

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Mikrobiomy krevsajících ploštic podčeledi
Triatominae**

Bakalářská práce

Veronika Škochová

Školitel: RNDr. Eva Nováková, PhD.

České Budějovice 2017

Škochová, V., 2017: Mikrobiomy krevsajících ploštic podčeledi Triatominae. [The microbiomes of blood-sucking bugs of the subfamily Triatominae. Bc. Thesis, in Czech.] – 45 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This study surveys the microbiome of 7 species of bloodsucking bugs from the subfamily Triatominae. Based on the field data and the data generated from the laboratory colonies, the microbiomes have been recognized as species specific and stable in time and space. Furthermore, using the two species, *R. prolixus* and *T. vitticeps*, from the laboratory colonies, the study brings insight into the microbiome changes following the host ontogeny. While triatomines serve as the vectors of *T. cruzi*, the causative agent of Chagas disease, possible effects that this parasite may pose on the microbiome were analyzed. In contrast to the results published on several other host-microbiome-parasite systems, no correlation was found between presence/absence of *T. cruzi* and triatomine microbiome structure.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 bakalářské 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, 19. dubna

Veronika Škochová

Poděkování

Za veškeré rady a pomoc v laboratoři a při psaní bakalářské práce bych ráda poděkovala své školitelce Evě Novákové, a také Sonie Rodriguez. Dále patří velké díky také všem studentům naší laboratoře, kteří mi v případě potřeby poradili a pomohli, zejména pak Simoně Křepelkové, Evě Šochové a Janě Říhové.

Obsah:

1	Úvod.....	1
1.1	Symbióza.....	1
1.2	Podčeleď Triatominae.....	3
1.3	<i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.4	Chagasova choroba.....	7
2	Cíle práce.....	8
3	Materiál a metody.....	9
3.1	Vzorky.....	9
3.2	Pitva a izolace DNA.....	10
3.2.1	Laboratorní chov ČR.....	10
3.2.2	Terénní sběry v USA.....	10
3.2.3	Laboratorní chov USA.....	11
3.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	11
3.3.1	Ověření úspěšnosti izolace.....	11
3.3.2	Diagnostika <i>T. cruzi</i>	12
3.3.3	Molekulární determinace taxonomie.....	14
3.4	Gelová elektroforéza.....	15
3.5	Sanger sekvenace a zpracování dat.....	15
3.6	Amplikonové sekvenování a zpracování dat.....	16
3.7	Zpracování dat.....	16
4	Výsledky.....	19
4.1	Pitva a izolace DNA.....	19
4.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	19
4.2.1	Ověření úspěšnosti izolace.....	19
4.2.2	Diagnostika <i>T. cruzi</i>	19
4.2.3	Molekulární determinace taxonomie.....	20
4.3	Sanger sekvenace a zpracování dat.....	20
4.4	Fylogenetická analýza.....	20
4.5	Posouzení profilu mikrobiomu v průběhu ontogeneze.....	21
4.6	Posouzení vlivu lokality na složení mikrobiomu.....	24
4.7	Posouzení druhové specifity mikrobiomu.....	25
4.8	Posouzení závislosti statutu přenašeče na profilu střevního mikrobiomu.....	27
5	Diskuze.....	29
5.1	Diagnostika <i>T. cruzi</i>	29

5.2	Posouzení profilu mikrobiomu v průběhu ontogeneze.....	30
5.3	Hostitelská specifita mikrobiomu.....	32
5.4	Vliv lokality na složení mikrobiomu.....	33
5.5	Vliv <i>T. cruzi</i> na složení mikrobiomu.....	33
6	Závěr.....	35
7	Seznam použité literatury.....	36
8	Přílohy.....	43

1 Úvod

1.1 Symbióza

Symbióza je definována jako společné soužití dvou nebo více organismů. Takových soužití je v přírodě známo velké množství. Častěji se tento termín používá pouze pro popis vztahu, který je výhodný pro všechny zúčastněné organismy. V takovém případě jde o mutualismus (Margulis, 1973). Ve skutečnosti však pojem symbióza zahrnuje i parazitismus nebo komenzalismus. Pro rozdíly mezi mutualismem a parazitismem nelze v zásadě definovat žádnou pevnou hranici. Některé bakterie totiž mohou být prospěšné pro jednoho hostitele za určitých podmínek, ale pro jiného mohou být za stejných podmínek, ale v jiném prostředí, škodlivé (Dale & Moran, 2006). Pro symbiózu je typické to, že v mnoha případech není jeden z partnerů schopen vyrábět si některé látky nezbytně důležité pro život. Tyto látky získává právě od svého symbionta (Margulis, 1973). Symbióza tak umožňuje rozšíření niky hostitele a přispívá k evoluční diverzifikaci (Moran et al., 2003).

U bezobratlých živočichů, a zejména u hmyzu, se vyskytuje řada pozoruhodných symbiotických vztahů s bakteriemi (Moran et al., 2003). Asociace mezi hostiteli a jejich obligátními endosymbionty existují s odhadem 30 – 250 milionů let (Feldhaar, 2011). Buchner (1953) ve své knize morfologicky popsal stovky různých symbióz hmyzu s mikroorganismy. Až 21. století ale přineslo možnost vzhledu do genomické podstaty těchto vztahů, a to díky rozvoji sekvenačních technik. V poslední dekádě jsou tyto symbiotické vztahy studovány komplexně. Jde o studium genomu hostitele spolu s genomem/genomy všech jeho mikrobiálních symbiontů (mikrobiomu), tedy o studium tzv. holobiontu a hogenomu (Feldhaar, 2011). Mikrobiom je souhrnným označením pro intracelulární a extracelulární bakterie, případně jednobuněčné eukaryotické symbionty, přenášené jak vertikálně, tak horizontálně.

Pro vztahy hmyzu s bakteriemi byly definovány dvě ekologicky odlišné skupiny symbióz. U mnoha druhů hmyzu lze nalézt obligátní endosymbiotické bakterie, jinak také primární symbionty. Vyskytují se pouze v bakteriocytech, případně bakteriomech, což jsou hostitelské buňky a orgány specializované pro „ubytování“ symbiontů. V hemocoelu nebo v jiných typech buněk nejsou schopni přežít (Moran & Yun, 2015). Primární symbionti mají minimální, často dokonce žádný negativní vliv na celkovou fitness hostitele. Naopak přináší nutriční, reprodukční nebo imunitní výhody a stávají se tak pro hostitele životně důležitými. (Dale & Moran, 2006). Proto jsou pevně spjati s hostitelskou populací a najdeme je u

každého jedince populace (Koga et al., 2003), ve které jsou přenášeni přímo z matky na potomstvo (Moran & Yun, 2015). Typický vztah hmyzu s primárními symbionty je založen na poskytování živin, které se v potravě hostitele vyskytují omezeně, nebo v ní zcela chybí. Zejména fytofágní a hematofágní hmyz přežívá jen díky symbiontům, kteří jim k jejich extrémně nevyvážené stravě syntetizují chybějící esenciální látky. Mezi nejstarší známé primární symbionty patří rody *Buchnera*, *Blochmannia* nebo *Wigglesworthia* (Dale & Moran, 2006).

Druhou skupinou jsou pak sekundární symbionti. Jde o fakultativní endosymbiotické bakterie, které se vyskytují v různých druzích tkání a buněk (Koga et al., 2003; Moran & Yun, 2015). Mezi takové tkáně patří například tukové těleso, svaly, nervová tkáň nebo i střevo (Feldhaar, 2011). Oproti primárním symbiontům se tedy obvykle nevyskytují v žádných specializovaných orgánech a pro hostitele nejsou nezbytní (Dale & Moran, 2006). Na rozdíl od primárních se sekundární symbionti mohou přenášet mezi hostiteli i horizontálním přenosem (Moran & Yun, 2015). Z pohledu hostitele jsou tyto bakterie fakultativní a mohou být jak prospěšné, tak i škodlivé (Dale & Moran, 2006; Feldhaar, 2011). Hostitelé například profitují z toxinů nebo antibiotik, které symbionti produkují (Feldhaar, 2011). Na druhou stranu mohou někteří fakultativní symbionti negativně ovlivňovat reprodukci hostitele ve svůj vlastní prospěch, příklad tzv. „sex-distorters“ (Jeong & Suh 2008).

Symbiotické vztahy v podčeledi Triatominae se ale výše popsané klasifikaci vymykají. Ač Triatominae patří do skupiny živočichů, kteří se živí výhradně krví, tedy potravou s nedostatečným množstvím určitých látek (Beard, 2001), postrádají typické primární symbionty vázané na bakteriocyty. Zástupci této podčeledi udržují vztah s bakteriemi lokalizovanými volně v lumen střeva, k jejichž přenosu mezi jedinci dochází koprofágií (požírání výkalů) nebo při vzájemném sání (Schofield, 2000; Otálora-Luna et al., 2015). Tato specifická mikroflóra je velice důležitá, jelikož její absence může mít negativní dopad na vývoj i funkci imunitního systému (Feldhaar, 2011). Předpokládá se, že tyto extracelulární bakterie napomáhají doplňovat nedostatek vitaminů skupiny B (Baines, 1956).

Mezi nejvýznamnější symbiotické bakterie střeva triatom patří *Rhodococcus rhodnii* (Baines, 1956; Garcia et al., 2007). Absence těchto bakterií má vliv na ontogenetický vývoj triatom (Baines, 1956). Velikost populace těchto symbiontů závisí na několika faktorech, jako je fáze životního vývoje nebo doba od příjmu potravy (Eichler & Schaub, 2002). Druhým známým symbiontem triatom je *Arsenophonus triatominarum*. Poprvé byl popsán u

druhu *Triatoma infestans* jako intracelulární i extracelulární bakterie nalezená v srdci, hemolymfě, nervovém ganglionu, slinných žlázách, vaječnicích, varlatech a viscerálních svalech (Hypša & Dale, 1997). Výskyt této bakterie byl potvrzen u 17 různých druhů podčeledi Triatominae (Šorfová, 2008). Z fylogenetické analýzy je patrné, že *A. triatominarum* je blíže příbuzný s další bakterií tohoto rodu *Arsenophonus nasoniae* (Hypša & Dale, 1997; Nováková, 2009). Kromě Triatominae byl rod *Arsenophonus* identifikován ještě u parazitických vos, molic, mšic, klíšťat, včel, vši, mravenců a několika druhů rostlin (Nováková, 2009).

K oběma výše zmíněným bakteriím byla historicky upírána značná pozornost. Jsou dostupné jejich genomické sekvence, ale role těchto symbiontů v systému zatím není známá (Nováková, 2009). Recentní studie, založené na „high throughput“ sekvenování, například poukazují na absenci těchto symbiontů u některých zástupců triatom (Díaz, 2016). Jejich nutriční význam je tak značně diskutabilní. Je velice pravděpodobné, že triatomy nemají výhradního nutričního symbionta, ale na doplnění živin se podílí více zástupců z mikrobiomu. Jelikož jsou dnešní znalosti o mikrobiomech triatom značně omezené, především na několik málo jihoamerických druhů jako hlavních přenašečů Chagasovy choroby, je nutné dále se zabývat především celkovou diversitou, stabilitou a funkcí těchto mikrobiálních komunit.

1.2 Podčeleď Triatominae

Podčeleď Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) se obvykle dělí na 6 kmenů, ve kterých je dále 18 rodů (Hypša et al., 2002; Vallejo, 2009). Dnes je známo 140 druhů (Schofield & Galvao, 2009; Vallejo, 2009), jejichž společným charakteristickým znakem je to, že se živí výhradně krví obratlovců. Proto mají různě modifikované části ústního ústrojí, specifické složení slin, a také různě modifikované zažívací ústrojí (Schofield, 2000). Dvěma hlavními rody s největším epidemiologickým významem jsou rody *Triatoma* a *Rhodnius* (Vallejo, 2009). Nejvýznamnější zástupci se přizpůsobili životu v blízkosti lidských obydlí (Schofield & Galvao, 2009). Většina zástupců této podčeledi se vyskytuje výhradně v Severní a Jižní Americe. Existují však i druhy, které jsou rozšířeny i mimo tyto oblasti. Ve východní části Asie jde o druh *T. rubrofasciata* (Jurberg & Galvao, 2006; Schofield & Galvao, 2009), v Indii je to rod *Linshcosteus* (Schofield & Galvao, 2009). Některé druhy žijí i na pobřeží Austrálie (Jurberg & Galvao, 2006).

Stanoviště, které Triatominae vyhovuje, musí poskytovat určité stabilní klima a přístup ke zdroji krve. Většina druhů je schopna žít v podmínkách, kde se vzdušná vlhkost pohybuje mezi 30 – 80 % a teploty jsou ideálně mezi 24 – 28 °C. Na teplotě je závislý jejich vývoj. Pod 16 °C se triatomy vyvíjí velice pomalu, naopak teploty vyšší než 40 °C už jsou letální (Jurberg & Galvao, 2006).

Triatominae patří mezi hmyz s nedokonalou proměnou. Z vajíčka se tak dospělec vyvine přes pět nymfálních stádií (Jurberg & Galvao, 2006). Celý vývojový cyklus trvá od 3 až 4 měsíců u druhu *Rhodnius prolixus* až po dva roky, a to u druhu *Panstrongylus megistus* (Jurberg & Galvao, 2006). Všechna vývojová stadia se živí krví. Vzhledově se nymfy od dospělců liší. Dospělci mají dobře vyvinutý zevní genitál a křídla, která u nymfy chybí. Další rozdíly jsou mezi jednotlivými pohlavími. Samičky mají konec těla do špičky, zatímco samečci zaoblený. Samičky jsou také větší (Jurberg & Galvao, 2006).

