Morfološka i proteomska analiza izolata bičaša roda Trypanosoma na području Republike Hrvatske

Martinković, Franjo

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:599945

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

Sveučilište u Zagrebu

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Franjo Martinković, dr. med. vet.

MORFOLOŠKA I PROTEOMSKA ANALIZA IZOLATA BIČAŠA RODA *TRYPANOSOMA* NA PODRUČJU REPUBLIKE HRVATSKE

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014.

University of Zagreb

UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Franjo Martinković, dr. med. vet.

MORPHOLOGICAL AND PROTEOMIC ANALYSIS OF FLAGELLATES FROM *TRYPANOSOMA* GENUS IN CROATIA

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014.

Sveučilište u Zagrebu

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Franjo Martinković, dr. med. vet.

MORFOLOŠKA I PROTEOMSKA ANALIZA IZOLATA BIČAŠA RODA *TRYPANOSOMA* NA PODRUČJU REPUBLIKE HRVATSKE

DOKTORSKI RAD

MENTOR: prof. dr. sc. Albert Marinculić

Zagreb, 2014.

University of Zagreb

UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Franjo Martinković, dr. med. vet.

MORPHOLOGICAL AND PROTEOMIC ANALYSIS OF FLAGELLATES FROM *TRYPANOSOMA* GENUS IN CROATIA

DOCTORAL THESIS

REVISOR: prof. dr. sc. Albert Marinculić

Zagreb, 2014.

Ova je disertacija izrađena na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom, te Institutu „Ruđer Bošković“ Zagreb, Zavodu za molekularnu medicinu, Laboratoriju za sistemsku biomedicinu, a u sklopu Sveučilišnoga poslijediplomskog studija „Veterinarske znanosti“ Sveučilišta u Zagrebu te pod vodstvom prof. dr. sc. Alberta Marinculića.

Zahvaljujem svojem mentoru prof.dr.sc. Albertu Marinculiću, na stručnoj pomoći i savjetima.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom na stručnoj pomoći, razumijevanju i potpori pri izradi rada.

Osobito zahvaljujem dr. sc. Srđanu Vučiniću i Aniti Horvatić, dipl. ing. kemije na velikoj pomoći i savjetima pri izvedbi proteomskog dijela disertacije.

Hvala mojem ocu na izradi stalka za autoklaviranje i svojoj obitelji na podršci u svemu što činim.

Zahvaljujem se svojoj djevojci, Ivi Štimac, dr. med. vet., na strpljenju, pomoći i beskrajnoj podršci.

Zahvaljujem se dragim prijateljima na podršci i savjetima.

SAŽETAK:

MORFOLOŠKA I PROTEOMSKA ANALIZA IZOLATA BIČAŠA RODA *TRYPANOSOMA* NA PODRUČJU REPUBLIKE HRVATSKE

Pripadnici roda *Trypanosoma* prošireni su po cijelom svijetu. Pojedine vrste uzrokuju ozbiljne zdravstvene probleme kod ljudi i životinja dok su neke vrste apatogene za svojeg nosioca. Kod nas su izolirane *T. melophagium* iz krpuše, *T. theileri* iz goveda, *Trypanosoma* sp. iz jelena, koje spadaju u podrod *Megatrypanum*, te *T. rotatorium* iz jestivih zelenih žaba. Za seroepizootiološka istraživanja se koristi antigen od uzgojenih tripanosoma. Osim uzgoja *in vitro*, za istraživanje antigenskih komponenata se koristi proteomska analiza. Ciljevi ovog istraživanja su na temelju morfometrijskih parametara detaljno opisati morfologiju krvnih oblika *T. rotatorium*, uzgojiti izolirane vrste tripanosoma na novoj hranjivoj podlozi za seroepizootiološka istraživanja, te prikazati proteomski profil izoliranih tripanosoma po prvi puta u svijetu. Temeljem standardnih morfometrijskih parametara prikazana je morfologija *T. rotatorium.* Uzgojem tripanosoma u novoj hranjivoj podlozi, bifazičnom čokoladnom agaru, dobiven je adekvatni antigen za seroepizootiološka istraživanja. Također po prvi puta u svijetu je prikazan proteomski profil izoliranih tripanosoma metodama dvodimenzionalne elektroforeze i spektrometrije masa. Dobiveni rezultati dali su uvid u njihove međusobne razlike, te razlike i sličnosti s patogenim vrstama iz roda *Trypanosoma.*

Ključne riječi: morfologija, *Trypanosoma*, *in vitro* uzgoj, proteomska analiza.

SUMMARY:

MORPHOLOGICAL AND PROTEOMIC ANALYSIS OF FLAGELLATES FROM *TRYPANOSOMA* GENUS IN CROATIA

Backgorund and purpose: The species of *Trypanosoma* genus are spread worldwide. Some species can cause serious health problems in humans and animals, although some species are apathogenic for their host. In Croatia apathogenic species were isolated: *T. melophagium* from sheep ked, *T. theileri* from cattle, *Trypanosoma* sp. from cervids and *T. rotatorium* from frogs. For seroepizootiological studies as antigen source, *in vitro* cultured trypanosomes are used. Except by *in vitro* cultivation, antigen research can be done with proteomic analysis. The aims of this study were to describe *T. rotatorium* bloodstream forms based on morphometric parameters, *in vitro* cultivation of isolated tripanosomes in new *in vitro* culture system medium as antigen source for further seroepizootiological research and their proteomic profiling. Also, by *in vitro* cultivation, goal is to describe the vitality and morphology of all the trypanosome species present in Croatia and culture the bloodstream forms for further seroepizootiological investigations. Proteomic analysis of trypanosome isolates will elucidate their differences and similarities.

Materials and methods: *T. rotatorium* morphology was described using standard morphometric parameters. A new in *vitro culture*, Biphasic Chocolate Agar for Trypanosomatids was compared with Liver Tryptose Medium by *in vitro* cultivation of isolated trypanosomes. Proteomic profile of trypanosomes was analyzed by two dimensional electrophoresis and mass spectrometry.

Results: Morphometric analysis of *T. rotatorium* bloodstream forms showed high polymorphism. By culturing the trypanosomes in new culture system, antigen for further seroepidemiological research was produced. Proteomic analysis showed marked difference between analyzed trypanosome flagellates.

Conclusions: This is for the first time that *T. rotatorium* bloodstream forms were analyzed in Croatia. We showed here a new *in vitro* culture system media. For the first time proteome profile of *T. rotatorium*, *T. theileri*, *T. melophagium* and cervid trypanosome were presented.

