium, u dospelých jedincov ich pohlavie a ak bolo možné morfológické určenie druhu. Z niektorých hniezd boli odobrané vzorky pôdy na analýzu mikrobiómu prostredia. Mimo hniezd bolo zozbieraných 10 jedincov dravých ploštíc čeľade *Reduviidae* z lokalít: Las Cienegas National Conservation Area (LCNCA) a the University of Arizona Desert Station (DS) v Tucsone, AZ; Gainesville county, FL; Georgia national forest (GANF) a Sapelo Island, GA; Chaparral Wild Life Management Area (Chaparral) a Lackland Air Force Base (LacklandAFB), San Antonio, TX.

Druh	ARIZONA	TEXAS	FLORIDA	GEORGIA
<i>T. rubida</i>	46	0	0	0
<i>T. sanguisuga</i>	0	1	5	0
<i>T. gerstaeckeri</i>	0	7	0	0
<i>T. lecticularia</i>	0	12	0	0
<i>T. protracta</i>	39	0	0	0
<i>Zelus longipes</i>	0	0	0	7
<i>Reduvius sonoraensis</i>	17	0	0	0
<i>Stenolemoides arizonensis</i>	3	0	0	0
<i>Ploiaria hirticornis</i>	0	0	7	3
<i>Ornithodoros turicata</i>	59	25	0	0

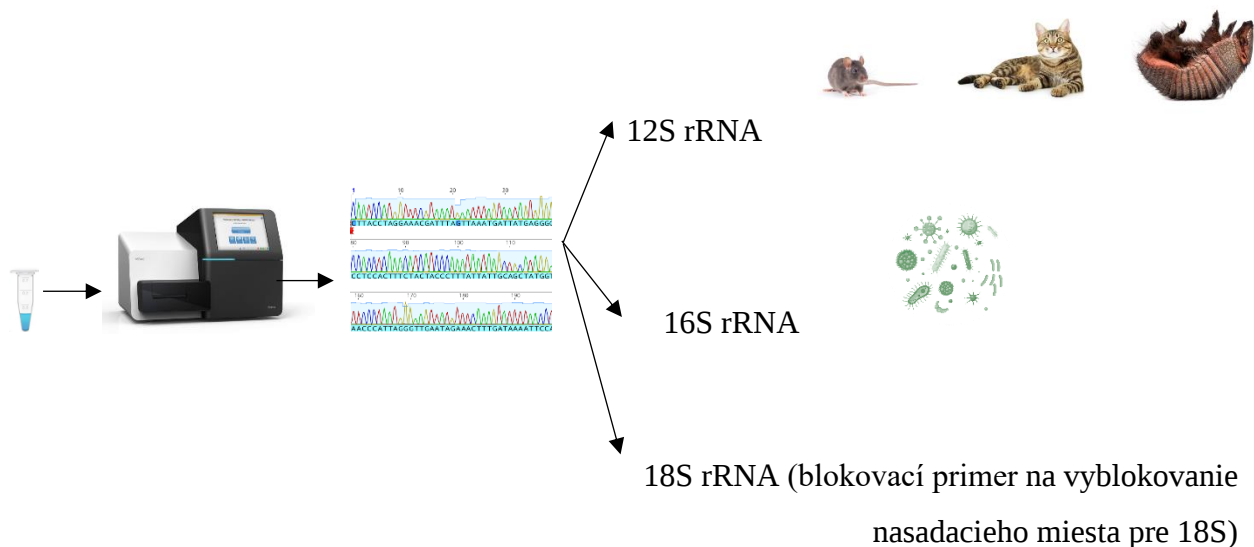
Tabuľka č. 1: Počet jedincov zozbieraných druhov rozdelených podľa lokalít.

3.2 Izolácia DNA a určenie druhov

Vzorky boli po zbere uchované v 100% etanole v -75 °C. Na extrakciu DNA z celej brušnej dutiny bol použitý DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). Na extrakciu DNA zo vzoriek pôdy bol použitý DNeasy PowerSoil Pro kit (Qiagen, Hilden, Germany). Mäkké kliešte boli druhovo určené na základe ich morfológie. Triatomy boli druhovo určené nie len na základe ich morfológie, ktorá hlavne u nedospelých jedincov je nejednoznačná, ale aj molekulárne. Triatomy boli zaradené na základe podobnosti sekvencie k referenčným sekvenciám zo štúdie Brown 2020 do druhov *T. rubida*, *T. lecticularia*, *T. sanguisuga* a *T. gerstaeckeri* pomocou primerov a amplifikácie 663 bp úseku genu cytochromu B (Monteiro et al., 2003). Na identifikáciu *T. protracta*, ktorú nedokážeme identifikovať pomocou predošlých primerov sme použili primery Tpr_F (5'- CCTACTATCCGCGGTTTCCTT-3') a Tpr_R (5'- GGGATGGATCGGAGAATTGCG-3') na získanie 380 bp (Brown et al. 2020). Dravé ploštice čeľade *Reduviidae* boli identifikované použitím sekvenácie s primerami 16sa (5'- CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') a 16sb (5'-CTCCGGTTTGAAGTCAGATCA-3') (Weirauch et al., 2009) a následnej fylogenetickej analýze, ktorú robila Anna Maria Floriano PhD.

3.3 Amplikonové sekvenovanie

Po extrakcii DNA a druhovom určení, nasledovalo amplikonové sekvenovanie a práca s dátami. Schéma postupu práce je zobrazená na Obr. č. 1. Zo sekvenovania boli získané 16S rRNA amplikony na určenie mikrobiómu a 12S rRNA amplikony na taxonomické zaradenie hostiteľov, z ktorých si krv nasali triatomy a kliešte. Pre 18S rRNA gén bol použitý blokovací primer prispôsobený podľa Brown et al., 2020. V prípade 18S rDNA sekvencií sme chceli zabrániť ich amplifikácii, preto sme použili blokačný primer, ktorý vyblokoval nasadacie miesta na géne 18S pre amplifikačné primery. V PCR tak vzniká minimum produktu 18S, o ktorý nemáme v tomto konkrétnom prípade záujem. Nedá sa podľa neho určiť druh triatom a na zistenie primárneho hostiteľa u krvsajúcich členovcov to tiež nie je ideálny marker. Na vytvorenie 16S rRNA amplikónov podľa Earth Microbiome Project štandardu bol použitý protokol <http://earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/16s/>. Multiplexovanie vzorkov a kontrol bolo založené na dvojitej barkódovacej stratégii zahrňujúcej 12bp Golay barkódy vo forward primeri a 5bp v reverse primeri. Ako kontrola kontaminácii boli použité 2 kontroly z extrakcie DNA (Blank2 a Blank21) a 4 kontroly z PCR amplifikácie (NK1, NK2, NK3 a NK11). Osem pozitívnych kontrol bolo použitých na vyhodnotenie barkodingového výstupu a zistenie možného amplifikačného biasu, zahrňovali tzv. „mock community“, ktoré obsahovali baktérie o známej distribúcii. Konkrétne ATCC® MSA-1000™ (vzorky MCE a MCE1) a ATCC® MSA-1001™ (vzorky MCS a MCS1), ktoré sa skladali z 10 druhov baktérii. ZymoBIOMICS™ Microbial Community DNA Standard II (vzorky PC1 a PC3) a ZymoBIOMICS™ Microbial Community DNA Standard II (vzorky PC2 and PC31), ktoré zahrňovali 8 bakteriálnych druhov a 2 druhy kvasiniek s logaritmickým rozložením. Vyčistenie PCR amplikonov bolo prevedené pomocou AMPure XP (Beckman Coulter) magnetických guľčiek. Na odstránenie vysokej koncentrácie blokovacieho primeru a nešpecifických amplikonov bol použitý Pippin Prep (Sage science). Knižnica pre vzorky pôdy bola zostavená rovnako ako je popísané vyššie a zahrňovala 1 PCR negatívnu kontrolu a 2 pozitívne. Knižnice boli sekvenované v dvoch čítaniach na MiSeq (Illumina) za použitia v2 a Nano v2 chemie s výstupom 2 x250 bp.



Obrázok č. 1: Schematické znázornenie postupu pri práci so vzorkami.

3.4 Analýza dát

Na analýzu dát zo 16S rRNA ampikonového sekvenovania bolo potrebné vytvoriť OTU tabuľku (OTU=Operational taxonomic unit) pomocou prispôbených skriptov z USEARCH v9.2.64. Dáta boli demultiplexované (spárovanie jednotlivých readov k vzorkám) a spojené z oboch sekvenovaní. Po kontrole kvality a orezaní primerov ampikony mali dĺžku 373nt. OTU tabuľka bola vytvorená s reprezentačným setom na základe 100% zhody sekvencií, ku ktorej boli de novo priradené OTUs pomocou USEARCH global alignment s 97% zhodou sekvencií. Taxonomické zaradenie bolo vytvorené hľadaním najpodobnejších sekvencií pomocou BlastN v SILVA databázi (https://www.arb-silva.de/no_cache/download/archive/release_138.1/Exports/). Ďalej nasledovalo filtrovanie možných kontaminácií v R studiu s použitím decontam package v1.1.0 (<https://rdrr.io/bioc/decontam/man/isContaminant.html>). Celkovo bolo za kontamináciu považovaných a vyradených 48 OTUs. *Wolbachia* (OTU_95), ktorá bola vyhodnotená ako kontaminácia, bola ďalej použitá pre analýzu. Vyskytovala sa s veľkou prevalenciou naprieč vzorkami a jej prítomnosť je u bezstavovcov obecná známa (Duron et al., 2017; Espino et al., 2009; Riano et al., 2009). Z výslednej OTU tabuľky boli odstránené aj všetky nebakteriálne OTUs. U vzoriek pôdy bol urobený „clean“ dataset na 2 refraktilných hodnotách (800 a 1000 readov na vzorku, seed=5), aby bolo zachované dostatočné množstvo vzoriek pôdy.

U krvsajúcich jedincov (triatom a kliešťov) sme boli schopní identifikovať hostiteľa, z ktorého si nasali krv na základe 12S rRNA. Z dát bola vytvorená OTU tabuľka pomocou USEARCH v9.2.64 s príkazmi `fastq_join`, `fastx_uniques` and `cluster_otus`. OTUs boli porovnané s BLASTn voči NCBI nukleotidovej databáze na zistenie taxonomického zaradenia (Sayers et. al, 2021). Na určenie primárneho hostiteľa bola použitá dominantná 12S rRNA OTU. Pre analýzu boli použité iba vzorky s viac ako 20 readmi pre gén 12 rDNA. V negatívnych kontrolách boli nájdené rody *Neotoma* a *Homo*, preto ich určenie bolo použité iba vo vzorkách, kde hodnoty najvyšších dvoch táx boli nad hodnotami v negatívnych kontrolách.