Jelikož se původně triatomy živily na bezobratlých, jejich přechod na obratlovce vyžadoval různé adaptace těla. Obecně je ústní ústrojí dravců z rodiny Reduviidae velmi robustní a silně chitinizované, často se zakřivením. V případě Triatominae je však štíhlé a přizpůsobuje se charakteru povrchu těla hostitele (Schofield, 2000). Další modifikace souvisí se složením slin. Ostatní dravci potřebují toxické sliny, které jsou schopné rychle oběť imobilizovat. Naopak sliny krevsajících Triatominae musí být mnohem méně agresivní (Schofield, 2000). Fungují jako anestetikum a snižují srážlivost krve (Kollien & Schaub 2000; Jurberg & Galvao, 2006). Po pozření krve dochází také k chemickým změnám, a to hlavně v oblasti recta. Do té doby mírně kyselé pH se během 24 hodin mění na alkalické a zvyšuje se osmolalita (Kollien & Schaub 2000). Následuje defekace. Dochází k ní buď přímo při krmení, nebo brzy po krmení. Některé druhy nejprve opustí zdroj potravy a vyprazdňují se až poté (Jurberg & Galvao, 2006).

Obecně platí, že většina organismů má určitou strukturu, která chrání jejich trávicí trakt. U hmyzu to může být peritrofická (PM) nebo perimicrovillární membrána, u obratlovců je to pak slizniční vrstva. Podčeled Triatominae nemá PM, ale u druhu *Rhodnius prolixus* byla nalezena již zmíněná perimicrovillární membrána. Tato membrána se vyskytuje u všech zástupců řádu Hemiptera (kromě těch živících se xylémem) (Ferreira, 1988; Silva et al., 1995; Alves, 2007). Pokrývá mikrokly v trávicím traktu (Shao, 2001). Je to permanentní struktura, ale její růst pravděpodobně závisí na dostupnosti potravy (Silva et al., 1995). Funguje jako fyzikální i fyziologická bariéra pro enzymy a podílí se jak na zažívání, tak na vstřebávání živin z krve. Byla také zjištěna její souvislost s infekcí

triatom *Trypanosomou cruzi*. *T. cruzi* se totiž na svého vektora přichytí právě v místě této membrány. Absence PM u Triatominae může být extrémně důležitá jak pro evoluci a mechanismus mikrobiální symbiomy, tak pro vektorovou kapacitu (Alves, 2007).

Morfologie střeva u hmyzu živícího se krví se liší, ale obecně se střevo dělí na dvě nebo více funkčních částí. Tyto oblasti jsou po celé své délce tvořeny jednou vrstvou epiteliálních buněk (Billingsley & Downe 1983). Střevo triatom je rozděleno do tří různých částí, kterými jsou apikální, mediální a bazální část (Alves, 2007). Kollien & Schaub (2000) dělí střevo triatom na 4 části: foregut, přední midgut (jinak také „žaludek“ nebo „vole“), zadní midgut („malé střevo“) a hindgut. Na povrchu střeva dochází po nakrmení k určitým změnám souvisejícím se strukturou. Před krmením je apikální část typickou plasmatickou membránou, která je pokrytá glykokalyxem. Po požití krve se ale objevují složitější struktury, konkrétně dvě plasmatické membrány oddělené již zmíněnou perimicrovillární membránou (Billingsley & Downe 1983). Z funkčního hlediska je rozděleno na dvě oblasti, a to na přední shromažďující oblast a zadní trávicí oblast, která obsahuje symbiotické bakterie (Billingsley & Downe 1983).

Zástupci všech druhů jsou pravděpodobně schopni přenášet *Trypanosomu cruzi*, která je původcem Chagasovy choroby (Jurberg & Galvao, 2006; Schofield & Galvao, 2009; Vallejo, 2009). Některé druhy rodu *Rhodnius* mohou přenášet i blízkce příbuznou *T. rangeli* (Vallejo, 2009). Zdá se, že *T. cruzi* své vektory ovlivňuje pouze v případě, kdy vektorů hladoví, takže je označována jako subpatogenní. V případě *T. rangeli* je situace jiná. Tento druh je pro rod *Rhodnius* patogenní, jelikož snižuje počet symbiontů v hostiteli (Vallejo, 2009).

1.3 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi je parazitický prvok ze skupiny Kinetoplastida. Tyto prvoky lze v rámci taxonu zařadit do několika různých skupin, a to na základě jejich genotypové i fenotypové variability (Gumiel et al., 2015). Jejich široká genetická diverzita vzniká v důsledku toho, že při množení nedochází k žádné (nebo výjimečně malé) výměně genetické informace (Souto, 1997). Jednou z možností je klasifikace s využitím specifických primerů, které jsou založeny na mini-exonech, rovněž použitých v této práci. Často se používá rozdělení do šesti tzv. „Discrete Typing Units“ (DTUs). V rámci těchto DTUs existují skupiny TcI – TcVI (Gumiel et al., 2015).

Geografické rozšíření těchto skupin poukazuje na fakt, že jedinci ze skupin TcII – TcVI jsou nejčastěji původci Chagasovy choroby v jižních částech Jižní Ameriky. Trypanosomy skupiny TcI v těchto oblastech infikují pouze volně žijící živočichy (Espinoza et al., 2010). Hlavními původci nemoci u člověka jsou naopak v Kolumbii, Venezuele a Střední Americe (Mejía-Jaramillo, 2009).

Trypanosoma cruzi je schopná žít a vyvíjet se pouze ve střevě triatom (Garcia et al., 2007). Jde tedy o sterkorálního parazita, na rozdíl od *Trypanosomy brucei*, která způsobuje spavou nemoc (Africkou trypanosomiázu) a je přenášena mouchou tse-tse. *T. cruzi* je schopná infikovat okolo 100 různých druhů savců (Garcia et al., 2007). K přenosu *T. cruzi* na dalšího hostitele dochází hned několika způsoby. Trypanosomou mohou být infikováni triatomy obou pohlaví, a to jak ve stádiu nymfy, tak i ve stádiu dospělce, jelikož potravou všech stádií je krev. Míra infekce se však zvyšuje s jejich stářím (Bern et al., 2011). Mezi živočichy, kteří fungují jako rezervoáry infekce, patří vačice, mývalové, pásovci, skunkové, ale i domestikovaní psi (Montgomery, 2014). Po vstupu do trávicí soustavy triatom spolu s požitou krví se parazit musí vyrovnávat s několika změnami. Jde o změny teploty, osmolality nebo změny související se zásobou živin, ale také s přítomností mikrobiomu hostitele. Také musí čelit trávicím enzymům a dalším látkám, které jsou obsaženy ve slinách Triatominae.

Člověka ploštice nejčastěji infikuje při sání krve, kdy zároveň dochází k uvolňování výkalů. Ty se poté dostávají přímo do rány a tím pádem do krve. V případě, že je stolice vylučována ve větší vzdálenosti od rány, může se infekce do rány dostat škrábáním (Nouvellet et al., 2013). Dále se infekce může šířit při krevních transfuzích, transplantacích orgánů, konzumaci infikovaného jídla, případně vertikálním přenosem (z matky na plod) (Bern et al., 2011).

Trypanosoma cruzi představuje mezi ostatními trypanosomatidy zástupce s jedním z nejsložitějších životních vývoju vůbec (Kollien & Schaub, 2000; de Souza, 2010). Její cyklus zahrnuje několik vývojových stádií (de Souza, 2010). *Trypanosoma cruzi* je schopná obývat mnoho nejrůznějších tkání, a také se neustále pohybovat mezi různými hostiteli. Tyto vlastnosti z ní dělají jednoho z nejúspěšnějších organismů s parazitickým způsobem života (Jansen et al., 1999).

1.4 Chagasova choroba

Chagasova choroba (jinak také Americká trypanosomiáza) je onemocnění, které popsal Carlos Chagas. Podle světové zdravotnické organizace (WHO) jde o vůbec nejrozšířenější chorobu způsobenou parazity v Severní i Jižní Americe. Odhaduje se, že v současné době je nakaženo asi 8 milionů lidí (Bern et al., 2011), z toho 300 000 ve Spojených státech amerických (Hotez et al., 2012). *Trypanosoma cruzi* je přenášena minimálně 20 druhy z podčeledi Triatominae (Nouvellet et al., 2013). Nejméně 11 z nich je rozšířeno ve Spojených státech amerických (Montgomery, 2014). Přesto, že pravděpodobnost přenosu parazita z triatom na člověka je pouze $5,8 \times 10^{-4}$ na jeden kontakt s infikovaným přenašečem, je tato nemoc velice rozšířená a ohrožuje miliony lidí na americkém kontinentu (Nouvellet et al., 2013).

U Chagasovy choroby existují tři typy infekcí, a to akutní, vrozená a chronická. Inkubační doba, po které dojde k propuknutí akutní fáze nemoci, se pohybuje mezi jedním až dvěma týdny. Samotná akutní fáze pak trvá asi 8 – 12 týdnů. Důkazem již probíhající nemoci je v tomto případě např. detekce trypomastigotů ve vzorcích čerstvé periferní krve pod mikroskopem (Montgomery, 2014). Nejvíce pacientů nevykazuje buď žádné příznaky, nebo se u nich objevují pouze netypické příznaky jako je horečka (Bern et al., 2011). Vrozená Chagasova choroba se projevuje nízkou porodní hmotností, narozením nedostatečně vyvinutého dítěte, anémií nebo trombocytopenií (Bern et al., 2011). Neléčená infekce přechází do chronické fáze. U 20 – 30 % lidí s desítky let trvající chronickou fází může docházet k přechodu na klinické srdeční onemocnění nebo onemocnění trávicího traktu (Montgomery, 2014). Existují pouze dvě látky, nifurtimox a benznidazol, u kterých byly prokázány účinky proti Chagasově chorobě (Maya et al., 2007; Bern et al., 2011). Obě látky jsou schopné potlačit akutní fázi nemoci, u chronické fáze jsou jejich účinky nižší. Navíc je jejich použití vzhledem k množství vedlejších účinků značně kontroverzní.

Někteří vědci shledávají situaci kolem Chagasovy choroby podobnou té, kdy začala epidemie HIV viru, potažmo onemocnění AIDS (Hotez et al., 2012). Lze totiž najít hned několik podobností mezi lidmi trpícími Chagasovou chorobou a HIV/AIDS pozitivními pacienty (Hotez et al., 2012). Obě nemoci se objevují hlavně v chudých poměrech, kdy lidé žijí ve špatných podmínkách. U obou je v případě chronické fáze nutná dlouhodobá léčba. V případě HIV/AIDS je léčba schopna uchránit nemocného od smrti, nikoliv však od viru/onemocnění jako takového. U Chagasovy choroby byla účinnost léků prokázána pouze u akutních fází infekce anebo u dětí do 12 let, u kterých byla chronická fáze teprve

v začátcích (Hotez et al., 2012). Navíc léky proti oběma nemocem jsou velice drahé. U Chagasovy choroby je odhadovaná cena kolem 1 028 dolarů za rok na pacienta a stává se tak nedostupnou pro obyvatele chudých rozvojových zemí (Hotez et al., 2012).

2 Cíle práce

V této práci se budu zabývat mikrobiálními komunitami krevsajících ploštic skupiny Triatominae. Konkrétně se zaměřím na studium následujících témat.

- I. Zmapování dynamiky mikrobiomu v průběhu ontogeneze hostitele.
- II. Posouzení diversity a hostitelské specifity mikrobiomů vybraných druhů severoamerických triatomínů.
- III. Posouzení závislosti statutu přenašeče (tj. pozitivně diagnostikována *Trypanosoma cruzi*) na profilu střevního mikrobiomu.

3 Materiál a metody

3.1 Vzorky

Soubor analyzovaných jedinců pocházel ze tří různých zdrojů. Prvním zdrojem byly vlastní laboratorní kolonie chované na Katedře parazitologie Přírodovědecké fakulty JU, ze kterých bylo zpracováno celkem 50 vzorků z 50 jedinců. Konkrétně šlo o Triatominae druhu *Rhodnius prolixus* a *Triatoma vitticeps*. Druhým zdrojem byly laboratorní kolonie chované v Arizoně, ze kterých pocházelo 20 vzorků od 20 jedinců, a to druhů *Triatoma recurva*, *Triatoma protracta* a *Triatoma rubida*. Posledním zdrojem byly pak terénní sběry zajištěné spolupracujícími laboratoři. Dvacet vzorků jsme získali z abdomenů 20 jedinců v ethanolu, 14 z nich pocházelo z Kalifornie (*Triatoma protracta*) a 6 z Arizony (*Triatoma protracta* a *Triatoma rubida*). Zbylé vzorky byly posbírány v Texasu. Zde bylo získáno celkem 34 vzorků různých tkání ze 17 jedinců. Taxonomické zařazení u těchto jedinců bylo určeno molekulárně pomocí sekvencí cytochrom oxidázy.

Tab. I: Přehled získaných vzorků.