Key words: morphology, *Trypanosoma*, *in vitro* cultivation, proteomic analysis

SADRŽAJ

Stranica

1. UVOD **1**

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA **2**

2.1. Općenito o tripanosomama 2

2.2. Stanična građa bičaša iz razreda Kinetoplastida 3

2.2.1. Oblici tijela bičaša iz porodice Trypanosomatidae 4

2.3. *Trypanosoma grayi* 8

2.4. Tripanosome podroda *Megatrypanum* 9

2.4.1. *Trypanosoma (Megatrypanum) melophagium* 10

2.4.1.1. Povijest i razvojni ciklus 10

2.4.1.2. Rasprostranjenost i prevalencija 11

2.4.1.3. Posrednici 12

2.4.1.4. Ponašanje *T. (Megatrypanum) melophagium* u nosiocu 12

2.4.1.5. Vrsna specifičnost *T. (Megatrypanum) melophagium* za nosioca i posrednika 13

2.4.2. *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* 15

2.4.2.1. Povijest i razvojni ciklus 15

2.4.2.2 Rasprostranjenost i prevalencija 16

2.4.2.3. Ponašanje *T. (Megatrypanum) theileri* u nosiocu 16

2.4.2.4. Posrednici 18

2.4.2.4.1. Obadi 18

2.4.2.4.2 Krpelji 19

2.4.2.4.3 Ostali člankonošci 20

2.4.3. *T.(Megatrypanum)* tripanosome u cervida 21

2.4.3.1. Povijest i razvojni ciklus 21

2.4.3.2. Rasprostranjenost i prevalencija 22

2.4.3.3. Ponašanje *Megatrypanum* tripanosoma u nosiocu 23

2.4.3.4. Posrednici 24

2.4.4. *Trypanosoma (Megatrypanum) theodori* 25

2.5. *T. rotatorium* i tripanosome u žaba 26
2.5.1. Povijest i razvojni ciklus 26
2.5.2. Rasprostranjenost i prevalencija 27
2.5.3. Morfologija i klasifikacija 27
2.5.4. Ponašanje *T. rotatorium* u nosiocu 29
2.5.5. Posrednici 30
2.6. *In vitro* uzgoj bičaša podroda *T. (Megatrypanum)* i *T. rotatorium* 32
2.6.1. Izolacija i uzgoj tripanosoma 32
2.6.2. NNN-hranjiva podloga (NNN-kosi krvni agar) 33
2.6.3. Tekuće hranjive podloge bez stanica 33
2.7. Proteomska analiza bičaša porodice Trypanosomatidae 37
3. OBRAZLOŽENJE TEME 38
4. MATERIJAL I METODE 40
4.1. Područje istraživanja 40
4.2. Podrijetlo uzoraka 40
4.3. Prikupljanje arhivskih uzoraka 40
4.4. Morfološka karakterizacija *T. rotatorium* 41
2.4.1. Bojanje arhivskih krvnih razmaza po Giemsi 41
2.4.2. Analiza morfometrijskih parametra 41
4.5. Statistička obrada podataka 42
4.6. *In vitro* uzgoj, vitalnost i morfologija izolata bičaša iz roda *Trypanosoma* u hranjivim podlogama 43
4.6.1. Priprema hranjivih podloga 43
4.6.1.1. BCAT 43
4.6.1.2. LIT 46
4.6.2. Uzgoj tripanosoma na hranjivim podlogama 46
4.6.2.1. Uzgoj tripanosoma na hranjivim podlogama na sobnoj temperaturi 46
4.6.2.2. Uzgoj tripanosoma na hranjivim podlogama na 37°C 47
4.6.3. Morfologija i vitalnost 47
4.6.3.1. Bojanje bičaša iz hranjive podloge po Giemsi 48

4.6.3.2. Provjera vitalnosti 48
4.7. Preoteomska analiza 49
4.7.1. Izolacija proteina iz bičaša roda *Trypanosoma* 49
4.7.2. Određivanje koncentracije proteina u lizatu 49
4.7.3. Dvodimenzionalna gel - elektroforeza 50
4.7.4. Izoelektrično fokusiranje – IEF 50
4.7.5. Ekvilibracija trakica IPG 52
4.7.6. Poliakrilamidna gel - elektroforeza – 2 DE 52
4.7.7. Bojanje gelova 53
4.7.8. Računalna analiza gelova i rezanje spotova 54
4.8. Spektrometrija masa 54
4.8.1. Priprema uzoraka za analizu na MALDI – TOF/TOF spektrometru masa 56
4.8.2. Analiza spektrometrom masa MALDI TOF/TOF 57
4.8.3. Identifikacija proteina uz pomoć baza podataka 58
5. REZULTATI 59
5.1. Morfološka karakterizacija *T. rotatorium* 59
5.2. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *T. melophagium* na 25°C u BCAT-u 62
5.3. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *T. melophagium* na 37°C u BCAT-u 62
5.4. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *T. melophagium* na 37°C u LIT-u 64
5.5. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *Trypanosoma* sp. iz jelena na 25°C u BCAT-u 64
5.6. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *Trypanosoma* sp. iz jelena na 37°C u BCAT-u 66
5.7. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *Trypanosoma* sp. iz jelena na 37°C u LIT-u 67
5.8. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *T. theileri* na 25°C u BCAT-u 67
5.9. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *T. theileri* na 37°C u BCAT-u 67
5.10. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *T. theileri* na 37°C u LIT-u 67
5.11. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *Trypanosoma rotatorium* na 25°C u BCAT-u 69
5.12. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *Trypanosoma rotatorium* na 37°C u BCAT-u i LIT-u 70

5.13. Vitalnost i *in vitro* uzgoj tripanosoma na 25°C u LIT-u 70
5.14. Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE) 72
5.15. Proteomska analiza bičaša podroda *T. (Megatrypanum)* 72
5.16. Proteomska analiza bičaša *T. rotatorium* 77
6. RASPRAVA 79
6.1. Morfologija *T. rotatorium* 79
6.2. *In vitro* uzgoj tripanosoma 80
6.3. Urin kao alternativni dodatak u hranjive podloge 84
6.4. Usporedba BCAT-a i LIT-a 86
6.5. Proteomska analiza 87
7. ZAKLJUČCI 89
8. POPIS LITERATURE 90
9. ŽIVOTOPIS 117
10. PRILOZI 126

1. UVOD

Tripanosomoze su važne životinjske i ljudske bolesti uzrokovane parazitskim protozoonima, bičašima iz roda *Trypanosoma,* porodice Trypanosomatidae. Pojedine vrste iz toga roda predstavljaju ogroman problem u svijetu uzrokujući veliku smrtnost u ljudi i velike ekonomske gubitke u životinja (BARRETT i sur., 2003.). Pripadnici roda *Trypanosoma* svrstani su u nekoliko podrodova. Primjerice, vrste nađene kod preživača smještene su u podrod *Trypanosoma (Megatrypanum)*, a vrste nađene u žaba u podrod *Trypanosoma (Trypanosoma)* (HOARE, 1964.; 1972.). Vrste podroda *T. (Megatrypanum)* spadaju u kompleks filogenetski srodnih vrsta i genotipova koji su prošireni po cijelom svijetu.

