

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Diverzita linií *Trypanosoma cruzi* v přirozených
vektorech rodu *Triatoma*
na jihu Spojených států amerických (USA)**

Diplomová práce

Bc. Hana Vargová

Školitel: doc. RNDr. Eva Nováková, PhD.

České Budějovice 2024

Vargová, H., 2024: Diverzita linií *Trypanosoma cruzi* v přirozených vektorech rodu *Triatoma* na jihu Spojených států amerických (USA) [Diversity of *Trypanosoma cruzi* lineages in natural vectors of the genus *Triatoma* in the southern United States (US). Mgr. Thesis, in Czech]- 61 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The main goal of this master thesis is to optimize the screening approach and to determine the diversity of parasitic protozoa *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, in natural vectors of the genus *Triatoma* in the southern United States (US). While a few studies have been conducted, the diversity of *Tryp. cruzi* is not yet sufficiently explored in the US. Since *Tryp. cruzi* lineages span an extensive genetic diversity, they have been classified into „Discrete Typing Units“ (DTUs) termed TcI – TcVI and TcBat based on their genotypic and phenotypic variability. In my thesis, I aimed to reveal prevalence of *Tryp. cruzi* and diagnose DTUs in individuals of *Triatoma sanguisuga* from Georgia and Florida. While the results showed a high prevalence of *Tryp. cruzi* in these vectors from both states, routinely established PCR diagnosis for *Tryp. cruzi* DTUs yields very limited results. With *de novo* designed primers for four nuclear genes employed in this study, we recovered four marker sequences from a wider set of selected positive isolates of four *Triatoma* species (*T. sanguisuga*, *T. rubida*, *T. protracta* a *T. gestaeckeri*) from six US States (Florida, Georgia, Texas, California, Arizona, New Mexico). After Sanger sequencing, the phylogenetic analyses revealed considerable diversity of *Tryp. cruzi* lineages in the USA, when up to three DTUs (TcI, TcII, TcIV – USA) were obtained.

Prohlášení

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

V Českých Budějovicích dne 12. 4. 2024

.....

Hana Vargová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce doc. RNDr. Evě Novákové, Ph.D. za pomoc, trpělivost, vstřícný přístup a poskytnutí cenných informací při psaní této diplomové práce. Také velmi děkuji Janu Zimovi, Ph.D. a Mgr. Jitce Kockové za spolupráci při zpracovávání materiálu, cenné rady a ochotu. Zároveň děkuji i ostatním členům laboratoře za jejich veškerou pomoc a podporu.

Obsah

1 Úvod	1
1.1. Podčeď Triatominae	1
1.1.1 Evoluční původ a adaptace	1
1.1.2 Životní cyklus	2
1.1.3 Hostitelé a habitat Triatominae	2
1.1.4 Geografické rozšíření	3
1.2 Triatomami přenášení parazitů	5
1.2.1 Trypanosomy	5
1.2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.2.2.1 Životní cyklus	5
1.2.2.2 Faktory ovlivňující vektorovou kapacitu triatom	6
1.2.2.3 Chagasova choroba	8
1.2.2.4 Preventivní opatření	8
1.3 Genetická diverzita linií <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
1.4. Screening genetické diverzity linií <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
1.5 Současné poznatky o diverzitě linií <i>Trypanosoma cruzi</i> ve Spojených státech amerických (USA)	13
2 Cíle	15
3 Materiál a metody	16
3.1 Materiál	16
3.2 Izolace DNA	16
3.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	17
3.3.1 Diagnostika <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
3.4 Design nových primerů a jejich testování	20
3.5 Gelová elektroforéza	22
3.6 Sangerovo sekvenování	23
3.7 Zpracování Sanger sekvencí a fylogenetická analýza	23
4 Výsledky	25
4.1 Diagnostika <i>Trypanosoma cruzi</i> ve vzorcích <i>Triatoma sanguisuga</i> z Georgie a Floridy	25
4.1.1 Diagnostika <i>Trypanosoma cruzi</i> ve vzorcích <i>Triatoma sanguisuga</i> z Floridy	25
4.1.2 Diagnostika <i>Trypanosoma cruzi</i> ve vzorcích <i>Triatoma sanguisuga</i> z Georgie	25
4.2 Testování primerů	27
4.2.1 Testování čtyř setů primerů pro tři nukleární a jeden mitochondriální gen	27

4.2.2 Testování nových párů primerů	28
4.3 Fylogenetická analýza.....	29
4.3.1 Fylogenetická analýza datasetu TcYC6_0030750	29
4.3.2 Fylogenetická analýza datasetu TcYC6_0032630	31
4.3.3 Fylogenetická analýza datasetu TcYC6_0017400	33
4.3.4 Fylogenetická analýza datasetu COII – ND1.....	35
5 Diskuze	37
5.1 Diagnostika <i>Trypanosoma cruzi</i> u <i>Triatoma sanguisuga</i> v Georgii a na Floridě	37
5.2 Screening genetické diverzity linií <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
6 Závěr.....	42
7 Seznam použité literatury	43
8 Přílohy:	56

Předmluva

Do podčeledi Triatominae (Reduviidae, Hemiptera) patří epidemiologicky a medicínsky nejvýznamnější rod *Triatoma* (*T.*) (Otálora-Luna et al., 2015; Barges et al., 2017). Krevsající triatomy představují důležité vektory parazita *Trypanosoma cruzi* (*Tryp. cruzi*), původce Chagasovy choroby (Jurberg & Galvão, 2006; Catala et al., 2017). Předchozí studie odhalují, že *Tryp. cruzi* vykazuje rozsáhlou genetickou diverzitu (Zingales et al., 2012). Ta byla dosud identifikována především u vektorů z rodu *Triatoma* v Latinské Americe a Mexiku. Nicméně u severoamerických triatominů, je soudobé poznání diverzity a rozšíření *Tryp. cruzi* značně limitováno. *Tryp. cruzi* byla klasifikována do tzv. „Discrete Typing Units“ (DTUs) (Zingales et al., 2012; Gumiel et al., 2015). Tyto skupiny charakterizují soubor kmenů (linií) *Tryp. cruzi*, pojmenovaných TcI – VI (Zingales et al., 2012; Gumiel et al., 2015) a TcBat (Pinto et al., 2015) s různým geografickým rozšířením i klinickými projevy lidských nálezů (Zingales et al., 2012; Pinto et al., 2015). Pro zařazení *Tryp. cruzi* k jednotlivým DTUs se využívá mnoho molekulárních markerů. Nejčastěji využívaným markerem je mini – exon, opakovaný úsek v genomu *Tryp. cruzi* (Fernandes et al., 2001; Eloy & Lucheis, 2012; Gumiel et al., 2015). Publikované studie však ukázaly, že tento marker není dostatečně citlivý pro klasifikaci linií *Tryp. cruzi*, jelikož neumožňuje přesnou identifikaci DTUs (Provnost et al., 2020; Barnabé et al., 2023). V soudobých publikacích (Flores-López et al., 2022; Barnabé et al., 2023) byly používány jaderné a mitochondriální markery, které odhalily větší diverzitu linií *Tryp. cruzi* v některých státech USA. Tyto studie jsou však limitovány nejen počtem použitých biologických vzorků, ale i velikostí zkoumané geografické oblasti (Flores-López et al., 2022; Barnabé et al., 2023). Cílem této práce je provést rozsáhlejší screening v jižních oblastech USA, a to na co největším území, lišícím se nejen výskytem jednotlivých druhů triatom, ale i biotopy. Tato práce může přinést nové poznatky o genetické diverzitě a rozšíření kmenů *Tryp. cruzi* v oblastech, které ještě nebyly dostatečně prozkoumány.

V první kapitole jsou shrnuty základní poznatky o podčeledi Triatominae. Druhá kapitola přináší základní informace o parazitovi *Tryp. cruzi*, původci Chagasovy choroby. Třetí kapitola diplomové práce se věnuje genetické diverzitě a rozšíření jednotlivých linií *Tryp. cruzi* ve vektorech rodu *Triatoma* v Americe a ve světě. Kapitola čtvrtá se zabývá detekcí a zařazením *Tryp. cruzi* do jednotlivých DTUs a dostupnou molekulární diagnostikou. Dosavadní informace o diverzitě linií *Tryp. cruzi* na jihu USA shrnuje poslední kapitola.

1 Úvod

1.1. Podčeleď Triatominae

Podčeleď Triatominae se řadí do čeledi Reduviidae (Hemiptera, Heteroptera) (Otálora-Luna et al., 2015; Bargues et al., 2017). Je rozdělena do 5 kmenů, 15 rodů a složena z přibližně 148 druhů (Bargues et al., 2017). Triatominae patří mezi hmyz s proměnou nedokonalou (hemimetabola). Jejich vývoj od vajíčka po dospělého jedince vyžaduje 5 larválních stádií (instarů). Stádium nymfy i dospělé se živí krví obratlovců. Všechna vývojová stádia mají též schopnost přenosu parazitického prvoka *Trypanosoma cruzi*, způsobující Chagasovu chorobu (Jurberg & Galvão, 2006; Catala et al., 2017). V endemických zemích Latinské Ameriky jsou epidemiologicky významnými vektory *Tryp. cruzi* tři rody: *Rhodnius*, *Triatoma* a *Panstrongylus* (Berenger & Parola, 2016).

1.1.1 Evoluční původ a adaptace

Podčeleď Triatominae pochází z predátorských ploštic čeledi Reduviidae. Přechod z predátora na hematofága (krevsajícího živočicha) vyžadoval nejen morfologické modifikace trávicího a ústního ústrojí, ale i změnu chování (Bargues et al., 2017). Dospělí jedinci z rodu *Triatoma* se od dravých zástupců čeledi Reduviidae liší rovným štíhlým ústním ústrojím, zvaným proboscis (Catala et al., 2017). Toho využívají k proniknutí kůží obratlovce, zatímco predátoři svým typicky robustním, často zakřiveným ústním ústrojím z chitinu, pronikají přes pevný exoskelet bezobratlých (Otálora-Luna et al., 2015; Catala et al., 2017). Silně jedovaté a zároveň proteolytické sliny čeledi Reduviidae slouží k rychlému zneškodnění hostitele. Toxiny některých druhů mají dokonce i lékařsky a zemědělsky využitelné vlastnosti. Mohou fungovat jako insekticidy či terapeutika (Bargues et al., 2017; Walker et al., 2017). U krevsajícího hmyzu jsou sliny sice méně toxické, ale navíc obohacené antihemostatiky, analgetickými proteiny, antikoagulanty a dalšími molekulami inhibujícími srážlivost krve a neutralizujícími zánětlivou reakci. Krev, kterou získávají od obratlovců, včetně člověka, je bohatá na bílkoviny, pro ploštice velice výživná a funguje jako zdroj energie (Capinera, 2008; Otálora-Luna et al., 2015). Další adaptací umožňující přechod od predace k obligátní hematofágii (permanentní závislosti na příjmu krve hostitele) se stala změna chování. Dravý předchůdce triatom, jenž se specializoval na bezobratlé živočichy, si musel osvojit novou strategii vyhledávání

potravy, tj. rozpoznání vylučovaného CO₂ a zdroje tepla (Krinsky, 2002; Klotz et al., 2014; Otálora-Luna et al., 2015).

1.1.2 Životní cyklus

Životní cyklus triatom může trvat několik měsíců (*Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*) nebo dokonce jeden až dva roky (*Triatoma dimidiata*, *Panstrongylus megistus*) (Catala et al., 2017). Délka cyklu jednotlivých druhů závisí na teplotě, vlhkosti prostředí, na dostupnosti zdroje a intenzitě příjmu potravy nebo hustotě populace (Krinsky, 2002). Celý cyklus začíná stádiem vajíčka, ze kterého se vyvine dospělý jedinec prostřednictvím pěti instarů nymfy. Ty se od dospělců odlišují nejen nevyvinutými křídly, ale i absencí vnějších pohlavních orgánů a pohlavní dvoutvárností (Catala et al., 2017). Jednotlivá životní stádia se živí krví obratlovců. Její dostupnost je důležitá pro délku vývoje jednotlivých instarů nymfy a následnou přeměnu v dospělé (Krinsky, 2002; Catala et al., 2017).

Samičky se mohou pářit s jedním i více samci a jejich sperma jsou schopny uchovat několik měsíců (Krinsky, 2002; Catala et al., 2017). Samice dokáže odehnat samce od kopulace pomocí stridulačního orgánu, který má zároveň obrannou funkci (Roces & Manrique, 1996). Klazení vajec (ovipozice) začíná 10 - 30 dní po kopulaci. Jedna samice může naklásat za svůj život až 1000 vajíček (v závislosti na druhu) (Krinsky, 2002). Čerstvě snesená vejce jsou bílá, ale před vylihnutím se zbarvují do růžova až červena (Krinsky, 2002; Catala et al., 2017). Vajíčka, umístěná v hnízdech ptáků či nalepená na jejich peří, mohou být pasivně přenášena, či transportována na lidských předmětech. Ploštice tak mohou migrovat se svými hostiteli a rozšiřovat svůj areál (Catala et al., 2017).

1.1.3 Hostitelé a habitat Triatominae

Ploštice jsou schopné aktivně migrovat z volně žijících hostitelů (hlodavci, vačice, atd.) na domestikovaná zvířata (slepice, kočky, psi, atd.) i člověka. Obvykle v noci jsou vábeny světlem z lidských příbytků, kde sají krev na odhalené kůži lidí (obličej, paže, nohy) (Otálora-Luna et al., 2015). Kousnutí a sání ploštice je pro člověka téměř bezbolestné. Dochází při něm k uvolnění slin s obsahem proteinů, které mohou způsobit závažné alergické reakce projevující se svěděním, vyrážkou, otoky, nevolností, průjmem, dušností či anafylaktickým šokem (Krinsky, 2002; Capinera et al., 2008; Zeledón et al., 2012). Během dne se ploštice často ukrývají v dírách a trhlinách různých materiálů (skalní štěrby,

zbytky hnízd, klády dřeva, atd.) či v lidských příbytcích (matrace, nábytek, otvory ve zdi, atd.). Přítomnost triatom v uzavřených prostorech jim poskytuje dostatečné množství potravy, ochranu před predátory nebo před nepříznivými klimatickými podmínkami. To vede k vyšší reprodukci a nárůstu hustoty jejich populace (Otálora-Luna et al., 2015).

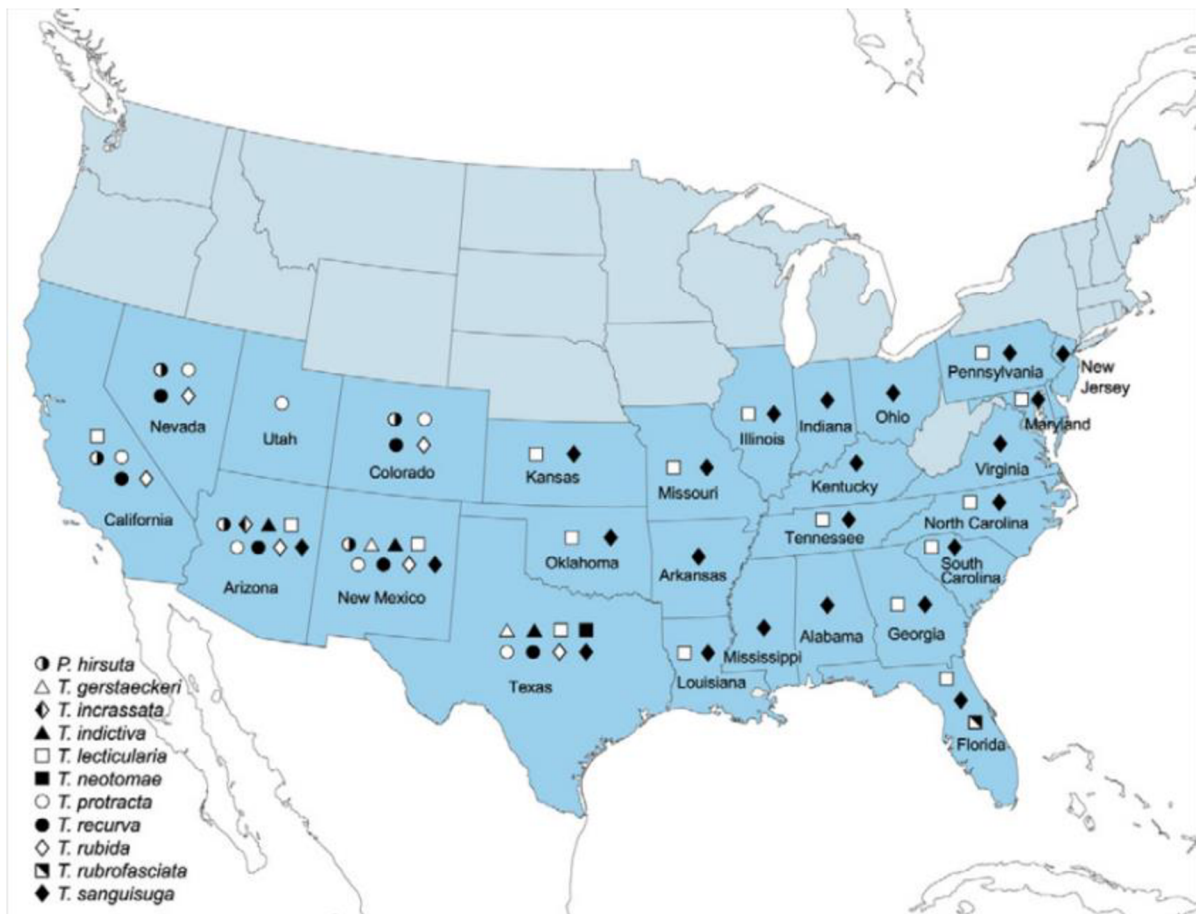
1.1.4 Geografické rozšíření

Velká část zástupců podčeledi Triatominae pochází z Ameriky, kde jsou rozšířeny od jižní Argentiny až po Spojené státy americké (Berenger & Parola, 2016). Někteří zástupci obývají Indii (rod *Linshcosteus*) (Schofield, 2000; Schofield & Galvão, 2009). Od jihovýchodu Asie až po Novou Guineu a severní Austrálii byly též zmapovány další druhy této podčeledi, zejména *T. rubrofasciata* (Schofield & Galvão, 2009). Rozšíření triatom mimo americký kontinent pravděpodobně souvisí s šířením jejich hostitelů, zejména krys, vyskytujících se na lodích (Schofield & Galvão, 2009; Berenger & Parola, 2016).