Druh	Zdroj/Lokalita	Počet jedinců	Počet vzorků	Počet let v lab. kolonii
<i>Triatoma vitticeps</i>	České Budějovice	24	24	>10
<i>Rhodnius prolixus</i>	České Budějovice	26	26	>10
<i>Triatoma protracta</i>	Arizona – kolonie	5	5	7
	Arizona – terén	3	3	NA*
	Kalifornie	14	14	NA*
	Texas	2	4	NA*
<i>Triatoma rubida</i>	Arizona – kolonie	5	5	7
	Arizona – terén	3	3	NA*
<i>Triatoma recurva</i>	Arizona	10	10	7
<i>Triatoma sanguisuga</i>	Texas	10	20	NA*
<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Texas	5	10	NA*

* vzorky pochází z terénu

3.2 Pitva a izolace DNA

3.2.1 Laboratorní chov ČR

K posouzení profilu mikrobiomu v průběhu ontogeneze byly použity vzorky z laboratorního chovu v Českých Budějovicích. Z tohoto chovu byli pitváni jedinci nejpočetnějších druhů *Rhodnius prolixus* a *Triatoma vitticeps*. Pitva byla prováděna vždy u 3 jedinců z každého ze šesti instarů (celkem 36 vzorků), dále byla k izolaci DNA použita také 3 vajíčka od každého druhu (viz oddíl 8, Tab. P1). Cílem pitvy bylo z každého jedince získat celé střevo, ze kterého byla poté DNA vyizolována. Pitva probíhala pod stereomikroskopem na Petriho misce s PBS (phosphate-buffered saline). Střevo bylo následně přemístěno do zkumavky se směsí pufru ATL a proteinázy K (dle návodu DNeasy Blood & Tissue kitu (Qiagen)), stejně tak vajíčka. Ta byla ještě předtím propíchnuta jehlou, aby do nich izolační směs dostatečně pronikla. Zbytky těl byly dány do zkumavek se 100% ethanolem a následně uchovány v -4°C . Po pitvě následovala izolace DNA s použitím DNeasy Blood & Tissue kitu (Qiagen), postup byl dodržen dle návodu od výrobce.

3.2.2 Terénní sběry v USA

K posouzení diversity a hostitelské specifity byly využity vzorky pocházející z terénu, které byly poskytnuty spolupracujícími laboratořemi. Informace o těchto vzorcích jsou shrnuty v následující tabulce II.

Tab. II: Vzorky z terénních sběrů v USA.

Druh	Počet jedinců	Počet vzorků	Zdroj DNA	Lokalita
<i>Triatoma protracta</i>	14	14	Abdomen	Kalifornie
<i>Triatoma protracta</i>	3	3	Abdomen	Arizona
<i>Triatoma rubida</i>	3	3	Abdomen	
<i>Triatoma protracta</i>	2	4	G GR	Texas
<i>Triatoma sanguisuga</i>	10	20	G GR	Texas
<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	5	10	G GR	Texas

Bylo nutné využít několik různých zdrojů DNA. Z etanolových vzorků byla templátová DNA izolována z celého abdomenu. DNA z živých jedinců byla vyizolována po jejich pitvě. Pocházela ze střeva (G) a ze zbytku orgánů a tkání nacházejících se v abdomenu (GR). Izolace ze střeva umožnila analyzovat mikrobiom specifický pro tento orgán. Izolace GR pak umožnila dobře porovnat data mezi G (bioinformaticky spárovanými s GR) a abdomenem.

3.2.3 Laboratorní chov USA

K posouzení hostitelské specifity a stability mikrobiomů vybraných druhů severoamerických triatomů byly využity vzorky pocházející z laboratorního chovu v Arizoně. Celkem šlo o 20 vzorků DNA získané z 20 jedinců rodů *Triatoma recurva*, *Triatoma protracta* a *Triatoma rubida*. Z toho 15 vzorků DNA bylo vyizolováno z celého těla a 5 vzorků ze střeva. Většina triatom (celkem 17), ze kterých tyto vzorky pocházely, byla druhého instaru (9 vzorků *T. recurva*, 5 vzorků *T. protracta* a 3 vzorky *T. rubida*). Dva vzorky rodu *T. rubida* byly pak první instar a 1 vzorek (*T. recurva*) byl instar třetí.

3.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

3.3.1 Ověření úspěšnosti izolace

Pro ověření úspěšnosti izolace DNA, a to především pro ověření přítomnosti bakteriální složky, byla provedena zkušební PCR s nespecifickými EMP primery (viz Tabulka III). Přítomnost bakteriální složky byla testována pro 22 vzorků DNA pocházejících z jedinců z laboratorního chovu. EMP primery, navržené pro ampliconové sekvenování, targetují V3-V4 region 16S rRNA o délce cca 390 bp (<http://press.igsb.anl.gov/earthmicrobiome/protocols-and-standards/16s/>). Reakce byla namíchána vždy do objemu 20 µl, a to následujícím způsobem: 10 µl Plain PP Master Mixu (150 mM Tris-HCl, pH 8,8; 40 mM (NH₄)₂ SO₄; 0,02% Tween 20,5 mM MgCl₂; 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, 100 U/ml Tag DNA polymerázy, stabilizátory, aditiva; průmyslově vyrobený), 7 µl vody, 1 µl reverse primeru, 1 µl forward primeru a 1 µl DNA. PCR reakce (viz Tabulka IV) probíhala v přístroji Mastercycler (Eppendorf).

Tab. III: Sekvence EMP primerů (<http://press.igsb.anl.gov/earthmicrobiome/protocols-and-standards/16s/>).

Primer	Sekvence (5' - 3')
EMP F (515f)	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA
EMP R (806rB)	GGACTACNVGGGTWTCTAAT

Tab. IV: Podmínky PCR pro EMP primery.

Fáze cyklu	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	94 °C	2 min
Denaturace	94 °C	45 s
Nasedání primerů	50 °C	1 min
Syntéza DNA	72 °C	90 s
Konečná syntéza DNA	72 °C	10 min
Počet cyklů		35

3.3.2 Diagnostika *T.cruzi*

PCR na diagnostiku *T.cruzi* byla provedena na 18 vzorcích DNA. U 14 vzorků šlo o DNA jedinců pocházejících z volné přírody v Kalifornii, zbylé 4 vzorky byla DNA z laboratorního chovu v Arizoně. Využity byly primery TCZ1 a TCZ2. Jde o specifické primery pro *Trypanosoma cruzi* (Piron, 2007; Reisenman, 2010) amplifikující opakující se sekvence mikrosatelitního regionu nukleární DNA (nDNA) o délce 188 bp (Eloy & Lucheis 2012). Reakce o objemu 20 µl byla připravena stejným způsobem, jako v případě EMP primerů. Sekvence specifických TCZ1 a TCZ2 primerů uvádí tabulka V. V tabulce VI jsou pak shrnuty podmínky PCR pro tyto primery.

Tab. V: Sekvence specifických primerů.

Primer	Sekvence (5' - 3')
TCZ1 - F	CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT
TCZ2 - R	CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG

Tab. VI: Podmínky PCR.

Fáze cyklu	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	94 °C	5 min
Denaturace	94 °C	20 s
Nasedání primerů	57 °C	10 s
Syntéza DNA	72 °C	30 s
Konečná syntéza DNA	72 °C	7 min
Počet cyklů	37	

Diagnostická PCR byla rovněž provedena s kombinací primerů ME s reverzním primerem TC1 nebo TC2. Ty jsou specifické pro mini-exon gene *T. cruzi* (Gumiel et al., 2015). Reverzní primer TC2 se po první zkušební PCR ukázal jako lepší, proto byly všechny následující reakce prováděny právě s párem ME, TC2. Reakci bylo podrobena 37 vzorků, které byly získány v terénu. Z toho 14 vzorků pocházelo z Escondida v Kalifornii, 6 z Tucsonu v Arizoně a zbylých 17 z Texasu. Stejně jako v předchozích případech byla reakce míchána do 20 µl a opět s použitím stejných látek i stejných objemů. Další informace jsou v tabulkách VII (sekvence primerů) a VIII a IX (podmínky PCR).

Tab. VII: Sekvence primerů.

Primer	Sekvence (5' - 3')
ME - F	TACCAATATAGTACAGAAACTG
TC2 - R	TTGCTCGCACACTCGGCTGCAT
TC1 - R	ACACTTTCTGTGGCGCTGATCG

Tab. VIII: Podmínky PCR – dvojice TC1, ME.

Fáze cyklu	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	95 °C	1 min
Denaturace	94 °C	30 s
Nasedání primerů	57 °C	30 s
Syntéza DNA	72 °C	30 s
Konečná syntéza DNA	72 °C	10 min
Počet cyklů	35	

Tab. IX: Podmínky PCR – dvojice TC2, ME.

Fáze cyklu	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	95 °C	1 min
Denaturace	94 °C	30 s
Nasedání primerů	51 °C	30 s
Syntéza DNA	72 °C	30 s
Konečná syntéza DNA	72 °C	10 min
Počet cyklů		35

3.3.3 Molekulární determinace taxonomie

K určení druhu hostitele byla provedena PCR reakce s primery amplifikujícími cytochrom oxidázu (COX). Taxonomii bylo nutné určit u 17 jedinců pocházejících z volné přírody v Texasu. Reakce byla namíchána následujícím způsobem: do 20 μ l: 10 μ l Plain PP Master Mixu (150 mM Tris-HCl, pH 8,8; 40 mM $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$; 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl_2 ; 400 μ M dATP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dTTP, 100 U/ml Tag DNA polymerázy, stabilizátory, aditiva; průmyslově vyrobený), 7 μ l vody, 1 μ l reverse primeru, 1 μ l forward primeru a 1 μ l DNA. Použity byly primery COI L6625 (forward) a COI H7005 (reverse). Tyto primery amplifikují produkty o velikosti 381 bp (Hafner, 1994). V případě dvou vzorků byl forward primer COI L6625 nahrazen jiným forward primerem, který amplifikoval delší úsek DNA, a to 652 bp. Šlo o primer COI L1490. Sekvence všech těchto primerů jsou uvedeny v následující tabulce X (Lee, 2000). Podmínky PCR reakce pro první dvojici primerů pak v tabulce XI, pro druhou dvojici v tabulce XII (Alekseev et al., 2009).

Tab. X: Sekvence COX primerů.

Primer	Sekvence (5' - 3')
COI L6625	CCGGATCCTTYTGRTTYTTYGGNCAYCC
COI H7005	CCGGATCCACNACRTARTANGTRTCRTG
COI L1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG

Tab. XI: Podmínky PCR.

Fáze cyklu	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	95 °C	5 min
Denaturace	94 °C	1 min
Nasedání primerů	50 °C	1 min
Syntéza DNA	72 °C	1 min
Konečná syntéza DNA	72 °C	10 min
Počet cyklů		30

Tab. XII: Podmínky PCR.

Fáze cyklu	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	5 min	
Denaturace	90 °C	30 s	5
Nasedání primerů	45 °C	1 min	
Syntéza DNA	72 °C	90 s	
Denaturace	90 °C	30 s	27
Nasedání primerů	55 °C	45 s	
Syntéza DNA	72 °C	1 min	
Konečná syntéza DNA	72 °C	10 min	

3.4 Gelová elektroforéza

K rozdělení DNA fragmentů vzniklých při polymerázové řetězové reakci podle velikosti byla použita gelová elektroforéza. Cca 2 μ l PCR produktu bylo smícháno s přibližně stejným množstvím fluorescenčního barviva SYBR GREEN (Invitrogen) obsahujícím loading dye. Každý takto smíchaný vzorek produktu byl poté napipetován do 1% agarózového gelu. K určení přibližné velikosti DNA fragmentů byl využit 1kb DNA Ladder (GeneRuler 1kb Plus, Thermo Scientific). Následně byly výsledky vizualizovány pomocí UV záření v zařízení UVITEC s využitím programu Alliance.

3.5 Sanger sekvenace a zpracování dat

Na Sanger sekvenaci (<https://www.seqme.eu/cs>) byly odeslány pozitivní produkty PCR. Šlo o 19 produktů amplifikace cytochrom oxidázy o délce 381 bp a dva produkty o délce 652 bp. Dva produkty PCR screeningu na *T. cruzi* byly sekvenovány za účelem specificity amplifikace. Před odesláním byly PCR produkty enzymaticky přečištěny

exonukleázou (Exo I., Thermo Scientific) a alkalickou fosfatázou (Fast AP, Thermo Scientific). Ke každému PCR produktu bylo přidáno 0,2 µl od každého enzymu. Následně byly vzorky umístěny do přístroje Mastercycler (Eppendorf), kde proběhlo enzymatické přečištění (jeho podmínky viz Tab. XIII). Vzorky byly poté připraveny pro sekvenaci dle pokynů servisní laboratoře (<https://www.seqme.eu/cs>). Z každého přečištěného PCR produktu bylo odpipetováno 5 µl, k nim bylo přidáno 5 µl reverzního primeru.

Tab. XIII: Podmínky PCR pro enzymatické přečištění.

Fáze cyklu	Teplota	Čas
Inkubace	37 °C	15 min
Inaktivace enzymu	80 °C	15 min

Výsledné sekvence DNA byly na základě „quality scores“ osekány v programu Geneious (<http://www.geneious.com>) a alignovány pomocí příkazu „multiple align“. Z databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) byl alignment doplněn o sekvence COX druhů *T. dimidiata* (outgroup) a *T. gerstaeckeri*. Výsledná matice byla analyzována metodou Maximum Likelihood (ML) s použitím PhyML pluginu programu Geneious. Výsledný fylogenetický strom byl ilustrován v programu InkScape (<https://inkscape.org/en/>).

3.6 Amplikonové sekvenování a zpracování dat

Amplikonové knihovny 16S rRNA byly připraveny spolupracující laboratoří (Prof. Noah Fierer, CU Boulder, CO, USA) dle protokolu EMP (Earth Microbiome Project, <http://www.earthmicrobiome.org>). Celkově bylo v jednom multiplexovém běhu platformy Illumina MiSeq osekvenováno 384 barcodově odlišných vzorků, z toho 124 pro tento projekt.