Sve vrste iz roda *Trypanosoma* opisivane su iz krvnih razmaza i to na temelju morfoloških osobina i morfometrijskih parametara krvnih oblika (HOARE, 1972.). Neke vrste su strogo monomorfne, dok su druge morfološki raznolike. Morfološka raznolikost (polimorfizam) tripanosoma opisuje postojanje dva ili više fenotipa unutar biološke vrste, što nam dokazuje velika raznolikost oblika tripanosoma nađenih u nosioca i posrednika, tj. vektora.

Zbog problema u klasifikaciji žabljih tripanosoma na temelju morfoloških osobina, tripanosome žaba svrstane su *T. rotatorium* kompleks (BARDSLEY i HARMSEN, 1973.).

Za istraživanje antigenih komponenata, metaboličkih i biokemijskih puteva te osjetljivosti tripanosoma na lijekove pojavilo se zanimanje za uzgoj tripanosoma umjetnim putem, na hranjivim podlogama, još na početku 20.-og stoljeća. U hranjivim podlogama krvni oblici tripanosoma obično promijene svoj oblik u oblik karakterističan za posrednika. S obzirom da postoje morfološke, biokemijske i metaboličke razlike između krvnih oblika tripanosoma i tripanosoma koje se nalaze u posredniku, cilj je bio proizvesti takvu podlogu koja će podržavati rast krvnih oblika (SCHUSTER i SULLIVAN, 2002.).

Do sada je razvijen velik broj različitih vrsta hranjivih podloga za *in vitro* uzgoj tripanosoma koje podržavaju uzgoj razvojnih stadija prisutnih u posredniku i nosiocu (TAYLOR i BAKER, 1988.; ATLAS, 1997.). Osim uzgoja *in vitro*, koji je temelj za dobivanje dovoljnih količina parazita, za istraživanje antigenskih komponenata se koristi i proteomska analiza parazitskih oblika.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Općenito o tripanosomama

Tripanosome sisavaca podijeljene su na temelju načina prijenosa u dvije velike skupine, sterkorarija (grupa A) i salivarija (grupa B) (HOARE, 1972.). U vektoru iz grupe salivarija, ce-ce muhi (*Glossinidae*), nakon hranjenja na invadiranom nosiocu i uzimanja tripanosoma zajedno s krvnim obrokom, odvija se ciklički razvoj bičaša do invazivnih, metacikličkih stadija. Nakon završenog razvoja u vektoru, za vrijeme ponovnog hranjenja, tj. ubadanja, vektor te metacikličke oblike prenese na novog nosioca. U skupinu salivarija spadaju vrste podrodova *Dutonella, Nannomonas, Trypanozoon* i *Pycnomonas*.

Skupina sterkorarija, je nasuprot tome, karakterizirana kontaminativnim prijenosom. Nakon hranjenja posrednika na nosiocu koji je invadiran s tripanosomama, one prolaze ciklički razvoj unutar crijeva insekta. Metaciklički oblici nalaze se unutar crijeva insekta i izlučenom izmetu. Tijekom pregrizanja posrednika dolazi do kontaminacije sluznice usne šupljine s izmetom posrednika. Metaciklički oblici tripanosoma dospijevaju u krvožilni sustav prodiranjem kroz usnu sluznicu. S obzirom da mnogi posrednici iz skupine sterkorarija izlučuju izmet tijekom krvnog obroka, može isto tako doći do kontaminacije i lizanjem ubodnog mjesta. Nadalje, moguće su i invazije putem drugih sluznica (oko, vagina).

Pripadnici mnogobrojne skupine sterkorarija, pripadaju podrodovima *Schizotrypanum, Herpetosoma* i *Megatrypanum*, te su osim uzročnika Chagasove bolesti, *Trypanosoma (Schyzotrypanum) cruzi*, apatogene za svoje nosioce. Iznimku čini *Trypanosoma. theileri* koja može biti uvjetno patogena.

Podrod *T. (Megatrypanum)* kojem pripadaju *T. melophagium*, *T. theileri* i vrste tripanosoma iz cervida, predstavlja mnogobrojnu i heterogenu skupinu velikih tripanosoma sisavaca. Vrste mogu biti dugačke i do 81 μm (*Trypanosoma ingens*). Pored dužine, tipična odlika tripanosoma je da imaju kinetoplast smješten bliže jezgri nego zašiljenom stražnjem kraju tijela (HOARE, 1964.). Većina vrsta je nedovoljno istražena. Isto tako, nije u potpunosti poznato ponašanje i razmnožavanje u nosiocu, kao i podaci o posrednicima. Vrste podroda *Megatrypanum* smatraju se filogenetski

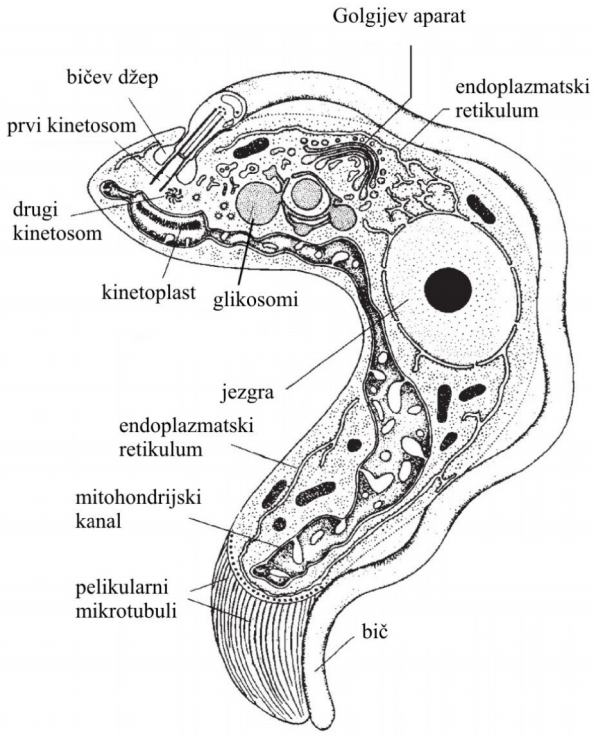
najstarijim vrstama tripanosoma sisavaca, među ostalim i zbog njihovih zajedničkih karakteristika s tripanosomama ptica, gmazova i vodozemaca.