Tato práce se zaměřuje na triatomy severoamerického kontinentu. Ve Spojených státech amerických (USA) bylo dokumentováno celkem 11 druhů triatom, z toho se 10 z nich řadí do rodu *Triatoma* (*Triatoma gerstaeckeri*, *T. incrassata*, *T. indictiva*, *T. lecticularia*, *T. neotomae*, *T. protracta*, *T. recurva*, *T. rubida*, *T. rubrofasciata*, *T. sanguisuga*) a jeden do rodu *Paratriatoma* (*Paratriatoma hirsuta*) (Bern et al., 2011; Zeledón et al., 2012; Klotz et al., 2016). Záznamy o jejich výskytu sice pocházejí až z 27 států USA, někde se však může jednat o ojediněle zavlečené případy. K nejrozšířenějším druhům triatom severoamerického kontinentu patří *T. sanguisuga* (23 států) a *T. lecticularia* (16 států). Jejich nejvyšší koncentrace se objevuje na jihozápadě USA, především v Texasu, Arizoně a v Novém Mexiku (8 druhů). Velká druhová diverzita triatom je dále soustředěna v Kalifornii (5 druhů), v Nevadě a Coloradu (4 druhy) (Zeledón et al., 2012). Diverzita druhů z podčeledi Triatominae ve státech USA je znázorněna na obrázku 1.

T. sanguisuga dominuje celému jihu USA, avšak areál nezasahuje až na pobřeží Pacifiku (Zeledón et al., 2012). Okrajově byl její výskyt zaznamenán v některých severnějších státech (Indiana, Illinois, Ohio, Pensylvánie a New Jersey) (Zeledón et al., 2012). *T. sanguisuga* je poměrně plastickým druhem, jelikož toleruje vysokou vlhkost (vyskytuje se např. kolem vodních ploch) (Klotz et al., 2016). Na jihovýchodě USA, zejména na Floridě a v Georgii, je jediným běžně nacházeným druhem. V USA je často spojována s přenosem

Tryp. cruzi a autochtonní nákazou člověka (Dorn et al., 2007; Cesa et al., 2011). V centrální části na jihu Spojených států (Texas a Nové Mexiko) se často *T. sanguisuga* vyskytuje synantropně s *T. gerstaeckeri* (Kjos et al., 2009). Na jihozápadě USA, od Nového Mexika po Kalifornii, převažují druhy *T. protracta* a *T. rubida* (Zeledón et al., 2012; Klotz et al., 2016). Dalšími rozšířenými druhy této oblasti jsou *T. indictiva* a *T. recurva*. Naopak mezi vzácné druhy patří *T. rubrofasciata*, jejíž výskyt byl zaznamenán pouze na Floridě, a *T. incrassata* se záchyty v Arizoně (Bern et al., 2011; Zeledón et al., 2012; Klotz et al., 2014). Většina druhů triatom na jihozápadě USA preferuje aridní prostředí. Například *T. rubida* a *T. protracta* obývají typicky kamenité pouště Arizony, Nového Mexika a Kalifornie (Bern et al., 2011, Zeledón et al., 2012; Klotz et al., 2016).



Obrázek 1: Diverzita druhů z podčeledi Triatominae přes státy USA (převzato z: Zeledón et al., 2012).

1.2 Triatomami přenášení parazitů

1.2.1 Trypanosomy

Rod *Trypanosoma* patří do třídy Kinetoplastida, která je součástí čeledi Trypanosomatidae. Trypanosomy jsou parazitické prvoci infikující obratlovce. Rod *Trypanosoma* zahrnuje různé druhy, z nichž některé jsou přenášeny vektory z podčeledi Triatominae (Gourbière et al., 2012; Garcia et al., 2016; Vieira et al., 2018). Krysy napadá *Trypanosoma conorhini*, jejímž přenašečem je *Triatoma rubrofasciata*. Parazitem netopýrů je *Tryp. cruzi marinkellei*, jejímž vektorem je triatoma rodu *Cavernicola* (Hamilton et al., 2017). K trypanosomám se schopností infikovat obratlovce, včetně člověka, patří *Trypanosoma rangeli*. Ta sice není pro člověka patogenní, ale je lékařsky nezanedbatelná z důvodu možných falešně pozitivních výsledků při detekci Chagasovy choroby, způsobené druhem *Tryp. cruzi*. Na rozdíl od ní, *Tryp. rangeli* proniká do hostitele během sání triatom pomocí slin. *Tryp. rangeli* je přenášena pouze triatomami rodu *Rhodnius* a je rozšířena zejména ve Střední a Jižní Americe (Hamilton et al., 2017). Z medicínského hlediska je zvláště významná *Tryp. cruzi* jako původce Chagasovy choroby. *Tryp. cruzi* je přenášena výkaly všemi zástupci podčeledi Triatominae. *Tryp. cruzi* se odlišuje od *Tryp. rangeli* životním cyklem, způsobem přenosu na hostitele a odolností vůči imunitním reakcím. S *Tryp. rangeli* se naopak shoduje v biologických znacích, geografickém rozšíření, vektorech a hostitelích. Oba druhy trypanosom tak mohou vyvolávat smíšené infekce jak u hostitelů, tak i vektorů (Klotz et al., 2014; Vieira et al., 2018). *Tryp. cruzi* je z důvodu zásadního epidemiologického významu předmětem většiny studií (Pronovost et al., 2020).

1.2.2 *Trypanosoma cruzi*

1.2.2.1 Životní cyklus

Životní cyklus *Tryp. cruzi* začíná proniknutím pohyblivé formy parazita (metacyklický trypomastigot) přes porušenou kůži nebo sliznici do krevního oběhu savčího hostitele (Tyler & Engman, 2001). Trypomastigot infikuje v hostiteli mnoho druhů jaderných buněk, v jejichž cytoplazmě se diferencuje na amastigota. Po binárním dělení se amastigot přemění zpět na trypomastigota. Následně dojde k prasknutí buňky a trypomastigot se dostane opět do krevního řečiště. Po replikaci se dále šíří a napadá další buňky, které se stanou infekčními, což vede k patologiím spojeným s Chagasovou chorobou

(Tyler & Engman, 2001; Vieira et al., 2018). Životní cyklus pokračuje, když triatoma získá trypomastigota během sání krve na infikovaném savčím hostiteli. Trypomastigot pronikne do střední části střeva triatom a přemění se na stádium epimastigot (Bern et al., 2011; Vieira et al., 2018). Tato forma po replikaci putuje do zadní části střeva a transformuje se pomocí procesu metacyklogeneze na infekční metacyklické stádium trypomastigot. Toto stádium již neprochází replikací, ale je vylučováno pomocí výkalů triatom. Tento cyklus se systematicky opakuje (Bern et al., 2011; Klotz et al., 2014).

1.2.2.2 Faktory ovlivňující vektorovou kapacitu triatom

Tryp. cruzi žije v gastrointestinálním traktu svého vektora (Klotz et al., 2021). Když ploštica saje krev, dojde k zvětšení abdomenu. Potravu následně tráví v zadní části střeva. Během krmení nebo po plném nasycení se většina zástupců této podčeledi vyprázdní na hostiteli nebo v jeho blízkosti, čímž dochází k přenosu parazita. Pokud probíhá defekace až po delší době od opuštění hostitele, snižuje se pravděpodobnost přenosu *Tryp. cruzi* (Krinsky, 2002; Zeledón et al., 2012). Defekace s prodlevou je pravděpodobně jedním z faktorů přispívajících k nižší vektorové kapacitě dvou severoamerických druhů triatom *T. rubida* a *T. protracta* na jihozápadě Spojených států amerických (Klotz et al., 2009). Na délce jejich krmení závisí množství přijaté krve. Když triatoma nepřijme dostatek potravy, defekace se oddálí, nebo k ní nedojde a tudíž nedojde ani k přenosu parazita (Krinsky, 2002; Catala et al., 2017). *Tryp. cruzi* vstupuje do hostitele po mechanickém poškození kůže. Výkaly se společně s parazitem dostanou do rány a následně do krve hostitele. Další možnosti transferu *Tryp. cruzi* jsou přes sliznici (oka, nosu, úst), orálním způsobem, kontaminovanými potravinami či nápoji, krevní transfuzí, transplantacemi některých orgánů či přenosem z infekční matky na novorozence (Bern et al., 2011; Berenger & Parola, 2016).

Vývoj parazitů je ve střevě triatom regulován souborem střevních bakterií, zvaných mikrobiom (Azambuja et al., 2005). Tyto symbiotické bakterie mohou ovlivnit rozvoj populace parazitů jak pozitivně, tak i negativně. U triatom dochází k přímému kontaktu mikrobiomu s *Tryp. cruzi*, soutěžícími mezi sebou o zdroj potravy. Interakce může probíhat i nepřímou za zvýšené exprese molekul s antiparazitárním účinkem nebo pomocí humorálních imunitních obranných faktorů hostitele (Azambuja et al., 2005). Soudobé poznatky o interakcích mezi mikrobiomem triatom a tímto parazitem jsou značně omezené. Dostupné

jsou především korelační studie, které shodně poukazují na zvýšenou diverzitu mikrobiomů infikovaných ploštic (Rodríguez-Ruano et al., 2018; Eberhard et al., 2022).

Stanoviště obývaná jednotlivými druhy triatom závisí na preferenci hostitele (Rabinovich et al., 2011). Infekce *Tryp. cruzi* je přenášena různými druhy triatom v rámci sylvatických a synantropních (domestických) cyklů. V sylvatickém cyklu *Tryp. cruzi*, ploštice upřednostňují volně žijící živočichy, vyskytující se v dutých či padlých stromech (lenochodí, vačnatci), v podzemních doupatech či norách (hlodavci, pásovci, mývalové, skunci) nebo v jeskyních (netopýři) (Bern et al., 2011; Otálora-Luna et al., 2015). Vlivem globalizace, odlesňování, rozvojem průmyslu, budováním, rozšiřováním městských aglomerací a infrastruktury dochází k ničení přirozeného prostředí volně žijících živočichů jako rezervoárů *Tryp. cruzi* (Bern et al., 2011). Hostitelem triatom v synantropním cyklu *Tryp. cruzi* jsou pak vedle člověka domácí mazlíčci (psi, kočky, morčata) a hospodářská zvířata (slepice, koně, králíci) (Otálora-Luna et al., 2015). Oba cykly se vlivem lidské činnosti často propojují a vytváří tak prostor pro přenos parazita z volně žijících živočichů na zvířata domácí a jejich prostřednictvím následně na člověka (Bern et al., 2011).

V Jižní a Střední Americe jsou příkladem triatom v synantropním cyklu druhy *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* a *Rhodnius prolixus* (Klotz et al., 2014; Otálora-Luna et al., 2015). U severoamerických ploštic druhu *T. rubida* a *T. protracta* bylo zjištěno, že preferují hlodavce, zejména rod *Neotoma*, v jejichž norách mohou přežít zimní období (Zeledón et al., 2012; Otálora-Luna et al., 2015). Hlodavci tohoto rodu se stávají synantropními v mnoha státech, např. v Kalifornii, Arizoně a Novém Mexiku. Často si staví hnízda v zahradách, na golfových hřištích, či v městských parcích v těsné blízkosti lidských sídel (Klotz et al., 2014, Klotz et al., 2021). Zatímco *T. protracta* není většinou invazivní, *T. rubida* se v lidských obydlích vyskytuje velmi často (Klotz et al., 2010; Klotz et al., 2021). Nejde pouze o domy se špatnými hygienickými podmínkami, ale i o velice bohatá sídla okrajových částí aglomerací, která zasahují do přirozeného prostředí rezervoárových obratlovců, včetně rodu *Neotoma* (Wood et al., 1949; Klotz et al., 2010; Zeledón et al., 2012).

1.2.2.3 Chagasova choroba

Chagasova choroba (americká trypanosomiáza) patří mezi parazitární tropická onemocnění. Nemoc popsal brazilský lékař Carlos Chagas, podle kterého byla zároveň i pojmenována. Onemocnění se značně rozšířilo v Mexiku, Střední a Jižní Americe (Gourbière et al., 2012; Klotz et al., 2016). V důsledku migrace a turismu se stává globálním problémem. Šíří se z endemických oblastí Latinské Ameriky do ostatních částí světa, např. USA, Kanady nebo evropských států (Španělsko) (Gourbière et al., 2012; Antinori et al., 2018; Vieira et al., 2018).

Chagasova choroba má dvě po sobě jdoucí fáze, akutní a chronickou (Zingales et al., 2018). Akutní fáze Chagasovy choroby je obvykle asymptomatická. Po jednom až dvou týdnech infekce se může objevit horečka, kožní vyrážky, zvětšení lymfatických uzlin, jater a sleziny. V chronické fázi (neurčitě) většina nakažených jedinců opět nevykazuje žádné symptomy, avšak v průběhu několika let se u zhruba 20 – 30 % pacientů projeví srdeční a gastrointestinální onemocnění (Pérez-Molina & Molina, 2018; Bern et al., 2019).

K léčbě Chagasovy choroby se v současné době využívají dva léky - benzinadol a nifurtimox (Pérez-Molina & Molina, 2018). Při akutní fázi nemoci jsou oba léky účinné, ale během chronické fáze se jejich efektivita snižuje. Zároveň obě léčiva prokazují závažné vedlejší nežádoucí účinky (Chatelain, 2015; Zingales et al., 2018). Výzkumy prokázaly, že kmeny *Tryp. cruzi*, patřící do různých skupin DTUs, vykazují rozdílnou citlivost na používané léky (Yun et al., 2009; Gruending et al., 2015; Magalhães et al., 2022). Z tohoto důvodu by se nově vyvíjené léčebné látky měly testovat na všechny linie DTUs *Tryp. cruzi*. (Zingales et al., 2014; Zingales et al., 2018; Magalhães et al., 2022).

1.2.2.4 Preventivní opatření

Ve státech Střední a Jižní Ameriky jsou dlouhodobě uplatňována preventivní opatření proti šíření infikovaných vektorů. Z tohoto důvodu se doporučuje sledovat prevalenci a diverzitu *Tryp. cruzi* v populacích. Za tímto účelem se využívají moskytiérové sítě nebo žluté osvětlení místo bílého, méně lákající triatomy (Bern et al., 2011). Na domy a hospodářské budovy se aplikují insekticidy. Tyto chemické prostředky mají však omezenou účinnost na vajíčka. Stejně tak si na ně vyvinuly rezistenci mnohé populace triatom

(Germano et al., 2010). V endemických oblastech Latinské Ameriky, kde se staví domy z nepálených cihel s doškovými střechami (Klotz et al., 2016), by bylo vhodné zvýšit bezpečnost lidských obydlí proti vniknutí hmyzu např. střechami z keramických tašek, lepším těsněním domů, použitím klimatizace, apod. (Jurberg & Galvão, 2006). V USA, i přes tato zvýšená opatření, jsou infestace triatom poměrně časté. Problémem je nedostatečná informovanost o Chagasově chorobě v běžné společnosti, včetně monitorování prevalence a diverzity *Tryp. cruzi* infekcí (Waleckx et al., 2014). K zabránění šíření tohoto onemocnění je vhodné též odstraňování hnízd rezervoárových hostitelů, případně i habitatů hlodavců a omezení kontaktu domácích zvířat s nimi (Bern et al., 2011; Zingales et al., 2012).

1.3 Genetická diverzita linií *Trypanosoma cruzi*

V současné době jsou linie *Trypanosoma cruzi* klasifikovány na základě genotypové i fenotypové variability do tzv. „Discrete Typing Units“ (DTUs) pojmenovaných TcI – VI (Zingales et al., 2012; Gumiel et al., 2015) a TcBat (Lima et al., 2015; Pinto et al., 2015). Znalosti o genetické diverzitě pochází z laboratorních linií *Tryp. cruzi* izolovaných z pozitivních jedinců, pocházejících ze Střední a Jižní Ameriky. *Tryp. cruzi* je diploidní organismus, jehož genom se skládá z homologních párů chromozomů, lišících se počtem a velikostí (Branche et al., 2006; Zingales et al., 2018). Ze 41 kmenů *Tryp. cruzi* byla registrována největší velikost u kmenu CL Brener (89,94 Mb) a nejmenší u kmenu Y (15,55 Mb) (převzato z databáze GenBank; Herreros-Cabello et al., 2020). Díky těmto vlastnostem a rozdílům v obsahu DNA mezi liniemi, vykazuje genom *Tryp. cruzi* vysokou míru plasticity. Původně byla tato plasticita připisována vysoké mutační rychlosti, ale recentní studie ukázaly, že příčinou je zejména výměna genetické informace mezi jednotlivými genetickými liniemi *Tryp. cruzi* (Zingales et al., 2018; Barnabé et al., 2023). Ač se *Tryp. cruzi* běžně rozmnožuje asexuálně, dochází i k sexuální reprodukci a rekombinaci genů (Messenger et al., 2015).