3.7 Zpracování dat

Primární zpracování celého souboru hrubých Illumina pair-end dat, včetně párování, demultiplexování a kontroly kvality, bylo provedeno v programech Usearch (<http://www.drive5.com/usearch/>) a Qiime (<http://qiime.org/>) dle následujícího schématu.

- a) Nejprve byl vytvořen adresář pro ukládání dokumentů.
- b) Poté byly soubory přemístěny na server.

- c) Dále bylo nutné provést kontrolu mapy, aby splňovala požadavky programu Qiime. Ke kontrole byl použit skript „validate_mapping_file.py“.
- d) Následně byla data demultiplexována pomocí příkazu „prep_fastq_for_uparse_paired.py“.
- e) Pomocí skriptu „fastq_mergepairs demultiplexed_seqs/demultiplexed_seqs_1.fq“ bylo dosaženo spárování koncových readů.
- f) Poté byla data s pomocí skriptu „derep_fulllength“ v programu Usearch dereplikována. Byl zjištěn počet naprosto shodných sekvencí.
- g) Pomocí příkazu „sortbysize“, došlo k seřazení datasetu a následně byly odstraněny všechny sekvence, které se v celém datasetu vyskytovaly pouze jednou.
- h) Dále byla ze sekvencí vytvořena databáze, a to s použitím příkazu „cluster_otus“.
- i) Skript „usearch_global“ přiřadil demultiplexované sekvence k reprezentativnímu setu databáze, což vedlo k vytvoření OTU tabulky.
- j) V příštím kroku byla přidána taxonomická klasifikace za použití blast algoritmu a databáze SILVA. Nejprve bylo třeba změnit formát OTU tabulky z formátu .txt do formátu .biom. K tomu byl použit příkaz „convert biom“. Následně již došlo k přidání klasifikace, a to příkazy „assign_taxonomy.py“ a „biom add-metadata“.
- k) K odstranění kontaminací, jako např. chloroplastových a mitochondriálních sekvencí, byl v programu Qiime použit příkaz „filter_taxa_from_otu_table.py“.
- l) Dále pomocí skriptu „biom_summarize-table“ byl zkontrolován počet sekvencí pro každý vzorek a zvolena vhodná hladina znáhodnění.
- m) Dalším krokem bylo znáhodnění biomu na 990. Použit byl příkaz „single_rarefaction.py“.

K posouzení profilu mikrobiomu v průběhu ontogeneze u druhů *Rhodnius prolixus* a *Triatoma vitticeps* byly použity programy Qiime a R Studio. Postupovalo se podle následujícího schématu. Biomové soubory pro jednotlivé druhy byly vytvořeny příkazem „filter_samples_from_otu_table.py“. Taxonomický přehled pro mikrobiomy v jednotlivých ontogenetických stádiích byl generován příkazem „summarize_taxa_through_plots.py“. Podobnost mezi mikrobiomy různých vývojových stádií byla posouzena na základě NMDS

analýzy Bray-Curtis distancí kalkulovaných modulem *vegan* v programu R Studio (viz oddíl 8, Tabulka P2). Statistické vyhodnocení nebylo vzhledem k počtu vzorků provedeno.

Posouzení vlivu lokality na složení mikrobiomu bylo provedeno pro vzorky *T. protracta*. Jelikož DNA izoláty pro tento druh pocházely jak z celých abdomenů, tak z pitvaných střev a ostatních orgánů, byl nejprve vytvořen porovnatelný dataset. Data ze stejného jedince získaná specificky pro dva izoláty, ze střeva (G) a z ostatních orgánů (GR, viz 3.2.2) byla bioinformaticky sloučena do „datového abdomenu“ pomocí skriptu „collapse_samples.py“. Podobnost mezi mikrobiomy hostitelů s různým geografickým původem byla analyzována postupem popsaným v předchozím odstavci. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny funkcí *adonis* modulu *vegan* (<https://cran.r-project.org/web/packages/>). Podobným způsobem proběhla také analýza druhové specifiity mikrobiomů a korelace mikrobiomového profilu s přítomností/absencí *T. cruzi* v hostiteli.

4 Výsledky

4.1 Pitva a izolace DNA

Celkem se mi podařilo vyizolovat 36 vzorků DNA. DNA jsem izolovala z vypitvaného střeva. Pitvala jsem zástupce nejpočetnějších kolonií laboratorního chovu, a to vždy 15 jedinců z každého rodu (*Rhodnius prolixus* a *Triatoma vitticeps*). Dále jsem DNA izolovala z vajíček (3 vajíčka pro každý druh). Další analyzované vzorky (13) pocházely z trusu triatom. Získané vzorky DNA jsou shrnuty v tabulce XIV.

Tab. XIV: Počty získaných vzorků DNA.

Instar	L0 vajíčko	L1	L2	L3	L4	L5	L6 dospělec	L6 trus
<i>Rhodnius prolixus</i>	3	3	3	3	3	3	3	5
<i>Triatoma vitticeps</i>	3	3	3	3	3	3	3	3

4.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

4.2.1 Ověření úspěšnosti izolace

Nejprve jsem ověřovala úspěšnost izolace DNA, a to pomocí EMP primerů. Tuto zkušební PCR jsem prováděla jak u 18 vzorků DNA, které jsem vypitvala, tak u 4 vzorků DNA pocházejících z laboratoře v Arizoně. Izolace se ukázala úspěšná u všech z 18 testovaných vzorků. PCR byla pozitivní i u vzorků z Arizony.

4.2.2 Diagnostika *T. cruzi*

Diagnostiku *T. cruzi* jsem prováděla na celkem 18 vzorcích DNA. Čtyři vzorky z neinfikovaných kolonií druhů *Triatoma recurva* a *Triatoma protracta* pocházejících z laboratorního chovu v Arizoně byly použity jako negativní kontrola. PCR byla u jednoho z těchto vzorků pozitivní. Proto byly následně nalezeny a použity jiné primery, konkrétně dvě dvojice primerů specifických pro *T. cruzi* (Gumiel et al., 2015). Šlo o forward primer ME a reversní primery TC1 a TC2. PCR jsem provedla u 37 vzorků. Všechny tyto vzorky DNA byly z jedinců žijících ve volné přírodě v Kalifornii, Arizoně a Texasu. Osm vzorků

bylo pozitivních na *T. cruzi*. U dvou vzorků se pak PCR nepodařila provést ani při opakovaném pokusu. Výsledky shrnuje tabulka P3 (viz oddíl 8).

4.2.3 Molekulární determinace taxonomie

Za účelem taxonomické klasifikace jedinců žijících ve volné přírodě v Texasu bylo získáno celkem 20 produktů amplifikace genu COX.

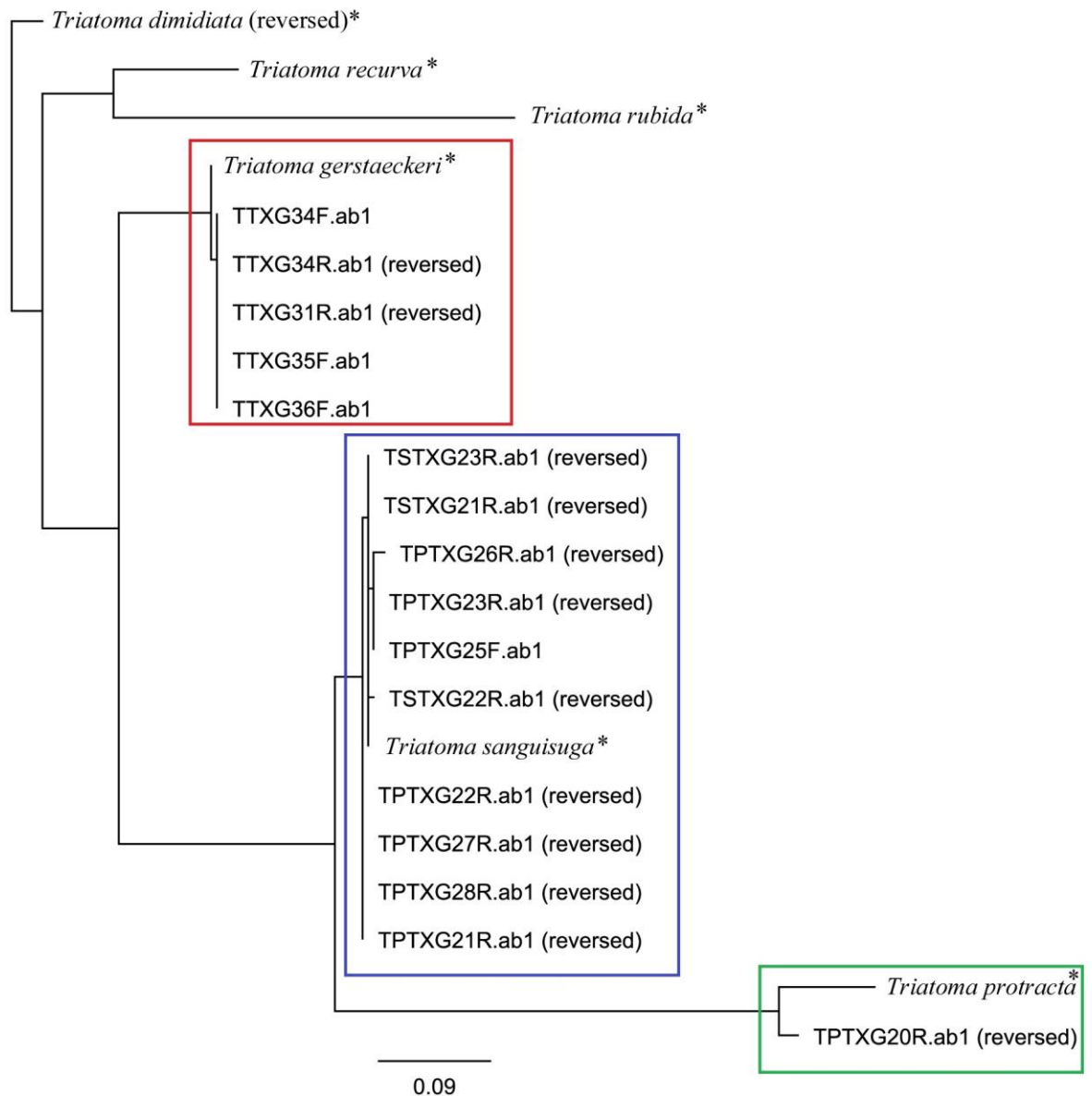
4.3 Sanger sekvenace a zpracování dat

Dva produkty screeningu trypanosom byly na základě 100% sekvenční shody identifikovány jako mini-exon gene *Trypanosoma cruzi*, a byla tak potvrzena specifická dvojice primerů ME a TC2.

Dále bylo získáno 20 sekvencí COX, 18 o délce 381 bp, 2 o délce 652 bp. Vzhledem k absenci sekvencí použitého markeru pro některé severoamerické druhy byla provedena jednoduchá fylogenetická analýza.

4.4 Fylogenetická analýza

Výsledná fylogeneze, tj. taxonomická příslušnost jednotlivých vzorků, byla použita pro účely analýz hostitelské specifity mikrobiomů. Pět vzorků pocházelo ze čtvrtých a pátých instarů druhu *Triatoma gertaeckeri*, 11 vzorků pocházelo ze čtvrtých, pátých a šestých instarů druhu *Triatoma sanguisuga*. Dva vzorky pak byly z dospělců druhu *Triatoma protracta*, jeden vzorek z druhého instaru druhu *Triatoma recurva* a jeden vzorek z druhého instaru druhu *Triatoma rubida* (viz Obr. 1 a Tabulka P4 v oddílu 8).

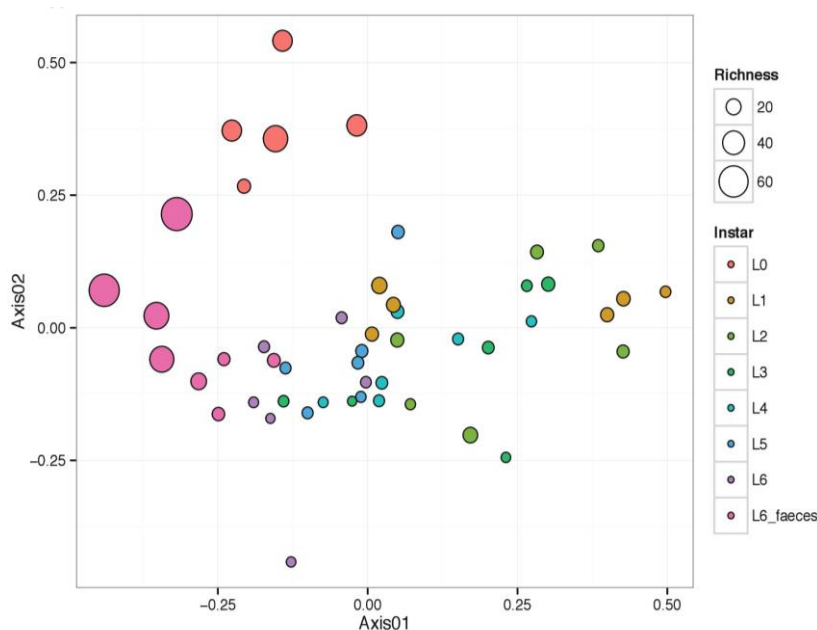


Obr. 1: Fylogenetický strom generovaný metodou ML z dat pro gen COX. Barvy zvýrazňují výslednou taxonomickou příslušnost jednotlivých vzorků: červená – *T. gerstaeckeri*, modrá – *T. sanguisuga*, zelená – *T. protracta* (*morfologicky determinovaný jedinec).