Nasuprot spomenutim načinima prijenosa, kod kojih postoji ciklički razvoj u posredniku, postoji i mehanički način prijenosa. Nakon što je posrednik sisao krv na invadiranom nosiocu, na usnom aparatu mogu zaostati prikačene tripanosome. Ako isti posrednik u kratkom vremenu siše krv na drugome nosiocu može prenijeti tripanosome zaostale u usnom aparatu.

Kod skupine salivarija taj način prijenosa ima veće značenje. Neke vrste iz skupine salivarija (npr., *T. evansi*) isključivo se prenose mehaničkim prijenosom (HOARE, 1972.).

2.2. Stanična građa bičaša iz razreda Kinetoplastida

Vrste razreda Kinetoplastida parazitiraju u različitim živim organizmima - od biljnih pa sve do ljudskih. Karakteristika članova ovog razreda je veliki mitohondrij u tijelu, tzv. kinetoplast, koji se u histološkim preparatima boji tamno. Kinetoplast se nalazi na bazi biča iza kinetosoma. Tijekom cijelog razvojnog ciklusa parazita ostati će, u većoj ili manjoj mjeri, zajedno s okolnim dijelovima mitohondrija povezan s kinetosomom. Kinetoplast je organela koji se nalazi unutar mitohondrija i ima oblik diska. Sadrži DNA (tzv. kDNA) koja je organizirana u mrežu povezanih krugova što se razlikuje od organizacije DNA u kromosomima. U mreži kinetoplasta nalazi se i do 20 tisuća malih krugova (mini-krugova) te 20-50 većih krugova (maksi-krugova). Na slikama dobivenim pomoću elektronskog mikroskopa ne uočava se fizička povezanost kinetosoma i kinetoplasta, a priroda njihove povezanosti je nepoznata. Citoskelet (stanični kostur) kinetoplastida sastoji se od mikrotubula pravilno poredanih ispod plazmine ovojnice. Druge osobine su poveći bičev džep, rešetkasti kristalni paraksijalni štap duž aksoneme s kratkim izdancima kojima se povezuje s aksonemskim mikrotubulima, zatim undulirajuća membrana (ovisno o vrsti) i ponekad prominirajući glikokaliks ili površinski omotač koji je vidljiv elektronskim mikroskopom. Glikosomi – su organeli u kojima se odvija proces glikolize (Slika 1).



Razlika između pojedinih rodova očituje se u njihovoj rasprostranjenosti u različitim nosiocima, razvojnom ciklusu te medicinskom i veterinarskom značaju.

Razlikujemo dvije porodice: *Bodonidae* (red: *Bodonida*, koprozoični i slobodno živući ili paraziti riba i beskralježnjaka) i *Trypanosomatidae* (red: *Trypanosomatida*) od kojih su neki pripadnici izrazito važni patogeni u ljudi i životinja.

Slika 1. Shematski prikaz građe bičaša iz roda *Trypanosoma* (ROBERTS i sur., 2004.).

2.2.1. Oblici tijela bičaša iz porodice Trypanosomatidae

Vrste koje spadaju u porodicu *Trypanosomatidae* imaju jednu jezgru te su izduženog oblika tijela s jednim bičem ili su okrugli s vrlo malim, neprominirajućim bičem. Veliki broj pripadnika ove porodice su heterokseni, odnosno tijekom jednog životnog stadija žive u krvi i/ili vezivnom tkivu kralježnjaka, a tijekom drugog u crijevu hematofagnih insekata (insekata koji sišu krv). Zbog toga što je za njihov uzgoj potrebno osigurati laboratorijske podloge koje sadrže krv zovemo ih krvnim bičašima.

Većina populacije je najvjerojatnije skupina klonova. Naime, spolni način razmnožavanja nije zamijećen rutinski, ali postoje neki indirektni dokazi koji ukazuju na spolnu razmjenu genetskog materijala.

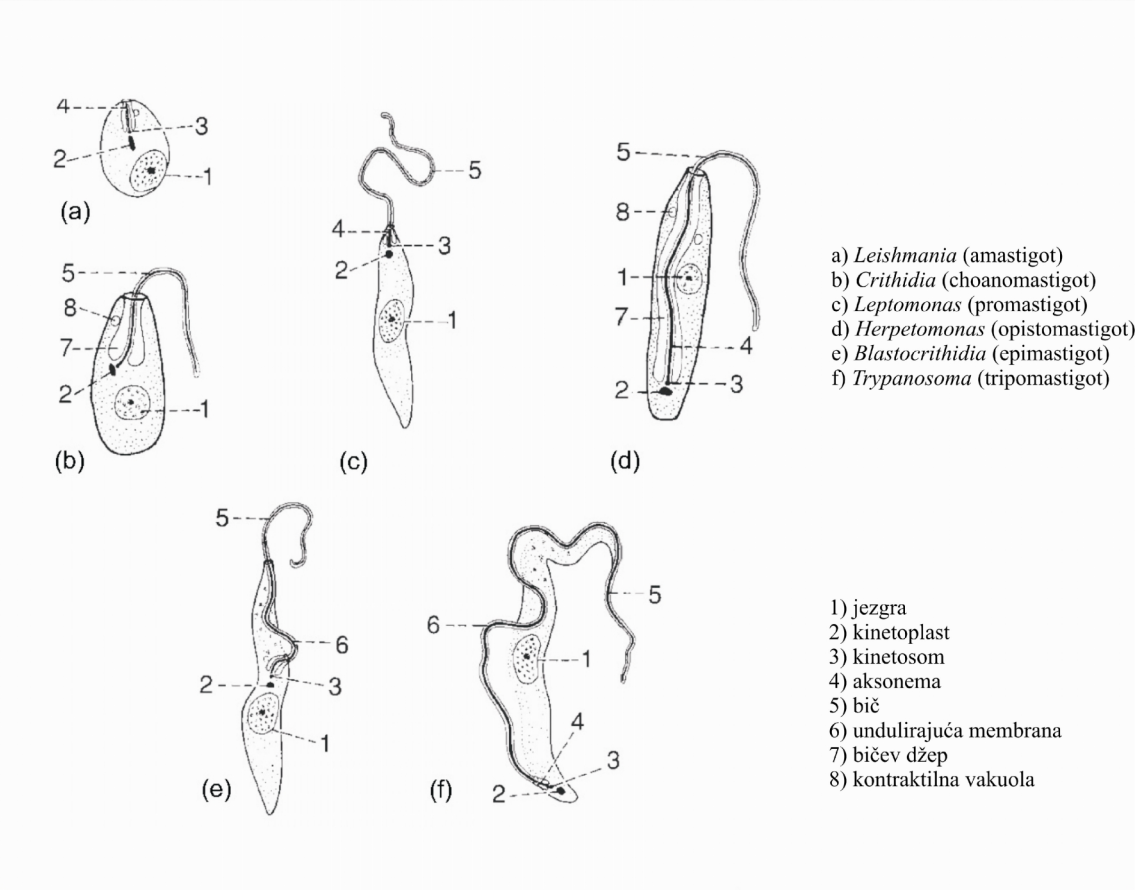
Postoji mogućnost da su tripanosomatidi originalno parazitirali u probavnom traktu insekata i pijavica. Međutim, znanstvenici su predložili alternativni scenarij u kojem su kralježnjaci originalni nosioci. Iako su neke vrste još uvijek monoksene, odnosno parazitiraju unutar jednog artropodnog nosioca, većina tripanosomatida je heteroksena