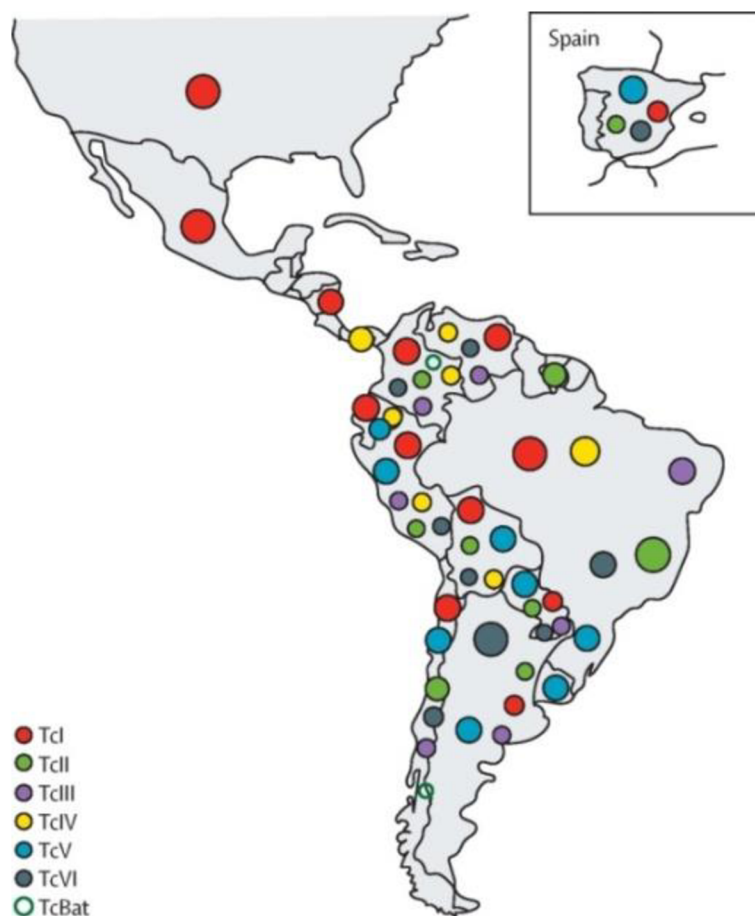
TcI a TcII patří mezi rodové linie, které speciovaly ze společného předka. Linie TcV a TcVI jsou považovány za hybridy vzniklé hybridizační událostí mezi předky TcII a TcIII (Brenière et al., 2016). U kmene TcI pravděpodobně dochází k rekombinacím poměrně často. Studií Roellig et al., 2013 byla například zjištěna genetická výměna mezi TcI a TcIV. Rekombinace zvyšuje genetickou variabilitu a potenciálně i fitness parazita,

čímž se rekombinantní linie TcI mohou šířit a adaptovat na nové hostitele (Carrasco et al., 1996; Brenière et al., 2016). TcI je proto nejrozšířenějším DTU s areálem od jihu Spojených států po severní Argentinu a Chile (Zingales et al., 2012; Lisboa et al., 2015; Brenière et al., 2016). Kmeny TcIII a TcIV se značnou genetickou diverzitou jsou především rozšířeny v Jižní Americe (Martins et al., 2015; Brenière et al., 2016). TcIV se geneticky liší od kmenu TcIV v Severní Americe, pojmenovaného TcIV – USA (TcIV – US). Tento kmen se objevuje jako samostatná monofyletická skupina ve fylogenetických analýzách (Zingales et al., 2012, Flores-López et al., 2022). Dosud však nebyl prozkoumán její epidemiologický význam, geografická distribuce a patogenita u zvířat, ale dokonce ani u lidí (Flores-López et al., 2022). Hybridní druhy TcV a TcVI jsou geograficky rozšířeny v jižních částech Jižní Ameriky (Argentina, Brazílie, Chile, Paraguay a Uruguay) (Zingales et al., 2012; Brenière et al., 2016). Linie TcV se též vyskytuje v Bolívii a severních zemích Jižní Ameriky, jako je Peru a Ekvádor. TcVI se objevuje v Kolumbii a Ekvádoru jen ojediněle (Zingales et al., 2012; Perez et al., 2013; Brenière et al., 2016). Nízká genetická diverzita byla naopak identifikována u skupiny TcII. Ta se sice vzácně vyskytuje ve Střední a Severní Americe, čteněji je však zastoupena v Jižní Americe, na jih od povodí Amazonky, odkud pravděpodobně pochází (Zingales et al., 2012; Lisboa et al., 2015; Brenière et al., 2016). Posledně objevená linie TcBat má původ od netopýrů z Amazonie (Brazílie, Panama) (Marcili et al., 2009; Ramírez et al., 2014; Pinto et al., 2015).

Skupiny TcI, TcII, TcIV, TcV a TcVI patří mezi časté původce Chagasovy choroby (Zingales et al., 2012; Brenière et al., 2016; Magalhães et al., 2022). U linie TcIII, vyznačující se nízkou patogenitou, jsou lidské infekce vzácné (Martins et al., 2015; Brenière et al., 2016). Linie TcI byla detekována u domestikovaných savců, člověka i u volně žijících hostitelů. Skupiny TcII, TcV a TcVI jsou spojovány především se synantropními cykly, zatímco TcIII, TcIV se objevují zejména u volně žijících živočichů (Bern et al., 2011; Brenière et al., 2016). Linie TcBat, blízké příbuzná TcI, byla kromě volně žijících netopýrů rovněž identifikována u lidí (Pinto et al., 2012).

Kromě Jižní Ameriky, se také značné množství autochtonních nákaz Chagasovy choroby objevuje v USA. Vlivem migrace se zvyšuje počet importovaných případů tohoto onemocnění na evropském kontinentě (Španělsko), kde jsou imigranti, původem z Latinské Ameriky, nakaženi různými skupinami DTUs. Nejrozšířenější z nich je TcV a dále též TcIV,

TcVI a TcI (Brenière et al., 2016; Tavares de Oliveira et al., 2020). Rozšíření jednotlivých skupin DTUs je zobrazeno na obrázku 2.



Obrázek 2: Genetická rozmanitost linií *Trypanosoma cruzi* (DTUs) u člověka v Jižní, Střední, Severní Americe a Španělsku (převzato z: Brenière et al., 2016).

1.4. Screening genetické diverzity linií *Trypanosoma cruzi*

Pro identifikaci všech linií DTUs byly navrženy v průběhu let různé strategie. Ke stanovení genetické diverzity izolátů *Trypanosoma cruzi* se běžně používá metoda polymerázové řetězové reakce (PCR), založená na amplifikaci konkrétních genů (mini – exon a mikrosatelitní DNA). Na základě rozdílných délek produktů bylo navrženo dělení do genetických linií (Eloy & Lucheis, 2012; Zingales et al., 2012; Brenière et al., 2016). Pro amplifikaci mini - exonu se využívá dvojice primerů TCZ1/TCZ2, které slouží k základní diagnostice přítomnosti *Tryp. cruzi*. Tyto primery amplifikují opakující se sekvence mikrosatelitní oblasti jaderné DNA (nDNA) *Tryp. cruzi* o délce 188 bp. Mezi druhy trypanozom jsou relativně konzervované a vykazují různé velikosti a sekvence nukleotidů i mezi velmi blízkými druhy. Tyto primery jsou schopny amplifikovat všechny

linie *Tryp. cruzi* a naopak by neměly amplifikovat jiné druhy trypanozom, jako je zmiňovaná *Tryp. rangeli* (Eloy & Lucheis, 2012). Pro zařazení linií *Tryp. cruzi* do taxonomických skupin DTUs (TcI - VI) se používají dva specifické sety primerů (ME/TC1; ME/TC2), opět založené na mini – exonu *Tryp. cruzi*. Dvojice primerů ME/TC1 jsou specifické pro DTU TcI a pár ME/TC2 amplifikuje DTUs TcII-VI (Fernandes et al., 2001; Gumiel et al., 2015). Primery navržené Fernandesem a kolegy (2001) byly aplikovány v řadě studií pro základní diagnostiku skupin TcI a TcII – VI, ale ne pro přesnou klasifikaci všech DTUs (Gumiel et al., 2015; Herrera et al., 2015; Torhorst et al., 2023). Zmiňovaná trojice primerů byla též použita v této diplomové práci (Kapitola 3).

Klasické Sangerovo sekvenování i sekvenování nové generace NGS (Next Generation Sequencing) ukazují, že výše popsané typy markerů nejsou vhodné pro rozlišení jednotlivých DTUs. NGS oproti Sangerovu sekvenování umožňuje detekci všech haplotypů, tedy i násobné infekce. Z toho plyne, že sekvence mini - exonů nejsou považovány za univerzální markery pro jakékoliv DTUs (Dumonteil et al., 2018; Barnabé et al., 2023). Screening je nutné doplnit o další vhodné markery s dostatečnou fylogenetickou informací. Soudobé studie navrhly několik vhodnějších genetických markerů, tj. konkrétní jaderné a mitochondriální geny (Flores-López et al., 2022; Barnabé et al., 2023).

Výsledky studie Barnabé et al., 2023 (s použitím kultur *Tryp. cruzi*) ze států Jižní Ameriky (Brazílie, Venezuela, Bolívie, Chile, Paraguay) a Severní Ameriky (USA, Mexiko) ukázaly, že jaderné geny s jednou kopií jsou nejlepším standardem pro klasifikaci linií *Tryp. cruzi*. Mitochondriální geny poskytují relevantní výsledky o evoluci a určení skupin DTUs linií *Tryp. cruzi*. Mitochondriální DNA (mtDNA) je běžný referenční fylogenetický marker (Galtier et al., 2009; Dong et al., 2021). Její vysoká variabilita s vícenásobnými identickými kopiemi v buňce, umožňuje snadnou amplifikaci pomocí metody PCR a následnou rekonstrukci fylogenetického stromu k identifikaci jednotlivých kmenů *Tryp. cruzi* (Barnabé et al., 2023). Díky svým vlastnostem, jako jsou absence rekombinace, uniparentální přenos a další, je běžně využívána, avšak některé její vlastnosti se zdají být sporné (Galtier et al., 2009; Dong et al., 2021) vlivem přítomnosti více typů mitochondriální DNA v jednom kmeni (heteroplazmie) (Barnabé et al., 2023). Heteroplazmii prokázali ve své studii Barnabé et al., 2023, pomocí NGS sekvenování se třemi mitochondriálními markery.

1.5 Současné poznatky o diverzitě linií *Trypanosoma cruzi* ve Spojených státech amerických (USA)

Vzhledem k rozšíření vektorů *Trypanosoma cruzi* na území USA (27 států), jsou současné poznatky o distribuci a genetické rozmanitosti linií tohoto parazita značně limitovány. Limitací dosud provedených studií (jak na vektorech, tak rezervoárových hostitelích) byl nejen počet vzorků a úzké zaměření na menší geografické oblasti v USA (často jednotlivé státy), ale i nedostatečná univerzálnost molekulárních markerů, původně navržených na jihoamerické linie *Tryp. cruzi* (Pronovost et al., 2020; Barnabé et al., 2023).

U domestikovaných i volně žijících savců v USA byly nejprve objeveny dva genotypy, a to TcI a TcIV. Ty patří mezi nejrozšířenější a nejčastější původce Chagasovy choroby (Barnabé et al. 2001; Bern et al., 2011). Teorii, že se v USA nachází jen dvě skupiny TcI a TcIV, zahrnul výzkum prováděný na hlodavcích z jižní Louisiany (Herrera et al., 2015). Tato studie z roku 2015 identifikovala vysokou míru cirkulace TcII (Herrera et al., 2015). Později bylo poukázáno na možnou přítomnost dalších DTUs. Publikace od Provnost et al., 2020 zkoumala pouze šest rezervoárových savců (hlodavců) v městské aglomeraci (New Orleans, Louisiana), u kterých se zaměřila na tkáňovou specifitu infekce (srdce, slezina, játra). Na základě NGS sekvencí pro mini – exon identifikovala tato studie, jako jediná v USA, skupiny TcV a TcVI (Provnost et al., 2020). Vzhledem k použitému markeru, na jehož variabilitu (v podobě odlišných haplotypů nespecifických pro konkrétní DTU) bylo nedávno upozorněno (Barnabé et al., 2023), je výskyt TcV a TcVI na území USA značně diskutabilní a bude nutné jej ověřit.

Dostupná data pro prevalenci a diverzitu *Tryp. cruzi* v severoamerických triatomách potvrzují přítomnost nejméně dvou DTUs. Studie od Flores-López et al., 2022 sledovala genetickou diverzitu *Tryp. cruzi* u pěti druhů triatom (*Triatoma gerstaeckeri*, *T. lecticularia*, *T. indictiva*, *T. sanguisuga* a *T. recurva*) na území států Arizona a Texas. Na základě MLST (Multi – Locus Sequence Typing) pomocí čtyř molekulárních markerů (tři jaderné geny s jednou kopií a jeden mitochondriální gen) byly mezi zmíněnými vektory detekovány linie DTUs TcI a TcIV – USA (Flores-López et al., 2022). Stejně markery byly také použity v mé práci (Kapitola 3).

Z výše uvedeného textu vyplývá jak potřeba inovace metodiky screeningu (zejména vývoje citlivých molekulárních markerů umožňujících detekci diversifikovaných linií *Tryp. cruzi*), tak rozšíření množství biologických vzorků z širší geografické oblasti. Tyto strategie jsou klíčové k získání relevantního přehledu o diverzitě linií *Tryp. cruzi* v Severní Americe. Z tohoto důvodu se moje diplomová práce orientuje na výběr dostatečně informativních markerových genů a poskytuje základní náhled do diverzity a distribuce *Tryp. cruzi* linií na jihu USA. Současné snahy výzkumné skupiny, pod kterou jsem tuto magisterskou práci vypracovávala, se orientují na implementaci NGS sekvenování mnou vybraných markerů a použití tohoto přístupu na širší set *Tryp. cruzi* pozitivních triatomů.

2 Cíle

Tato práce se zabývá diverzitou linií *Trypanosoma cruzi* v přirozených vektorech rodu *Triatoma* na jihu Spojených států amerických (USA). V rámci tohoto komplexního tématu byly stanoveny tyto dílčí cíle:

1. Diagnostika parazita *Tryp. cruzi* ve vzorcích *T. sanguisuga* z Georgie a Floridy.
2. Výběr setu *Tryp. cruzi* pozitivních triatom z vybraných lokalit na jihu USA.
3. Testování nově navržených primerů s vybraným setem *Tryp. cruzi* pozitivních triatom z různých států USA.
4. Determinace genetické diverzity *Tryp. cruzi* linií pomocí fylogenetické analýzy.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

Sběr triatom byl proveden mojí školitelkou doc. RNDr. Evou Novákovou, Ph.D. na jihu Spojených států amerických. Celkově bylo v roce 2021 nasbíráno 104 jedinců druhu *Triatoma sanguisuga* na území států Georgie a Florida. Z ostrova Sapello v Georgii bylo zpracováno 11 vzorků. Na severu Floridy z Gainesvillu a jeho okolí (Micanopy, Hawthorne) bylo celkem analyzováno 93 jedinců. Většina jedinců pocházela z oblastí obývaných lidmi, budov s domácími a hospodářskými zvířaty (psi, slepice) a pouze 3 vzorky pocházely z volné přírody. U každého jedince byla zaznamenána informace o poloze a povaze stanoviště (GPS souřadnice), povaze templátu, vývojovém stádiu a datu sběru (Tab. P2 v sekci Přílohy).

Dalším zdrojem využívaného materiálu byla již vyizolovaná DNA triatom, která byla pozitivně testována na *Tryp. cruzi* a následně též přidána do fylogenetické analýzy. Celkem bylo vybráno 46 izolátů druhů *T. sanguisuga*, *T. rubida*, *T. protracta* a *T. gersteackeri* z 6 zemí USA. 36 vzorků vyizolované DNA triatom pocházelo z Kalifornie, Arizony, Nového Mexika a Texasu, nasbíraných v letech 2018, 2019 a 2022. Tento set se dále skládal z 10 našich testovaných *Tryp. cruzi* pozitivních izolátů z Floridy a Georgie. Přehled všech použitých izolátů lze najít v Tab. P2 v sekci Přílohy.

3.2 Izolace DNA

Jednotliví jedinci byli následně po sběru rozdělení podélně na poloviny a uchováni v 100 % etanolu při teplotě -75 °C. Polovina jedinců byla předána spolupracující laboratoři v USA. Ze zbytků jednotlivých jedinců byla Janem Zimou, Ph.D. vyizolována DNA. Extrakce DNA triatom byla provedena podle návodu izolačního kitu, DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA pocházela z polovin orgánů, tkání a lymfy každého jedince.

3.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

3.3.1 Diagnostika *Trypanosoma cruzi*

Přítomnost parazita *Trypanosoma cruzi* na 104 vzorcích DNA z oblastí Floridy a Georgie byla detekována polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Screening byl prováděn na 93 jedincích z Floridy a 11 z Georgie, a to dvoukolově pomocí třech setů primerů. Nejprve byly použity primery TCZ1_F (5' - CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT – 3') a TCZ2_R (5' - CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG – 3') pro detekci přítomnosti *Tryp. cruzi*. Tato dvojice primerů amplifikuje opakující se sekvence mikrosatelitního regionu nukleární DNA (nDNA) o délce 188 bp u všech známých DTUs (determinačních taxonomických jednotek) (Virreira et al., 2003; Piron et al., 2007; Reisenman, 2010; Eloy & Lucheis, 2012). K zařazení *Tryp. cruzi* do konkrétních DTUs byly použity další dvě dvojice primerů. Dvojice primerů ME_F (5' - TACCAATATAGTACAGAACTG – 3') a TC1_R (5' - ACACTTTCTGTGGCGCTGATCG – 3') je specifická pro DTU TcI. Kombinace primerů ME_F (5' - TACCAATATAGTACAGAACTG – 3') s reverzním primerem TC2_R (5' - TTGCTCGCACACTCGGCTGCAT – 3') detekuje skupiny DTUs TcII-VI. Obě dvojice amplifikují mini – exonový gen *Tryp. cruzi* (Fernandes et al., 2001; Gumiel et al., 2015). S reverzním primerem TC2 nedošlo v první PCR reakci k amplifikaci ani u jednoho vzorku (pozitivní kontrola funguje). Z tohoto důvodu nebyly u páru ME/TC2 prováděny další PCR reakce a vzorky byly stanoveny jako negativní.

PCR byla prováděna vždy v objemu 20 µl a byla připravena následujícím způsobem: 10 µl Combi PPP Master Mix (Top-Bio, 2x koncentrovaný); 0,8 µl reverse primeru (10 µM); 0,8 µl forward primeru (10 µM); 7,6 µl vody a 0,8 µl DNA. PCR směs byla následně vložena do přístroje Mastercycler (Eppendorf). Tabulky 1, 2 a 3 shrnují podmínky PCR pro primery zmiňované v předešlém odstavci. U každé PCR byly použity pozitivní i negativní kontroly, vždy pro různé kombinace primerů. Byla aplikována 1 µl pozitivní kontrola, obsahující komerčně dostupnou DNA *Tryp. cruzi* (Amplirun *Trypanosoma cruzi* DNA Control, Vircell) a negativní kontrola představovala buď blank, tj. PCR mix bez templátu (DNA), nebo 1 µl komerčně dostupné DNA *Tryp. rangeli* (Amplirun *Trypanosoma rangeli* DNA Control, Vircell).

Tabulka 1: Podmínky PCR pro primery TCZ1 a TCZ2.

Fáze cyklu	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	94 °C	5 min.
Denaturace	94 °C	20s
Nasedání primerů	60 °C	10 s
Syntéza DNA	72 °C	30 s
Konečná syntéza DNA	72 °C	7 min.
Počet cyklů	34	

Tabulka 2: Podmínky PCR pro primery ME a TC1.

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	34	

Tabulka 3: Podmínky PCR pro primery ME a TC2.

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	34	

Následně byly také otestovány další sety primerů, včetně primerů pro 3 nukleární geny (Tc00, MSH2, DHFR) a jeden pár primerů pro mitochondriální gen (COII-ND1), publikované v recentním článku z roku 2022 (Flores-Lopez et al., 2022). V této diplomové práci byly pomocí PCR ověřeny zmiňované primery u 6 floridských vzorků. Jako v předcházejících případech byla PCR připravena do objemu 20 μ l, za použití stejných látek i objemů. Opět byly aplikovány pozitivní a negativní kontroly. V následujících tabulkách jsou popsány sekvence primerů (Tab. 4), podmínky PCR pro jaderné geny (Tab. 5) a mitochondriální gen (Tab. 6).

Tabulka 4: Přehled testovaných primerů (Flores-Lopez et al., 2022).