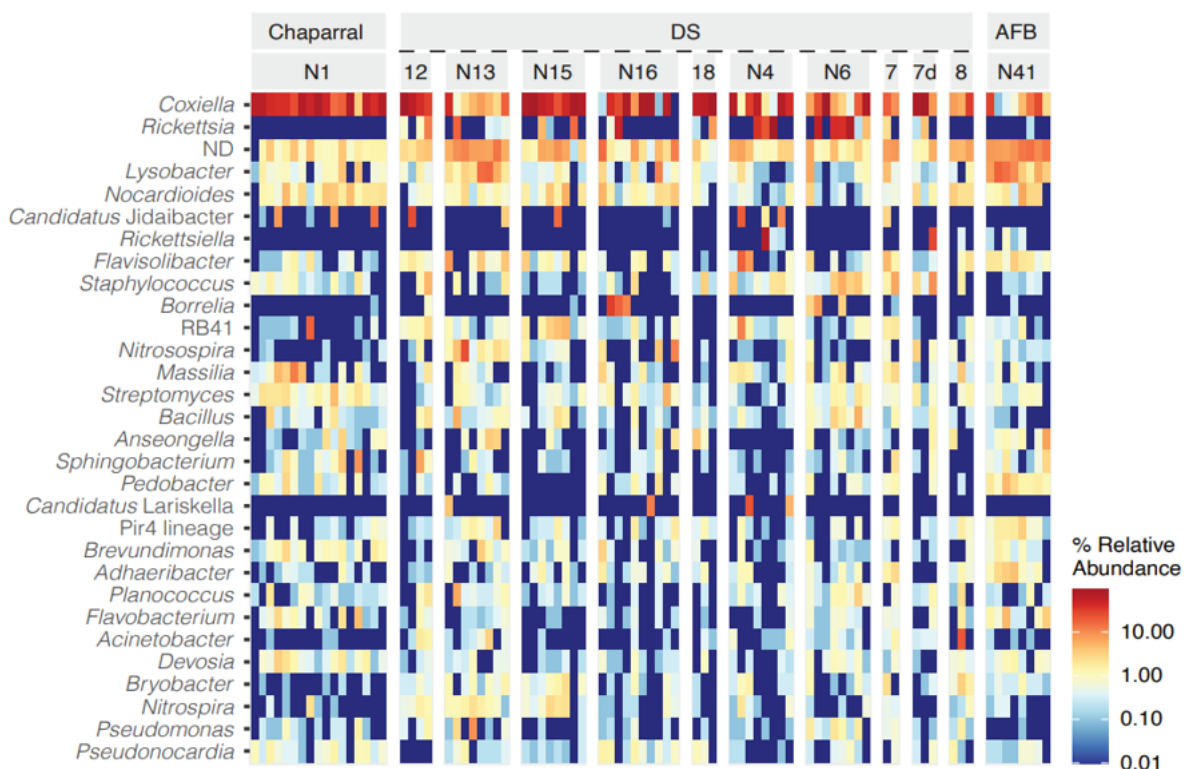
Celková analýza mikrobiómu, vrátane vizualizácie a štatistických testov, bola prevedená v R studiu pomocou `phyloseq` v1.42.0, `vegan` v2.6-4, `MicEco` v0.9.19 (<https://github.com/Russel88/MicEco/tree/v0.9.15>) a `MicroEco` v0.13.0 balíkov (Liu et al. 2021). Balíky `ggplot2` v3.4.0 a `svglite` v2.1.0 boli použité k porovnaniu pozitívnych kontrol. Balík `ggplot2` v3.4.0 bol tiež využitý k tvorbe grafických výstupov, ktoré boli následne upravované v Adobe Illustrator v25.4.1. Na identifikáciu zdieľaných baktérií bol použitý `ps_venn` v `MicEco` balíku s rôznymi frakciami (0.5, 0.8, 0.9 a 1). Zdieľaná frakcia je taká, ktorá je prítomná aspoň u 50% porovnávaných vzoriek (frakcia 0.5). Na prítomnosť zdieľaných baktérií sme sa pozerali v relaxovaných aj prísnych podmienkach (frakcia 1). V rámci analýzy boli vytvorené rôzne podskupiny na porovnanie odlišností u týchto skupín ako napríklad na základe stravy (krv verus hemolymfa). Ak sa konkrétne OTU objavilo aspoň u 30% vzoriek pôdy bolo vyhodnotené za identifikované (funkcia `ps_venn` v balíku `MicEco`).

K analýze mikrobiómu bola použitá trieda `trans_abundance`, vďaka ktorej boli nájdené najpočetnejšie taxy baktérií. Na zistenie alpha a beta diverzity boli použité triedy `trans_alpha` a `trans_beta`. Nájdené rozdiely v počte táx (alpha diverzity) boli štatisticky vyhodnotené na základe Dunn's Kruskal-Wallis komparizačného testu. Beta diverzita bola analyzovaná podľa Bray Curtisovej metódy. Zistenia boli vizualizované graficky, a to tvorbou nemetrického viacrozmerného škálovania (NMDS) a tvorbou heatmáp.

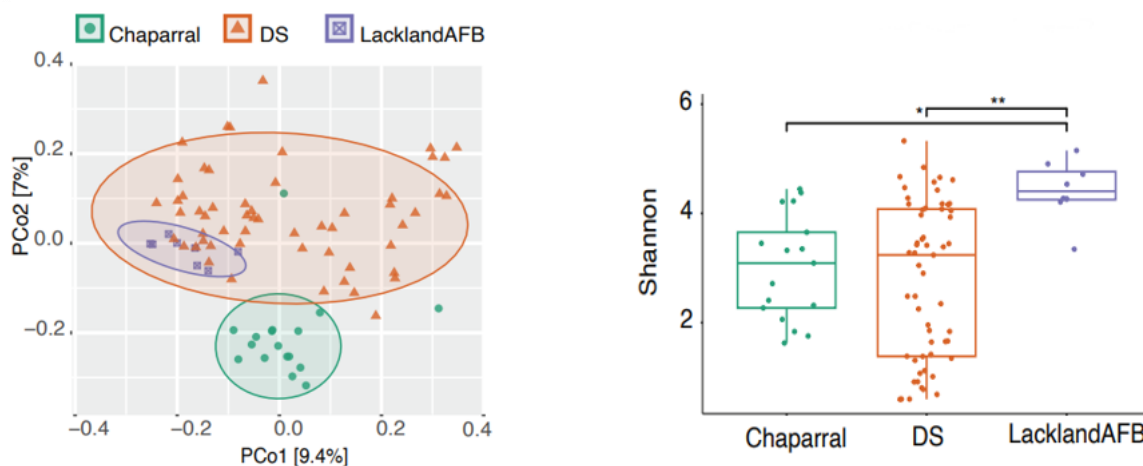
4. Výsledky

4.1 Mikrobiom mäkkého kliešťa *Ornithodoros turicata*

V dátach sú porovnávané hniezda (n=12) z troch lokalít: Desert Station, Tucson, Arizona; Chaparral Wildlife Management Area, Texas; Lackland Air Force Base, San Antonio, Texas. Najpočetnejšou bakteriálnou taxou u väčšiny analyzovaných jedincov je *Coxiella*.. Prítomnosť *Coxiella* bola potvrdená u 96% zo všetkých kliešťov. U niektorých jedincov bola prítomná *Rickettsia*, konkrétne u 32% kliešťov a jej distribúcia je viazaná na konkrétne hniezda, hlavne v Arizone. S veľkou početnosťou cez všetky hniezda sa objavujú baktérie *Lysobacter* a *Nocardioides*. U niektorých jedincov sa nachádza patogén *Borrelia*, prevažne v Arizone. Mikrobióm kliešťov obsahuje baktérie *Bacillus* a *Pseudomonas* (Obr. č. 2). V rámci lokalít z ktorých kliešte pochádzajú sa charakteristiky mikrobiómu líšia, na základe Bray Curtisových distancií, mikrobióm z oblasti Lackland Air Force Base má signifikantne vyššie hodnoty alfa diverzity (Obr. č. 3).



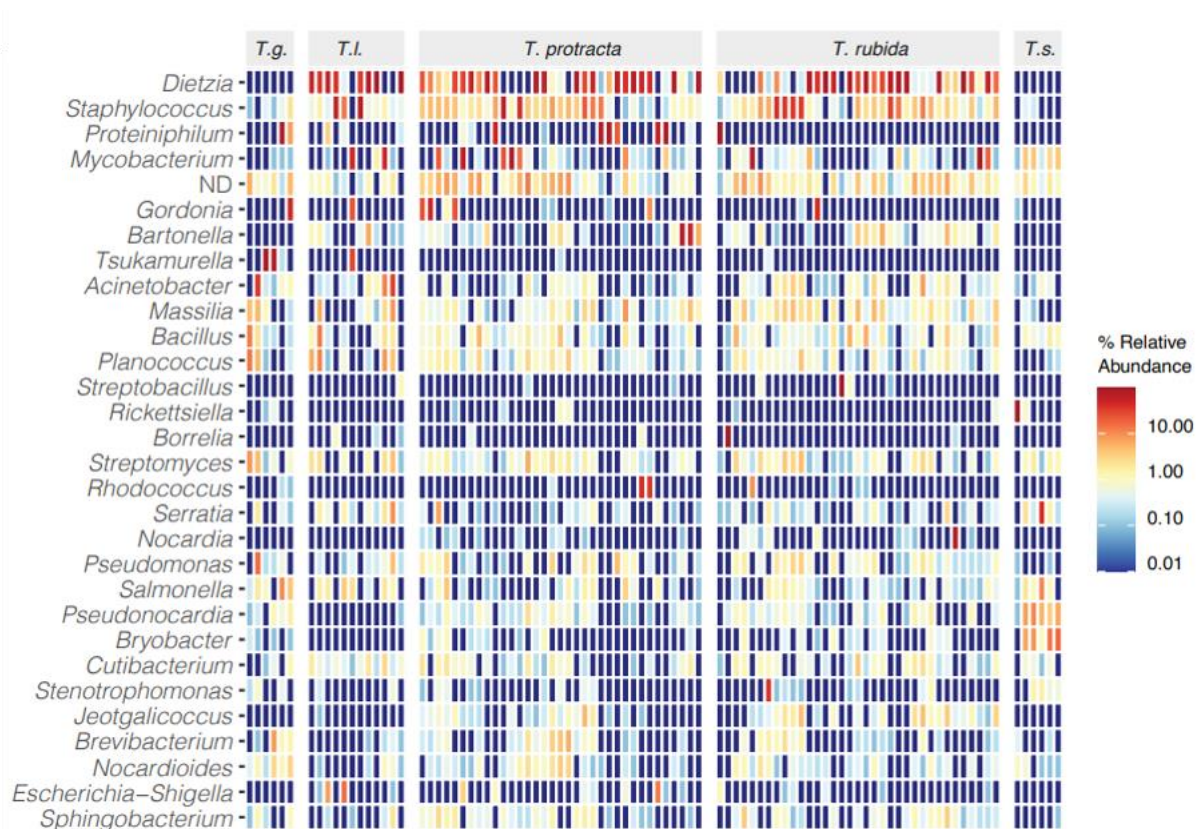
Obrázok č. 2: Heatmapa zobrazujúca tridsať najpočetnejších bakteriálnych tax v mikrobióme mäkkého kliešťa *O. turicata*. ND = nedefinovaná taxa na úrovni rodu. DS- Desert Station, Tucson, Arizona; Chaparral- Chaparral Wildlife Management Area, Texas; AFB- Lackland Air Force Base, San Antonio, Texas.