te prolazi kroz različite morfološke oblike koji ovise o njihovom razvojnom ciklusu i nosiocu u kojem parazitiraju. U prošlosti su oblici dobivali naziv prema rodovima u kojima najčešće parazitiraju, npr. leptomonadni oblik za rod *Leptomonas*, no danas koristimo nazivlje s obzirom na mjesto kinetoplasta i jezgre. Razlikujemo više različitih morfoloških oblika (Slika 2).

Tripomastigotni oblik karakterističan je za krvne oblike roda *Trypanosoma* te za invazivne metacikličke oblike u posredniku. Kinetoplast i kinetosom nalaze se blizu zadnjeg kraja tijela. Bič se pruža uzduž cijele površine tijela i završava kao slobodan na početku tijela. Membrana biča usko je povezana s površinom tijela. Kada se bič pomiče, stvara nabor na površini tijela čineći tako undulirajuću membranu. Drugi kinetosom nema bič pa ga se naziva „golim" kinetosomom. On se često može pronaći u blizini prvog kinetosoma - bičevog kinetosoma. Kod krvnog oblika tripomastigota iz kinetoplasta izlazi jednostavni mitohondrij s tubularnim kristama ili bez njih. Međutim, u razvojnom stadiju u insektu, mitohondrij je znatno veći i složenije građe (posjeduje lamelarne kriste). Na bazi biča se nalazi bičev džep, koji okružuje kinetosom. Tijelo tripomastigota je okruženo sustavom pelikularnih mikrotubula smještenih ispod stanične membrane. Grubi endoplazmatski retikulum je dobro razvijen. Golgijev aparat je smješten između jezgre i kinetosoma. Razlika između ostalih tipova oblika tijela tripanosoma očituje se u obliku, mjestu položaja kinetosoma i kinetoplasta, razvijenosti biča i obliku bičevog džepa. **Sferični amastigotni oblik** karakterističan je za vrste roda *Leishmania,* no može se pronaći i u razvojnom ciklusu drugih vrsta. Amastigotni oblici *Leishmania* veličine su svega 2-3 mikrona i predstavljaju jedne od najmanjih eukariotskih stanica. Posjeduju vrlo kratak bič koji blago prominira izvan bičevog džepa. U **promastigotnom obliku** bič je ispružen prema naprijed kao funkcionalna organela. U blizini prednjeg kraja tijela, ispred jezgre, smješteni su kinetosom i kinetoplast. Promastigotni oblici pronađeni su u različitim posrednicima vrsta kada se radi o diksenim, odnosno različitim nosiocima kada se radi o monoksenim bičašima. Dobar primjer toga su vrste roda *Leptomonas*. **Hoanomastigotni oblik** je specifičan po tome što bič izlazi kroz široki bičev džep oblika ovratnika. Ovakav oblik tijela pronađen je u nekih vrsta iz roda *Crithidia.*

Epimastigotni oblik javlja se u nekim razvojnim ciklusima. Kinetoplast i kinetosom su smješteni između jezgre i prednjeg dijela tijela, kratka undulirajuća membrana leži

uzduž proksimalnog dijela biča. Javlja se kod rodova *Crithidia* i *Blastocrithidia* koji su paraziti insekata.



Slika 2. Shematski prikaz pojedinih rodova i oblika bičaša iz porodice *Trypanosomatidae* (ROBERTS i sur., 2004.).

Paramastigotni i opistomastigotni oblici nađeni su u bičaša roda *Herpetomonas*. Pripadnici ovoga roda čine veliku grupu parazita insekata, uglavnom muha (red *Diptera*). U paramastigota se kinetosom i kinetoplast nalaze iza jezgre, a u opistomastigota su smješteni između jezgre i stražnjeg kraja tijela. Undulirajuće membrane nema, bič prolazi cijelom dužinom tijela i završava na njegovom prednjem dijelu. Pripadnici roda *Herpetomonas* razmnožavaju se samo u promastigotnom obliku, a ostali oblici tijela javiti će se kada populacija dostigne maksimum brojnosti, kao npr. u *in vitro* hranjivim podlogama. Tripanosomatidi pokazuju izrazito složenu staničnu strukturu kada se promatraju pod elektronskim mikroskopom (Slika 2).

Razvojni ciklus tripanosomatida pokazuje varijacije s obzirom na vrste nosioca u kojima parazitiraju i vektore kojima se prenose. Razlike se očituju i u ponašanju

parazita u vektoru i nosiocu i samim stadijima razvoja životnog ciklusa u kojima se tripanosomatidi razmnožavaju. Razvojni ciklus pripadnika roda *Leptomonas* je najjednostavniji. Insekt je nosioc, a bičaši se razmnožavaju u crijevu insekta i to u promastigotnom obliku, te se prenose cistama koje nalikuju amastigotima. Vrste roda *Leishmania* razmnožavaju se u promastigotnom obliku u hematofagnim insektima (npr. papatači). Ponovnim hranjenjem invadiranog hematofagnog insekta na nosiocu, paraziti će u nosioca dospjeti regurgitacijom sadržaja usnog aparata insekta. U različitim tkivima nosioca će se razmnožavati kao amastigoti.

Pripadnici roda *Trypanosoma* pokazuju tijekom svog razvojnig ciklusa najveću raznolikost oblika. U crijevu posrednika (insekta, pijavice) se nalaze u epimastigotnom obliku u kojem se dijele. Invazivni (metaciklički) oblici mogu se pronaći u prednjem ili u stražnjem kraju crijeva ovisno o vrsti *Trypansoma* (ROBERTS i sur., 2004.).

2.3. *Trypanosoma grayi*

Vrsta *Trypanosoma grayi* koja dolazi u afričkog krokodila, predstavlja primjer za djelomičnu sličnost između vrsta podroda *Megatrypanum* i vrsta tripanosoma nižih kralježnjaka. Prilikom detaljnih istraživanja HOARE (1931.) je uspio opisati razvojni ciklus u posredniku. On je radio s laboratorijski uzgojenim izolatima ce-ce muha (*Glossina palpalis*) i krokodilima, te je dobio sljedeće rezultate: U krokodilu čak i nakon inokulacije mnogobrojnim metatripanosomama, *T. grayi* uzrokuje nisku parazitemiju, koja može trajati godinama, vjerojatno i doživotno. Simptomi bolesti se ne javljaju. U slobodnoj prirodi prevalencija je vrlo visoka, vjerojatno i do 100%.