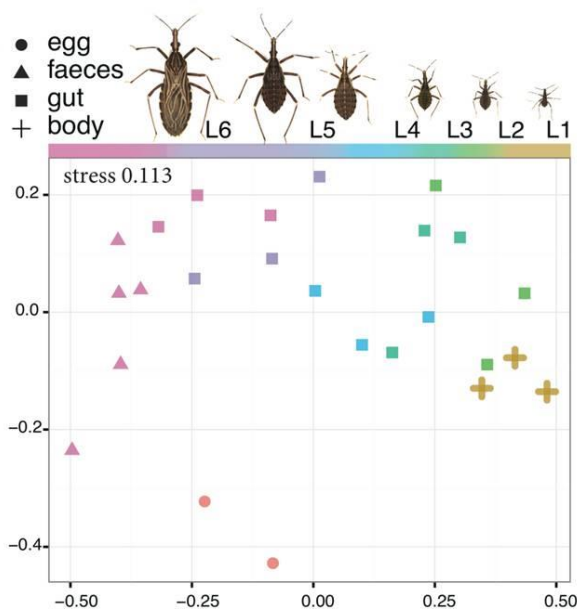
4.5 Posouzení profilu mikrobiomu v průběhu ontogeneze

Podařilo se mi prozkoumat mikrobiom jedinců v jednotlivých fázích ontogeneze. Šlo o jedince druhu *Rhodnius prolixus* a *Triatoma vitticeps*. Zkoumáno bylo od každého druhu vajíčko, všechny vývojové fáze (instary), a také trus.

Richness mikrobiomu u obou druhů byla výrazně vyšší v případě vajíčka a trusu (viz Obr. 2). NMDS analýza ukazuje posun mikrobiomových profilů korelující s ontogenezí hostitele, a to výrazněji pro druh *R. prolixus*.



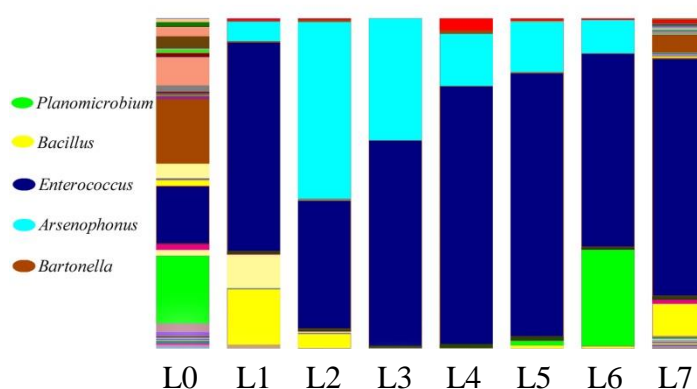
Obr. 2: NMDS analýza nepodobnosti mikrobiomů pro různá vývojová stádia a trus druhů *R. prolixus* a *T. vitticeps*. Body reprezentující v 2D prostoru podobnost jednotlivých mikrobiomů různých vývojových stádií byly škálovány dle odpovídajících hodnot richness. Barvy označují jednotlivé instary. Čím blíže jsou si body, tím podobnější jsou si mikrobiomy.



Obr. 3: Vývoj mikrobiomu během ontogeneze druhu *R. prolixus*. Barvy rozlišují jednotlivá vývojová stádia. Různé tvary rozlišují různý původ DNA: kolečko – vajíčko, trojúhelník – trus, čtverec – střevo, křížek – tělo.

Složení mikrobiálních profilů v průběhu ontogeneze obou analyzovaných hostitelů se výrazně mění. U druhu *T. vitticeps* jsou nejčastějšími druhy bakterií

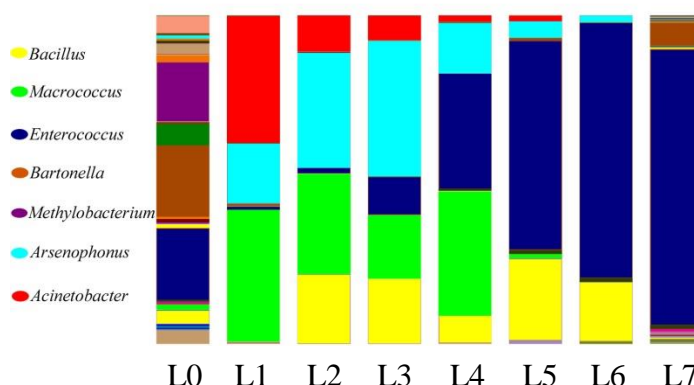
ve vajíčku (z celkových 42 druhů) druhy *Planomicrobium* (20,6 %), *Bartonella* (19,5 %) a *Enterococcus* (17,3 %). Jednotlivé instary jsou druhově méně bohaté. Nejvíce druhů ze všech má první instar (12 druhů), druhým nejbohatším je pátý instar (11 druhů). V obou případech je velice dominantním druhem *Enterococcus*. V případě druhého instaru tvoří polovinu mikrobiomu (53,3 %) *Arsenophonus*. Nejméně druhů se vyskytuje u třetího instaru (4), opět dominuje *Enterococcus* (62,1 %). Stejná situace nastává i u čtvrtého instaru (*Enterococcus* tvoří 77,9 %) i šestého (*Enterococcus* tvoří 58,5 %). V trusu je mikrobiom více rozmanitý, celkem obsahuje 35 druhů bakterií. I zde je ale nejvíce zastoupen *Enterococcus* (71,9 %).



Obr. 4: Složení mikrobiomu v průběhu ontogeneze *Triatoma vitticeps*. Jednotlivé sloupce odpovídají profilu mikrobiomů tří jedinců v konkrétním vývojovém stádiu, tj. zleva vajíčko (L0), první až pátý larvální instar (L1 – L5), dospělec (L6) a trus (L7).

I u druhu *R. prolixus* je mikrobiom nejrozmanitější u vajíčka. Detekováno je 33 druhů, z nichž největší zastoupení mají, a to shodně 21,8 %, *Enterococcus* a *Bartonella*. Třetím nejrozšířenějším druhem je pak druh *Methylobacterium* s 18,2 %. Čím se *Rhodnius prolixus* velice liší od druhu *Triatoma vitticeps*, je diverzita mikrobiomu u jednotlivých instarů. V tomto případě mají všechny instary velice podobný počet druhů, pohybující se od 9 do 11. První instar je specifický tím, že *Enterococcus* tentokrát tvoří pouhé 1 % mikrobiomu. Dominují zde *Macrocooccus* (40,2 %) a *Acinetobacter* (38,6 %). V případě druhého instaru najdeme nejvíce zastoupený druh opět *Macrocooccus* (30,6 %), a také s téměř shodným zastoupením druh *Arsenophonus* (35 %). Třetímu instaru pak dominuje také *Arsenophonus* (41,3 %). Co se týče čtvrtého instaru, v něm se nejvíce vyskytuje *Macrocooccus* (38 %). Pátému instaru dominuje *Enterococcus* (63,7 %). Čím ale tento instar vybočuje, je poměrně vysoké procento druhu *Bacillus* (24,8 %). V šestém instaru má

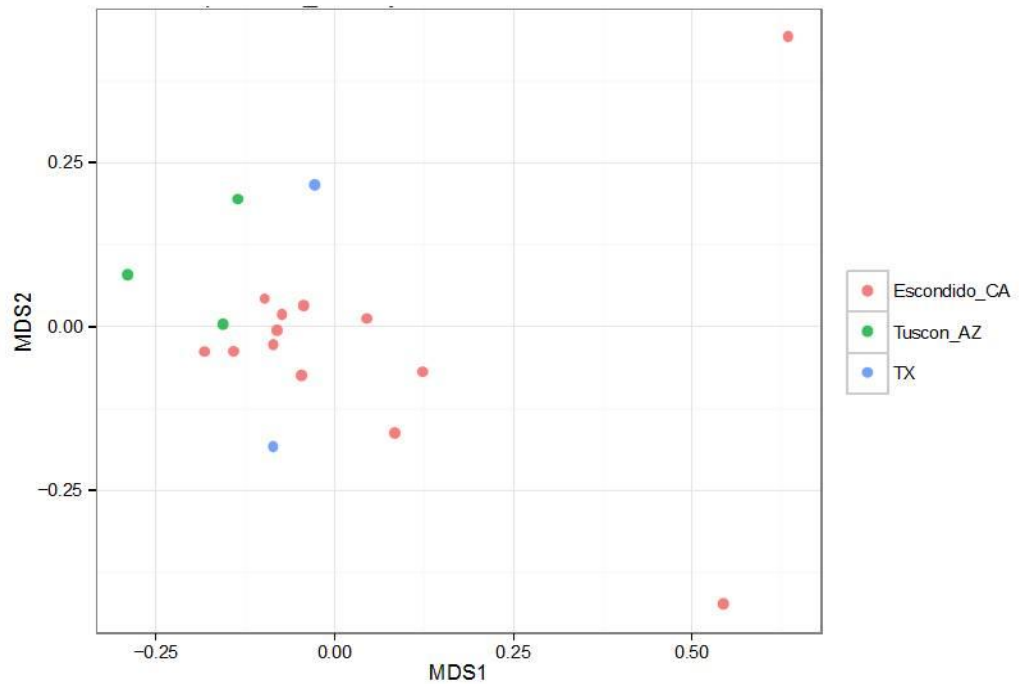
nejvyšší výskyt *Enterococcus* (77,6 %), který dominuje i vzorkům z trusu. Zde je jeho zastoupení dokonce 83,8 %.



Obr. 5: Složení mikrobiomu v průběhu ontogeneze *Rhodnius prolixus*. Jednotlivé sloupce odpovídají profilu mikrobiomů tří jedinců v konkrétním vývojovém stádiu, tj. zleva vajíčko (L0), první až pátý larvální instar (L1 – L5), dospělec (L6) a trus (L7).

4.6 Posouzení vlivu lokality na složení mikrobiomu

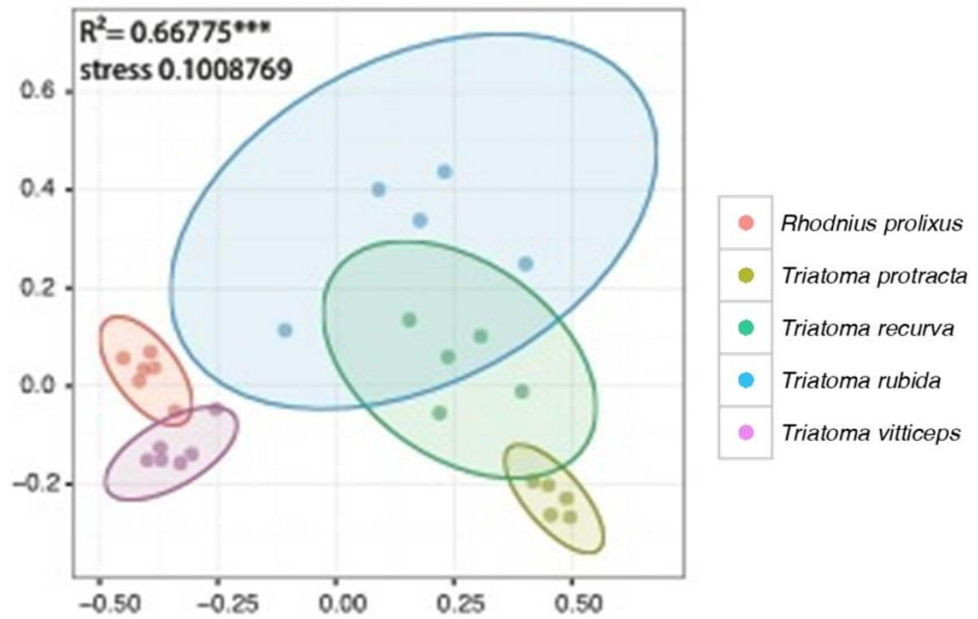
Otázka, zda má odlišný geografický původ vzorků vliv na složení mikrobiomu, byla zkoumána u severoamerického druhu *Triatoma protracta*. Z následujícího plotu na obrázku 6 vyplývá, že ve složení mikrobiomů u hostitelů z různých lokalit nebyly zjištěny signifikantní rozdíly. Mikrobiom si je podobný u všech vzorků pocházejících ze třech analyzovaných lokalit.



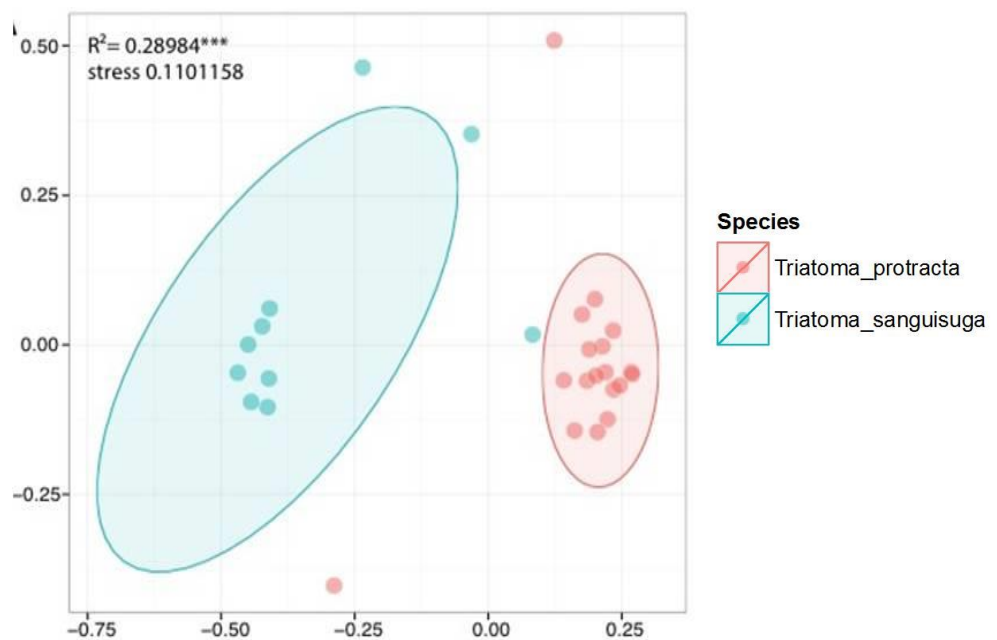
Obr. 6: NMDS analýza podobnosti mikrobiomů hostitelů druhu *T. protracta* nasbíraných ve třech státech USA (Kalifornie – červená, Arizona – zelená, Texas – modrá). Hodnota $R^2=0,25238$ nesignifikantní v hladině významnosti 0.001.