Obrázok č. 3: Analýza mikrobiómov *O. turicata* podľa lokalít na základe Bray Curtisových distancií. Rozdielne farby znázorňujú odlišné lokality. DS- Desert Station, Tucson, Arizona; Chaparral- Chaparral Wildlife Management Area, Texas; LacklandAFB- Lackland Air Force Base, San Antonio, Texas. Hviezdičky označujú štatisticky významné odlišnosti medzi mikrobiómami.

4.2 Mikrobióm triatom

Mikrobióm triatom bol porovnaný v rámci druhov: *T. gerstaeckeri*, *T. lectacularia*, *T. protracta*, *T. rubida* a *T. sanguisuga*. V mikrobióme triatom prevažuje pár bakteriálnych tax, ktoré sa zdajú byť druhovo špecifické. U viac ako 50% triatom fylogenticky blízkych druhov *T. lectacularia*, *T. protracta*, *T. rubida* prevláda *Dietzia*. *Dietzia* sa nenachádza u fylogeneticky vzdialenejších druhov *T. gerstaeckeri* a *T. sanguisuga*. Cez všetky druhy triatom a v hniezdach *Neotoma* sa nachádza pôdna bakteriálna taxa *Streptomyces*. U všetkých druhov triatom vo vysokom počte sa nachádzajú bakteriálne taxy: *Massilia*, *Bacillus*, *Planococcus*, *Streptomyces*. V mikrobióme triatom sa vyskytol oportúnny patogén *Serratia* (Obr. č. 4). Bakteriálne taxy zdieľané medzi mikrobiómom triatom a prostredím podľa Vennových frakcií 1, 0.9 a 0.8 sú: *Salmonella*, *Staphylococcus* sp., *Mycobacterium* a *Pelomonas* (Tabuľka č. 2). Nemetrické viacrozmerné škálovanie (NMDS) ukazuje odlišnosti v mikrobiómoch podľa druhov. Najviac sa na základe Bray Curtisových distancií odlišuje mikrobióm *T. sanguisuga* (Obr. č. 5).



Obrázok č. 4: Heatmapa zobrazujúca tridsať najpočetnejších bakteriálnych táx v mikrobióme triatom druhov: *Triatoma gerstaeckeri*, *T. lecticularia*, *T. protracta*, *T. rubida*, *T. sanguisuga*. ND = nedefinovaná taxa na úrovni rodu.



Obrázok č. 5: Nemetrické viacrozmerové škálovanie (NMDS) zobrazujúce odlišnosti v mikrobiálnych komunitách na základe Bray Curtisových distancií. Každý bod je jednotlivá triatoma. Druhy triatom sú odlíšené podľa farieb a znakov. Číslo v pravom rohu označuje hodnotu stresu.

Venn fraction	<i>Triatoma</i> species	Taxonomy
1	<i>sanguisuga</i>	<i>Mycobacterium</i> , <i>Alteribacillus</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Actinomyces</i>
1	<i>lecticularia</i>	<i>Cutibacterium</i>
0.9	<i>lecticularia</i> , <i>protracta</i> , <i>rubida</i>	<i>Staphylococcus</i>
0.8	<i>gerstaeckeri</i> , <i>lecticularia</i> , <i>protracta</i> , <i>rubida</i>	<i>Staphylococcus</i>
0.8	<i>gerstaeckeri</i> , <i>sanguisuga</i>	<i>Salmonella</i>
0.8	<i>protracta</i> , <i>rubida</i>	<i>Dietzia</i> , <i>Massilia</i> , <i>Pseudomonas</i>

Tabuľka č. 2: Zdieľané bakteriálne taxy druhov triatom na základe Vennových frakcií (1, 0.9, 0.8). Zelenou sú označené bakteriálne taxy, ktoré sa vyskytovali v prostredí.

4.3 Určenie primárneho hostiteľa kliešťov *O. turicata* a triatom

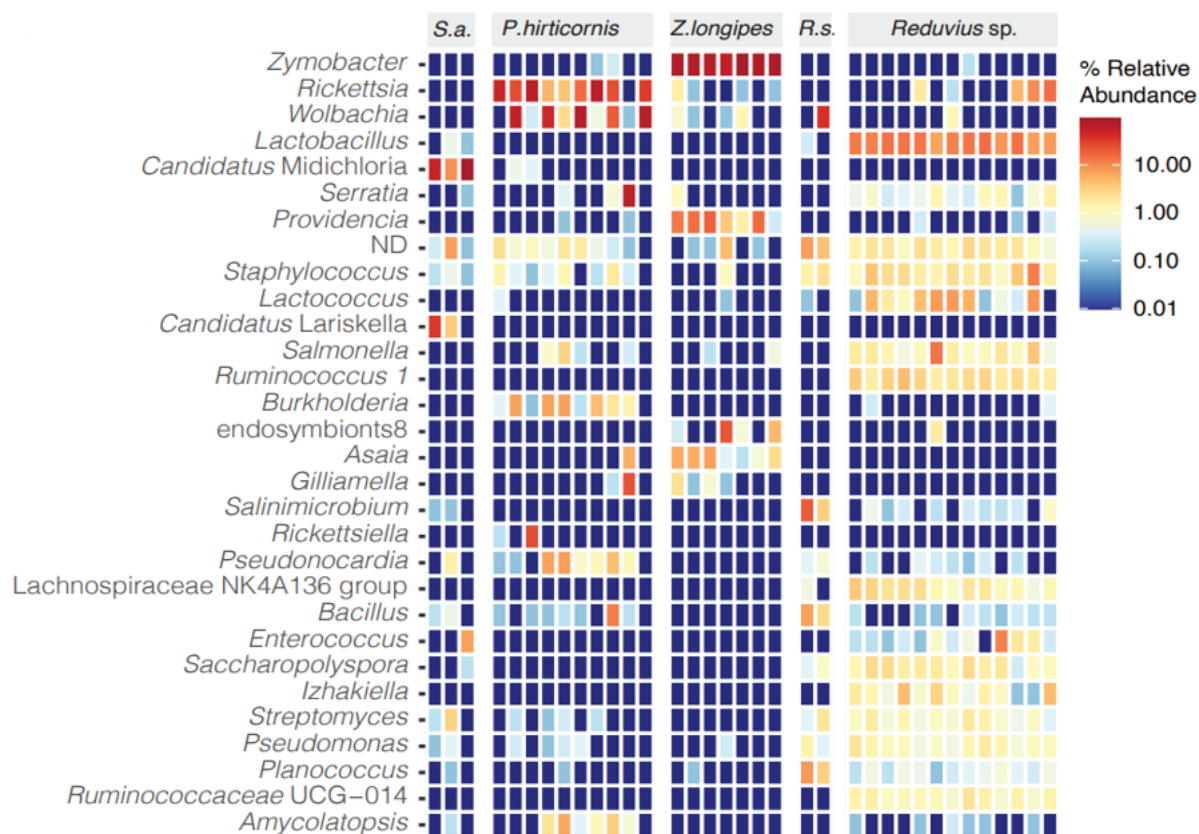
Podarilo sa identifikovať primárneho hostiteľa u 84% triatom a 6% kliešťov *O. turicata*. *Neotoma* sp. bola identifikovaná ako primárny hostiteľ u 88% triatom: *T. protracta* (38/39), *T. rubida* (34/46) and *T. lecticularia* (10/12). *Dasyus* sp. bol identifikovaný u 6% triatom: *T. gerstaeckeri* (4/7) a *T. sanguisuga* (2/6). Päť triatom: *T. rubida* (4) a *T. lecticularia* Sali na hmyzožravcovi *Episoriculus* sp. (3) a malých hlodavcoch *Peromyscus* a *Callospermophilus*. Podarilo sa tiež identifikovať sekundárneho hostiteľa u 36 triatom a 1 mäkkého kliešťov. Boli to rody *Felis* (32), *Dasyus* (2), *Callospermophilus* (1), *Chaetophractus* (1) a u mäkkého kliešťov *Neotoma*. Viac ako 50% triatom a kliešťov s hostiteľom *Neotoma* sp. malo v mikrobióme *Cutibacterium*, *Streptomyces*, *Brachybacterium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Pseudonocardia*, *Massilia*, *Pseudomonas* a *Actinobacter*, čo naznačuje ich prepojenie s hostiteľom. U triatom s primárnym hostiteľom *Dasyus* sp. Boli naopak nájdené *Alteribacillus*, *Pseudonocardia* a *Mycobacterium* (Tabuľka č. 3).

Primárny hostiteľ	Krvsajúci členovec	Zdieľané bakteriálne taxy
<i>Neotoma sp.</i>	Triatomy a mäkké kliešte	<i>Cutibacterium</i> <i>Streptomyces</i> <i>Brachybacterium</i> <i>Arthrobacter</i> <i>Microbacterium</i> <i>Pseudonocardia</i> <i>Massilia</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Actinobacter</i>
<i>Dasypus sp.</i>	Triatomy	<i>Alteribacillus</i> <i>Pseudonocardia</i> <i>Mycobacterium</i>
Iné hlodavce a hmyzožravce	Triatoma	

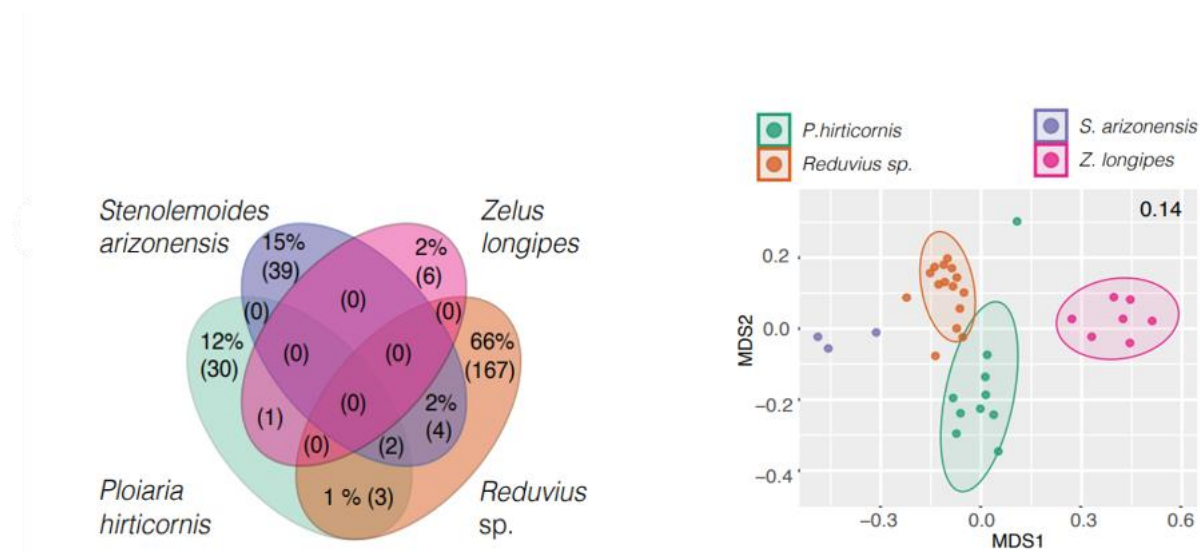
Tabuľka č. 3: Tabuľka zobrazujúca primárneho hostiteľa u krvsajúcich členovcov (triatom a *O. turicata*) a zdieľané bakteriálne taxy medzi hostiteľom a krvsajúcim členovcom.