Posrednik *Glossina palpalis* siše krv uglavnom na krokodilima te unatoč niskoj parazitemiji, gotovo uvijek s krvnim obrokom uzima i tripanosome. Nakon jednokratnog hranjenja na invadiranom krokodilu, prosječno je više od polovice ce-ce muha invadirano s *T. grayi.* Razvoj u posredniku započinje u srednjem crijevu. Nakon početnog sporijeg razmnožavanja, od trećeg do 14. dana izmjenjuju se faze brzog umnažanja s fazama rasta tripanosoma po dužini. Iz nejednakih dvojnih dioba mogu nastati epimastigoti i tripomastigoti. Najčešće se u srednjem crijevu nalaze epimastigotni oblici s jasno vidljivom undulirajućom membranom i slobodnim bičem. Pored toga, mogu nastati i amastigotni oblici te vrlo dugački tanki oblici. Zbog peritrofne membrane daljnji razvoj tripanosoma je kompliciraniji nego u ostalim posrednicima. Svoj razvoj *T. grayi* završava u prednjem kraju stražnjeg crijeva. Tu nastaju mali, svega 12-20 μm dugi epimastigoti te tripomastigoti s terminalno smještenim kinetoplastom. Krokodil se invadira s tim metacikličkim oblicima *per os* izmetom ce-ce muhe ili jedenjem cijele ce-ce muhe. Tripanosome prolaze kroz sluznicu usne šupljine i tako dospijevaju u krv. Nakon prepatentnog perioda od četiri dana moguće je dokazati velike tripomastigotne oblike u krvi krokodila.

2.4. Tripanosome podroda *Megatrypanum*

HOARE (1964.) je klasificirao unutar podroda *Megatrypanum* samo vrste tripanosoma koje invadiraju vrste sisavaca iz reda Artiodactyla. No, u njegovoj zadnjoj klasifikaciji tripanosoma sisavaca (HOARE, 1972.), još neke vrste tripanosoma su uključene u taj podrod, koji je zatim postao grupa tripanosoma s raširenošću u najvećeg broja nosioca. U sadašnje vrijeme podrod *Megatrypanum* (Stercoraria) obuhvaća vrste iz praktički svakog reda sisavaca, uglavnom Artiodactyla (vrste iz porodice Bovidae i Cervidae su najučestaliji nosioci) i Chiroptera (WELLS, 1976.). Morfologija je korištena kao ekskluzivni taksonomski kriterij za klasifikaciju vrsta tripanosoma iz podroda *Megatrypanum*, čiji članovi u krvi sisavaca imaju najduže krvne oblike s malim kinetoplastom smještenim vrlo blizu jezgre.

Vrste unutar toga roda su definirane temeljem svoje specifičnosti za vrstu. Temeljem morfologije i pretpostavke da su *Megatrypanum* spp. specifične za vrstu sisavaca ili najmanje bar invazivne za vrlo srodne vrste, svi izolati iz goveda su klasificirani kao *T. theileri.* Mnogi znanstvenici su je prije opisivali kao neovisnu vrstu koja se javlja u različitih vrsta ili pasmina iz porodice Bovidae ili u različitim zemljama, što je u konačnici rezultiralo značajnom sinonimnošću (WELLS, 1976.).

HOARE (1972.) je reklasificirao sve tripanosome iz goveda i bivola kao *T. theileri*. No, s obzirom na WELLSA (1976.), samo izolati iz goveda trebali bi se smatrati kao sinonimi *T. theileri*, dok svi ostali *Megatrypanum* izolati iz reda Artiodactyla koji nisu iz goveda, uključujući i one iz drugih vrsta, porodice Bovidae, s izuzetkom izolata iz koza i ovaca, trebali bi se nazvati *T. theileri*-slični. Tripanosome morfološki slične *T. theileri* su identificirane u najmanje 24 različite vrste preživača (SCHLAFER, 1979.). Značajna sličnost krvnih oblika *T. theileri* iz goveda s krvnim oblicima iz drugih nosioca reda Artiodactyla, te nedostatak izolata uzgojenih u hranjivim podlogama i bioloških podataka, sprečavaju konačno razlikovanje vrsta.

Uz *T. theileri* iz goveda, samo se *Trypanosoma. melophagium* (ovca) i *Trypanosoma. theodori* (koza) smatraju zasebnim vrstama koje se javljaju u porodici Bovidae, jer se specifičnost za nosioca i vektora dokazala eksperimentalnim unakrižnim invazijama.

Slično tome, nemogućnost invazije bovida tripanosomama koje invadiraju vrste životinja iz porodice Cervidae, *T. cervi* i *T. mazamarum* podržava teoriju zasebnih vrsta tripanosoma i razlikovanje od *T. theileri* (WELLS, 1976.)
Trenutna saznanja o većini vrsta iz roda *Megatrypanum* spp. koja invadiraju druge redove je ograničena na morfologiju krvnih oblika.

2.4.1. *Trypanosoma (Megatrypanum) melophagium*

2.4.1.1. Povijest i razvojni ciklus

Trypanosoma (*Megatrypanum*) *melophagium,* je apatogeni parazit domaće ovce *(Ovis aries)*, kojeg prenosi ovčja krpuša *(Melophagus ovinus)*. Ta tripanosoma je po prvi puta pronađena u ovčjih krpuša u Njemačkoj. Zbog nemogućnosti pronalaska nikakvih tripanosoma u krvi ovaca invadiranih s krpušama, mislilo se da je to monokseni tripanosomatid insekata, nazvan u to vrijeme *Crithidia melophagia.* (PFEIFER, 1905.). Po prvi puta je WOODCOCK (1910.) pronašao epimastigotne oblike tripanosoma u ovce invadirane s velikim brojem krpuša, te ih nazvao *Trypanosoma woodcocki*. Konačna povezanost tih tripanosoma u ovaca i tripanosoma iz ovčjih krpuša dokazana je ksenodijagnozom koristeći ovčje krpuše i ovce. Uspješnim invadiranjem ovaca sa sadržajem crijeva ovčjih krpuša, tada je napokon razjašnjen i razvojni ciklus. Izolati uzgojeni u hranjivim podlogama, dobiveni su iz ovčjih krpuša i krvi ovaca te je ta tripanosoma nazvana *Trypanosoma melophagium* (NÖLLER, 1917a.).
Razvoj ove tripanosome detaljno je istražio HOARE (1923.). Autor je opisao sve stadije parazita u posredniku osim tripomastigotnih stadija koji su potjecali iz krvnog obroka posrednika. Njihov opis je temeljio na opisima inicijalnog uzgoja tripanosoma iz krvi u hranjivim podlogama. Kao i u *T. grayi*, cjelokupni razvoj u posredniku se odvija unutar crijeva. Prvi razvojni stadiji, koji se mogu naći u srednjem crijevu, su tripomastigotni oblici koji potječu još od krvnog oborka, a nisu se stigli transformirati u epimastigotne stadije. Epimastigotni oblici nakon transformacije, su sa svojim bičevima prikačeni između mikrovila crijeva. Rjeđi su slobodni oblici, u vidu rozeta (nakupina poput cvijeta) ili ostali razvojni oblici poput amastigota ili promastigota. U stražnjem crijevu nakon mnogobrojnih dvojnih dioba, započinje razvoj metacikličkih oblika. Potonji su,