4.7 Posouzení druhové specifiity mikrobiomu

Také jsem se zabývala tím, zda je složení mikrobiomu podmíněno druhovou příslušností hostitele. Posuzovala jsem jednak 5 druhů Triatominae, které pocházely z kolonií, konkrétně druhy *Rhodnius prolixus*, *Triatoma protracta*, *Triatoma vitticeps*, *Triatoma recurva* a *Triatoma rubida*. Šlo o první a druhá vývojová stádia (instary). Ukázal se zde signifikantní rozdíl ($R^2=0,66775^{***}$) v mikrobiomových profilech klastrujících se do skupin dle hostitelských druhů. Grafické znázornění poskytuje obrázek 7. Dále jsem toto kritérium hodnotila u 2 druhů z volné přírody, a to druhů *Triatoma sanguisuga* a *Triatoma protracta*. Mikrobiomy těchto dvou druhů jsou signifikantně odlišné ($R^2=0,28984^{***}$, v hladině významnosti 0.001; obrázek 8).



Obr. 7: Závislost složení mikrobiomu na druhu hostitele. Pro NMDS analýzu byly použity vzorky pěti druhů Triatominae, a to v počátečních larválních stádiích, tedy L1 (kolečko) a L2 (trojúhelník). Barvy odlišují jednotlivé druhy.

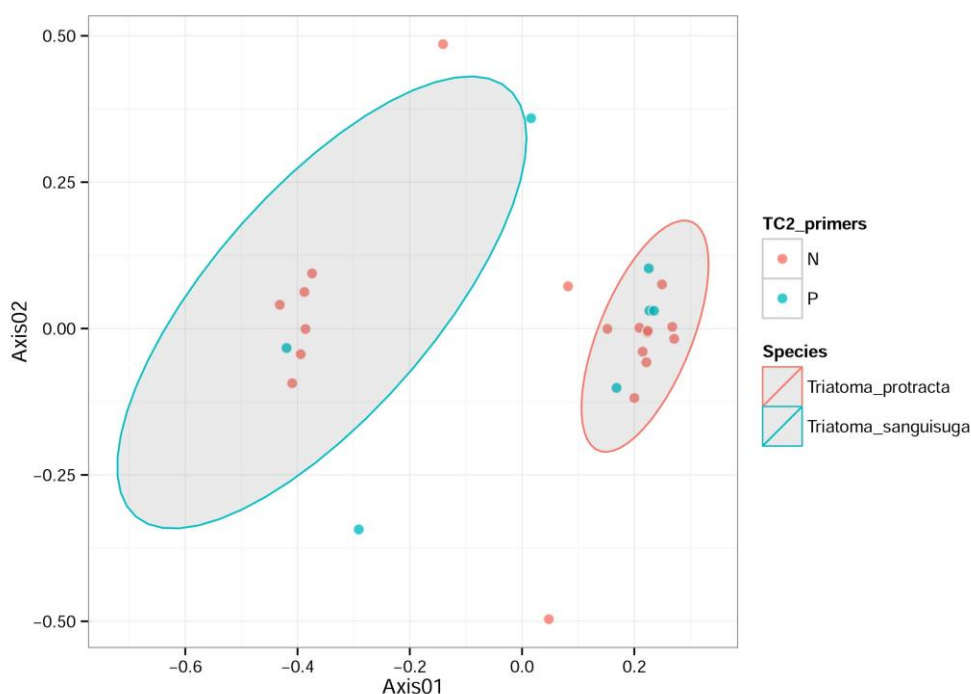


Obr. 8: NMDS analýza podobnosti mikrobiomů druhů *Triatoma sanguisuga* a *Triatoma protracta* z volné přírody. Pozice mikrobiomů každého druhu ve dvourozměrném prostoru je zvýrazněna statistickými elipsami. Signifikantní hodnota R^2 v hladině významnosti 0.001 je označena symbolem***.

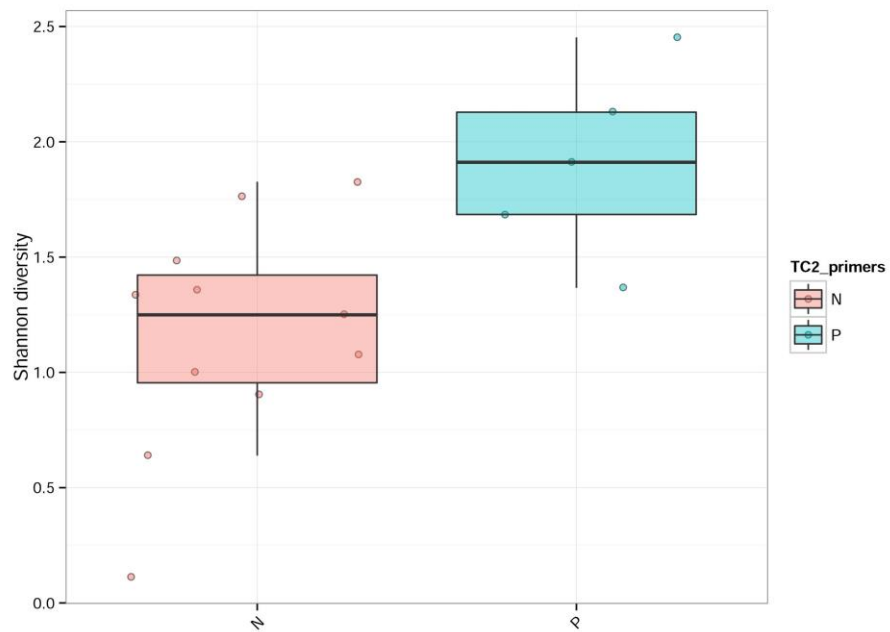
Rozdíly mezi mikrobiomy druhů *Triatoma protracta* a *Triatoma sanguisuga* jsem se podrobněji zabývala na úrovni jednotlivých OTU. Významným rozdílem byla přítomnost bakterie *Arsenophonus* u triatom *T. sanguisuga*, *T. protracta* tuto bakterii neměla. Dále byly u druhu *T. sanguisuga* nalezeny bakterie *Streptomyces* sp., *Brevibacterium* a *Staphylococcus*. Naopak u druhu *T. protracta* se vyskytovaly bakterie *Proteiniphilum*, dále bakterie *Klebsiella* sp., *Petrimonas* a *Peptoniphilus*.

4.8 Posouzení závislosti statutu přenašeče na profilu střevního mikrobiomu

Závislost profilu střevního mikrobiomu na statutu přenašeče byla hodnocena na 37 vzorcích amerických triatom druhů *T. protracta* a *T. sanguisuga*, a to na základě výsledků diagnostické PCR pro parazita *Trypanosoma cruzi*. NMDS analýzy mikrobiomů ukázaly nesignifikantní rozdíly mezi negativními a pozitivními hostiteli (viz Obr. 9). U druhu *T. protracta* porovnání indexů diversity mikrobiomů z *T. cruzi* pozitivních i *T. cruzi* negativních jedinců odhalilo patrnou tendenci k vyšší diverzitě u *T. cruzi* pozitivních vzorků (Obr. 10). Statisticky však tato data hodnocena nebyla kvůli nízkému počtu pozitivních vzorků.



Obr. 9: NMDS analýzy mikrobiomů *T. protracta* a *T. sanguisuga* a jejich statistické vyhodnocení, které neukazuje signifikantní rozdíly mezi mikrobiomy *T. cruzi* pozitivních a *T. cruzi* negativních jedinců (adonis, $R^2=0,02409$).



Obr. 10: Kruskal – Wallis test: Tendence *T. cruzi* pozitivních vzorků druhu *T. protracta* k vyšší diverzitě mikrobiomu.

5 Diskuze

5.1 Diagnostika *T. cruzi*

Přítomnost *T. cruzi* byla diagnostikována u 21,6 % z celkového počtu 37 jedinců druhů *Triatoma protracta*, *Triatoma rubida*, *Triatoma sanguisuga* a *Triatoma gerstaeckeri*. *T. cruzi* pozitivní vzorky tvořily 62,5 % z analyzovaného setu jedinců *T. protracta*, 25 % jedinců *T. sanguisuga* a 12,5 % jedinců *T. rubida*. Z hlediska geografické distribuce *T. cruzi* bylo zaznamenáno 21,5 % pozitivních hostitelů v Kalifornii (ve 100 % případů *T. protracta*), 50 % v Arizoně (v 66,7 % případů *T. protracta*, 33,3 % *T. rubida*) a pouze 11,7 % v Texasu (ve 100 % případů *T. sanguisuga*). U dvou vzorků se screening nepodařil. Jelikož se u jednoho z těchto dvou vzorků nepodařilo, a to ani opakovaně, amplifikovat gen cytochrom oxidázy, domnívám se, že izolát obsahoval inhibitory polymerázové řetězové reakce.

Oproti dosud publikovaným datům je zjištěná prevalence *T. cruzi* poměrně nízká. V populacích druhů *T. gerstaeckeri*, *T. sanguisuga* a *T. leucogaster* z Texasu dosáhla prevalence *T. cruzi* 33 %. Z celkem 254 zkoumaných vzorků bylo *T. cruzi* 84 pozitivních (Sarkar, 2010). V novější studii byl zaznamenán výskyt ještě vyšší. Z 282 vzorků druhů *T. gerstaeckeri*, *T. leucogaster* a *T. indictiva* bylo 147 (cca 52 %) pozitivních (Rivaldi, 2015). V Kalifornii byla infekce *T. cruzi* od roku 1916 zaznamenána již několikrát, a to u savců, a také u druhu *Triatoma protracta* (Navin et al., 1985). Výzkum Sherwina F. Wooda z roku 1975 detekoval infekci u druhých a třetích vývojových instarů *T. protracta* v oblasti Paicines, další pozitivní vzorky (57 z 257 dospělců, tj. 22 %) *T. protracta* pak v Mulholland drive (Wood, 1975). V Tucsonu (Arizona) bylo zaznamenáno 41,5 % pozitivních vzorků z triatom sbíraných uvnitř, anebo v okolí lidského obydlí (Reisenman, 2010). Patrný je zvyšující se trend infekce *T. cruzi*. Zatímco v roce 1943 byla stanovena celková míra infekce na 4 % (Wood, 1975), v roce 1964 v Tucsonu na 7,5% u druhu *T. rubida* a 19,5 % u druhu *T. protracta* (Bice, 1966). V roce 2010 šlo o zmíněných 41,5 % s 96,3 % pozitivních jedinců u druhu *T. rubida*, 3 % *T. recurva* a 0,6 % *T. protracta* (Reisenman, 2010).

Celkově nižší počet záchytu *T. cruzi* v mé práci může být způsoben dvěma faktory, tj. nízkým počtem analyzovaných vzorků a druhovým složením testovaného souboru. Dva z analyzovaných druhů, *Triatoma protracta* a *Triatoma rubida*, nepatří k nejrozšířenějším severoamerickým triatomám (tři běžně uváděné druhy jsou

Triatoma gerstaeckeri, *Triatoma sanguisuga* a *Triatoma lecticularia*). I přesto je ale důležité se v budoucnu zabývat ostatními druhy severoamerických triatom, které jsou také kompetentními vektory *T. cruzi* a mohou napomáhat šíření Chagasovy choroby na území Spojených států.

5.2 Posouzení profilu mikrobiomu v průběhu ontogeneze

Střevní mikrobiom triatom má v laboratorních podmínkách malou diverzitu. Většinou mu dominuje pouze jeden nebo pár druhů endosymbiotických bakterií (Díaz, 2016). To se potvrdilo i v mé práci. Nejvyšší diverzitu vykazovaly vzorky z vajíčka a trusu. Zde se však nejspíš jednalo o bakterie, které se vyskytovaly na povrchu vajíčka, respektive v trusu, jelikož celá řada bakterií se vyskytla pouze u těchto vzorků. Ve střevě jednotlivých instarů se pak neobjevily. To platilo jak pro vzorky druhu *R. prolixus*, tak pro *T. vitticeps*.

Zajímavé je porovnání složení a dynamiky mikrobiomu v průběhu ontogeneze triatom se zástupcem fytofágních heteropter z rodiny Pyrrhocoridae. *Pyrrhocoris apterus* funguje jako modelový organismus pro fyziologické a endokrinologické výzkumy. Stejně jako zástupci podčeledi Triatominae se v dospělce vyvíjí přes 5 vývojových stádií (instarů) (Kaltenpoth, 2012).