4.4 Mikrobióm dravých ploštíc čeľade *Reduviidae*

Mikrobióm dravých ploštíc čeľade *Reduviidae* bol porovnaný v rámci druhov: *Stenolemoides arizonensis*, *Ploiaria hirticornis*, *Zelus longipes*, *Reduvius sonoarensis* a ploštíc zaradených do rodu *Reduvius*., u ktorých nebolo možné zistiť konkrétny druh. Nejedná sa o blízko príbuzné druhy, iba dva druhy patria to skupiny *Emesinae*, nepredstavujú teda fylogeneticky reprezentatívne vzorky, ale analyzujeme ich pretože zdieľajú spoločný habitat s triatomami. Mikrobióm ploštíc čeľade *Reduviidae* je druhovo špecifický, čo ukazuje analýza na základe Bray Curtisových distancií (Obr. č. 7). Mikrobiómy analyzovaných druhov nemajú spoločný „core“, nezdieľajú teda žiadne bakteriálne taxony (Obr. č. 7). V každom druhu ploštíc dominuje jedna bakteriálna taxa, *Rickettsia* u *P. hirticornis*, *Lactobacillus* u *Reduvius* sp., *Candidatus Midichloria* u *S. arizonensis* a *Zymobacter* u *Z. longipes* (Obr. č. 6). Cieľom mojej práce nebolo analyzovať diverzitu mikrobiómu dravých ploštíc čeľade *Reduviidae*, ale vytvoriť ekologický kontext pre porozumenie dynamiky a vysokej variability mikrobiómu severoamerických triatom. V mikrobióme dravých ploštíc sa objavili symbiotické bakteriálne taxy hmyzu: *Rickettsia*, *Candidatus Midichloria*, *Wolbachia*, *Candidatus Lariskella*, *Asaia*, *Gilliamella*, *Burkholderia*, baktéria z rodu *Morganellaceae* (obrázok č. 8, endosymbiont8) s najbližšou sekvenačnou zhodou *Arsenophonus* (Obr. č. 6).



Obrázok č.6: Heatmapa zobrazujúca tridsať najpočetnejších bakteriálnych táx mikrobiómu dravých ploštíc čeľade Reduviidae. ND = nedefinovaná taxa na úrovni rodu. Mikrobiómy sú rozdelené na základe druhov: *Stenolemoides arizonensis*, *Ploiaria hirticornis*, *Zelus longipes*, *Reduvius sonoarensis*, *Reduvius sp.*.

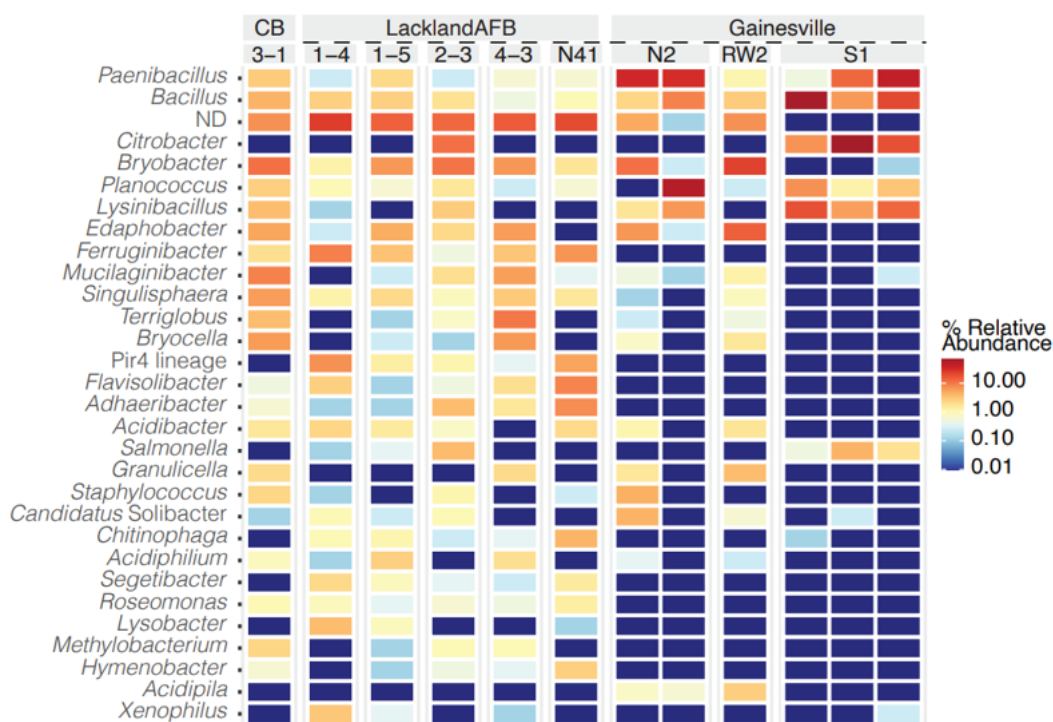


Obrázok č. 7: Vennový diagram znázorňujúci percentuálne zastúpenie zdieľaných táx baktérii mikrobiómu cez jednotlivé druhy dravých ploštíc čeľade Reduviidae (vľavo). Nemetrické viacrozmerové škálovanie (NMDS) zobrazujúce odlišnosti v mikrobiálnych komunitách na základe

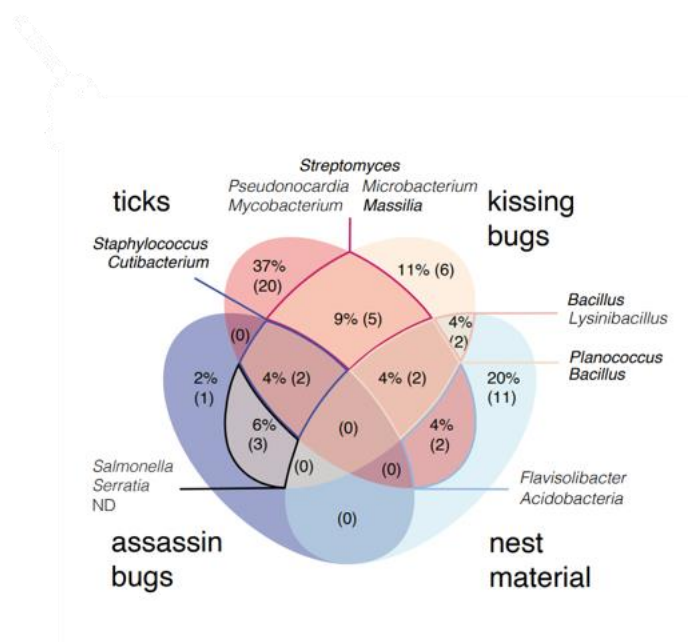
Bray Curtisových distancií. Každý bod je jednotlivá ploštica. Druhy dravých ploštíc sú odlišené podľa farieb a znakov (vpravo).

4.5 Mikrobióm prostedia

Vzorky z prostredia pochádzajú z oblastí: Camp Bullis a Lackland Air Force Base, San Antonio, Texas a Gainesville, Florida. V mikrobióme prostredia hniezd na Floride dominuje pár bakteriálnych táx: *Peenibacillus*, *Bacillus* and *Lysinibacillus*. U texaských hniezd je obsiahnutie bakteriálnych táx mikrobiómu rôznorodejšie: *Acidobacteriia* (*Bryobacter*, *Edaphobacter*), *Chitinophagia* (*Ferruginibacter*, *Flavisolibacter*) a *Planctomycetia* (*Singulisphaera* a *Pirellula* related Pyr4 lineage) (Obr. č. 8). Bakteriálne taxy *Bacillus* a *Planococcus* sú zdieľané u kliešťov, triatom a v prostredí. *Bacillus* a *Lysinibacillus* sa nachádzajú u triatom a v prostredí. Baktérie *Streptomyces*, *Massilia*, *Microbacterium*, *Pseudonocardia*, *Mycobacterium* sú u kliešťov a triatom. *Staphylococcus* a *Cutibacterium* sú zdieľané bakteriálne taxy medzi triatomami a dravými plošticami. Kliešte, triatomy a dravé ploštice zdieľajú v mikrobiome *Salmonellu*, *Serratia* (Obr. č. 9).



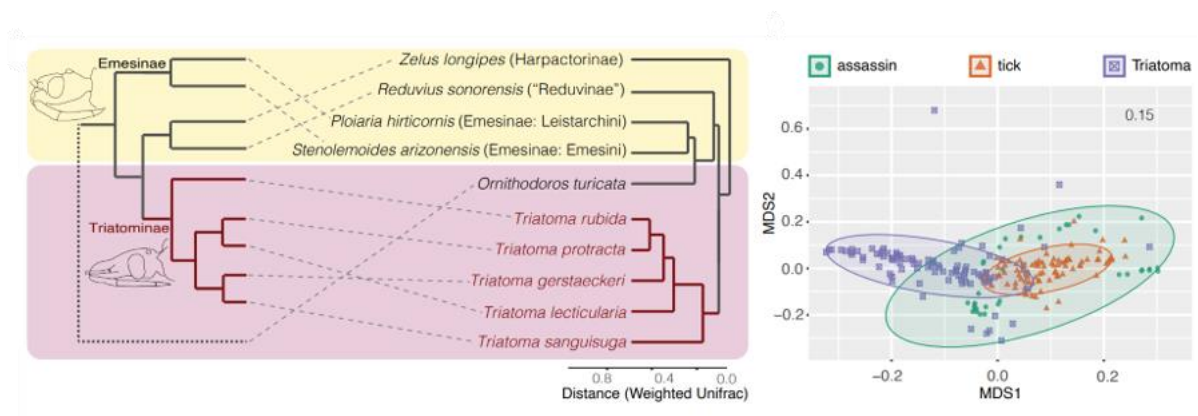
Obrázok č. 8: Heatmapa znázorňujúca tridsať najpočetnejších bakteriálnych táx prostredia hniezd hlodavca *Neotoma albigula* z oblastí: CB (Camp Bullis), San Antonio, Texas, Lackland Air Force Base, San Antonio, Texas, Gainesville, Florida.



Obrázok č. 9: Vennový diagram znázorňujúci percentuálne zastúpenie zdieľaných bakteriálnych taxónov cez pozorované skupiny: ticks (*O. turicata*), kissing bugs (triatomy), assassin bugs (dravé ploštice čeľade *Reduviidae*), nest material (prostredie hniezd hlodavca *Neotoma albigula*).