usporedno s krvnim tripomastigotnim oblicima (40-60 μm), vrlo mali (5.0 – 8.5 μm) i ne posjeduju izduženi usmjereni stražnji kraj. Kod kruškolikih metatripanosoma, relativno veliki i terminalno smješteni kinetoplast leži iza izdužene i centralno smještene jezgre. Slobodni bič ili je vrlo kratak ili u potpunosti nedostaje. Undulirajuća membrana isto tako nedostaje. Ovce se invadiraju *per os* prilikom pregrizanja ovčjih krpuša. Zbog svoje apatogenosti, *T. melophagium* je zapostavljena tijekom godina te od njezina otkrića do danas nitko nije izvijestio postojanje „karike koja nedostaje" tj. tripomastigotnih oblika u posredniku, a koji potječu iz krvi nosioca, dok nisu MARTINKOVIĆ i sur. (2012.) prvi izvijestili njihovo postojanje.

2.4.1.2. Rasprostranjenost i prevalencija

T. melophagium je rasprostranjena po cijelom svijetu, pojavljuje se isključivo u ovaca, a prenosi je ovčja krpuša (*Melophagus ovinus*). Određivanje prevalencije *T. melophagium* u ovaca zahtijeva specifične pretrage u vidu *in vitro* uzgoja u hranjivim podlogama, koje su jedina dokazana metoda dijagnostike ove vrste tripanosoma. Smatra se da se latentne invazije javljaju širom svijeta gdje su ovce invadirane s ovčjim krpušama. Distribucija ovčjih krpuša je po cijelom svijetu, tamo gdje ima i njezinog nosioca – ovce, osim u tropskim dijelovima gdje se mogu pronaći jedino u hladnijim predjelima (BEQUAERT i sur., 1952.; MEHLHORN i sur., 2001.). Prije pojave primjene sistemskih insekticida te s time i kontrole same pojavnosti ovčjih krpuša, moglo ih se pronaći invadirano s *T. melophagium* u umjerenim klimatskim dijelovima Europe (Njemačka, Engleska, Škotska, Nizozemska i Jugoslavija), Azije (Rusija, Kina), Afrike (Tunis i južna Afrika), Sjeverna Amerike (Kanada), Južna Amerike (Argentina i Brazil) i Australije (HOARE, 1923.; 1972.; TURNER i MURNANE, 1930.; KATIĆ, 1940.; MACKERRAS, 1959.; NELSON 1961.; BAKER, 1967.; LU, 1975.; COSTA i sur., 1983.). U današnje vrijeme se *T. melophagium* javlja u svim predjelima gdje krpuše nisu eradicirane insekticidima te je ta vrsta tripanosoma, zajedno s *T. theileri* u goveda najrasprostranjenija tripanosoma u preživača. U Hrvatskoj je prevalencija *T. melophagium* u ovčjih krpuša i do 100%. (MARTINKOVIĆ i sur., 2012.). No s obzirom na to da je u današnje vrijeme učestala primjena sistemskih insekticida, ovčje krpuše su relativno rijetke. Prije uvođenja efektivnih insekticida, ti paraziti su bili od veterinarskog značaja zbog lezija

na koži s posljedičnim dermatitisima u invadiranih ovaca te zbog njihove uloge u prijenosu određenih bolesti. U današnje vrijeme, zbog sve češće prisutnijeg ekstenzivnog načina uzgoja ovaca krpuše se polako vraćaju (SMALL, 2005.).

2.4.1.3. Posrednici

Općenito, vrste tripanosoma mogu biti prenesene različitim artropodima koji sišu krv, uključujući hemiptere, buhe i različite vrsta diptera kao što su glosinidi (ce-ce muhe), tabanidi (obadi), flebotomidi (papatači) i hipoboscidi (BAKER, 1967; HOARE, 1972; MOLYNEUX, 1977.). Hippoboscidae roda *Melophagus* i *Lipoptena* su poznate vrste beskrilnih insekata iz reda dvokrilaca (Diptera) kao posrednici *T. melophagium* (ovčja krpuša), *T. theodori* (kozja krpuša) i *T. cervi* (jelenja krpuša), ukratko vrsta tripanosoma koje sve pripadaju podrodu *T.* (*Megatrypanum).* Hipoboscidi drugih rodova su posrednici ptičjih tripanosoma i pretpostavlja se da su isto tako posrednici tripanosoma šišmiša (HOARE, 1972; BAKER, 1967; MANSFIELD, 1977; MOLYNEUX, 1977.; BÖSE i PETERSEN, 1991.; VOTÝPKA i sur., 2002).

Krpuša, *M. ovinus* je obligatni ektoparazit koji siše krv, pripada porodici Hippoboscidae, pupiparim, beskrilnim insektima, strogo povezanim za ovcu njihov cijeli razvojni ciklus i nesposobnim da prežive izvan svog nosioca. Ne postoje slobodno-živući stadiji, a prijenos se odvija prisnim tjelesnim kontaktom u stadima ovaca (SMALL, 2005.).

Iako uzrokuju jake invazije u ovčjih krpuša, *T. melophagium* je bezopasna za ovčju krpušu, a sam prijenos sa insekta na insekta se ne javlja (BAKER, 1967.; NELSON, 1981.).

2.4.1.4. Ponašanje *T. (Megatrypanum) melophagium* u nosiocu

T. melophagium je u vrijeme svojeg otkrića prvo poznata od razvojnih stadija u crijevu ovčje krpuše, a krvni oblici u prirodnih invazija su relativno nepoznati stoga što je parazitemija ekstremno niska u prirodno invadiranih ovaca (HOARE, 1972.). Pokušaji da se otkriju oblici u fazi diobe u krvotoku, različitim organima i unutar stanica bili su neuspješni. Skrivene invazije mogu se otkriti uzgojem pune krvi ili limfocita na

hranjivim podlogama (HOARE, 1923.; TURNER i MURNANE, 1930.; NALBANTOĞLU i KARAER, 2008.).