Název genu	Primer	Sekvence (5' - 3')	Délka produktu (bp)
Tc00	Tc00_F	TTCTTTCAGGCTGCGATTTT	727
	Tc00_R	CGCTG TTTGGCTCATTCTT	
MSH2	MSH2_F	TNACNGGNCCNAAAYATG	737
	MSH2_R	TYTCNRCCATRAANGT	
DHFR	DHFR_F	CGCTGTTTAAGATCCGNATGCC	1408
	DHFR_R	CGCA TAGTCAATGACCTCCATGTC	
COII – ND1	COII-ND1_F	GCTACTARTTCACTTTTACATTC	1226
	COII-ND1_R	GCATAAATCCATGTAAGACMCCACA	

Tabulka 5: Podmínky PCR pro jaderné geny (Tc00, MSH2, DHFR).

Fáze cyklu	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	94°C	3 min.
Denaturace	94 °C	30 s
Nasedání primerů	55 °C	30 s
Syntéza DNA	72 °C	1 min.
Konečná syntéza DNA	72 °C	10 min.
Počet cyklů	35	

Tabulka 6: Podmínky PCR pro mitochondriální gen (COII-ND1).

Fáze cyklu	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	94 °C	3 min.
Denaturace	94 °C	30 s
Nasedání primerů	55 °C	30 s
Syntéza DNA	72 °C	1,5 min.
Konečná syntéza DNA	72 °C	10 min.
Počet cyklů	35	

3.4 Design nových primerů a jejich testování

Jelikož běžně zavedený screening na určení taxonomických skupin (DTUs) za použití předešlých publikovaných primerů selhává, byly navrženy nové citlivější primery, s cílem postihnout celou diverzitu známých linií *Tryp. cruzi*. Prostřednictvím TriTryp databáze (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/app>) se ve 40 chromozomech *Tryp. cruzi* vyhledávaly orthologní sekvence dle anotovaných transkriptů mezi jejími 14 známými genomy. Nejméně 13 nalezených orthologních sekvencí *Tryp. cruzi* bylo zvětšeno tak, aby mohla být stažena pouze viditelná oblast konkrétního genu. Pomocí příkazu „save track data“ byly sekvence z této databáze exportovány ve formátu GFF3 a následně ve fasta formátu nahrány do programu Geneious (Geneious Prime, 2023.2, <https://www.geneious.com/>). Poté byly alignovány příkazem „multiple align“ pomocí programu Muscle. Z databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) byl alignment doplněn o všechny homologní sekvence *Tryp. cruzi*, *Tryp. rangeli* a *Tryp. cruzi marinkellei*, sloužící jako outgroup. Následně byly tyto sekvence z databáze GenBank (NCBI) společně s alignmentem znovu alignovány pomocí stejného programu (Muscle). Z výsledného alignmentu byl vytvořen fylogenetický strom metodou Maximum Likelihood (ML) za použití PhyML pluginu v programu Geneious. Prvotní fylogeneze byla rekonstruována za účelem ověření dostatečné variability vybraných genů, posuzované na základě struktury výsledného stromu, s klastry odpovídajícími jednotlivým DTUs. Nové primery, založené na konsenzu *Tryp. cruzi*, byly vytvořeny v programu Geneious prostřednictvím příkazu „design new primers“ s defaultními parametry. Primery byly navrženy do těch míst, kde se dostatečně lišily sekvence mezi *Tryp. cruzi* a outgroupem (*Tryp. rangeli* či *Tryp. cruzi marinkellei*), které mohou také běžně triatomy infikovat.

Primery na amplifikaci genu DHFR, převzaté z článku (Flores-Lopez et al., 2022), byly rovněž modifikovány a navrženy s menší specifitou v programu Geneious. Všechny dostupné sekvence *Tryp. cruzi* genu DHFR byly postahovány z databáze GenBank, také z dané publikace (Flores-Lopez et al., 2022) a importovány ve fasta formátu do programu Geneious. Poté byl proveden stejný postup navrhování primerů jako v předchozím odstavci. Po úpravě alignmentu činila výsledná délka produktu 383 bp z původní délky 1408 bp. Přehled nově navržených párů primerů amplifikující produkty o daných velikostech je uveden v Tab. 7. S nově navrženými primery pro geny DHFR, TcYC6_0030660, TcYC6_0032630, TcYC6_0030750, TcYC6_001740, byl testován vzorek z Floridy (FLTS62) pozitivní na obecné a DTU TcI specifické primery. Zároveň byla použita pozitivní kontrola *Tryp. cruzi* a dvě negativní kontroly, z nichž jedna představovala *Tryp. rangeli* a druhá blank, tj. PCR mix bez templátu (DNA). PCR byla provedena týmž způsobem za použití identických chemikálií, jako u předchozích reakcí.

Výsledné 3 funkční páry primerů (17c_59F/17c_674R; 17d_163F/17d_579R; 18c_185F/18c_795R) společně s původními primery (COII – ND1_F/COII – ND1_R) ze studie (Flores-Lopez et al. 2022), byly Janem Zimou, Ph.D. otestovány pomocí PCR s rozšířeným setem vzorků z různých oblastí Spojených států amerických. Dataset obsahoval nejen mnou otestované vzorky z Floridy a Georgie, ale i vybrané izoláty testované v minulých letech z dalších států USA. Na diagnostiku bylo vybráno celkem 46 jedinců pro páry primerů (17d_163F/17d_579R; 17c_59F/17c_674R; 18c_185F/18c_795R; COII – ND1_F/COII – ND1_R). Screening zahrnoval čtyři druhy triatom (*T. sanguisuga*, *T. rubida*, *T. protracta*, *T. gersteackeri*) získané v letech 2019, 2021 a 2022. Konkrétně šlo o 4 mnou testované vzorky z Georgie, 6 z Floridy, 3 z Kalifornie, 25 z Arizony, 7 z Texasu a jeden vzorek z Nového Mexika. Primery byly otestovány metodou PCR stejným způsobem za použití totožných chemikálií a kontrol jako u předchozích reakcí. Pro optimalizaci podmínek PCR novými páry primerů, byly testovány dvě nasedací teploty primerů (50 °C a 55 °C). Reakce se uskutečnila v přístroji Mastercycler (Eppendorf) za shodných podmínek jako u jaderných genů (Tab. 5).

Tabulka 7: Přehled sekvencí primerů.

Název genu	Primer	Sekvence (5' - 3')	Délka produktu (bp)
DHFR	DHFR_14F	GGAATGTGCCCGAGGACAT	383
	DHFR_397R	AATGAACSCACGGCGGGCGA	
TcYC6_0030660	17a_502F	ACGGACCAAATCATGTCGCT	562
	17a_1064R	GTGGGAGGGTACACATCGAC	
TcYC6_0030660	17a_21F	TCACACACAATCTGTCCCGG	1043
	17a_1064R	GTGGGAGGGTACACATCGAC	
TcYC6_0032630	17c_59F	CTTTGCGCCTTTTTGCCTCT	615
	17c_674R	TCTCCATACCGACACCCCAT	
TcYC6_0032630	17c_126F	AGATGCAGAGTGTGGACGTG	548
	17c_674R	TCTCCATACCGACACCCCAT	
TcYC6_0030750	17d_163F	TGCCGGCAAATCACGTCTAT	416
	17d_579R	TTGCATGGAGGGAGCCAATT	
TcYC6_0017400	18c_185F	ATTGCGGCAAATGCGACTTT	610
	18c_795R	AATGTTGGCTCGGACTCCAG	

3.5 Gelová elektroforéza

Úspěšnost polymerázové řetězové reakce byla primárně vyhodnocena pomocí gelové elektroforézy. K rozdělení DNA fragmentů byl použit 1 % agarózový gel z agarózy a TE pufru. Do připraveného gelu bylo napipetováno 2 μ l fluorescenčního barviva GelRed (Biotium). Z důvodu jeho citlivosti na světlo, byl následně gel umístěn do tmy. Vzhledem k použití Combi PPP Master Mix s obsahem barviv a dalších složek během PCR reakce, bylo možné 4 μ l PCR produktu z jednotlivých reakcí aplikovat na gel

přímo. Podle 100 bp Plus DNA Ladderu (Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific) byla stanovena přibližná velikost fragmentů DNA. Výsledné gely byly vizualizovány prostřednictvím UV záření v zařízení UVITEC (Uvitec Cambridge), pomocí programu Alliance. Shoda sekvencí PCR produktů s lokusy *Tryp. cruzi* byla ověřena pro každou dvojici primerů pomocí Sanger sekvenace.

3.6 Sangerovo sekvenování

Před posláním PCR produktů na Sangerovo sekvenování, muselo být nejprve provedeno jejich enzymatické přečištění, z důvodu odstranění zbylých primerů a neinkorporovaných nukleotidů. Ke každému PCR produktu s obsahem 5 µl roztoku byly napipetovány 2 µl směsi exonukleázy a fosfatázy (kit ExoCleanUp FAST, VWR). V přístroji Mastercycler (Eppendorf) proběhlo enzymatické dvoufázové přečištění vzorků pomocí inkubace (37°C, 15 min.) a inaktivace enzymů (80 °C, 15 min.). Každý enzymaticky upravený vzorek se 7 µl roztoku byl přepipetován do nové zkumavky, s následným přidáním 2,5 µl forward primeru. Takto připravené vzorky byly poslány na Sangerovo sekvenování (Sanger sequencing & Fragment analysis | SEQme). Tím byla u všech pozitivních PCR produktů potvrzena pozitivita a následně mohly být použity pro fylogenetickou analýzu.

3.7 Zpracování Sanger sekvencí a fylogenetická analýza

Bioinformatické zpracování dat a následná rekonstrukce fylogenetického stromu byly provedeny v programu Geneious. DNA sekvence byly na základě kvality upraveny (odstraněny inzerty a nehomologní úseky) a alignovány prostřednictvím příkazu „multiple align“ programem Muscle. Do alignmentu, použitého k identifikaci fylogenetických vztahů, byl přidán dataset našich připravených sekvencí, společně se sekvencemi z databáze GenBank. Do výsledného alignmentu byly z celkového množství pozitivních sekvencí vybrány pouze ty sekvence, které se dobře alignovaly s výsledným alignmentem.

Fylogenetický strom byl zkonstruován metodou Maximum Likelihood (ML) za použití PhyML pluginu programu Geneious. Podpory jednotlivých uzlů byly vypočítány na základě bootstrap analýzy ze 100 replikátů. Fylogenetická analýza na serveru ATGC (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) umožňuje „Smart Model Selection“ (SMS), tedy automaticky vybrat nejlepší model evoluce pro daná data (model evoluce K80 +G pro alignment TcYC6_0032630, model K80 pro alignmenty TcYC6_0030750,

TcYC6_0017400 a model TN93 +G pro alignment COII – ND1). Výsledná grafická podoba fylogenetických stromů byla upravena v programu Adobe Illustrator verze 28.0 (2023, Adobe Systems, www.adobe.com/products/illustrator). Byly vytvořeny čtyři fylogenetické stromy, pro každý vybraný gen jeden (TcYC6_0030750, TcYC6_0032630, TcYC6_0017400 COII – ND1). Na první fylogenetickou analýzu pro marker TcYC6_0030750 bylo využito celkem 54 sekvencí, obsahujících 42 našich vybraných sekvencí a 12 referenčních z GenBank. Druhá fylogenetická analýza markeru TcYC6_0032630 zahrnovala dohromady 51 sekvencí, z nichž bylo 17 referenčních z GenBank a 34 námi vybraných. Třetí fylogeneze byla provedena u markeru TcYC6_0017400. Výsledný dataset 47 sekvencí obsahoval 16 sekvencí různých druhů trypanosom z databáze GenBank a našich 31 testovaných sekvencí. Poslední analýza, provedená přes marker COII – ND1, obsahovala celkem 102 sekvencí, z nichž 26 bylo námi testovaných, zbytek byl převzat z databáze GenBank a ze zmiňované publikace (Flores-Lopez et al., 2022). Jako outgroupy pro *Tryp. cruzi* datasety byly použity sekvence *Tryp. rangeli*, *Tryp. cruzi marinkelli* nebo oba druhy najednou. Přehled sekvencí použitých pro analýzy je uveden v Tab. P1 a v Tab. P2 v sekci Přílohy.

4 Výsledky

4.1 Diagnostika *Trypanosoma cruzi* ve vzorcích *Triatoma sanguisuga* z Georgie a Floridy

4.1.1 Diagnostika *Trypanosoma cruzi* ve vzorcích *Triatoma sanguisuga* z Floridy

Na základě využití obecných primerů (TCZ1/TCZ2) bylo z celkového množství 93 vzorků *Triatoma sanguisuga*, pocházejících z Floridy, zaznamenáno 58 pozitivních (62 %) a 34 negativních jedinců (37 %) na parazita *Trypanosoma cruzi*. Determinovat infekční status nebylo možné pouze u jednoho vzorku (1 %) z celkového počtu. Důvodem byla nedostatečně zřetelná viditelnost bandu na gelu u obecných primerů, a tak vzorek nemohl být s jistotou označen jako pozitivní či negativní.

Pomocí specifických primerů (ME/TC1, ME/TC2) byly jedinci rozděleni do jednotlivých taxonomických skupin (DTUs). 27 jedinců (29 %) bylo shledáno pozitivními jak na obecné (TCZ1/TCZ2), tak na specifické primery (ME/TC1), proto je bylo možné zařadit do skupiny DTU TcI. Dále bylo detekováno 31 pozitivních vzorků (tj. 33%) na obecné primery (TCZ1/TCZ2) a zároveň negativních na specifické (ME/TC1, ME/TC2). Tyto vzorky byly sice pozitivní na *Tryp. cruzi*, ale nebylo možné stanovit jejich taxonomickou skupinu. Bohužel, ani sekvenace pomocí Sangerovy metody nepotvrdila specifický produkt *Tryp. cruzi*, a tudíž nebylo možné tyto vzorky zařadit do skupiny DTUs TcII – VI.

V první PCR reakci s reverzním primerem TC2 nedošlo k amplifikaci ani jednoho vzorku, přestože pozitivní kontrola fungovala. To vedlo k tomu, že s párem ME/TC2 nemohla být provedena další PCR reakce, a tudíž ostatní vzorky byly stanoveny jako negativní. Přehled výsledků je uveden v Tab. 8.

4.1.2 Diagnostika *Trypanosoma cruzi* ve vzorcích *Triatoma sanguisuga* z Georgie

Použitím obecných primerů (TZC1/TCZ2) byla zjištěna přítomnost *Tryp. cruzi* v 11 vzorcích druhu *T. sanguisuga* z Georgie. Celkem 10 vzorků (90,91 %) vyšlo z polymerázové řetězové reakce pozitivních a 1 jedinec (9,09 %) negativní na *Tryp. cruzi*. Výsledek PCR u všech

těchto vzorků, při použití specifických primerů ME/TC1 a ME/TC2, byl negativní. Pro kontrolu byl produkt TCZ1/TCZ2 osekvenován Sangerovou metodou. Výsledná sekvenace vykazovala 95,86 % podobnosti k sekvenci EU178923.1 v databázi GenBank, na základě čehož bylo vyvozeno, že se v dané databázi nenachází naše sekvence. Výsledky shrnuje Tab. 8.

Tabulka 8: Přehled vzorků pozitivních, negativních a neidentifikovatelných na dané primery, stanovujících přítomnost parazita *Trypanosoma cruzi* a specifikujiících danou DTU.

Stát	Celkový počet vzorků	počet vzorků	TCZ1/TCZ2 primery	ME/TC1 primery	ME/TC2 primery	<i>Tryp. cruzi</i> status	DTU TcI/NI/N
Florida	93	27 (29 %)	P	P	N	P	DTU TcI
		31 (33 %)	P	N	N	P	NI
		34 (37 %)	N	N	N	N	N
		1 (1 %)	NI	NI	NI	NI	NI
Georgie	11	10 (90,91 %)	P	N	N	P	NI
		1 (9,09 %)	N	N	N	N	N

Vysvětlivky: pozitivní (P), negativní (N), nelze identifikovat (NI)

S použitím těchto publikovaných primerů nebyl dosažen požadovaný cíl, který zahrnoval zařazení všech infekcí *Tryp. cruzi* do jednotlivých taxonomických skupin DTUs. Bylo pouze identifikováno 58 *Tryp. cruzi* pozitivních triatom (62 %) z Floridy, z nichž 27 (29 %) bylo možné zařadit do DTU TcI. Je však velmi zvláštní, že u 31 *Tryp. cruzi* pozitivních jedinců (33 %) z Floridy a u 10 *Tryp. cruzi* pozitivních jedinců (90,91 %) z Georgie nebyla identifikována determinální taxonomická skupina (DTU). Na základě zjištěných výsledků lze soudit, že zavedený screening pro stanovení DTU při použití výše uváděných primerů, bohužel selhává. Z tohoto důvodu byly vyzkoušeny další sety primerů, publikované v nedávné studii (Flores-Lopez et al., 2022).

4.2 Testování primerů

4.2.1 Testování čtyř setů primerů pro tři nukleární a jeden mitochondriální gen

Pomocí čtyř setů primerů, převzatých ze studie Flores-Lopez et al., 2022, byly získány dva produkty genu COII – ND a jeden produkt genů TC00, DHFR. U genu MSH2 nedošlo k amplifikaci ani u jednoho vzorku. Celkově byly získány pouze dva vzorky (FLTS 61, FLTS 62) z počtu 6 vybraných (FLTS 61, 62, 68, 69, 66, 67) (Tab. 9), a proto byly jenom dva geny (COII – ND1, DHFR) využity k následující analýze. Vzhledem k těmto nevyhovujícím výsledkům nebyly další vzorky z Georgie podrobeny testování.

Tabulka 9: Přehled *Trypanosoma cruzi* pozitivních a negativních vzorků, testovaných čtyřmi páry primerů pro jeden mitochondriální (COII – ND1) a 3 nukleární (DHFR, Tc00, MSH2) geny.

Vzorek	COII – ND1 gen	DHFR gen	TC00 gen	MSH2 gen
FLTS61	P	P	P	N
FLTS62	P	N	N	N
FLTS68	N	N	N	N
FLTS69	N	N	N	N
FLTS66	N	N	N	N
FLTS67	N	N	N	N
Počet <i>Tryp. cruzi</i> pozitivních vzorků	2	1	1	0
Status testovaných vzorků	6	6	6	6

Vysvětlivky: P = pozitivní, N = negativní

4.2.2 Testování nových párů primerů

Nově zavedeným screeningem z roku 2022, za použití čtyř párů primerů (Tab. 4), nebyly však získány potřebné výsledky k odhalení genetické diverzity *Tryp. cruzi* v infikovaných jedincích druhu *T. sanguisuga* na Floridě a v Georgii (Flores-Lopez et al., 2022). Výsledkem PCR reakce na 10 vzorcích z Georgie, s využitím upraveného primeru DHFR, však nebyl získán ani jeden pozitivní produkt. Následným screeningem mnou navrženými sedmi páry primerů (Tab. 7) byla u šesti z nich ověřena 100 % pozitivita na daný vzorek (FLTS62, pozitivní na obecné i na specifické primery) z Floridy, 100 % pozitivita na pozitivní kontrolu *Tryp. cruzi* a 100 % negativita na dvě negativní kontroly, z nichž jedna zahrnovala *Tryp. rangeli*. S použitím primeru (17a_21F, 17a_1064R) nebyla amplifikována cílová sekvence pro gen TcYC6_0030660. Tím bylo potvrzeno, že šest párů primerů z celkového počtu sedmi dvojic, dobře fungují a mohou být použity k další analýze. Produkty amplifikované šesti páry primerů poskytly sekvence o délkách 383 bp (DHFR_14F, DHFR_397R), 562 bp (17a_502F, 17a_1064R), 615 bp (17c_59F, 17c_674R), 548 bp (17c_126F, 17c_674R), 416 bp (17d_163F, 17d_579R), 610 bp (18c_185F, 18c_795R).