4.6 Analýzy podobnosti mikrobiómov na fylogenetickom pozadí hostiteľa

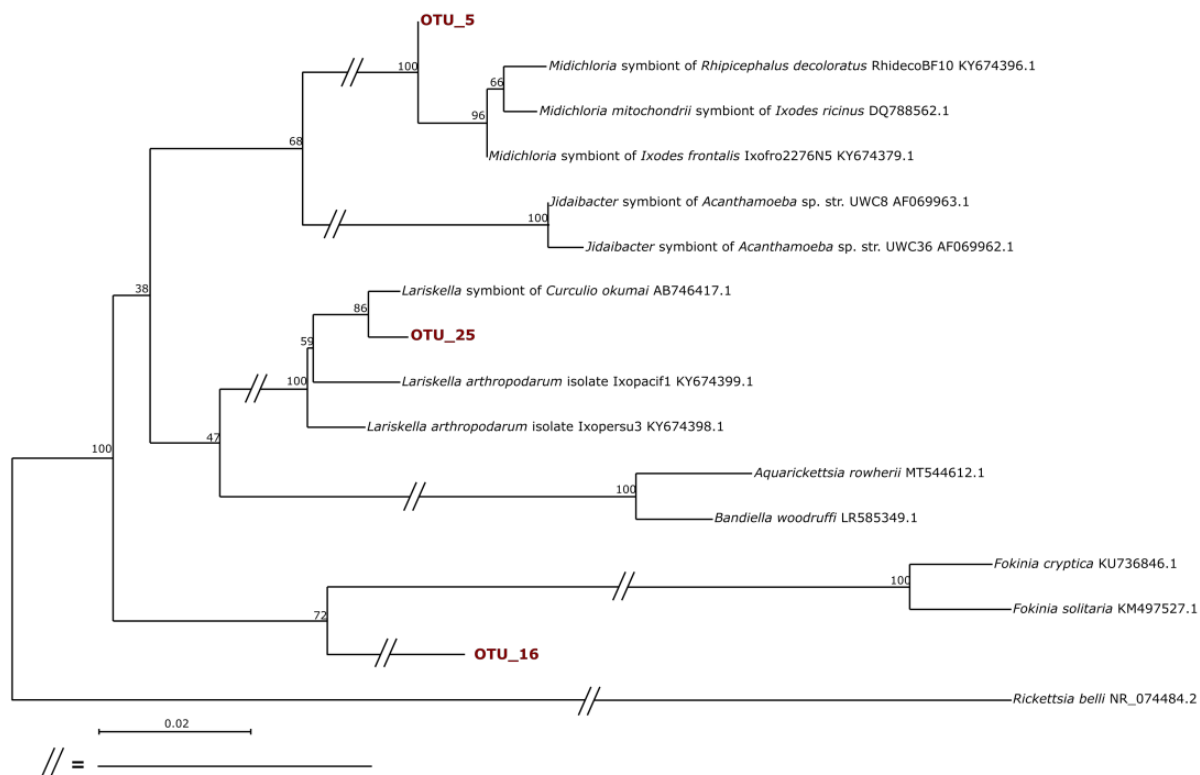
Fylogenetické vzťahy hostiteľov v porovnaní s odlišnosťami mikrobiómov medzi jednotlivými analyzovanými druhmi hostiteľov: *Triatominae*, dva druhy dravých ploštíc *Emesinae* z čeľade *Reduviidae* a mäkké kliešte ako vzdialený nehmyzí taxón. Obr. č. 10 naznačuje blízky vzťah mikrobiómov ploštíc *Emesinae*. U mikrobiómu mäkkého kliešťa *O. turicata* vidíme podobnosť s mikrobiómom so skupinou *Emesinae*, ktorú potvrdzuje i NMDS. Mikrobiómy jednotlivých druhov triatom sú si v rámci analyzovaných dát najpodobnejšie i cez prítomnosť zdieľaných taxónov, napríklad s kliešťami tvoria oddelený klaster (Obr. č. 10).



Obrázok č. 10: Schematické fylogenetické vzťahy hostiteľa v porovnaní s odlišnosťami mikrobiómov na základe Weighted Unifrac distancií. Nemetrické viacrozmerové škálovanie (NMDS) znázorňujúce odlišnosti mikrobiómov.

4.7 Fylogenetické zaradenie vybraných OTUs

Fylogenetická analýza troch OTUs rodín *Midichloriaceae*, *Morganellaceae*, *Rickettsiaceae* (OTU_5, OTU_25, OTU_16), ktoré boli zdieľané aspoň medzi dvomi skúmanými druhmi a boli predtým popísané ako symbionti členovcov. OTU_5 nájdené u dravých ploštíc čeľade *Reduviidae* sa kastruje s kliešťacími symbiontami mitochondrií. OTU_25 nájdené u kliešťov a dravých ploštíc sa spojuje s kliešťacími a inými symbiontami hmyzu. OTU_16 sa zaraduje do vodného mikrobiomu ako symbiont *Paramecium*. OTU_5 patrí do rodu *Midichloria*, OTU_25 bolo zaradené medzi *Lariskella* a OTU_16 medzi *Fokinia* (Obr. č. 11). Túto analýzu mi poskytla Anna Maria Floriano PhD.



Obrázok č. 11: Fylogenetická analýza troch OTUs z rodín *Midichloriaceae*, *Morganellaceae*, *Rickettsiaceae* (OTU_5, OTU_25, OTU_16).

5. Diskusia

O mikrobióme mäkkých kliešťov *O. turicata* sa toho zatiaľ vie veľmi málo, štúdie sa zaoberajú predovšetkým tvrdými kliešťami rodu *Ixodes*. Mäkké kliešte sú tiež medicínsky a veterinárne významné, pretože sú vektormi pre rôzne ochorenia ako bolo spomínané v úvode. Symbionti kliešťov sú veľmi diverzifikovaní. Spadajú do desiatich známych rodov: *Coxiella*-like endosymbionts, *Rickettsiella*, *Francisella*, *Midichloria*, *Rickettsia*, *Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Cardinium*, *Lariskella* a *Arsenophonus*. Symbióza baktérii s kliešťami má dynamickú evolúciu tzn. straty, horizontálne prenosy alebo de novo vytvorenie symbiotického vzťahu. Niektoré línie kliešťacích symbiontov sa vyvinuli z patogénov stavovcov (Duron et al. 2017). V mnou analyzovaných jedincoch *O. turicata* dominovali bakteriálne taxy *Coxiella*, *Rickettsia*, ktoré sú známe symbionti kliešťov, poskytujú svojim hostiteľom živiny, ktoré nevedia získať zo svojej potravy (Barraza-Guerrero et al. 2020; Bonnet et al. 2017; Moustafa et al. 2022). *Coxiellu* môžeme považovať za endosymbionta, bola popísaná u *O. rostratus*, u ktorého sa nachádzala aj vo vajíčkach, čo ukazuje na jej transovariálny prenos z matky na potomstvo (Almeida et al. 2012), tiež bola popísaná u *O. turicata* v Mexiku (Barraza-Guerrero et al. 2020) a u mäkkého kliešťa *Ornithodoros maritimus* (Gomard et al. 2021). Diverzita *Coxiella*-like endosymbiontov ukazuje na možné ko-evolučné prepojenie a tiež vertikálny prenos. *Coxiella*-like endosymbionti sú pravdepodobne ko-evolučne prepojení s druhmi kliešťov: *I. ricinus*, *I. hexagonus* a *I. uriae* (Almeida et al. 2012). U *Rickettsie* ako bakteriálneho druhu je možná zámena medzi *Rickettsiou*, ktorá je endosymbiontom kliešťov prenášaným vertikálne a jej blízko príbuzným patogénnym rickettsiám tiež prenášanými kliešťami. A to z dôvodu, že endosymbionti a patogéni sú fylogeneticky rozptýlení, to znamená, že kmene rickettsií môžu byť blízko príbuzné, ale geneticky odlišné (Duron et al. 2017). Pri porovnaní celkového rozloženia sa *Rickettsia* nachádza iba u arizonských kliešťov a v konkrétnych hniezdach, preto môže byť práve patogénom pochádzajúcim od *Neotom*, ktoré môžu byť prenášačmi baktérii *Rickettsiales* (Nicholson et al. 1999). Ďalším potvrdením tejto teórie je, že symbiont *Rickettsia* sa objavuje so symbiontom *Midichloria*, tento „pattern“ v mojich dátach nebol zaznamenaný. Patogénom v mikrobióme *O. turicata* je *Borrelia*. Kliešte rodu *Ornithodoros* a niektoré tvrdé kliešte sú známymi vektormi pre boréliu, v prípade *O. turicata* pravdepodobne môže ísť o *Borrelia turicatae* (Boyle et al. 2014, Talagrand-Reboul et al. 2018). V publikácii od Barraza-Guerrero et al. 2020, kde popisujú mikrobióm mäkkého kliešťa *O. turicata* v Mexiku dominuje symbiotická bakteriálna taxa *Midichloria*, ktorá v mojich dátach nebola zaznamenaná, ale u niektorých jedincov bolo možné nájsť bakteriálne taxy z rodiny

Midichloriaceae, a to *Jidaibacter* a *Lariskella*. Z hľadiska taxonomického zloženia mikrobiómu sú jedinci analyzovaní v mojej práci podobní mexickej populácii. V porovnaní s publikáciou od Barraza-Guerrero et al. 2020 a zdieľajú pomerne vysokom zastúpení taxy: *Coxiella*, *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Sphingobacterium* a *Bacillus*. Bakteriálne taxy *Bacillus* a *Pseudomonas*, ktoré boli zaznamenané u oboch mikrobiómov *O. turicata* sú pravdepodobne komenzálnymi baktériami kliešťov a kliešte ich získavajú z prostredia alebo kože hostiteľov na ktorých sali (Moustafa et al. 2022). Mikrobióm kliešťov je veľmi variabilný a mení sa v závislosti na lokalite viac ako v priebehu ontogenézy (Krawczyk et al. 2022). To potvrdzujú aj štatisticky významné odlišnosti medzi mikrobiómami v jednotlivých lokalitách v mojich dátach.

Mikrobióm triatom sa študuje v súvislosti s prenosom *T. cruzi*, ktorá je za vznikom Chagasovej nemoci. V mikrobióme triatom sa druhovo špecificky, u *Triatoma lectaculalria*, *T. protracta*, *T. rubida*, vyskytuje *Dietzia*, ktorej výskyt sa mení počas ontogenézy a začína narastať u instarov L3 a L4 (Brown et al. 2020). U väčšiny jedincov práve týchto troch druhov, ktoré som analyzovala je *Dietzia* prítomná, často ako dominantný taxón. Bakteriálna taxa *Streptomyces*, ktorá bola nedávno popísaná u *T. gerstaeckeri* a *T. sanguisuga* našim laboratóriom (Brown et al. 2020), sa vyskytovala v mikrofilmoch všetkých druhov analyzovaných triatom. Táto baktéria je v našom datasete zdieľaná jak triatomami tak kliešťami, uvažujeme o nej ako o komponente pochádzajúcom z pôdy a jej rola v mikrobióme je nejasná (Seipke et al. 2012). Zaujímavá je prítomnosť baktérií rodu *Serratia* cez všetky druhy triatom. Je u nej známa potenciálne anti-trypanosomálna aktivita, konkrétne u triatomy *Rhodnius prolixus*, u ktorej mala *Serratia marcescens* negatívny dopad na prežitie a replikáciu *Trypanosoma cruzi* (de Motta et al. 2018, Azambuja et al. 2004). Nie k všetkým jedincom v mojich dátach sú dostupné informácie o ich pozitivite či negativite na *T. cruzi*, takže som sa koreláciou výskytu *Serratie* a *T. cruzi* nezaoberala.