Mikrobiom u plošnice *Pyrrhocoris apterus* vykazuje vysokou bakteriální diverzitu, a to od vajíčka až po druhé nymfální stádium. V přechodu mezi druhým a třetím instarem dochází k ustálení složení mikrobiomu, který se v dalším vývoji už v podstatě nemění (Kaltenpoth, 2012). Oproti *P. apterus* vykazovaly mikrobiomy triatom druhů *R. prolixus* a *T. vitticeps* spíše kontinuální dynamiku. Složení mikrobiomu zaznamenává výrazný posun, a to od prvního instaru až po dospělce (6. instar). Velice podobné mikrobiomové profily mají jedinci v druhém a třetím instaru, a jedinci pátého instaru a dospělci.

Z dřívějších výzkumů vyplývá, že dominující čeledí mikrobiomu triatom jsou *Enterobacteriaceae*, s druhy *Arsenophonus*, *Pectobacterium*, *Rhodococcus* a *Dietzia* (Díaz, 2016). Ve stejné studii byl *Arsenophonus* identifikován jako převládající bakterie v mikrobiomu *R. prolixus* (59 %) z laboratorního chovu, a to jak u *T. cruzi* pozitivních, tak negativních jedinců. Mnou byl *Arsenophonus* detekován ve vzorcích *R. prolixus* a *T. vitticeps*, *Rhodococcus* ve vzorcích *R. prolixus*, *Dietzia* pak detekována nebyla. U jedinců, kteří nebyli infikováni *T. cruzi*, byly dominantní

bakterie rodu *Pectobacterium* (Díaz, 2016). V mém případě se tento druh nevyskytl ani v jednom ze zkoumaných vzorků.

I. Rhodnius prolixus

Ač je *Rhodococcus rhodnii* považován za specifického symbionta druhu *R. prolixus* (Díaz, 2016), u testovaných jedinců z našeho laboratorního chovu byl *Rhodococcus* nalezen pouze v šestém instaru, tzn. u dospělců, a také v jejich trusu. Procentuální zastoupení se navíc pohybovalo pouze ve zlomcích procenta (0,7 % pro dospělé, 0,6 % pro trus). Ostatní vývojová stádia tuto bakterii neměla. Převažoval *Enterococcus*.

Co se v mém případě u druhu *R. prolixus* vyskytlo, byl *Arsenophonus*. U vajíčka bylo procentuální zastoupení rovno 1. U prvního instaru už to ale bylo celých 18,4 %, u druhého 35 % a u třetího instaru dokonce 41,3 %. V dalších vývojových stádiích pak jeho zastoupení klesalo. Zástupci rodu *Arsenophonus* jsou endosymbionti, kteří jsou často spojeni nejen s hmyzem, ale také s různými druhy rostlin (da Mota, 2012). Konkrétní druh *Candidatus Arsenophonus triatominarum* byl izolován z druhu *Triatoma infestans*. Jde o intracelulární bakterii, která se vyskytuje v hemolymfě, srdeční tkáni, slinných žlázách, nervových gangliích, a také vaječnicích a varlatech (da Mota, 2012). Data v této studii, získaná převážně ze vzorků celého střeva, ale poukazují na výskyt této bakterie buď ve střevním epitelu, nebo přímo v lumen střeva.

Druhým nejvýznamnějším druhem bakterií vyskytujících se ve střevě Triatominae je druh *Corynebacterium*, patřící spolu s druhy *Dietzia* a *Rhodococcus* do řádu Corynebacteriales (Díaz, 2016). Zde se liší výsledky mé práce, kdy jsem druh *Corynebacterium* našla pouze ve zlomcích procenta, a to pouze ve vzorcích trusu a vajíček.

II. Triatoma vitticeps

Tento druh triatom patří mezi málo prozkoumané. Nepodařilo se najít žádnou studii, která by se, byť okrajově, *T. vitticeps* zabývala. Obecně platí, že pro skupinu triatom je specifický výskyt bakterie *Arsenophonus* (Díaz, 2016). To se potvrdilo i v případě mé práce. Tato bakterie se vyskytla u všech instarů včetně vajíčka, v trusu pak identifikována nebyla. Významnou část mikrobiomu pak tvořil *Enterococcus*, který většinou dominoval. Kromě vajíčka a 2. instaru převažoval ve všech vzorcích nad ostatními druhy bakterií, a to s podílem vyšším než 50 %. V porovnání

s druhem *R. prolixus* *T. vitticeps* vykazovala menší druhovou diverzitu a potvrdila se malá diverzita střevního mikrobiomu v laboratorních podmínkách (Díaz, 2016). Za dominantní druhy by mohly být považovány pouze právě zmíněné druhy *Enterococcus* a *Arsenophonus*.

Rozdílné složení mikrobiomu, vzhledem k citovaným studiím, je v mé práci možná způsobeno tím, že vzorky DNA pocházely od laboratorních jedinců. Určitá shoda byla nalezena, ale většinou se složení mikrobiomu lišilo. Je možné, že každá populace i přesto, že jde o stejný druh, si určitým způsobem přizpůsobuje svůj mikrobiom podmínkám, ve kterých žije.

5.3 Hostitelská specifita mikrobiomu

Podčeleď Triatominae zahrnuje dvě hlavní skupiny *Rhodnius* a *Triatoma*. Platí, že u každé ze skupin převládá jiný druh bakterií. Navíc pro každý druh je pak složení mikrobiomu u každého jedince velmi podobné. To nasvědčuje tomu, že jednotlivé mikrobiomy jsou velmi dobře přizpůsobeny životním podmínkám ve „svém“ druhu (da Mota, 2012). Hostitelskou specifitu potvrdila jak naše data z laboratorních chovů, tak data z populací *T. protracta* a *T. sanguisuga* z volné přírody. Druhová specifita mikrobiomu byla potvrzena i u jihoamerických druhů *T. brasiliensis* a *T. pseudomaculata* (Gumiel et al., 2015). Stejně tomu bylo u triatom druhů *T. infestans*, *T. vitticeps*, *R. prolixus*, *Panstrongylus megistus* a *Dipetalogaster maximus*, přičemž první dva zmíněné druhy vykazovaly největší diverzitu mikrobiomu (da Mota, 2012). I studie Eichlera a Schaub (2002) potvrzuje druhovou specifitu mikrobiomu u druhů *R. prolixus* a *T. infestans* (Eichler & Schaub, 2002). Dalším příkladem krevsajícího hmyzu, jehož mikrobiom je závislý na druhu hostitele, jsou komáři rodu *Anopheles* (Lindh, 2005). I mikrobiom termitů, kteří hostí mnohem složitější komunitu bakterií a jednobuněčných eukaryot, je ovlivněn fylogenetickou úrovní jednotlivých druhů (Brune & Dietrich 2015). Naopak mezi hostitele, kteří nevykazují hostitelskou specifitu mikrobiomu, patří ohniví mravenci rodu *Solenopsis*. Ti byli studováni v práci H. D. Ishaka (2011). Jejich mikrobiom byl srovnáván konkrétně u dvou druhů, a to *Solenopsis geminata* a *Solenopsis invicta*. Oba druhy měly stejnou bakteriální richness a nebyly nalezeny žádné specifické druhy bakterií, které by se vyskytovaly u jednoho druhu, ale u druhého by chyběly (Ishak, 2011).

5.4 Vliv lokality na složení mikrobiomu

S měnícím se životním prostředím se může měnit i složení mikrobiomu. To vede buď k fixaci různých komunit v různých populacích, nebo k polymorfismu komunit symbiontů uvnitř jedné populace (Ferrari & Vavre 2011). Toto tvrzení se ale u mých vzorků nepotvrdilo. Mikrobiomy jedinců *T. protracta*, získaných z různých lokalit a různých let, vykazovaly stabilitu v prostoru i čase. *Triatoma protracta* se vyskytuje v Severní Americe a Mexiku (Martínez-Ibarra, 2012). Hojně rozšířená je hlavně v Kalifornii (Hwang, 2010). Spolu s druhy *Triatoma rubida* a *Triatoma recurva* patří mezi druhy triatom vyskytujících se v oblasti právě Severní Ameriky a Mexika, o kterých není moc známo. Jejich sběr se provádí vzácně a chov v laboratorních podmínkách se nedaří (Martínez-Ibarra, 2012). Jedinci analyzovaní v této práci pocházeli z Arizony, Kalifornie a Texasu. Pro tyto oblasti je typické mírné podnebí, kdy se střídá teplé a vlhké léto s poměrně mírnou zimou. Výjimkou jsou suchá a horká léta v Tucsonu, která jsou ale většinou nahrazena monzunovým obdobím (National Weather Service, <http://www.wrh.noaa.gov/sgx/>, The Weather Channel, <https://weather.com/>). V mé práci se nevyskytly žádné signifikantní rozdíly mezi mikrobiomy z jednotlivých lokalit, environmentální podmínky tudíž nejsou faktorem, který by podmiňoval vlastnosti mikrobiomu u triatom druhu *T. protracta*. Stejná situace je i u druhu *Pyrrhocoris apterus*. Jeho mikrobiom se v různých lokalitách střední Evropy liší jen minimálně (Kaltenpoth, 2012). Jinak je tomu u komárů druhů *Aedes albopictus* a *A. aegypticus* (Zouache, 2010), a také u brouka rodu *Curculio sikkimensis* (Toju & Fukatsu, 2011), jejichž mikrobiomy se liší v závislosti na lokalitě a na dalších ekologických parametrech (Zouache, 2010; Toju & Fukatsu, 2011). Stabilita mikrobiomu, nalezená pro druh *T. protracta*, může implikovat určitý funkční konstraint, který výrazně limituje změny složení mikrobiomu dospělých jedinců. Může se například jednat o funkce mikrobiomu nezbytné pro výživu případně reprodukci hostitele.

5.5 Vliv *T. cruzi* na složení mikrobiomu

Také se ukázalo, že infekce parazitem, zde konkrétně parazitem *Trypanosoma cruzi*, může ovlivňovat složení mikrobiomu. Mikrobiom u infikovaných jedinců vykazoval větší diverzitu, než u jedinců neinfikovaných (Díaz, 2016). V mé práci se rozdíl mezi složením mikrobiomu u *T. cruzi* pozitivních a *T. cruzi* negativních jedinců ukázal být nesignifikantní, nicméně určitá tendence k vyšší diverzitě

mikrobiomu *T. cruzi* pozitivních jedinců se vyskytla. Jiná studie ukázala vliv na mikrobiom triatom (konkrétně šlo o druh *R. prolixus*), jak v případě Dm28c strainu, tak Y strainu *T. cruzi*, který spočíval pro Dm28c strain v celkovém nižším počtu bakterií, naopak vyšším počtu parazitů, a také v ovlivnění množství některých látek (redukce nitritu a jeho produkce, zvýšení přítomnosti phenoloxidázy). Y strain naopak zvyšoval počet bakterií (Castro, 2012). Zvýšenou koncentraci bakterií uvedl i Azambuja (2004). Eichler a Schaub nepotvrdili snížení koncentrace bakterií vlivem infekce *T. cruzi*, snížení způsobila infekce *T. rangeli* (Eichler & Schaub, 2002).

6 Závěr

Moje práce ukázala, že složení mikrobiomu triatom je primárně závislé na druhu hostitele. Hostitelská specifická mikrobiomů byla potvrzena jak v laboratorních koloniích, tak pro studované jedince z volné přírody. Na čem ale složení mikrobiomu naopak závislé není, je lokalita. Výsledky ukazují nesignifikantní rozdíly mezi jedinci druhu *T. protracta* z různých lokalit. V průběhu ontogeneze dochází u triatom ke změnám ve složení mikrobiomu. Mění se jeho celková richness a zřetelně se posouvá relativní četnost hlavních složek mikrobiomu. Vliv infekce *T. cruzi* na mikrobiomový profil zůstává diskutabilní, ačkoliv se projevuje mírná tendence k vyšší diverzitě mikrobiomu v případě přítomnosti parazita.

7 Seznam použité literatury

- ALEKSEEV, V. R., N. I. ABRAMSON, N. M. SUKHIKH. Introduction of sibling species to the ecosystem of the Baltic Sea. *Doklady Biological Sciences*. 2009, **429**(1), 544 – 547.
- ALVES, C. R., J. M. ALBUQUERQUE-CUNHA, C. B. MELLO, E. S. GARCIA, N. F. NOGUEIRA, S. C. BOURGUINGNON, W. DE SOUZA et al. *Trypanosoma cruzi*: Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*. 2007, **116**(1), 44 – 52.
- AZAMBUJA, P., D. FEDER, E. S. GARCIA. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Experimental Parasitology*. 2004, **107**, 89 – 96.
- BAINES, S. The role of the symbiotic bacteria in the nutrition of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Journal of Experimental Biology*. 1956, **33**(3), 533 – 541.
- 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**(6), 621 – 627.
- 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 Tuscon, Arizona. *Rev. Biol. Trop.* 1966, **14**(1), 3 – 12.
- BILLINGSLEY, P. F. & A. E. R. DOWNE. Ultrastructural changes in posterior midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Canadian Journal of Zoology*. 1983, **61**(11), 2574 – 2586.
- BRUNE A. & C. DIETRICH. The Gut Microbiota of Termites: Digesting the Diversity in the Light of Ecology and Evolution. *Annual Review of Microbiology*. 2015, **69**, 145 – 166.
- BUCHNER, P. Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen. *Verlag Birkhäuser*. 1953, Basel, Switzerland.