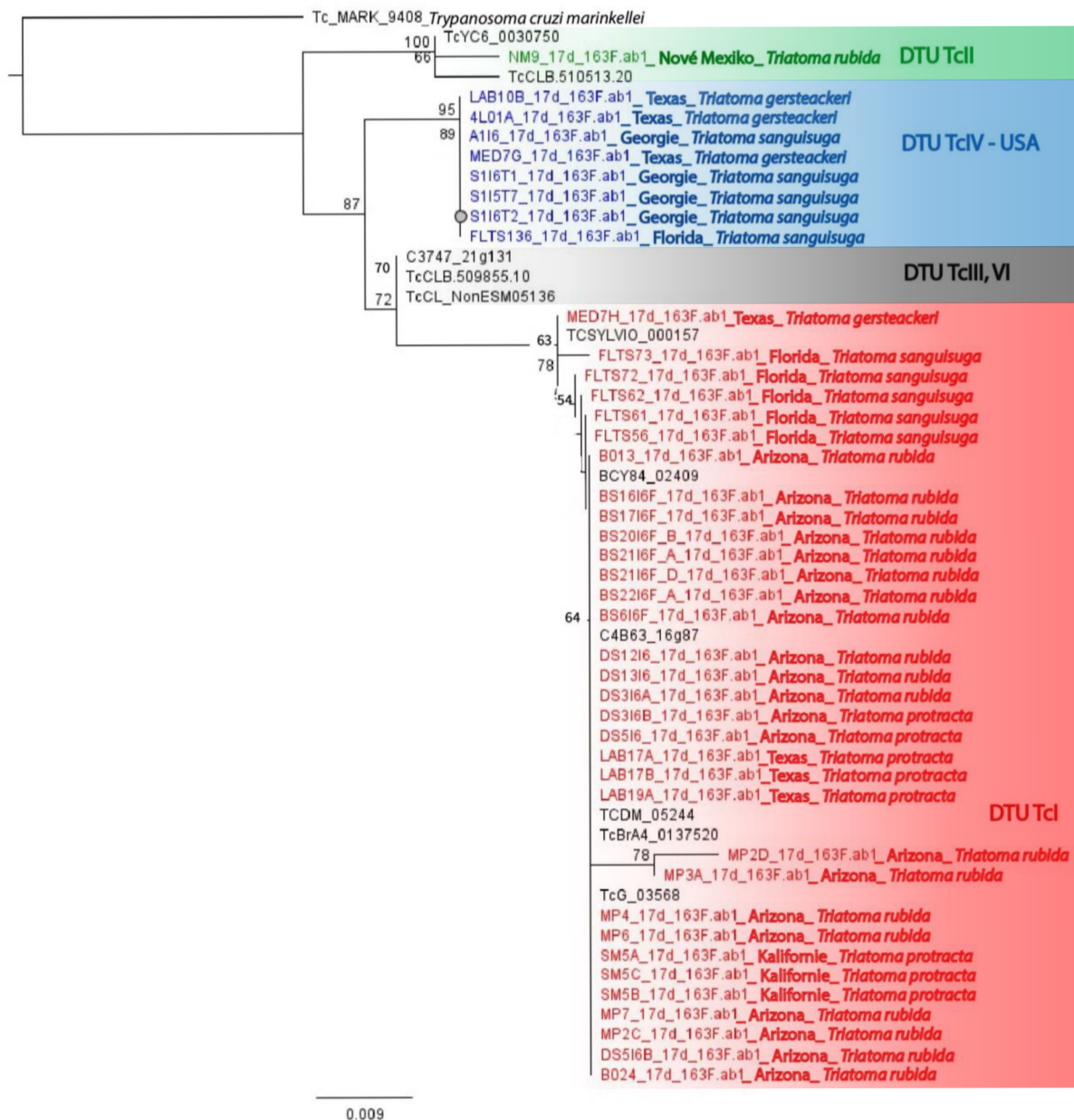
Po fázi testování, byly na základě úspěšnosti PCR a obsahu fylogenetické informace pro rozlišení jednotlivých DTUs, použity 3 nově navržené páry jaderných primerů (17c_59F, 17c_674R; 17d_163F, 17d_579R; 18c_185F, 18c_795R) z celkového množství 6 setů. Během primární PCR reakce byly ještě odhaleny pozitivní výsledky u mitochondriálního genu COII – ND1, čímž se stal, společně se třemi jadernými primery, vhodným pro následující analýzu. Tyto čtyři páry primerů byly otestovány s vybraným širším setem pozitivních vzorků (celkem 46) z různých států USA, osekvenovány pomocí Sangerovy metody. Tím bylo získáno 44 produktů genu TcYC6_0030750, 35 produktů genu TcYC6_0032630, 34 produktů genu TcYC6_0017400 a 27 produktů genu COII – ND1 (Tab. P1 v sekci Přílohy).

4.3 Fylogenetická analýza

Za účelem odhalení genetické diverzity parazita *Trypanosoma cruzi*, přenášeného triatomami na jihu Spojených států amerických, byly analyzovány čtyři datasey obsahující souhrnně 133 nově získaných sekvencí z celkového počtu 140 sekvenovaných produktů (Tab. P1 v sekci Přílohy).

4.3.1 Fylogenetická analýza datasetu TcYC6_0030750

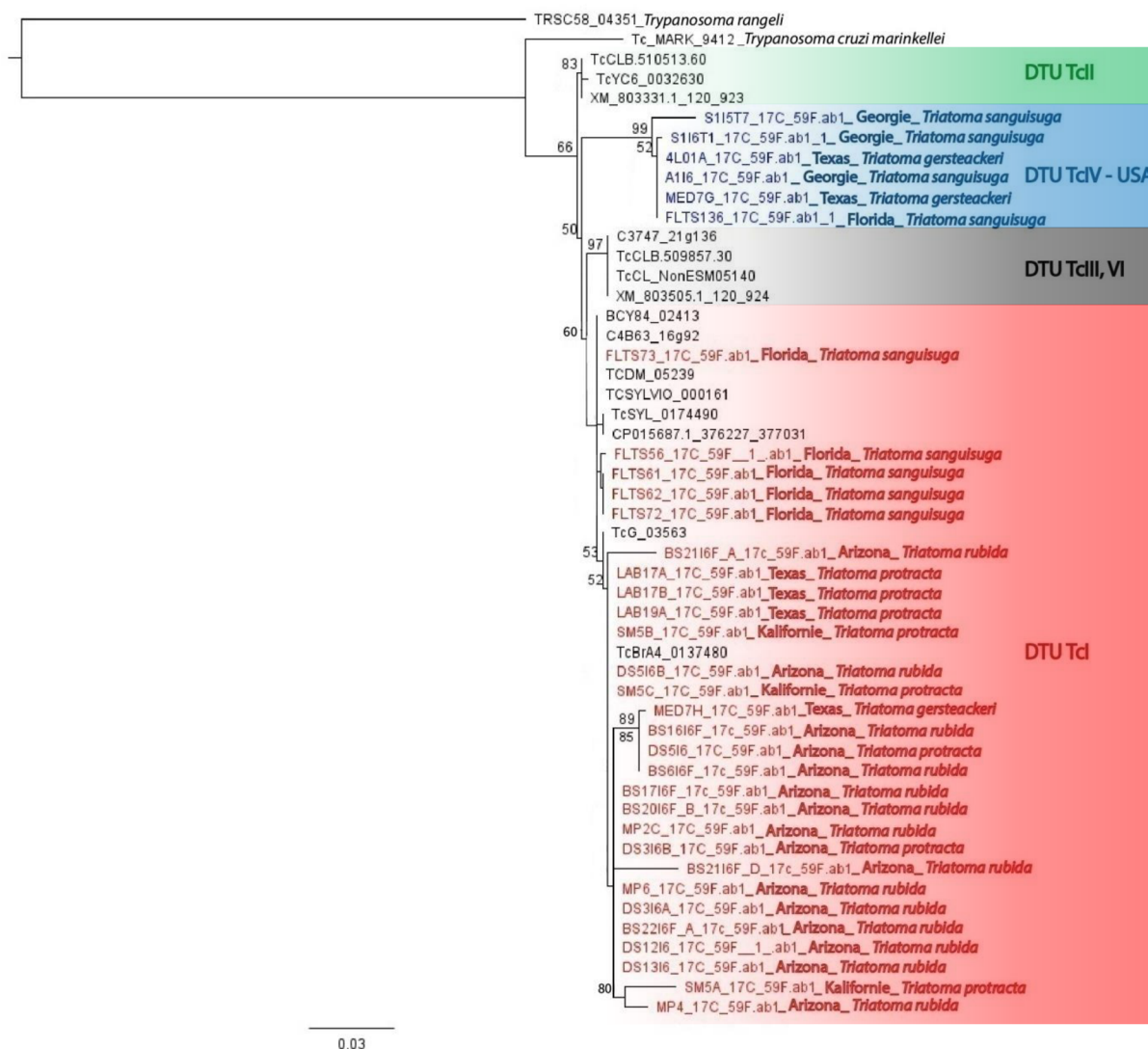
Fylogenetická analýza alignmentu pro gen TcYC6_0030750, s celkovým počtem 54 sekvencí o délce 416 bp, odhalila 3 taxonomické skupiny DTUs (DTUTcI, DTUTcII, DTU TcIV – USA). Fylogenetický strom obsahuje 42 barevně označených sekvencí z celkově 44 sekvenovaných produktů (Obr. 3). Nejpočetnější skupinu (červená) představuje DTU TcI. Do této skupiny spadá 33 námi získaných sekvencí *Tryp. cruzi*. Co se týče druhové příslušnosti a geografického původu vektorů, 3 triatomy z Texasu byli druhu *T. protracta* a jeden *T. gersteackeri*, 19 jedinců z Arizony druhu *T. rubida* a dva *T. protracta*, 3 izoláty *T. protracta* z Kalifornie a 5 mnou testovaných jedinců druhu *T. sanguisuga* z Floridy. Oproti této největší skupině je ve fylogenetickém stromu nejméně zastoupená skupina DTU TcII, která obsahuje pouze jednu sekvenci, získanou z izolátu *T. rubida* v Novém Mexiku (NM9_17D_163F. ab1). Ostatní markery (TcYC6_0017400, TcYC6_0032630, COII - ND1) se však nepodařilo z tohoto konkrétního vzorku (NM9_17D) získat. Další fylogenetickou větev tvoří celkem 8 sekvencí *Tryp. cruzi*, získaných z jedinců druhu *T. gersteackeri* z Texasu (3 sekvence), dále druhu *T. sanguisuga* z Georgie (4 sekvence) a jedna sekvence z *T. sanguisuga* z Floridy. Tito jedinci se klastrují do skupiny DTU TcIV – USA. Vzhledem k vysoké amplifikační účinnosti primerů pro gen TcYC6_0030750 a jejich schopnosti amplifikovat nejméně 3 taxonomické skupiny DTUs (DTUTcI, DTUTcII, DTU TcIV – USA), je tento molekulární marker nejlepším kandidátem pro analýzu diversity *Tryp. cruzi* u severoamerických druhů triatom.



Obrázek 3: Fylogenetické vztahy linií *Trypanosoma cruzi* založené na výsledcích Maximum Likelihood analýzy matice TcYC6_0030750. Číselné hodnoty představují bootstrap podporu (znázorněny jsou pouze hodnoty vyšší než 50). Nově získané sekvence jsou barevně odlišeny dle jejich příslušnosti k jednotlivým DTUs (na základě klastrování s referenčními sekvencemi převzatými z databáze GenBank). *Tryp. cruzi marinkellei* byla použita jako outgroup.

4.3.2 Fylogenetická analýza datasetu TcYC6_0032630

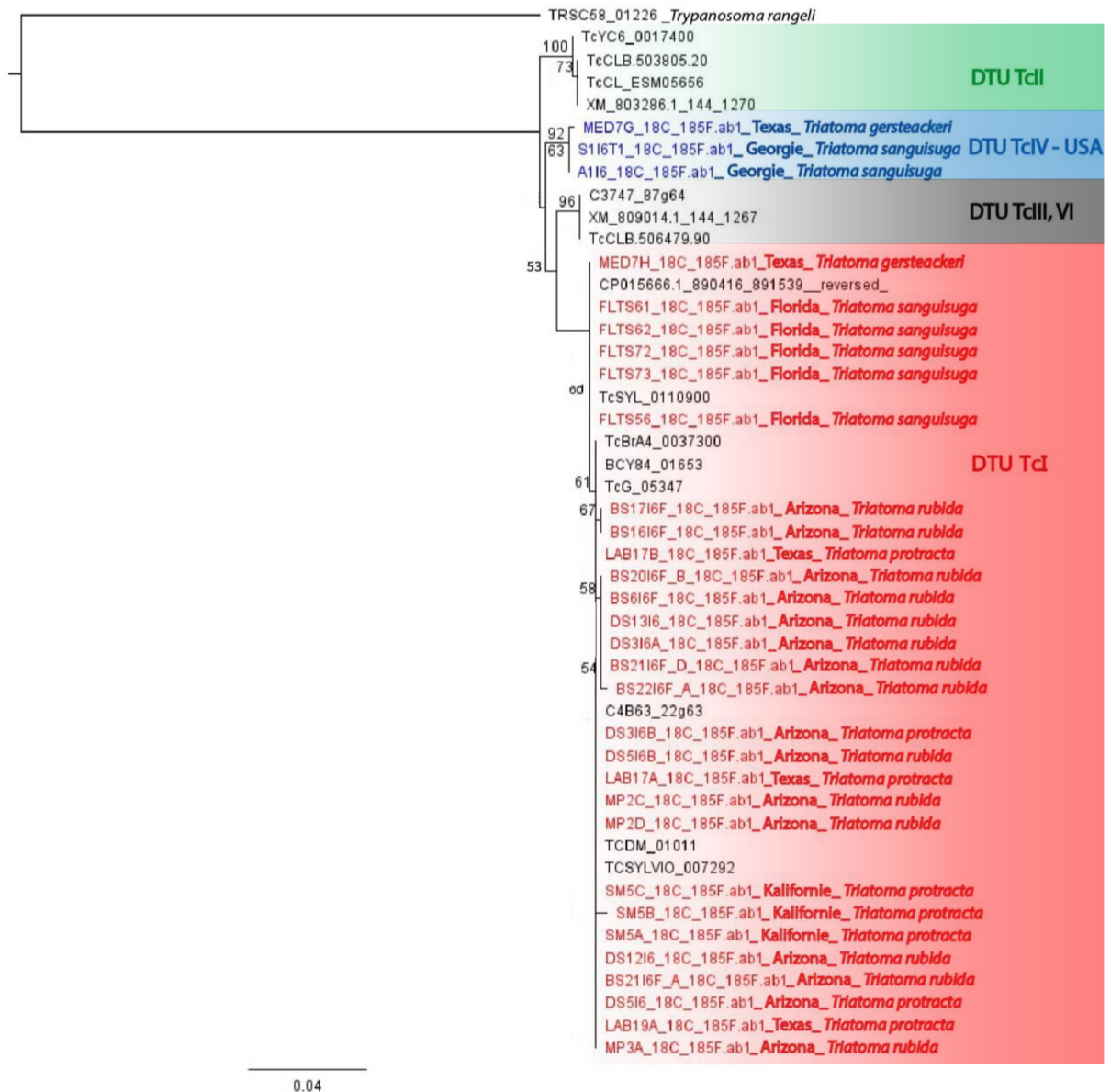
Druhá fylogenetická analýza alignmentu genu TcYC6_0032630, s 51 sekvencemi o délce 615 bp, obsahuje 34 nově získaných sekvencí (Obr. 4). Většina sekvencí, podobně jako v případě datasetu TcYC6_0030750 (Obr. 3), představuje DTU TcI. Do této skupiny bylo klastrováno 28 sekvencí *Tryp. cruzi*, z nichž 16 bylo získáno z jedinců druhu *T. protracta* (n = 2) a *T. rubida* (n = 14) pocházejících z Arizony. Skupina DTU TcIV – USA je reprezentována celkem 6 sekvencemi *Tryp. cruzi*. Z hlediska druhové příslušnosti hostitelských ploštic, byli dva jedinci druhu *T. gersteackeri* z Texasu, 3 druhu *T. sanguisuga* z Georgie a jeden jedinec druhu *T. sanguisuga* opět z Floridy. Na rozdíl od předcházejícího stromu (dataset TcYC6_0030750) (Obr. 3) není ve skupině DTU TcII obsažena žádná sekvence získaná z našich izolátů. Tato fylogenetická větev představuje pouze referenční sekvence z databáze GenBank.



Obrázek 4: Fylogenetické vztahy linií *Trypanosoma cruzi* založené na výsledcích Maximum Likelihood analýzy matice TcYC6_0032630. Číselné hodnoty představují bootstrap podporu (znázorněny jsou pouze hodnoty vyšší než 50). Nově získané sekvence jsou barevně odlišeny dle jejich příslušnosti k jednotlivým DTUs (na základě klastrování s referenčními sekvencemi převzatými z databáze GenBank). *Tryp. cruzi marinkellei* a *Tryp. rangeli* byly použity jako outgroup.