Baktérie zo skupiny *Nocardiaceae*, hlavne *Rhodococcus rhodnii* sú tradične považované za nutričných symbiontov triatom. Symbióza s touto baktériou bola nedávno potvrdená pre zástupcov skupiny *Rhodniini* (Filée et al. 2023). Existujú ale i záznamy o prítomnosti *R. rhodnii* v skupine *Triatimini*, konkrétne *Triatoma rubrofasciata*, *T. infestans*, *T. flavida* (Salado-Porras et al. 2020). Mojich dátach sa vyskytujú dvaja zástupcovia skupiny *Nocardiaceae*, tj. *Nocardia* sp. a *Rhodococcus rhodnii*, oba v nízkej abundanci, obzvlášť *Rhodococcus*. *Nocardia* sa vyskytuje u *Triatoma protracta*, *T. rubida* a *Rhodococcus* sa

vyskytuje u *Triatoma gerstaeckeri*, *T. protracta*, *T. rubida*. U *Nocardii* ako symbiontovi môžeme uvažovať, že je druhovo špecifická.

Mikrobióm dravých ploštíc čeľade *Reduviidae* sa zdá byť druhovo špecifický a obsahuje pravdepodobne konzervované komponenty. V publikácii od Li et al. 2022 zo šiestich druhov ploštíc podčeľade *Harpactorini* naznačili, že baktéria *Enterococcus* je konzervovaným komponentom mikrobiomov dravých ploštíc. V mojich dátach je baktéria *Enterococcus* iba u niektorých jedincov *Reduvius sp. a Stenolemoides arizonensis*, ktoré sú vzdialene príbuzní podčeľadi *Harpactorini*. Jediným druhom z podčeľade *Harpactorini* je v mojich dátach *Zelus longipes*, u ktorého sa *Enterococcus* nevyskytol.

U dravých ploštíc čeľade *Reduviidae* sa cez jednotlivé druhy objavujú rôzny známy symbionti hmyzu. U týchto symbiontov nie je známy ich vzťah k hostiteľovi, a či vytvárajú nejakú špecializovanejšiu symbiózu. Jednotlivé taxy symbiontov sú jasne dominované v druhoch, ktoré sú prítomné vo všetkých analyzovaných jedincoch v rámci druhu, a tak je scenár symbiotického vzťahu pravdepodobný. Napríklad *Wolbachia*, ktorá môže byť fakultatívnym alebo obligatónym symbiontom a bola nájdená aj u triatom, ale jej význam u nich nie je známy (Espino et al. 2009). *Wolbachia* môže negatívne ovplyvniť svojho hostiteľa v prospech svojho prenosu (fakultatívny symbiont) alebo môže prinášať nutričné prvky svojmu hostiteľovi (obligatónny symbiont) (Filée et al. 2023). Na našich dátach nie sme schopní určiť, či sa jedná o fakultatívneho alebo obligatórneho symbionta. Pre lepšiu pohľad by bolo nutné použiť aspoň MLST analýzu, na jej základe zaradiť *Wolbachia* do niektorej z jej superskupín, prípadne použiť celogenomové sekvenovanie, ktoré by nám poskytlo informácie o kapacite genomu tejto konkrétnej línie. Zaujímavé je vysoké zastúpenie bakteriálnej taxy OTU_5 u dravej ploštice *Stenolemoides arizonensis*, pre ktorú bola robená dodatočná fylogenetická analýza Annou Mariou Floriano PhD. OTU_5 bola zaradená do rodu *Midichloria*, konkrétne *Candidatus Midichloria*. mitochondrii. Je to intracelulárny endosymbiont kliešťov, ktorý bol detekovaný vo vnútri mitochondrií (Sgroi et al. 2022). Predmetom ďalšieho výskumu by mohlo byť zistenie, či aj u dravých ploštíc žije táto bakteriálna taxa v mitochondriách.

Kombinácia mikrobiómových analýz a analýza pôvodu nasatej krvi nám umožnila rozlíšiť pôvod niektorých baktérií mikrobiómu triatom a kliešťov. Kliešte aj triatomy žijúce v rovnakých hniezdach majú rovnaký zdroj potravy, ale mäkké kliešte majú dlhé obdobia medzi

príjmom potravy, a preto detekcia primárneho hostiteľa u nich nebola tak úspešná. Podarilo sa identifikovať primárneho hostiteľa u 6% mäkkých kliešťov a najčastejšie to bola *Neotoma sp.*. Primárny hostiteľ kliešťov môže byť rôznorodý, u mäkkých kliešťov *O. turicata* v jaskyniach (San Antonio, Texas) bol najčastejší primárny hostiteľ medvedík čistotný, a podarilo sa im identifikovať primárneho hostiteľa u 11% odchytených mäkkých kliešťov, čo podporuje teóriu o náročnosti analýzy primárneho hostiteľa u mäkkých kliešťov (Busselman et al. 2021). Viac ako 50% triatom a kliešťov s hostiteľom *Neotoma sp.* malo v mikrobiome *Cutibacterium*, *Streptomyces*, *Brachybacterium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Pseudonocardia*, *Massilia*, *Pseudomonas* a *Actinobacter*, čo naznačuje ich prepojenie s hostiteľom. Toto prepojenie tiež potvrdzuje nájdenie baktérií produkujúcich antimikrobiálne látky z čeľadí *Pseudonocardiaceae* a *Streptomycetaceae* v mikrobióme *Neotoma floridana smalli* a v jej hniezde (Platas et al. 1998, Thoemmes et al. 2020, Weinstein et al. 2021). *Acinetobacter* je spojovaný s rezistenciou na insekticíd cypermethrin a pyrethroid, ktorý je používaný na kontrolu hmyzích škodcov, bol detekovaný aj u 30% dravých ploštíc čeľade *Reduviidae* (Chalfant et al. 1990, Pietrantonio et al. 2007, Dennehy et al. 2004).

U triatom s primárnym hostiteľom *Dasypus sp.* boli nájdené *Alteribacillus*, *Pseudonocardia* a *Mycobacterium*. Rezervoárom baktérie *Mycobacterium leprae*, ktorá spôsobuje u človeka lepru je v Texase a Floride je pásavec (*Dasypus novemcinctus*) (Perez-Heydrich et al. 2016), to podporuje hypotézu, že *Mycobacterium* pochádza od primárneho hostiteľa. Zaujímavá je aj prítomnosť *Pseudonocardie*, ktorú využívajú mravce kmeňu *Attini* ako symbionta. *Pseudonocardia* produkuje sekundárne metabolity, ktoré môžu mať antibakteriálne a antifungálne vlastnosti (Goldstein a Klassen 2020).

Bakteriálne taxy *Bacillus* a *Planococcus* sú v mikrobióme zdieľané nezávisle na hostiteľovi u kliešťov, triatom a v prostredí. Baktéria *Bacillus*, ktorá má rôzne funkcie pre ekosystém pôdy (Saxena et al. 2020), veľmi pravdepodobne sa dostala do mikrobiómu členovcov z prostredia, bola tiež popísaná ako baktéria prítomná v pôde v Arizone (Kuske et al. 1997).

6. Záver

V tejto štúdii som sa zaoberala mikrobiómami krvsajúcich severoamerických triatom (*Reduviidae*) v širšom evolučnom a ekologickom kontexte, kde som porovnávala mikrobiómy s fylogeneticky príbuznými dravými ploštícami čeľade *Reduviidae*, ďalším krvsajúcim nehmyzím taxómom (mäkkým kliešťom *Ornithodoros turicata*) a prostredím kde títo členovci spoločne žijú. Pre krvsajúce vektory (triatomy, mäkké kliešte) analýza mikrobiómu ukazuje na tri možné zdroje baktérií: mikrobióm prostredia v ktorom spoločne žijú s hostiteľom na ktorom sajú krv, kožný mikrobióm hostiteľa a patogény obsiahnuté v krvnom riečišti hostiteľa. Aj napriek zjavnému ovplyvneniu mikrobiómu prostredím, mikrobióm triatom si zachováva svoju špecifitu a signifikantne sa líši od fylogeneticky príbuzných dravých ploštíc aj ekologicky porovnávaných kliešťov.

7. Zoznam použitej literatúry

- Almeida A. P., Marcili A., Leite R. C., Nieri-Bastos F. A., Domingues L. N., Martins J. R., Labruna M. B. (2012): *Coxiella symbiont in the tick Ornithodoros rostratus (Acari: Argasidae)*. Ticks Tick Borne Dis 3(4):203-6.
- Anderson C., Belnap C. (2015): The Kiss of Death: A Rare Case of Anaphylaxis to the Bite of the “Red Margined Kissing Bug”. Hawaii J Med Public Health. 74 (9 Suppl 2): 33–35.
- Apostolaki A., I. Livadaras, A. Saridaki, A. Chrysargyris, C. Savakis, K. Bourtzis (2011): Transinfection of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* with *Wolbachia*: towards a symbiont-based population control strategy. Journal of applied entomology , 546-553.
- Azambuja P., Feder D., Garcia E. S. (2004): Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. Exp Parasitol 107: 89-96.
- Azambuja P., Garcia E. S., Ratcliffe N. A. (2005): Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. Trends Parasitol 21(12): 568-72.
- Aželytė J., Wu-Chuang A., Žiegytė R., Platonova E., Mateos-Hernandez L., Maye J., Obregon D., Palinauskas V., Cabezas-Cruz A. (2022): Anti-Microbiota Vaccine Reduces Avian Malaria Infection Within Mosquito Vectors. Front Immunol. 13:841835.
- Barraza-Guerrero S. I., Meza-Herrera C. A., García-De la Peña C., González-Álvarez V. H., Vaca-Paniagua F., Díaz-Velásquez C. E., Sánchez-Tortosa F., Ávila-Rodríguez V., Valenzuela-Núñez L. M., Herrera-Salazar J. C. (2020): General Microbiota of the Soft Tick *Ornithodoros turicata* Parasitizing the Bolson Tortoise (*Gopherus flavomarginatus*) in the Mapimi Biosphere Reserve, Mexico. biology: 9.
- Beard C.B., Cordon-Rosales C. and Durvasula R.V. (2002): Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. Annual Review of Entomology 47: 123-141.
- Bern C., Kjos S., Yabsley M. J., Montgomery S. P. (2011): *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. Clinical Mic. Reviews: 655–681.