- CASTRO, D. P., C. S. MORAES, M. S. GONZALES, 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).
- DALE, C. & N. A. MORAN. Molecular Interactions between Bacterial Symbionts and Their Hosts. *Cell*. 2006, **126**(3), 453 – 465.
- 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 Triatominae Vectors of Chagas Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2012, **6**(5).
- DE SOUZA, W., T. M. U. DE CARVALHO, E. S. BARRIAS. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology*. 2010, **2010**, 1 – 18.
- 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).
- 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. *ISRN Veterinary Science*. 2012, **2012**, 1 – 6.
- ESPINOZA, B., T. RICO, S. SOSA, E. OAXACA, A. VIZCAINO-CASTILLO, M. L. CABALLERO, I. MARTÍNEZ. Mexican *Trypanosoma cruzi* (TCI) Strains with Different Degrees of Virulence Induce Diverse Humoral and Cellular Immune Responses in a Murine Experimental Infection Model. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010, **2010**, 1 – 10.
- FELDHAAR, H. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecological Entomology*. 2011, **36**(5), 533 – 543.

- FERRARI, J. & F. VAVRE. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011, **366**, 1389 – 1400.
- FERREIRA, C., A. F. RIBEIRO, E. S. GARCIA, W. R. TERRA. Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells. *Insect Biochemistry*. 1988, **18**(6), 521 – 530.
- GARCIA, E. S., N. A. RATCLIFFE, M. M. WHITTEN, M. S. GONZALEZ, P. AZAMBUJA. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *Journal of Insect Physiology*. 2007, **53**(1), 11 – 21.
- GUMIEL, M., F. F. DA MOTA, V. DE SOUSA RIZZO, O. SARQUIS, D. P. DE CASTRO, M. M. LIMA, E. DE SOUZA 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**(2).
- HAFNER, M. S., P. D. SUDMAN, F. X. VILLABLANCE, T. A. SPRADLING, J. W. DEMASTES, S. A. NADLER. Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. *Science*. 1994, **365**, 1087 – 1090.
- HOTEZ, P. J., E. DUMONTEIL, L. WOC-COLBURN, J. A. SERPA, S. BEZEK, M. S. EDWARDS, C. J. HALLMARK et al. Chagas Disease: “The New HIV/AIDS of the Americas”. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2012, **6**(5).
- HWANG, W. S., G. ZHANG, D. MASLOV, C. WEIRAUCH. Infection Rates of *Triatoma protracta* (Uhler) with *Trypanosoma cruzi* in Southern California and Molecular Identification of Trypanosomes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010, **83**(5), 1020 – 1022.
- 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**(3), 447 – 457.

- 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).
- ISHAK, H. D., R. PLOWES, R. SEN, K. KELLNER, E. MEYER, D. A. ESTRADA, S. E. DOWD et al. Bacterial Diversity in *Solenopsis invicta* and *Solenopsis geminata* Ant Colonies Characterized by 16S amplicon 454 Pyrosequencing. *Microbial Ecology*. 2011, **61**(4), 821 – 831.
- JANSEN, A. M., A. P. SANTOS DE PINHO, C. V. LISBOA, E. CUPOLILLO, R. H. MANGIA, O. FERNANDES. The Sylvatic Cycle of *Trypanosoma cruzi*: a Still Unsolved Puzzle. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, 1999, **94**, 2.
- JEONG, G. & E. SUH. *Wolbachia*-induced reproductive anomalies and their future applications. *Entomological Research*. 2008, **38**, 41 – 48.
- JURBERG, J. & C. GALVAO. Biology, ecology and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease, and implications for human health. *Festschrift zum 70. Geburtstag von Ernst Heiss. Denisia 19, zugleich Katalogue der OÖ. Landesmuseen Neue Serie 50*. Linz: 2006, **19**, 1095 – 1116.
- KALTENPOTH, M., S. SUDAKARAN, H. SALEM, C. KOST. Geographical and ecological stability of the symbiotic mid-gut microbiota in European firebugs, *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Molecular Ecology*. 2012, **21**(24), 6134 – 6151.
- KOGA, R., T. TSUCHIDA, T. FUKATSU. Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2003, **270**(1533), 2543 – 2550.
- KOLLIEN, A. H. & G. A. SCHAUB. The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitology Today*. 2000, **16**(9).
- LEE, C. E. Global phylogeography of a Cryptic copepod species complex and Reproductive isolation between genetically proximate „populations“. *Evolution*. 2000, **54**(6), 2014 – 2027.
- LINDH, J. M., O. TERENIUS, I. FAYE. 16S rRNA Gene-Based Identification of Midgut Bacteria from Field-Caught *Anopheles gambiae* Sensu Lato and *A. funestus*

- Mosquitoes Reveals New Species Related to Known Insect Symbionts. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, **71**(11), 7217 – 7223.
- MARGULIS, L. Symbiosis and evolution. *Scientific American*. 1973, **225**(2), 48 – 57.
- MARTÍNEZ-IBARRA, J. A., E. PAREDES-GONZÁLEZ, Á.-L. TRILLO, O. D. MONTAÑEZ-VALDEZ, G. ROCHA-CHÁVEZ, B. NOGUEDA-TORRES. The biology of three Mexican-American species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): *Triatoma recurva*, *Triatoma protracta* and *Triatoma rubida*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, 2012, **107**(5).
- MAYA, J. D., B. K. CASSELS, P. ITURRIAGA-VÁSQUEZ, J. FERREIRA, M. FAÚNDEZ, N. GALANTI, A. FERREIRA, A. MORELLO. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2007, **146**(4), 601 – 620.
- MEJÍA-JARAMILLO, A. M., V. H. PEÑA, O. TRIANA-CHÁVEZ. *Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of lineages I and II supports the predominance of lineage I in Colombia. *Experimental Parasitology*. 2009, **121**(1), 83 – 91.
- MONTGOMERY, S. P., M. C. STARR, P. T. CANTEY, M. S. EDWARDS, S. K. MEYMANDI. Neglected Parasitic Infections in the United States: Chagas Disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014, **90**(5), 814 – 818.
- MORAN, N. A., G. R. PLAGUE, J. P. SANDSTROM, J. L. WILCOX. A genomic perspective on nutrient provisioning by bacterial symbionts of insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003, **100**(Supplement 2), 14543 – 14548.
- MORAN, N. A. & Y. YUN. Experimental replacement of an obligate insect symbiont. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015, **112**(7), 2093 – 2096.
- NAVIN, T. R., R. R. ROBERTO, D. D. JURANEK, K. LIMPAKARNJANARAT, E. W. MORTENSON, J. R. CLOVER, R. E. YESCOTT et al. Human and Sylvatic *Trypanosoma cruzi* Infection in California. *AJPH*. 1985, **75**(4), 366 – 369.
- NOUVELLET, P., E. DUMONTEIL, S. GOURBIÉRE. 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).

- NOVÁKOVÁ, E., V. HYPŠA, N. A. MORAN. *Arsenophonus*, an emerging clade of intracellular symbionts with a broad host distribution. *BMC Microbiology*. 2009, **9**(1).
- 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).
- PIRON, M., R. FISA, N. CASAMITJANA, P. LÓPEZ-CHEJADE, L. PUIG, M. VERGÉS, J. GASCÓN et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica*. 2007, **103**(3), 195 – 200.
- 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.
- RIVALDI, C.-L. Triatominae (Hemiptera:Reduviidae) in Texas: Mitochondrial Genome Assembly, *Trypanosoma Cruzi* Detection, and Bacterial Community Analysis. *Biology Theses*. 2015, Paper 27.
- SARKAR, S., S. E. STRUTZ, D. M. FRANK, C.-L. RIVALDI, B. SISSEL, V. SÁNCHEZ-CORDERO. Chagas Disease Risk in Texas. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2010, **4**(10).
- SCHOFIELD, C. J. Biosystematics and evolution of the Triatominae. *Cad. saúde pública*. Rio de Janeiro, 2000, **16**(2).
- SCHOFIELD, C. J. & C. GALVÃO. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*. 2009, **110**(2 – 3), 88 – 100.
- SHAO, L., M. DEVENPORT, M. JACOBS-LORENA. The Peritrophic Matrix of Hematophagous Insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 2001, **47**(2), 119 – 125.
- SILVA, C. P., A. F. RIBEIRO, S. GULBENKIAN, W. R. TERRA. Organization, Origin and Function of the Outer Microvillar (Perimicrovillar) Membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) Midgut Cells. *Journal of Insect Physiology*. 1995, **41**(12).
- SOUTO, R. P., O. FERNANDES, A. MACEDO, B. ZINGALES. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1997, **83**(2), 141 – 152.

ŠORFOVÁ, P., A. ŠKERŤÍKOVÁ, 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**(2), 88 – 100.

TOJU, H. & T. FUKATSU. Diversity and infection prevalence of endosymbionts in natural populations of the chestnut weevil: prevalence of local climate and host plants. *Molecular Ecology*. 2011, **20**, 853 – 921.

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

WOOD, S. F. *Trypanosoma cruzi*: New foci of enzootic Chagas disease in California. *Experimental Parasitology*. 1975, **38**(2), 153 – 160.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of chagas disease: second report of the WHO Expert Committee. *Second report of the WHO Expert Committee*. Geneva: WHO, 2002.

ZOUACHE, K., F. N. RAHARIMALALA, V. RAQUIN, V. TRAN-VAN, L. H. R. RAVELOSON, P. RAVELONANDRO, P. MAVINGUI. Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *FEMS Microbiology Ecology*. 2011, **75**, 377 – 389.

8 Přílohy

Tab. P1: Vzorky určené k izolaci DNA za účelem posouzení profilu mikrobiomu v průběhu ontogeneze.

Druh	Instar	Počet vzorků
<i>Rhodnius prolixus</i>	L0 - vajíčko	3
	L1	3
	L2	3
	L3	3
	L4	3
	L5	3
	L6 - dospělec	3
<i>Triatoma vitticeps</i>	L0 - vajíčko	3
	L1	3
	L2	3
	L3	3
	L4	3
	L5	3
	L6 - dospělec	3

Tab. P2: Moduly R studia a jejich funkce.

Modul	Funkce
biom	schopnost práce se soubory ve formátu .biom
ggplot2	vizualizace dat
permut	generování omezené obměny dat
vegan	analýzy diversity, sumarizace dat do 2D nebo 3D formátu
lattice	grafika pro R studio
nlme	porovnávání dat

<https://cran.r-project.org/web/packages/>

Tab. P3: Výsledky PCR pro diagnostiku přítomnosti *T. cruzi* ve vzorcích.

Druh	Označení vzorku	Instar	PCR
<i>Triatoma protracta</i>	TPCAA1	L6	N
<i>Triatoma protracta</i>	TPCAA2	L6	N
<i>Triatoma protracta</i>	TPCAA3	L6	N
<i>Triatoma protracta</i>	TPCAA4	L6	N
<i>Triatoma protracta</i>	TPCAA5	L6	N
<i>Triatoma protracta</i>	TPCAA6	L6	N
<i>Triatoma protracta</i>	TPCAA7	L6	N
<i>Triatoma protracta</i>	TPCAA8	L6	P
<i>Triatoma protracta</i>	TPCAA9	L6	P
<i>Triatoma protracta</i>	TPCAA10	L6	P
<i>Triatoma protracta</i>	TPCAA11	L6	N
<i>Triatoma protracta</i>	TPCAA12	L6	N
<i>Triatoma protracta</i>	TPCAA13	L6	N
<i>Triatoma protracta</i>	TPCAA14	L6	N
<i>Triatoma protracta</i>	TPAZA16	L6	P
<i>Triatoma protracta</i>	TPAZA17	L6	N
<i>Triatoma protracta</i>	TPAZA18	L6	P
<i>Triatoma rubida</i>	TRUAZA16	L6	N
<i>Triatoma rubida</i>	TRUAZA17	L6	P
<i>Triatoma rubida</i>	TRUAZA18	L6	N
<i>Triatoma</i> sp.	TPTXG19	L6	NA
<i>Triatoma protracta</i>	TPTXG20	L6	N
<i>Triatoma sanguisuga</i>	TSTXG21	L6	N
<i>Triatoma sanguisuga</i>	TSTXG22	L6	P
<i>Triatoma sanguisuga</i>	TSTXG23	L6	N
<i>Triatoma sanguisuga</i>	TPTXG21	L4	N
<i>Triatoma sanguisuga</i>	TPTXG22	L4	N
<i>Triatoma sanguisuga</i>	TPTXG23	L4	N
<i>Triatoma sanguisuga</i>	TPTXG25	L5	N
<i>Triatoma sanguisuga</i>	TPTXG26	L5	P
<i>Triatoma sanguisuga</i>	TPTXG27	L5	N

<i>Triatoma sanguisuga</i>	TPTXG28	L5	N
<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	TTXG30	L5	N
<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	TTXG31	L4	N
<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	TTXG34	L5	N
<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	TTXG35	L5	N
<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	TTXG36	L5	NA

Tab. P4: Taxonomické zařazení vzorků na základě morfologie* a fylogenetické analýzy genu COX.

Označení vzorku	Instar	Druh
TPTXG19	L6	<i>Triatoma</i> sp.
TPTXG20*	L6	<i>Triatoma protracta</i>
TSTXG21*	L6	<i>Triatoma sanguisuga</i>
TSTXG22	L6	<i>Triatoma sanguisuga</i>
TSTXG23	L6	<i>Triatoma sanguisuga</i>
TPTXG21	L4	<i>Triatoma sanguisuga</i>
TPTXG22	L4	<i>Triatoma sanguisuga</i>
TPTXG23	L4	<i>Triatoma sanguisuga</i>
TPTXG25	L5	<i>Triatoma sanguisuga</i>
TPTXG26	L5	<i>Triatoma sanguisuga</i>
TPTXG27	L5	<i>Triatoma sanguisuga</i>
TPTXG28	L5	<i>Triatoma sanguisuga</i>
TTXG30	L5	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>
TTXG31	L4	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>
TTXG34	L5	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>
TTXG35	L5	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>
TTXG36	L5	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>