4.3.3 Fylogenetická analýza datasetu TcYC6_0017400

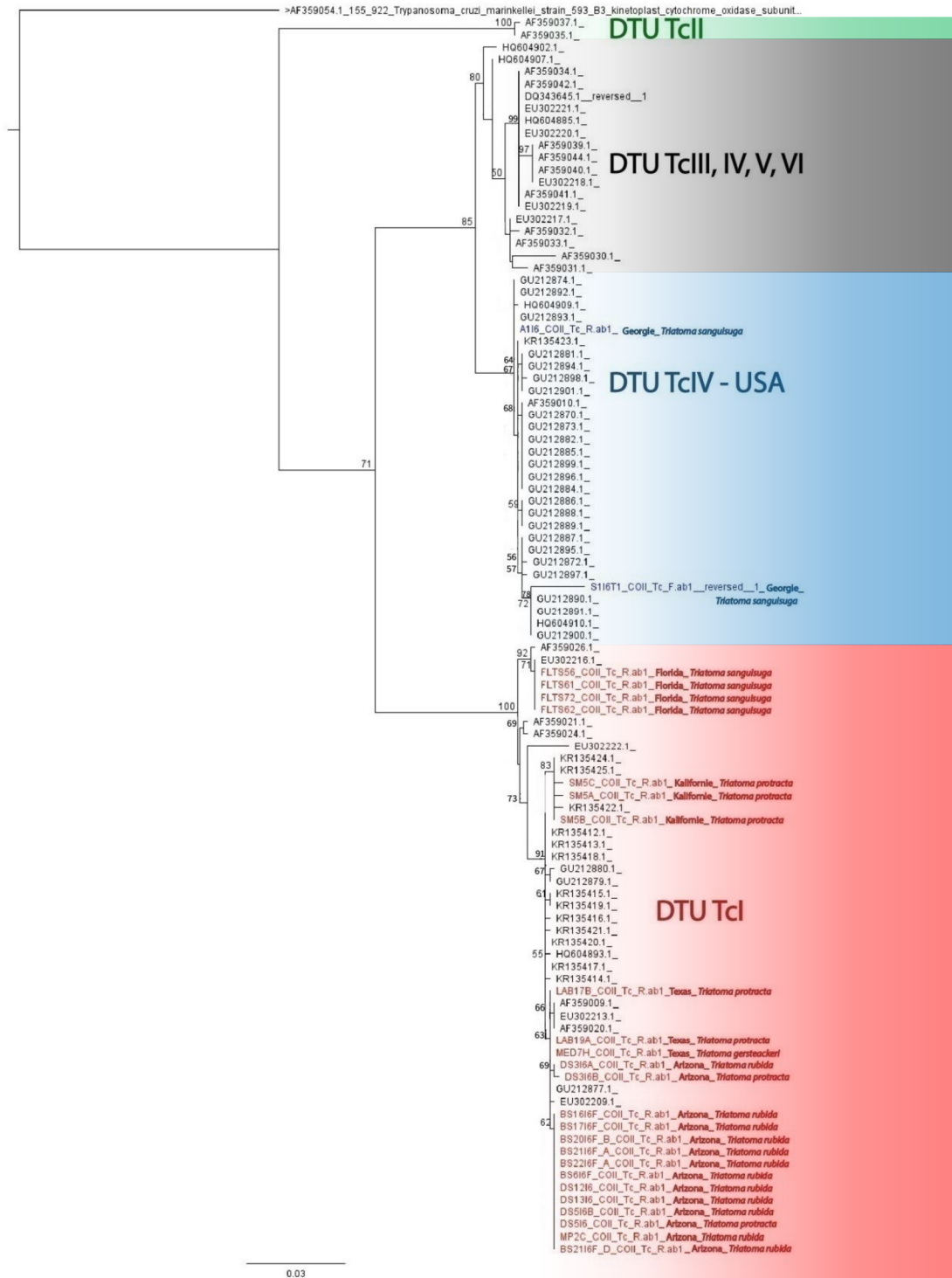
Třetí fylogeneze, založená na alignemntu genu TcYC6_0017400 o délce 610 bp, obsahuje 47 sekvencí (Obr. 5). Z celkového množství 34 osekvenovaných produktů bylo 31 použito k analýze. Výsledný fylogenetický strom znázorňuje podobný profil, jako u předchozí analýzy genu TcYC6_0032630 (Obr. 4). Výsledný klastr DTU TcI představuje shodný počet našich sekvencí, získaných ze stejných druhů ve státech USA, jako u předešlého markeru. Skupina DTU TcIV – USA je oproti výše prezentovaným fylogenezím zastoupena pouze 3 sekvencemi *Tryp. cruzi*.



Obrázek 5: Fylogenetické vztahy linií *Trypanosoma cruzi* založené na výsledcích Maximum Likelihood analýzy matice TcYC6_0017400. Číselné hodnoty představují bootstrap podporu (znázorněny jsou pouze hodnoty vyšší než 50). Nově získané sekvence jsou barevně odlišeny dle jejich příslušnosti k jednotlivým DTUs (na základě klastrování s referenčními sekvencemi převzatými z databáze GenBank). *Tryp. rangeli* byla použita jako outgroup.

4.3.4 Fylogenetická analýza datasetu COII – ND1

Poslední fylogenetická analýza alignmentu genu COII – ND1 o délce 1226 bp, s celkovým množstvím 102 sekvencí, shodně odhalila dvě taxonomické skupiny DTU TcI a DTU TcIV – USA (Obr. 6). Z 26 nově získaných sekvencí *Tryp. cruzi* klastruje 24 do skupiny DTU TcI. Fylogenetická větev představující klastr DTU TcIV – USA obsahuje pouze dvě sekvence získané z druhu *T. sanguisuga* z Georgie. Podobně jako u fylogenezí pro geny TcYC6_0017400 a TcYC6_0032630 není ve skupině DTU TcII ani jedna z našich sekvencí.



Obrázek 6: Fylogenetické vztahy linií *Trypanosoma cruzi* založené na výsledcích Maximum Likelihood analýzy matice COII – ND1. Číselné hodnoty představují bootstrap podporu (znázorněny jsou pouze hodnoty vyšší než 50). Nově získané sekvence jsou barevně odlišeny dle jejich příslušnosti k jednotlivým DTUs (na základě klastrování s referenčními sekvencemi převzatými z databáze GenBank a z publikace od Flores-López et al., 2022). *Tryp. cruzi marinkellei* byla použita jako outgroup.

5 Diskuze

V Latinské Americe byla prevalence a genetická diverzita *Trypanosoma cruzi* dobře zdokumentována, na rozdíl od Spojených států amerických (Gumiel et al., 2015; Shender et al., 2016). Přestože se již několik studií v posledních letech na tuto problematiku v USA soustředilo, jejich úzké zaměření na malou geografickou oblast (městská aglomerace, případně jednotlivé státy USA) a počty analyzovaných jedinců, nepřinesly doposud robustnější poznatky (Pronovost et al., 2020; Flores-López et al., 2022; Barnabé et al., 2023). Různé linie *Tryp. cruzi* jsou přenášeny odlišnými druhy triatom, včetně severoamerických druhů z rodu *Triatoma* (Zeledón et al., 2012), kterým se věnuje tato diplomová práce. Jedním z cílů práce je zjistit prevalenci a genetickou diverzitu linií *Tryp. cruzi* u druhu *T. sanguisuga*, zejména v Georgii a na Floridě, kde doposud nebyla vektorům *Tryp. cruzi* věnována téměř žádná pozornost. Nejstarší záznamy o přítomnosti *Tryp. cruzi* na Floridě pochází z roku 1988, kdy byla v Gainesvillu u jediného dospělého druhu *T. sanguisuga* detekována přirozená infekce (Beard et al., 1988). Později byla prokázána přítomnost *Tryp. cruzi* u 3 z 5 analyzovaných jedinců druhu *T. sanguisuga*, pocházejících z jihovýchodní Georgie (Pung et al., 1995).

Za účelem zmapování diverzity *Tryp. cruzi* v různých vektorech napříč jižními státy USA, byly do této práce zařazeny další druhy triatom. Detekce přítomnosti *Tryp. cruzi* a spolehlivá diagnostika jednotlivých DTUs, kterou jsem v dané práci navrhla a optimalizovala, je klíčová pro pochopení dynamiky přenosu tohoto parazita z vektora na různé hostitele, včetně rizika lidské infekce a případné progresse Chagasovy choroby (Pronovost et al., 2020).

5.1 Diagnostika *Trypanosoma cruzi* u *Triatoma sanguisuga* v Georgii a na Floridě

V různých státech USA byla základní diagnostikou identifikována prevalence *Trypanosoma cruzi* pomocí publikovaných primerů (TCZ1/TCZ2), založených na mini – exonu (Virreira et al., 2003; Piron et al., 2007; Reisenman et al., 2010; Eloy & Lucheis, 2012). V rámci tohoto přístupu byla odhalena přítomnost *Tryp. cruzi* u 68 ze 104 nasbíraných jedinců z druhu *T. sanguisuga* (65,34 %) ve státech Georgie a Florida. Infekční status jednoho vzorku se však nepodařilo určit. Důvodem mohla být buď špatně vyizolovaná templátová DNA, nebo přítomností inhibitorů negativně ovlivněná PCR reakce.

U 93 jedinců druhu *T. sanguisuga* z Floridy byla prokázána 62 % (n = 58) prevalence *Tryp. cruzi*. Vysoká míra infekce *Tryp. cruzi* v analyzovaných vektorech odpovídá recentně publikovaným datům pro prevalenci v rezervoárových hostitelích, odchycených v různých floridských lokalitách. Ze 112 vačic bylo 50,9 % infikovaných *Tryp. cruzi* a ze 135 mývalů bylo nakaženo 42,2 % (Torhorst et al., 2023). Moje výsledky jsou srovnatelné i s mírou prevalence *Tryp. cruzi* u druhu *T. sanguisuga* z jiných států USA. V jihovýchodní Louisianě (Leconte) byla detekována 60,4 % (n = 180) prevalence *Tryp. cruzi* u celkového počtu 298 jedinců *T. sanguisuga* (Cesa et al., 2011). V roce 2014 byla v tomto státě u 49 triatom stejného druhu identifikována 55 % (n = 27) míra infekce *Tryp. cruzi* a u 40% z těchto triatom představovala potenciální riziko lidské infekce (Waleckx et al., 2014). U rezervoárových hostitelů, konkrétně různých druhů hlodavců z aglomerace New Orleans v Louisianě, byla detekována nejvyšší prevalence *Tryp. cruzi*, a to 76 % (n = 45) z celkového počtu 59 jedinců (Herrera et al., 2015).

Na území Texasu byl proveden dosud nejrozsáhlejší screening vektorů *Tryp. cruzi*, zahrnující 1510 jedinců 6 druhů triatom (*T. gestaeckeri*, *T. lecticularia*, *T. sanguisuga*, *T. indictiva*, *T. rubida* a *T. protracta*) (Curtis-Robles et al., 2018). Celková prevalence *Tryp. cruzi* dosáhla 54,4 %. Podle této studie byla z 315 zkoumaných jedinců *T. sanguisuga* zjištěna 47,6 % míra infekce tímto parazitem (Curtis-Robles et al., 2018). Mnou získané hodnoty z Floridy pro stejný druh vektoru byly 62 %, z čehož plyne, že prevalence *Tryp. cruzi* na území Texasu byla nižší (Curtis-Robles et al., 2018).

S ohledem na počty vzorků pocházejících z Floridy mají hodnoty prevalence *Tryp. cruzi* vysokou výpovědní hodnotu. Jelikož screenované triatomy (n = 93) pochází z přímé blízkosti lidských sídel, mnou zjištěné vysoké hodnoty prevalence *Tryp. cruzi* (62 %) poukazují na reálnou možnost vzniku autochtonních lidských nákaz v okolí Gainesville na Floridě. Naopak na ostrově Sapello (Georgie) byl nasbírán jen extrémně malý počet vzorků (n = 11), který navíc pocházel z jediného místa (kurníku na soukromém pozemku). Prevalence *Tryp. cruzi*, a to konkrétně 90,91 % (n = 10), z celkového množství 11 jedinců druhu *T. sanguisuga*, pouze upozorňuje na lokální zdroj infekce, tj. nakaženou drůbež.

5.2 Screening genetické diverzity linií *Trypanosoma cruzi*

Díky vysoké plasticitě genomu *Trypanosoma cruzi*, projevující se zejména jeho velikostí a výměnou genetické informace mezi liniemi, jsou jednotlivé DTUs genotypově a fenotypově odlišné (Zingales et al., 2018; Barnabé et al., 2023). Na základě této skutečnosti, byly linie *Tryp. cruzi* rozděleny do šesti DTUs TcI – TcVI (Zingales et al., 2012; Gumiel et al., 2015) a nové sedmé skupiny TcBat (Pinto et al., 2015). Pro diagnostiku jednotlivých DTUs, jsem ve své diplomové práci, podobně jako jiné studie (Herrera et al., 2015; Garcia et al., 2017; Torhorst et al., 2023), využila primery navržené Fernandes a kolegy v roce 2001. Tímto zavedeným screeningem byla odhalena pouze skupina TcI u 27 pozitivních jedinců na Floridě (29 %). Nízké procento rozlišených DTUs je i výsledkem screeningu rezervoárových hostitelů z několika floridských lokalit (Torhorst et al., 2023). Infekce *Tryp. cruzi*, zachycené v této studii u mývalů, byli autoři schopni zařadit do jednotlivých DTUs pouze u 8 % vzorků (Torhorst et al., 2023). Důvodem pro vysoké procento nerozlišených DTUs byly pravděpodobně mutace v nasedacích místech pro shodně použité primery. Nejen má práce, ale i nejnovější publikace (Barnabé et al., 2023; Torhorst et al., 2023) na toto téma naznačují, že markery ME/TC1 a ME/TC2 nejsou vhodné a dostatečně citlivé pro stanovení všech DTUs (Fernandes et al., 2001). I když tyto primery představují určité omezení, stále slouží pro základní diagnostiku *Tryp. cruzi* (tj. zjištění positivity *Tryp. cruzi*), kterou je ale nutné doplnit dalšími markery poskytujícími dostatečnou fylogenetickou informaci.

Informace o potenciálně citlivějších mitochondriálních a nukleárních markerech byly publikovány v recentní studii od Flores-López et al., z roku 2022, zaměřující se na *Tryp. cruzi*, přenášenou triatomy v jižní Arizoně a Texasu. Amplifikací 55 pozitivních vzorků bylo získáno 48 sekvencí pro nukleární markery (TC00, DHFR, MSH2) a 50 sekvencí pro mitochondriální marker (COII – ND1) (Flores-Lopéz et al. 2022). Úspěšnost amplifikace, zjištěná v této studii, je v rozporu s mými výsledky. V mém případě byly získány pouze 2 pozitivní produkty mitochondriálního genu (COII-ND1) a jeden produkt jaderných genů (TC00, DHFR) z celkového počtu 6 vybraných *Tryp. cruzi* pozitivních DNA izolátů. Z důvodu nízké citlivosti těchto markerů (TC00, MSH2) pro naše vzorky, byly na další analýzu využity geny COII – ND1 a DHFR, sloužící jako markery, u kterých byly zjištěny dobré výsledky z PCR a také dostatečná fylogenetická informativnost. S cílem získat dostatečně citlivé a informativní markery jsem optimalizovala amplifikaci celkem třech jaderných marekrů (geny TcYC6_0030750, TcYC6_0032630,

TcYC6_0017400). Primery byly založeny na konsenzu všech dostupných genomů *Tryp. cruzi* tak, aby neamplifikovaly jiné druhy trypanosom, zejména *Tryp. rangeli*, která se u triatom může vyskytovat. U těchto nově navržených markerů byla, společně s jedním převzatým mitochondriálním markerem ze studie od Flores-López et al., 2022, zjišťována citlivost u celkového počtu 46 izolátů. Nejcitlivějším markerem s 44 pozitivními izoláty (95,65 %) se stal nukleární gen (TcYC6_0030750), zatímco nejnižší citlivost byla odhalena u mitochondriálního genu (COII – ND1), u kterého bylo získáno pouze 27 produktů (58,7 %). V porovnání s mými výsledky, byla senzitivita zjištěná z publikace od Flores-López et al., 2022 vyšší u mitochondriálního markeru (50 sekvencí) než u nukleárních markerů (48 sekvencí).

Na základě fylogenetických analýz čtyř finálních markerů (viz. kapitola Výsledky), byla v rámci našeho setu vzorků nejpočetněji zastoupenou skupinou *Tryp. cruzi* DTU TcI, vyskytující se u čtyř druhů vektorů (*T. protracta*, *T. gerstaeckeri*, *T. rubida*, *T. sanguisuga*) s rozsáhlou geografickou distribucí ve státech USA (Florida, Georgie, Texas, Arizona, Kalifornie, Nové Mexiko). DTU TcI je nejběžnější skupinou nejen v Latinské Americe, ale i v USA (Bern et al., 2011; Herrera et al., 2013; Curtis-Robles et al., 2018). Druhou méně početnou skupinou je monofyletická skupina TcIV – USA, vyskytující se pouze v oblastech Spojených států amerických (Flores-López et al., 2022). Publikace z roku 2022 objasnila, že DTU TcIV – USA se liší nejen od jihoamerické TcIV, ale i od dříve definovaných DTUs. Tento výzkum současně objevil obě skupiny DTUs TcI a TcIV – USA, z nichž TcI byla popsána u 75 % infikovaných triatom a TcIV – USA u 25 %. Pro tento účel byly využity čtyři druhy triatom (*T. gerstaeckeri*, *T. lecticularia*, *T. indictiva*, *T. sanguisuga*) z Texasu a jeden druh (*T. recurva*) z Arizony (Flores-López et al., 2022). Podobný profil byl zaznamenán i v mých výsledcích, zejména u markeru TcYC6_0030750, v celkovém množství 42 sekvencí. Fylogenetickou analýzou byla prokázána nejběžnější linie TcI (79 %) a druhá rozšířená linie TcIV – USA (19 %). Tyto hodnoty korelují s výsledky publikovanými v roce 2020, kdy byly u 40 infikovaných jedinců druhu *T. sanguisuga* na jihu Louisiany odhaleny linie TcI (60 %) a TcIV – USA (37 %) (Dumonteil et al., 2020). Další studie z Texasu odhalila skupiny TcI a TcIV – USA u dvou druhů triatom (*T. sanguisuga* a *T. gestaeckeri*). Druh *T. gestaeckeri* (n = 548) byl častěji infikován linií DTU TcI (53,9 %) než TcIV – USA (34,4 %), zatímco u *T. sanguisuga* (n = 135) byla častěji diagnostikována skupina TcIV – USA (79,3 %) než TcI (15,6 %) (Curtis-Robles et al., 2018). Obě skupiny

byly prokázány výzkumy na hlodavcích v Lousianě. V roce 2015 bylo 23 infekcí *Tryp. cruzi* u hlodavců zařazeno do skupin TcI (82 %) a TcIV – USA (9 %) (Herrera et al., 2015).