- Bi J., Wang Y. (2020): The effect of the endosymbiont *Wolbachia* on the behavior of insect hosts. *Insect Sci.* 27(5): 846–858.
- Bian G., Xu Y., Lu P., Xie Y., Xi Z. (2010): The Endosymbiotic Bacterium *Wolbachia* Induces Resistance to Dengue Virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog.* 6(4):e1000833.
- Bissett J. D., Ledet S., Krishnavajhala A., Armstrong B. A., Klioueva A., Sexton C., Replogle A., Schriefer M. E., Lopez J. E. (2018): Detection of Tickborne Relapsing Fever Spirochete, Austin, Texas. *Emerging infectious diseases* 11: 2003–2009.
- Boissière A., Tchioffo M. T., Bachar D., Abate L., Marie A., Nsango S. E., Shahbazkia H. R., Awono-Ambene P. H., Levashina E. A., Christen R., Morlais I. (2012): Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog*8(5):e1002742.
- Bonnet S. I., Binetruy F., Hernández-Jarguín A. M., Duron O. (2017): The Tick Microbiome: Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen Transmission. *Front Cell Infect Microbiol* 8;7:236.
- Boyle W. K., Wilder H. K., Lawrence A. M., Lopez J. E. (2014): Transmission Dynamics of *Borrelia turicatae* from the Arthropod Vector. *PLoS Negl Trop Dis* 3;8(4):e2767.
- Brown J. J., Rodríguez-Ruano S. M., Poosakkannu A., Batani G., Schmidt J. O., Roachell W., Zima J. Jr, Hypša V., Nováková E. (2020): Ontogeny, species identity, and environment dominate microbiome dynamics in wild populations of kissing bugs (Triatominae). *Microbiome* 8(1):146.
- Busselman R. E., Olson M. F., Martinez V., Davila E., Briggs C., Eldridge D. S., Higgins B., Bass B., Cropper T. L., Casey T. M., Edwards T., Teel P. D., Hamer S. A., Hamer G. L. (2021): Host Bloodmeal Identification in Cave-Dwelling *Ornithodoros turicata* Dugès (Ixodida: Argasidae), Texas, USA. *Front Vet Sci* 8:639400.
- Capinera J. L.; *Encyclopedia of Entomology* (2008): 283-287, 311-319, 2091-2092.
- Castro D. P., Moraes C. S., Gonzalez M. S., Ratcliffe N. A., Azambuja P., Garcia E. S. (2012): *Trypanosoma cruzi* Immune Response Modulation Decreases Microbiota in *Rhodnius prolixus* Gut and Is Crucial for Parasite Survival and Development. *PLoS One.* 7(5):e36591.

Dennehy T. J., DeGain B. A., Harpold V. S., Brink S. A. (2004): Vegetable Report 2004. College of Agriculture and Life Sciences UoA, Tucson, AZ.

Donaldson T. G., Pérez de León A. A., Li A. I., Castro-Arellano I., Wozniak E., Boyle W. K., Hargrove R., Wilder H. K., Kim H. J., Teel P. D., Lopez J. E. (2016): Assessment of the Geographic Distribution of *Ornithodoros turicata* (Argasidae): Climate Variation and Host Diversity. PLoS Negl Trop Dis 10(2):e0004383.

Doudoumis V., Blow F., Saridaki A., Augustinos A., Dyer N. A., Goodhead I., Solano P., Rayaisse J. B., Takac P., Mekonnen S., Parker A. G., Abd-Alla A. M. M., Darby A., Bourtzis K., Tsiamis G. (2017): Challenging the *Wigglesworthia*, *Sodalis*, *Wolbachia* symbiosis dogma in tsetse flies: *Spiroplasma* is present in both laboratory and natural populations. Scientific Reports 7:4699.

Dworkin M. S., Schwan T. G., Anderson D. E., Borchardt S. M. (2013): Tick-Borne Relapsing Fever. Infect Dis Clin North Am. 22 (3): 449-468.

Duguma D., Hall M. W., Rugman-Jones P., Stouthamer R., Terenius O., Neufeld J. D., a Walton W. E. (2015): Developmental succession of the microbiome of *Culex* mosquitoes. BMC Microbiol. 15: 140.

Duron O., Binetruy F., Noel V., Cremaschi J., McCoy K. D., Arnathau C., Plantard O., Goolsby J., Perez de Leon A. A., Heylen D. J. A., Van Oosten A. R., Gottlieb Y., Baneth G., Guglielmone A. A., Estrada-Peña A., Opara M. N., Zenner L., Vavre F., Chevillon C. (2017): Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Molecular ecology* 26: 2905-2921.

Eberhard F. E., Klimpel S., Guarneri A. A., a Tobias N. J. (2022): Exposure to *Trypanosoma* parasites induces changes in the microbiome of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. Microbiome. 2022; 10: 45.

Espino C. I., Gomez T., Gonzalez G., do Santos M. F., Solano J., Sousa O., Moreno N., Windsor D., Ying A., Vilchez S., Osuna A. (2009): Detection of *Wolbachia* bacteria in multiple organs and feces of the triatomine insect *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae). Applied and environmental microbiology 75:547-550.

Filée J., Agésilas-Lequeux K., Lacquehay L., Bérenger J. M., Dupont L., Mendonça V., da Rosa J. A., Harry M. (2023): *Wolbachia* genomics reveals a potential for a nutrition-based symbiosis in blood-sucking Triatomine bugs.

Forsyth C. J., Manne-Goehler J., Bern C., Whitman J., Hochberg N. S., Edwards M., Marcus R., Beatty N. L., Castro-Sesquen Y. E., Coyle C., Granados P. S., Hamer D., Maguire J. H., Gilman R. H., Meymandi S. (2022): Recommendations for Screening and Diagnosis of Chagas Disease in the United States. *J Infect Dis.* 225(9):1601–1610.

de la Fuente J., Antunes S., Bonnet S., Cabezas-Cruz A., Domingos A. G., Estrada-Peña A., Johnson N., Kocan K. M., Mansfield K. L., Nijhof A. M., Papa A., Rudenko N., Villar M., Alberdi P., Torina A., Ayllón N., Vancova M., Golovchenko M., Grubhoffer L., Caracappa S., Fooks A. R., Gortazar C., Rego R. O. M. (2017): Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. *Front Cell Infect Microbiol* 7:114.

Gaudreault N. N., Madden D. W., Wilson W. C., Trujillo J. D., Richt J. A. (2020): African Swine Fever Virus: An Emerging DNA Arbovirus. *Front Vet Sci* 13;7:215.

Gladue D. P. a Borca M. V. (2022): Recombinant ASF Live Attenuated Virus Strains as Experimental Vaccine Candidates. *Viruses* 14(5):878.

Goldstein S. L. a Klassen J. L. (2020): *Pseudonocardia* Symbionts of Fungus-Growing Ants and the Evolution of Defensive Secondary Metabolism. *Front Microbiol* 11:621041.

Golnar A. J., Martin E., Wormington J. D., Kading R. C., Teel P. D., Hamer S. A., Hamer G. L. (2019): Reviewing the Potential Vectors and Hosts of African Swine Fever Virus Transmission in the United States. *Vector Borne Zoonotic Dis* 19(7):512-524.

Gomard Y., Flores O., Vittecoq M., Blanchon T., Toty C., Duron O., Mavingui P., Tortosa P., McCoy K. D. (2021): Changes in Bacterial Diversity, Composition and Interactions During the Development of the Seabird Tick *Ornithodoros maritimus* (Argasidae). *Microb Ecol* 81(3):770-783.

Gottlieb Y. , Lalar I. , Klasson L. (2015): Distinctive Genome Reduction Rates Revealed by Genomic Analyses of Two *Coxiella*-Like Endosymbionts in Ticks. *Genome Biol Evol* 7(6):1779-96.

Groom Z. C., Protopapas A. D., Zochios V. (2017): Tropical diseases of the myocardium. *Int J Gen Med.* 10:101–111.

Hugo L. E., Rašić G., Maynard A. J., Ambrose L., Liddington C., Thomas C. J. E., Nath N. S., Graham M., Winterford C., Wimalasiri-Yapa B. M. C. R., Xi Z., Beebe N. W., Devine G. J. (2022): *Wolbachia* wAlbB inhibit dengue and Zika infection in the mosquito *Aedes aegypti* with an Australian background. *PLoS Negl Trop Dis* 13;16(10):e0010786.

Hwang S. W. a Weirauch C. (2012): Evolutionary History of Assassin Bugs (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): Insights from Divergence Dating and Ancestral State Reconstruction. *PLoS One.* 7(9): e45523.

Hypsa V. and Dale C. 1997. In vitro culture and phylogenetic analysis of “*Candidatus Arsenophonus triatominarum*,” an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47: 1140-1144.

Chalfant R. B., N'Guessan K. F. (1990): Dose Response of the *Cowpea Curculio* (Coleoptera: Curculionidae) From Different Regions of Georgia to Some Currently Used Pyrethroid Insecticides. *Journal of Entomological Science* 25:219-222.

Jakab Á., Kahlig P., Kuenzli E., Neumayr A. (2022): Tick borne relapsing fever. *PLoS Negl Trop Dis* 16;16(2):e0010212.

Kalsi M. a Seal D. R. (2011): Milkweed Assassin Bug (Suggested Common Name) *Zelus longipes* Linnaeus (Insecta: Hemiptera: Reduviidae). IFAS extension.

Klotz S. A., Dorn P. L., Mosbacher M., Schmidt J. O. (2014): Kissing Bugs in the United States: Risk for Vector-Borne Disease in Humans. *Environ Health Insights.* 8(Suppl 2):49–59.

Klotz S. A., Smith S. L., Schmidt J. O: (2021): Kissing Bug Intrusions into Homes in the Southwest United States. *Insects.* 12 (7):654.

Klyachko O., Stein B. D., Grindle N., Clay K., Fuqua C. (2007): Localization and visualization of a coxiella-type symbiont within the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Appl Environ Microbiol* 73(20):6584-94.

Krawczyk A. I., Röttgers S., Coimbra-Dores M. J., Heylen D., Fonville M., Takken W., Faust K., Sprong H. (2022): Tick microbial associations at the crossroad of horizontal and vertical transmission pathways. *Parasit Vectors* 15(1):380.

Krishnavajhala A., Armstrong B. A., Kneubehl A. R., Gunter S. M., Piccione J., Kim H. J., Ramirez R., Castro-Arellano I., Roachell W., Teel P. D., Lopez J. E. (2021): Diversity and distribution of the tick-borne relapsing fever spirochete *Borrelia turicatae*. *PLoS Negl Trop Dis* 15(11):e0009868.

Kuske C. R., Barns S. M., Busch J. D. (1997): Diverse Uncultivated Bacterial Groups from Soils of the AridSouthwestern United States That Are Presentin Many Geographic Regions. *Appl Environ Microbiol.* 63(9):3614–3621.

Li Z., Chen W., Qiu Z., Li Y., Fan J., Wu K., Li X., Zhao M., Ding H., Fan S., Chen J. (2022): African Swine Fever Virus. *Life (Basel)*17;12(8):1255.

Liu C, Cui Y, Li X, Yao M. 2021. microeco: an R package for data mining in microbial community ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 97.