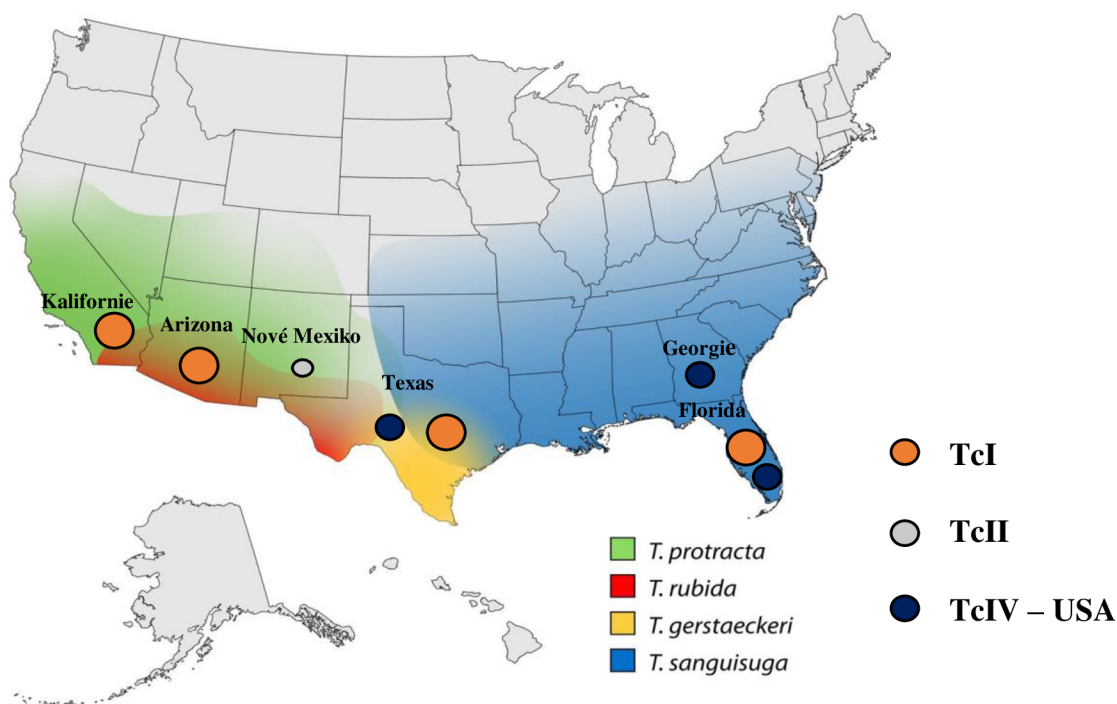
Do mé analýzy byl také včleněn jeden pozitivní jedinec druhu *T. rubida* z Nového Mexika, pro kterého byla získána jediná sekvence markeru TcYC6_0030750, klastrujícího se do skupiny TcII. Tato skupina byla popsána u 22 % hlodavců v roce 2015 ve státě Louisiana (Herrera et al., 2015) a v roce 2020 byla TcII prokázána v malé míře (3 %) u druhu *T. sanguisuga* (Dumonteil et al., 2020). Oproti tomu v recentní publikaci z roku 2022 (Flores-López et al., 2022) nebyla tato skupina zmíněna. Důvodem mohlo být použití nižšího počtu vzorků z omezené geografické oblasti a též i nižší citlivost použitých markerů (Flores-López et al., 2022).

Naše fylogenetické analýzy neprokázaly, v rámci testovaných lokalit a druhů triatom, přítomnost skupin TcIII a TcVI. Přesto výzkumná skupina Herrera et al., v roce 2019 identifikovala pomocí NGS sekvenování mini - exonů DTU TcVI u primátů v Lousianě. U již zmíněných 6 hlodavců z téhož státu byly s použitím stejné metodiky odhaleny DTUs TcI, TcII, TcIV a TcV-TcVI (Pronovost et al., 2020). Následná studie však ukázala (Barnabé et al., 2023), že variabilita mini – exonových sekvencí neumožňuje spolehlivé zařazení do jednotlivých DTUs. Pro konkrétní DTU, například TcVI, existuje až 5 odlišných haplotypů mini-exonu, z nichž jsou některé sdíleny až třemi různými DTUs. K záchytu TcIII a TcVI, majících společný haplotyp miniexonu *MeE* s linií TcII (Barnabé et al., 2023), by se proto mělo přihlížet kriticky a přítomnost těchto linií *Tryp. cruzi* na území USA by měla být ověřena pomocí jiných unikátních markerů.

Podobná kontroverze, vycházející z téhož metodického přístupu (sekvence miniexonů), provází i popisy smíšených (multiklonálních) infekcí různými DTUs *Tryp. cruzi* (Herrera et al. 2015; Garcia et al., 2017; Dumonteil et al., 2020). V mé diplomové práci, ač založené na nově vybraných jaderných markerech, nebylo možné multiklonální infekci odhalit, jelikož produkty amplifikace byly sekvenovány Sangerovou metodou. K posouzení multiklonality je potřeba mnou navržené markerové sekvenování převést do NGS postupu (Illumina amplikonů), který umožní detekci všech variant daného markeru *Tryp. cruzi* v konkrétním jedinci.

6 Závěr

V rámci této diplomové práce bylo diagnostikováno 58 *Trypanosoma cruzi* pozitivních jedinců (55,7 %) z Floridy a 10 infikovaných *Tryp. cruzi* jedinců (9,6 %) z Georgie z celkového množství 104 jedinců druhu *Triatoma sanguisuga*. Tento výzkum přinesl nové poznatky o genetické diverzitě linií *Tryp. cruzi*, přenášené vektory rodu *Triatoma*, napříč šesti státy USA. Tři nově navržené nukleární markery a jeden publikovaný marker odhalily distribuci dvou běžných skupin DTUs (TcI a TcIV - USA). DTU TcI byla nalezena u všech testovaných druhů triatom z oblastí v Kalifornii, Arizoně, Texasu a na Floridě. Výskyt TcIV – USA byl omezen na druhy *T. sanguisuga* a *T. gستاeckeri* a státy Texas, Georgie, Florida. Skupinu TcII v mém datasetu představuje jen jediný záchyt. DTU TcII byla potvrzena pouze jedním z nukleárních markerů (TcYC6_0030750) u jedince druhu *T. rubida* pocházejícího z Nového Mexika. Tento marker, amplifikující spolehlivě DTUs TcI, TcII a TcIV – USA, byl proto vyhodnocen jako nejcitlivější. Rozšíření čtyř druhů triatom, převzatých z publikace od Brenière et al., 2016, a distribuce jednotlivých DTUs *Tryp. cruzi* v těchto vektorech na území šesti států jihu USA (Obr. 7) naznačují možná geografická a hostitelská specifika infekcí, která bude nutné ověřit na početnějším setu vzorků.



Obrázek 7: Distribuce genetické diverzity linií *Trypanosoma cruzi* přenášených vektory čtyř druhů triatom v šesti státech USA (převzato z: Brenière et al., 2016., upraveno a doplněno o mé výsledky, znázorňující jednotlivé DTUs).

7 Seznam použité literatury

Antinori, S., Galimberti, L., Grande, R., Bianco, R., Oreni, L., Traversi, L., Ricaboni, D., Bestetti, G., Lai, A., Mileto, D., Gismondo, M. R., Petullà, M., Garelli, S., De Maio, G., Cogliati, C., Torzillo, D., Villa, A. M., Egidi, A. M., Repetto, E. C., Ridolfo, A. L., ... Galli, M. (2018). Chagas disease knocks on our door: a cross-sectional study among Latin American immigrants in Milan, Italy. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(12), 1340.e11340.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.03.017>

Azambuja, P., Garcia, E. S., & Ratcliffe, N. A. (2005). Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in parasitology*, 21(12), 568–572. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.09.011>

Bargues MD, Schofield C, Dujardin JP. Classification and Systematics of the Triatominae, in: American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research. (Second Edition) Elsevier, Amsterdam, Netherlands; 2017. pp. 113-143. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00006-X>

Barnabé, C., Brenière, S. F., Santillán-Guayasamín, S., Douzery, E. J. P., & Waleckx, E. (2023). Revisiting gene typing and phylogeny of *Trypanosoma cruzi* reference strains: Comparison of the relevance of mitochondrial DNA, single-copy nuclear DNA, and the intergenic region of mini-exon gene. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 115, 105504. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105504>

Barnabé, C., Yaeger, R., Pung, O., & Tibayrenc, M. (2001). *Trypanosoma cruzi*: a considerable phylogenetic divergence indicates that the agent of Chagas disease is indigenous to the native fauna of the United States. *Experimental parasitology*, 99(2), 73–79. <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4651>

Beard, C. B., Young, D. G., Butler, J. F., & Evans, D. A. (1988). First isolation of *Trypanosoma cruzi* from a wild-caught *Triatoma sanguisuga* (LeConte) (Hemiptera: Triatominae) in Florida, U.S.A. *The Journal of parasitology*, 74(2), 343–344.

- Berenger, J. M., & Parola, P. (2016). Arthropod vectors of medical importance. *Infect Dis (Auckl)*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 104-12. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00012-5>
- Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M. J., & Montgomery, S. P. (2011). *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clinical microbiology reviews*, 24(4), 655–681. <https://doi.org/10.1128/CMR.00005-11>
- Bern, C., Messenger, L. A., Whitman, J. D., & Maguire, J. H. (2019). Chagas Disease in the United States: a Public Health Approach. *Clinical microbiology reviews*, 33(1), e00023-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-19>
- Branche, C., Ochaya, S., Aslund, L., & Andersson, B. (2006). Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*, 147(1), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.01.005>
- Brenière, S. F., Waleckx, E., & Barnabé, C. (2016). Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(8), e0004792. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004792>
- Capinera J. L.; Encyclopedia of Entomology (2008): 283-287, 311-319, 2091-2092.
- Carrasco, H. J., Frame, I. A., Valente, S. A., & Miles, M. A. (1996). Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 54(4), 418–424. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.54.418>
- Catala, S. S., Noireau, F., Dujardin, J. P. (2017). Biology of Triatominae. American Trypanosomiasis Chagas disease: One undred Years of Research, 2nd ed. Elsevier, pp. 145–167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00007-1>

Cesa, K., Caillouët, K. A., Dorn, P. L., & Wesson, D. M. (2011). High *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) prevalence in *Triatoma sanguisuga* (Hemiptera: Reduviidae) in southeastern Louisiana. *Journal of medical entomology*, 48(5), 1091–1094. <https://doi.org/10.1603/me10195>

Curtis-Robles, R., Auckland, L. D., Snowden, K. F., Hamer, G. L., & Hamer, S. A. (2018). Analysis of over 1500 triatomine vectors from across the US, predominantly Texas, for *Trypanosoma cruzi* infection and discrete typing units. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 58, 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.12.016>

Curtis-Robles, R., Snowden, K. F., Dominguez, B., Dinges, L., Rodgers, S., Mays, G., & Hamer, S. A. (2017). Epidemiology and Molecular Typing of *Trypanosoma cruzi* in Naturally-Infected Hound Dogs and Associated Triatomine Vectors in Texas, USA. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(1), e0005298. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005298>

Dong, Z., Wang, Y., Li, C., Li, L., & Men, X. (2021). Mitochondrial DNA as a Molecular Marker in Insect Ecology: Current Status and Future Prospects. *Annals of the Entomological Society of America*, 114, 470 - 476.

Dorn, P. L., Perniciaro, L., Yabsley, M. J., Roellig, D. M., Balsamo, G., Diaz, J., & Wesson, D. (2007). Autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*, Louisiana. *Emerging infectious diseases*, 13(4), 605–607. <https://doi.org/10.3201/eid1304.061002>

Dumonteil, E., Pronovost, H., Bierman, E. F., Sanford, A., Majeau, A., Moore, R., & Herrera, C. (2020). Interactions among *Triatoma sanguisuga* blood feeding sources, gut microbiota and *Trypanosoma cruzi* diversity in southern Louisiana. *Molecular ecology*, 29(19), 3747–3761. <https://doi.org/10.1111/mec.15582>

Dumonteil, E., Ramirez-Sierra, M. J., Pérez-Carrillo, S., Teh-Poot, C., Herrera, C., Gourbière, S., & Waleckx, E. (2018). Detailed ecological associations of triatomines revealed by metabarcoding and next-generation sequencing: implications for triatomine behavior and *Trypanosoma cruzi* transmission cycles. *Scientific reports*, 8(1), 4140. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22455-x>

Eberhard, F. E., Klimpel, S., Guarneri, A. A., & Tobias, N. J. (2022). Exposure to Trypanosoma parasites induces changes in the microbiome of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Microbiome*, 10(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01240-z>

Eloy, L. J., & Lucheis, S. B. (2012). Hemoculture and Polymerase Chain Reaction Using Primers TCZ1/TCZ2 for the Diagnosis of Canine and Feline Trypanosomiasis. *ISRN veterinary science*, 2012, 419378. <https://doi.org/10.5402/2012/419378>

Fernandes, O., Santos, S. S., Cupolillo, E., Mendonça, B., Derre, R., Junqueira, A. C., Santos, L. C., Sturm, N. R., Naiff, R. D., Barret, T. V., Campbell, D. A., & Coura, J. R. (2001). A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(1), 97–99. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(01\)90350-5](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(01)90350-5)

Flores-López, C. A., Mitchell, E. A., Reisenman, C. E., Sarkar, S., Williamson, P. C., & Machado, C. A. (2022). Phylogenetic diversity of two common *Trypanosoma cruzi* lineages in the Southwestern United States. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 99, 105251. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105251>

Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., & Hurst, G. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular ecology*, 18(22), 4541–4550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x>

Garcia, A. R., Rocha, A. P., Moreira, C. C., Rocha, S. L., Guarneri, A. A., & Elliot, S. L. (2016). Screening of Fungi for Biological Control of a Triatomine Vector of Chagas Disease: Temperature and Trypanosome Infection as Factors. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(11), e0005128. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005128>

- Garcia, M. N., Burroughs, H., Gorchakov, R., Gunter, S. M., Dumonteil, E., Murray, K. O., & Herrera, C. P. (2017). Molecular identification and genotyping of *Trypanosoma cruzi* DNA in autochthonous Chagas disease patients from Texas, USA. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, *49*, 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.01.016>
- Germano, M. D., Roca Acevedo, G., Mougabure Cueto, G. A., Toloza, A. C., Vassena, C. V., & Picollo, M. I. (2010). New findings of insecticide resistance in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from the Gran Chaco. *Journal of medical entomology*, *47*(6), 1077–1081. <https://doi.org/10.1603/me10069>
- Gourbière, S., Dorn, P., Tripet, F., & Dumonteil, E. (2012). Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. *Heredity*, *108*(3), 190–202. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.71>
- Gruending, A. P., Massago, M., Teston, A. P., Monteiro, W. M., Kaneshima, E. N., Araújo, S. M., Gomes, M. L., Barbosa, M.d., & Toledo, M. J. (2015). Impact of benznidazole on infection course in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *92*(6), 1178–1189. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0690>
- Gumiel, M., da Mota, F. F., Rizzo, V. de S., Sarquis, O., de Castro, D. P., Lima, M. M., Garcia, E. de S., Carels, N., & Azambuja, P. (2015). 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*, *8*, 245. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0836-z>
- Hamilton, P. B., & Stevens, J. R. (2017). Classification and phylogeny of *Trypanosoma cruzi*. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease* (pp. 321-344). Elsevier.

- Herrera, C. P., Barnabé, C., & Brenière, S. F. (2013). Complex evolutionary pathways of the intergenic region of the mini-exon gene in *Trypanosoma cruzi* TcI: a possible ancient origin in the Gran Chaco and lack of strict genetic structuration. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 16, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.12.028>
- Herrera, C. P., Licon, M. H., Nation, C. S., Jameson, S. B., & Wesson, D. M. (2015). Genotype diversity of *Trypanosoma cruzi* in small rodents and *Triatoma sanguisuga* from a rural area in New Orleans, Louisiana. *Parasites & vectors*, 8, 123. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0730-8>
- Herrera, C., Majeau, A., Didier, P., Falkenstein, K. P., & Dumonteil, E. (2019). *Trypanosoma cruzi* diversity in naturally infected nonhuman primates in Louisiana assessed by deep sequencing of the mini-exon gene. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 113(5), 281–286. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try119>
- Herreros-Cabello, A., Callejas-Hernández, F., Gironès, N., & Fresno, M. (2020). *Trypanosoma Cruzi* Genome: Organization, Multi-Gene Families, Transcription, and Biological Implications. *Genes*, 11(10), 1196. <https://doi.org/10.3390/genes11101196>
- Chatelain E. (2015). Chagas disease drug discovery: toward a new era. *Journal of biomolecular screening*, 20(1), 22–35. <https://doi.org/10.1177/1087057114550585>
- Izeta-Alberdi, A., Ibarra-Cerdeña, C. N., Moo-Llanes, D. A., & Ramsey, J. M. (2016). Geographical, landscape and host associations of *Trypanosoma cruzi* DTUs and lineages. *Parasites & vectors*, 9(1), 631. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1918-2>
- 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 Kataloge der OÖ. Landesmuseen Neue Serie 50*. Linz: 2006, 19, 1095 – 1116.

Kjos, S. A., Snowden, K. F., & Olson, J. K. (2009). Biogeography and *Trypanosoma cruzi* infection prevalence of Chagas disease vectors in Texas, USA. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 9(1), 41–50. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0026>

Klotz, J. H., Dorn, P. L., Logan, J. L., Stevens, L., Pinnas, J. L., Schmidt, J. O., & Klotz, S. A. (2010). "Kissing bugs": potential disease vectors and cause of anaphylaxis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50(12), 1629–1634. <https://doi.org/10.1086/652769>

Klotz, S. A., Dorn, P. L., Klotz, J. H., Pinnas, J. L., Weirauch, C., Kurtz, J. R., & Schmidt, J. (2009). Feeding behavior of triatomines from the southwestern United States: an update on potential risk for transmission of Chagas disease. *Acta tropica*, 111(2), 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.03.003>

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. *Environmental health insights*, 8(Suppl 2), 49–59. <https://doi.org/10.4137/EHI.S16003>

Klotz, S. A., Shirazi, F. M., Boesen, K., Beatty, N. L., Dorn, P. L., Smith, S., & Schmidt, J. O. (2016). Kissing Bug (*Triatoma spp.*) Intrusion into Homes: Troublesome Bites and Domiciliation. *Environmental health insights*, 10, 45–49. <https://doi.org/10.4137/EHI.S32834>

Klotz, S. A., Smith, S. L., & Schmidt, J. O. (2021). Kissing Bug Intrusions into Homes in the Southwest United States. *Insects*, 12(7), 654. <https://doi.org/10.3390/insects12070654>

Krinsky, William L.. "5 – TRUE BUGS (Hemiptera)." *Medical and Veterinary Entomology* (2002): 67-86.