Liu L., Sonenshine D. E., Sultana H., Neelakanta G. (2022): Identification of a rickettsial endosymbiont in a soft tick *Ornithodoros turicata americanus*. *PLoS One* 17(12):e0278582.

Mann A. E., Mitchell E. A., Zhang Y., Curtis-Robles R., Thapa S., Hamer S. A., Allen M. S. (2020): Comparison of the Bacterial Gut Microbiome of North American *Triatoma* spp. With and Without *Trypanosoma cruzi*. *Front Microbiol* 11:364.

Manzano-Román R., Díaz-Martín V., de la Fuente J., Pérez-Sánchez R. (2012): Soft Ticks as Pathogen Vectors: Distribution, Surveillance and Control. *Parasitology*. Mohammad Manjur Shah.

Markowicz M., Schötta A., Höss D., Kundi M., Schray C., Stockinger H. a Stanek G. (2021):Infections with Tickborne Pathogens after Tick Bite, Austria, 2015–2018. *Emerg Infect Dis.* 27(4): 1048–1056.

Mateos-Hernández L., Obregón D., Wu-Chuang A., Maye J., Bornères J., Versillé N., de la Fuente J., Díaz-Sánchez S., Bermúdez-Humarán L. G., Torres-Maravilla E., Estrada-Peña

A., Hodžić A., Šimo L., Cabezas-Cruz A. (2021): Anti-Microbiota Vaccines Modulate the Tick Microbiome in a Taxon-Specific Manner. *Front Immunol* 12;12:704621.

Monteiro F.A., Barrett T. V., Fitzpatrick S., Cordon-Rosales C., Feliciangeli D., Beard C. B. (2003): Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol Ecol* 12(4):997-1006.

Monteiro F. A., Weirauch C., Felix M., Lazoski C., Abad-Franch F. (2018): Chapter Five - Evolution, Systematics, and Biogeography of the Triatominae, Vectors of Chagas Disease. *Advances in Parasitology* Volume 99, 265-344.

de Motta F. F., Castro D. P., Vieira C. S., Gumiel M., de Albuquerque J. P., Carels N., Azambuja P. (2018): In vitro Trypanocidal Activity, Genomic Analysis of Isolates, and in vivo Transcription of Type VI Secretion System of *Serratia marcescens* Belonging to the Microbiota of *Rhodnius prolixus* Digestive Tract. *Front Microbiol* 9:3205.

Moustafa M. A. M., Mohamed W. M. A., Lau A. C. C., Chatanga E., Qiu Y., Hayashi N., Naguib D., Sato K., Takano A., Matsuno K., Nonaka N., Taylor D., Kawabata H., Nakao R. (2022): Novel symbionts and potential human pathogens excavated from argasid tick microbiomes that are shaped by dual or single symbiosis. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 20:1979-1992.

Narasimhan S., Swei A., Abouneameh S., Pal U., Pedra J. H. F., Fikrig E. (2021): Grappling with the Tick Microbiome. *Trends Parasitol.* 37(8):722–733.

Nicholson W. L., Castro M. B., Kramer V. L., Sumner J. W., Childs J. E. (1999): Dusky-Footed Wood Rats (*Neotoma fuscipes*) as Reservoirs of Granulocytic Ehrlichiae (*Rickettsiales: Ehrlichiae*) in Northern California. *J Clin Microbiol.* 37(10): 3323–3327.

Perez-Heydrich C., Loughry W. J., Anderson C. D., Oli M. K. (2016): Patterns of *Mycobacterium leprae* Infection in Wild Nine-Banded Armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in Mississippi, USA. *J Wildl Dis* 52:524-32.

Pietrantonio P. V., Junek T. A., Parker R., Mott D., Siders K., Troxclair N., Vargas-Camplis J., Westbrook J. K., Vassiliou V. A. (2007): Detection and Evolution of Resistance to the

Pyrethroid Cypermethrin in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) Populations in Texas. Environmental Entomology 36:1174-1188.

Platas G., Morón R., González I., Collado J., Genilloud O., Peláez F., Diez M. T. (1998): Production of antibacterial activities by members of the family *Pseudonocardiaceae*: influence of nutrients. World Journal of Microbiology and Biotechnology 14:521-527.

Riano H. C., Jaramillo N., Dujardin J. P. (2009): Growth changes in *Rhodnius pallescens* under simulated domestic and sylvatic conditions. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 9, 162-168, doi:10.1016/j.meegid.2008.10.009.

Rodríguez-Ruano S. M., Škočová V., Rego R. O. M., Schmidt J. O., Roachell W., Hypša V., Nováková E. (2018): Microbiomes of North American *Triatominae*: The Grounds for Chagas Disease Epidemiology. Front Microbiol. 2018; 9: 1167.

Ruxton G. D. a Stevens M. (2015): The evolutionary ecology of decorating behaviour. Biol Lett. 11(6): 20150325.

Sahayaraj K., Kalidas S., Estelle L. Y. L (2020): Bioefficacy of *Rhynocoris longifrons* (Stål) (Heteroptera: Reduviidae) against multiple cotton pests under screen house and field conditions. Sci Rep. 10: 6637.

Salcedo-Porras N., Umaña-Díaz C., de Oliveira Barbosa Bitencourt, Lowenberger C. (2020): The Role of Bacterial Symbionts in Triatomines: An Evolutionary Perspective. Microorganisms. 8(9): 1438.

Saldaña M. A., Hegde S., Hughes G. L. (2017): Microbial control of arthropod-borne disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 112(2): 81–93.

Santo-Orihuela P. L., Vassena C. V., Carvajal G., Clark E., Menacho S., Bozo R., Gilman R. H., Bern C., Marcet P. L. (2017): Toxicological, Enzymatic, and Molecular Assessment of the Insecticide Susceptibility Profile of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae) Populations From Rural Communities of Santa Cruz, Bolivia. J Med Entomol. 54(1): 187–195.

Sayers E. W., Beck J., Bolton E. E., Bourexis D., Brister J. R., Canese K., Comeau D. C., Funk K., Kim S., Klimke W., Marchler-Bauer A., Landrum M., Lathrop S., Lu Z., Madden T. L.,

O'Leary N., Phan L., Rangwala S. H., Schneider V. A., Skripchenko Y., Wang J., Ye J., Trawick B. W., Pruitt K. D., Sherry S. T. (2021): Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 49:D10-D17.

Saxena A. K., Kumar M., Chakdar H., Anuroopa N., Bagyaraj D. J. (2020): *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *J Appl Microbiol* 128(6):1583-1594.

Scolari F., Casiraghi M. a Bonizzoni M. (2019): *Aedes* spp. and Their Microbiota. *Front. Microbiol., Sec. Systems Microbiology* Volume 10.|

Serrato-Salas J., Gendrin M. (2022): Involvement of Microbiota in Insect Physiology: Focus on B Vitamins. *mBio*. 14(1): e02225-22.

Seipke R. F., Kaltenpoth M., Hutchings M. I. (2012): *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? *FEMS Microbiol Rev* 36(4):862-76.

Sgroi G., Latta R., Lovreglio P., Stufano A., Laidoudi Y., Mendoza-Roldan J. A., Bezerra-Santos M. A., Veneziano V., Di Gennaro F., Saracino A., Chironna M., Bandi C., Otranto D. (2022): Detection of Endosymbiont *Candidatus Midichloria mitochondrii* and Tickborne Pathogens in Humans Exposed to Tick Bites, Italy. *Emerg Infect Dis*. 28(9): 1824–1832.

Soley F. G.(2016): Fine-scale analysis of an assassin bug's behaviour: predatory strategies to bypass the sensory systems of prey. *R Soc Open Sci*. 3(10): 160573.

Sonenshine D. E., Stewart P. E. (2021): Microbiomes of Blood-Feeding Arthropods: Genes Coding for Essential Nutrients and Relation to Vector Fitness and Pathogenic Infections. *Microorganisms*. 9(12): 2433.

Talagrand-Reboul E., Boyer P. H., Bergström S., Vial L., Boulanger N. (2018): Relapsing Fevers: Neglected Tick-Borne Diseases. *Front Cell Infect Microbiol*. 8: 98.

Tainchum K., Dupont C., Chareonviriyaphap T., Jumas-Bilak E., Bangs M. J. a Manguin S. (2020): Bacterial Microbiome in Wild-Caught *Anopheles* Mosquitoes in Western Thailand. *Front. Microbiol., Sec. Infectious Agents and Disease* Volume 11. |

Thoemmes M. S., Cove M. V. (2020): Bacterial communities in the natural and supplemental nests of an endangered ecosystem engineer. *Ecosphere* 11

Vial L. (2020): Biological and ecological characteristics of soft ticks (ixodida: argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite* 16(3):191-202.

Vieira C. B., Praça Y. R., da Silva Bentes K. L., Santiago P. B., Silva S. M., dos Santos Silva g., Motta F. N., Bastos I. M. D., de Santana J. M., de Araújo C.N. (2018): Triatomines: Trypanosomatids, Bacteria, and Viruses Potential Vectors? *Front Cell Infect Microbiol.* 8: 405.

Walker A. A., Madio B., Jin J., Undheim E. A. B. , Fry B. G. , King G. F. (2017): Melt With This Kiss: Paralyzing and Liquefying Venom of The Assassin Bug *Pristhesancus plagipennis* (Hemiptera: Reduviidae). *Mol Cell Proteomics* 16(4):552-566.

Wang M., An Y., Gao L., Dong S., Zhou X., Feng Y., Wang P., Dimopoulos G., Tang H., Wang J. (2021): Glucose-mediated proliferation of a gut commensal bacterium promotes *Plasmodium* infection by increasing mosquito midgut pH. *Cell Rep.* 35(3): 108992.

Weinstein S. B., Martínez-Mota R., Stapleton T. E., Klure D. M., Greenhalgh R., Orr T. J., Dale C., Kohl K. D., Dearing M. D. (2021): Microbiome stability and structure is governed by host phylogeny over diet and geography in woodrats (*Neotoma* spp.). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 118(47): e2108787118.

Weirauch C., Munro J. B. (2009): Molecular phylogeny of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. *Molecular phylogenetics and evolution* 53, 287-299

Welburn S. C., Maudlin I. (1999): Tsetse–Trypanosome Interactions: Rites of Passage. *Parasitol Today* 15(10):399-403.

Welburn S. C., Arnold K., Maudlin I., Gooday G. W. (1993): Rickettsia-like organisms and chitinase production in relation to transmission of trypanosomes by tsetse flies. *Parasitology* 107 (Pt 2):141-5.

Werren J. H. (1997): Biology of Wolbachia. *Annu Rev Entomol* 42:587-609.

Yun J., Roh S. W., Whon T. W., Jung M., Kim M., Park D., Yoon C., Nam Y., Kim Y., Choi J., Kim J., Shin N., Kim S., Lee W., Bae J. (2014): Insect Gut Bacterial Diversity Determined by Environmental Habitat, Diet, Developmental Stage, and Phylogeny of Host. *Appl Environ Microbiol.* 80(17): 5254–5264.