Lima, L., Espinosa-Álvarez, O., Ortiz, P. A., Trejo-Varón, J. A., Carranza, J. C., Pinto, C. M., Serrano, M. G., Buck, G. A., Camargo, E. P., & Teixeira, M. M. (2015). Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta tropica*, 151, 166–177. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.015>

Lisboa, C. V., Monteiro, R. V., Martins, A. F., Xavier, S. C., Lima, V.dosS., & Jansen, A. M. (2015). Infection with *Trypanosoma cruzi* TcII and TcI in free-ranging population of lion tamarins (*Leontopithecus* spp): an 11 - year follow-up. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *110*(3), 394–402. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140400>

Magalhães, L. M. D., Gollob, K. J., Zingales, B., & Dutra, W. O. (2022). Pathogen diversity, immunity, and the fate of infections: lessons learned from *Trypanosoma cruzi* human-host interactions. *The Lancet. Microbe*, *3*(9), e711 – e722. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00265-2](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00265-2)

Marcili, A., Lima, L., Cavazzana, M., Junqueira, A. C., Veludo, H. H., Maia Da Silva, F., Campaner, M., Paiva, F., Nunes, V. L., & Teixeira, M. M. (2009). A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*, *136*(6), 641–655. <https://doi.org/10.1017/S0031182009005861>

Martins, K., Andrade, C. de M., Barbosa-Silva, A. N., do Nascimento, G. B., Chiari, E., Galvão, L. M., & da Câmara, A. C. (2015). *Trypanosoma cruzi* III causing the indeterminate form of Chagas disease in a semi-arid region of Brazil. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, *39*, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.08.012>

Messenger, L. A., & Miles, M. A. (2015). Evidence and importance of genetic exchange among field populations of *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica*, *151*, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.007>

Otálora-Luna, F., Pérez-Sánchez, A. J., Sandoval, C., & Aldana, E. (2015). Evolution of hematophagous habit in Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). *Revista chilena de historia natural*, *88*, 1-13.

- Perez, E., Monje, M., Chang, B., Buitrago, R., Parrado, R., Barnabé, C., Noireau, F., & Brenière, S. F. (2013). Predominance of hybrid discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* in domestic *Triatoma infestans* from the Bolivian Gran Chaco region. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, *13*, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.09.014>
- Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *Lancet (London, England)*, *391*(10115), 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- Pinto, C. M., Kalko, E. K., Cottontail, I., Wellinghausen, N., & Cottontail, V. M. (2012). TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, *12*(6), 1328–1332. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.013>
- Pinto, C. M., Ocaña-Mayorga, S., Tapia, E. E., Lobos, S. E., Zurita, A. P., Aguirre-Villacís, F., MacDonald, A., Villacís, A. G., Lima, L., Teixeira, M. M., Grijalva, M. J., & Perkins, S. L. (2015). Bats, Trypanosomes, and Triatomines in Ecuador: New Insights into the Diversity, Transmission, and Origins of *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease. *PloS one*, *10*(10), e0139999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139999>
- Piron, M., Fisa, R., Casamitjana, N., López-Chejade, P., Puig, L., Vergés, M., Gascón, J., Gómez i Prat, J., Portús, M., & Sauleda, S. (2007). Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta tropica*, *103*(3), 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.05.019>
- Pronovost, H., Peterson, A. C., Chavez, B. G., Blum, M. J., Dumonteil, E., & Herrera, C. P. (2020). Deep sequencing reveals multiclonality and new discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* in rodents from the southern United States. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, *53*(4), 622–633. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2018.12.004>

Pung, O. J., Banks, C. W., Jones, D. N., & Krissinger, M. W. (1995). *Trypanosoma cruzi* in wild raccoons, opossums, and triatomine bugs in southeast Georgia, U.S.A. *The Journal of parasitology*, *81*(2), 324–326.

Rabinovich, J. E., Kitron, U. D., Obed, Y., Yoshioka, M., Gottdenker, N., & Chaves, L. F. (2011). Ecological patterns of blood-feeding by kissing-bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *106*(4), 479–494. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762011000400016>

Ramírez, J. D., Hernández, C., Montilla, M., Zambrano, P., Flórez, A. C., Parra, E., & Cucunubá, Z. M. (2014). First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. *Zoonoses and public health*, *61*(7), 477–479. <https://doi.org/10.1111/zph.12094>

Reisenman, C. E., Lawrence, G., Guerenstein, P. G., Gregory, T., Dotson, E., & Hildebrand, J. G. (2010). Infection of kissing bugs with *Trypanosoma cruzi*, Tucson, Arizona, USA. *Emerging infectious diseases*, *16*(3), 400–405. <https://doi.org/10.3201/eid1603.090648>

Reisenman, C. E., Savary, W., Cowles, J., Gregory, T. L., & Hildebrand, J. G. (2012). The distribution and abundance of triatomine insects, potential vectors of Chagas Disease, in a metropolitan area in southern Arizona, United States. *Journal of medical entomology*, *49*(6), 1254–1261. <https://doi.org/10.1603/me12139>

Requena-Méndez, A., Aldasoro, E., de Lazzari, E., Sicuri, E., Brown, M., Moore, D. A., Gascon, J., & Muñoz, J. (2015). Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, *9*(2), e0003540. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003540>

Roces, F., & Manrique, G. (1996). Different stridulatory vibrations during sexual behaviour and disturbance in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of insect physiology*, *42*(3), 231–238. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(95\)00099-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(95)00099-2)

Rodriguez, F., Luna, B. S., Calderon, O., Manriquez-Roman, C., Amezcua-Winter, K., Cedillo, J., Garcia-Vazquez, R., Tejeda, I. A., Romero, A., Waldrup, K., Watts, D. M., Khatchikian, C., & Maldonado, R. A. (2021). Surveillance of *Trypanosoma cruzi* infection in Triatomine vectors, feral dogs and cats, and wild animals in and around El Paso county, Texas, and New Mexico. *PLoS neglected tropical diseases*, *15*(2), e0009147. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009147>

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. *Frontiers in microbiology*, *9*, 1167. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01167>

Roellig, D. M., Savage, M. Y., Fujita, A. W., Barnabé, C., Tibayrenc, M., Steurer, F. J., & Yabsley, M. J. (2013). Genetic variation and exchange in *Trypanosoma cruzi* isolates from the United States. *PLoS one*, *8*(2), e56198. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056198>

Shender, L. A., Lewis, M. D., Rejmanek, D., & Mazet, J. A. (2016). Molecular Diversity of *Trypanosoma cruzi* Detected in the Vector *Triatoma protracta* from California, USA. *PLoS neglected tropical diseases*, *10*(1), e0004291. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004291>

Schofield C. J. (2000). Biosystematics and evolution of the Triatominae. *Cadernos de saude publica*, *16 Suppl 2*, 89–92. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2000000800010>

Schofield, C. J., & Galvão, C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta tropica*, *110*(2-3), 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.010>

Tavares de Oliveira, M., Sulleiro, E., Silgado Gimenez, A., de Lana, M., Zingales, B., Santana da Silva, J., Marin-Neto, J. A., & Molina, I. (2020). Quantification of parasite burden of *Trypanosoma cruzi* and identification of Discrete Typing Units (DTUs) in blood samples of Latin American immigrants residing in Barcelona, Spain. *PLoS neglected tropical diseases*, *14*(6), e0008311. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008311>

Telleria, J., & Tibayrenc, M. (Eds.). (2017). *American trypanosomiasis Chagas disease: one hundred years of research*. Elsevier.

Torhorst, C. W., Ledger, K. J., White, Z. S., Milleson, M. P., Corral, C. C., Beatty, N. L., & Wisely, S. M. (2023). *Trypanosoma cruzi* infection in mammals in Florida: New insight into the transmission of *T. cruzi* in the southeastern United States. *International journal for parasitology. Parasites and wildlife*, 21, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.06.009>

Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International journal for parasitology*, 31(5-6), 472–481. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00153-9)

Vieira, C. B., Praça, Y. R., Bentes, K. L. D. S., Santiago, P. B., Silva, S. M. M., Silva, G. D. S., Motta, F. N., Bastos, I. M. D., de Santana, J. M., & de Araújo, C. N. (2018). Triatomines: Trypanosomatids, Bacteria, and Viruses Potential Vectors?. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 405. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00405>

Virreira, M., Torrico, F., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Solano, M., Carlier, Y., & Svoboda, M. (2003). Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 68(5), 574–582. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2003.68.574>

Waleckx, E., Suarez, J., Richards, B., & Dorn, P. L. (2014). *Triatoma sanguisuga* blood meals and potential for Chagas disease, Louisiana, USA. *Emerging infectious diseases*, 20(12), 2141–2143. <https://doi.org/10.3201/eid2012.131576>

Walker, A. A., Madio, B., Jin, J., Undheim, E. A., Fry, B. G., & King, G. F. (2017). Melt With This Kiss: Paralyzing and Liquefying Venom of The Assassin Bug *Pristhesancus plagipennis* (Hemiptera: Reduviidae). *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 16(4), 552–566. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.063321>

WOOD S. F. (1949). Additional observations on *Trypanosoma cruzi* Chagas, from Arizona in insects, rodents, and experimentally infected animals. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 29(1), 43–55. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1949.s1-29.43>

Yun, O., Lima, M. A., Ellman, T., Chambi, W., Castillo, S., Flevaud, L., Roddy, P., Parreño, F., Albajar Viñas, P., & Palma, P. P. (2009). Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Médecins Sans Frontières. *PLoS neglected tropical diseases*, 3(7), e488. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000488>

Zeledón R, Beard CB, Pinto Dias JC, Leiby DA, Dorn PL, Coura JR. (2012). An appraisal of the status of Chagas disease in the United States, p 5–32. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(95\)00099-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(95)00099-2)

Zingales B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta tropica*, 184, 38–52. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>

Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., & Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 12(2), 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>

Zingales, B., Miles, M. A., Moraes, C. B., Luquetti, A., Guhl, F., Schijman, A. G., Ribeiro, I., Drugs for Neglected Disease Initiative, & Chagas Clinical Research Platform Meeting (2014). Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(6), 828–833. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140156>

8 Přílohy:

Tabulka P1: Amplifikační úspěšnost produktů uvedených markerů a jejich využití ve fylogenetické analýze.

marker	Celkový počet izolátů	Amplifikační úspěšnost (počet produktů/%)	Počet sekvencí použitých pro fyl. analýzu	počet sekvencí z NCBI	Celkový počet sekvencí ve fyl. stromě	outgroup
TcYC6_0030750	46	44 (95,65 %)	42	12	54	<i>Tryp. rangeli</i>
TcYC6_0032630	46	35 (76,10 %)	34	17	51	<i>Tryp. rangeli</i> <i>Tryp. cruzi</i> <i>marinkellei</i>
TcYC6_0017400	46	34 (73,91 %)	31	16	47	<i>Tryp. rangeli</i>
COII – ND1	46	27 (58,70 %)	26	76	102	<i>Tryp. cruzi</i> <i>marinkellei</i>
Celkový počet	46	140	133	121	254	

Tabulka P2: Seznam vzorků rozdělených dle druhu, povahy templátu, vývojového stádia, data sběru, polohy a povahy stanoviště (GPS souřadnice nejsou kompletní, tj. jsou neznámé, jelikož k jejich zveřejnění nebyl poskytnut souhlas majitele pozemku).

	Kód vzorku	povaha templátu	Druh	Instar	rok sběru	Stát	Lokalita	GPS_N	GPS_W
1	FLTS56	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
2	FLTS57	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
3	FLTS58	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
4	FLTS59	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
5	FLTS60	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
6	FLTS61	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
7	FLTS62	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
8	FLTS63	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Florida	Hawthorne	29.673028	82.033111
9	FLTS64	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Florida	Hawthorne	29.673028	82.033111
10	FLTS65	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Florida	Hawthorne	29.673028	82.033111
11	FLTS66	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
12	FLTS67	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Florida	Micanopy	neznámé	neznámé
13	FLTS68	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Florida	Micanopy	neznámé	neznámé
14	FLTS69	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Florida	Micanopy	neznámé	neznámé
15	FLTS70	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
16	FLTS71	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
17	FLTS72	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
18	FLTS73	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
19	FLTS74	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
20	FLTS75	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
21	FLTS76	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
22	FLTS77	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
23	FLTS78	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
24	FLTS79	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
25	FLTS80	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950

26	FLTS81	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
27	FLTS82	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
28	FLTS83	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
29	FLTS84	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
30	FLTS85	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
31	FLTS86	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
32	FLTS87	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
33	FLTS88	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
34	FLTS89	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L3	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
35	FLTS90	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L3	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
36	FLTS91	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L3	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
37	FLTS92	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
38	FLTS93	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
39	FLTS94	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
40	FLTS95	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
41	FLTS96	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
42	FLTS97	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
43	FLTS98	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
44	FLTS99	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
45	FLTS100	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
46	FLTS101	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
47	FLTS102	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
48	FLTS103	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Florida	Gainesville	29.626246	82.294686
49	FLTS104	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
50	FLTS105	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
51	FLTS106	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
52	FLTS107	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
53	FLTS108	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
54	FLTS109	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
55	FLTS110	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
56	FLTS111	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé

57	FLTS112	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
58	FLTS113	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L3	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
59	FLTS114	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
60	FLTS115	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
61	FLTS116	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
62	FLTS117	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
63	FLTS118	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
64	FLTS119	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
65	FLTS120	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
66	FLTS121	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
67	FLTS122	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
68	FLTS123	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Florida	Micanopy	29.496175	82.338141
69	FLTS124	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Micanopy	29.549014	82.334699
70	FLTS125	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Micanopy	29.549014	82.334699
71	FLTS126	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Micanopy	29.549014	82.334699
72	FLTS127	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Micanopy	29.549014	82.334699
73	FLTS128	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Micanopy	29.549014	82.334699
74	FLTS129	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Micanopy	29.549014	82.334699
75	FLTS130	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Micanopy	29.549014	82.334699
76	FLTS131	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Micanopy	29.549014	82.334699
77	FLTS132	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Micanopy	29.549014	82.334699
78	FLTS133	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Micanopy	29.549014	82.334699
79	FLTS134	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L4	2021	Florida	Micanopy	29.549014	82.334699
80	FLTS135	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Florida	Micanopy	29.549014	82.334699
81	FLTS136	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Florida	Micanopy	29.549014	82.334699
82	FLTS137	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
83	FLTS138	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Florida	Gainesville	neznámé	neznámé
84	FL1i2A	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L2	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
85	FL1i1A	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L1	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
86	FL1i1B	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L1	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
87	FL1i1C	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L1	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950

88	FL1i1D	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L1	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
89	FL1i1E	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L1	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
90	FL1i1F	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L1	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
91	FL1i1G	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L1	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
92	FL1i1H	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L1	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
93	FL1i1I	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L1	2021	Florida	Gainesville	29.625207	82.296950
94	A1I6	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Georgie	Oconee National forest	neznámé	neznámé
95	S1I6T1	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Georgie	Sapelo island	31.435253	81.277964
96	S1I5T2	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Georgie	Sapelo island	31.435253	81.277964
97	S1I6T3	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Georgie	Sapelo island	31.435253	81.277964
98	S1I6T4	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Georgie	Sapelo island	31.435253	81.277964
99	S1I5T5	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Georgie	Sapelo island	31.435253	81.277964
100	S1I5T6	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Georgie	Sapelo island	31.435253	81.277964
101	S1I5T7	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Georgie	Sapelo island	31.435253	81.277964
102	S1I5T8	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Georgie	Sapelo island	31.435253	81.277964
103	S1I5T9	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L5	2021	Georgie	Sapelo island	31.435253	81.277964
104	S1I6T10	jedinec	<i>T. sanguisuga</i>	L6	2021	Georgie	Sapelo island	31.435253	81.277964
105	4L01A	DNA	<i>T. gersteackeri</i>	L6	2019	Texas	Lackland	29.377283	98.686983
106	B013	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Bisbee	neznámé	neznámé
107	B024	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Bisbee	neznámé	neznámé
108	BS6I6F	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Bob's house	neznámé	neznámé
109	BS16I6F	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Bob's house	neznámé	neznámé
110	BS17I6F	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Bob's house	neznámé	neznámé
111	BS20I6F_B	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Bob's house	neznámé	neznámé
112	BS21I6F_A	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Bob's house	neznámé	neznámé
113	BS21I6F_D	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Bob's house	neznámé	neznámé
114	BS22I6F_A	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Bob's house	neznámé	neznámé
115	DS3I6A	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Desert Station	32.151601	111.499273
116	DS3I6B	DNA	<i>T. protracta</i>	L6	2019	Arizona	Desert Station	32.151601	111.499273
117	DS5I6	DNA	<i>T. protracta</i>	L6	2019	Arizona	Desert Station	32.253883	111.087867
118	DS5I6B	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Desert Station	32.253883	111.087867

119	DS12I6	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Desert Station	32.253883	111.087867
120	DS13I6	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Desert Station	32.253883	111.087867
121	LAB10B	DNA	<i>T. gersteackeri</i>	L4	2019	Texas	San Antonio	29.377888	98.681719
122	LAB17A	DNA	<i>T. protracta</i>	L6	2019	Texas	San Antonio	29.379125	98.686913
123	LAB17B	DNA	<i>T. protracta</i>	L6	2019	Texas	San Antonio	29.379125	98.686913
124	LAB19A	DNA	<i>T. protracta</i>	L6	2019	Texas	San Antonio	29.376775	98.684010
125	MED7G	DNA	<i>T. gersteackeri</i>	L6	2019	Texas	Medina	neznámé	neznámé
126	MED7H	DNA	<i>T. gersteackeri</i>	L6	2019	Texas	Medina	neznámé	neznámé
127	MP2A	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Madroya Pools, Saguaro NP	32.153508	110.608587
128	MP2B	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Madroya Pools, Saguaro NP	32.153509	110.608588
129	MP2C	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Madroya Pools, Saguaro NP	32.153510	110.608589
130	MP2D	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Madroya Pools, Saguaro NP	32.153511	110.608590
131	MP3A	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Madroya Pools, Saguaro NP	32.153512	110.608591
132	MP4	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Madroya Pools, Saguaro NP	32.153513	110.608592
133	MP6	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Madroya Pools, Saguaro NP	32.153514	110.608593
134	MP7	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2019	Arizona	Madroya Pools, Saguaro NP	32.153515	110.608594
135	NM9	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2022	Nové Mexiko	Hatch	32.699036	107.179724
136	SM5A	DNA	<i>T. protracta</i>	L5	2019	Kalifornie	Santa Margarita Ecological Lab	33.272133	117.100567
137	SM5B	DNA	<i>T. protracta</i>	L5	2019	Kalifornie	Santa Margarita Ecological Lab	33.272133	117.100567
138	SM5C	DNA	<i>T. protracta</i>	L5	2019	Kalifornie	Santa Margarita Ecological Lab	33.272133	117.100567
139	TU22i6A1	DNA	<i>T. rubida</i>	L6	2018	Arizona	Tuscon	32.257117	111.084667
140	TU33i6A1	DNA	<i>T. protracta</i>	L6	2018	Arizona	Tuscon	32.25675	111.085717