Dokaz o povezanosti između *T. melophagium* i ovčjih krpuša je prikazan eksperimantalnim invazijama krpuša koje su se hranile na invadiranim ovcama, kao i invazijama ovaca hranjenih s invadiranim krpušama. Invazija ove vrste nastupa kada ovca pojede ili zdrobi invadiranu krpušu, oslobađajući pri tome metacikličke tripomastigote iz crijeva, koji ulaze u krv kroz usnu sluznicu. Pokušaji invazije janjadi stavljanjem suspenzije metacikličkih tripomastigota iz ovčjih krpuša na ozlijeđenu kožu nisu rezultirali pozitivnom invazijom. Čini se da *T. melophagium* može biti također prenesena i kongenitalno (HOARE, 1923.; 1972.; WELLS, 1976.). U eksperimentalno invadiranih ovaca, krvni tripomastigoti mogu se ustanoviti u trajanju od oko 3 mjeseca nakon invazije i onda najednom, prirodno nestanu. Imunost nije dugotrajna u prirodnim uvjetima, a reinvazije su učestale. Visoka parazitemija može se vidjeti u splenektomiziranih ovaca, što ukazuje na potencijalnu patogenost. *T. melophagium* u imunokompromitiranih životinja, kao što je poznato i za *T. theileri* u goveda (HOARE, 1972.; MANSFIELD, 1977.; BÜSCHER i FRIEDHOFF, 1984.; VILLA i sur., 2008.).

2.4.1.5. Vrsna specifičnost *T. (Megatrypanum) melophagium* za nosioca i posrednika

Između vrsta tripanosoma podroda *Megatrypanum* koje invadiraju Bovidae, samo su *T. melophagium* i *T. theodori* sigurno izdvojene od *T. theileri* u goveda. Ona je tipičan predstavnik podroda *Megatrypanum*, te se prenosi obadovima. Pri izdvajanju tih dviju vrsta može se uzeti u obzir i mala morfološka razlika i uglavnom, nedostatak unakrižne invazije nosioca u prirodnim uvjetima, nemogućnost unakrižne invazije pokusnih životinja te vrsna specifičnost ovčje krpuše i kozje krpuše za nosioca (HOARE, 1972.; WELLS, 1976.).

Prevalencija, distribucija te specifičnost za nosioca i posrednika također potječu iz istraživanja napravljenih bez molekularne dijagnostike i taksonomskih alata (HOARE, 1923.; 1972.; BAKER, 1967.; MOLYNEUX i sur., 1975.; 1978.; BÜSCHER i FRIEDHOFF, 1984.; NALBANTOĞLU i KARAER, 2008.). Ograničeni broj uzoraka i provedena istraživanja temeljena na tradicionalnim taksonomskim pristupima su omela

procjenu stvarne genetske raznolikosti, te genotipova povezanih s nosiocem i filogenetske odnose vrsta podroda *T. (Megatrypanum*).

Nakon dugo vremena, bez ikakvih naznaka postojanja, *T. melophagium* je pronađena u domaće ovce u Turskoj (NALBANTOĞLU i KARAER, 2008.) i u krpuša pronađenih na divljim ovcama u Škotskoj. Samo je izolat iz Škotske imao parcijalnu sekvencu SSU rRNA i SL gena i uspoređen je s *T. theileri* iz goveda i srodnih vrsta iz jelena. Zbog rezultata koji su priopćili malu razliku u sekvencama, autori su opisali tu tripanosomu kao tripanosomu zasebnog porijekla od *T. theileri*, koja se privikla da postane ovisna o prijenosu krpušama, te s time postala specifični parazit ovaca (GIBSON i sur., 2010.). Nedavno je istražena kompleksnost unutar podroda *T.* (*Megatrypanum)* filogenetskim analizama SSU rRNA, ITS rDNA, gGAPDH, SL i Cathepsin L-like (CATL) sekvenci.

U istraživanju MARTINKOVIĆA i sur., (2012.) provedena je klasifikacija *T. melophagium* s obzirom na morfologiju u prirodno invadiranim ovčjim krpušama i hranjivim podlogama te njegovo pozicioniranje u filogenetskom stablu temeljeno na SSU rRNA i gGAPDH genima. Temeljem analize slijeda nukleotida u genima SSU rRNA, ITS1 rDNA, i SL evaluirana je i vrsna specifičnost za nosioca filogenetskim odnosom s tripanosomama iz drugih vrsta preživača podroda *T.* (*Megatrypanum)*.

2.4.2. *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*

2.4.2.1. Povijest i razvojni ciklus

Trypanosoma (Megatrypanum) theileri je tipična vrsta koja predstavlja podrod *Megatrypanum* i prva je primijećena, gotovo istodobno, u goveda u južnoj Africi od Laverana i istočnoj Africi od Brucea, 1902. godine (HOARE, 1972.; WELLS, 1976.). Već kratko nakon njezinog otkrića ova je tripanosoma dokazana i u Njemačkoj u goveda (HOARE, 1972.). Umnažanje u goveda odvija se nejednakom dvojnom diobom epimastigotnih stadija u perifernoj cirkulaciji (REICHENOW, 1940.), gdje su iz gotovo svih organa goveda izolirane tripanosome. Laboratorijske invazije su pokazale da se prijenos javlja prilikom ekskrecije metacikličkih tripomastigota izmetom obada, koji nakon toga ulaze u novog nosioca ili ubodnom ranom posrednika ili oštećenom kožom. Također, invazija nosioca može nastupiti prilikom ingestije izmeta ili posrednika od strane samog nosioca (BÖSE i sur., 1987.; BÖSE i HEISTER, 1993.).

Tripomastigoti *T. theileri* su relativno veliki, uglavnom 60–70 μm dugi, ali mogu biti kratki svega 25 pa sve do 120 μm (HOARE, 1972.). Ta vrsta ima dugi, usmjereni (pointed) stražnji kraj sa srednje velikim kinetoplastom ispred njega, te prominirajuću undulirajuću membranu i slobodni bič.

Na početku 20. stoljeća, gotovo istovremeno, znanstvenici su pretraživali obade. Jedni su autori zbog nedostatka podataka suzdržano opisivali što su našli, a drugi su bili uvjereni da su našli nove vrste monoksenih parazita. Tako su i nastali opisi novih vrsta kao što je *Crithidia haematopotae* (JEGEN, 1924.) i *Crithidia tabani*. NÖLLER (1916.) je zaključio da su obadi vjerojatni posrednici *T. theileri.* Izolirao je bičaše iz više vrsta obada. Bičaše iz obada *Tabanus glaucopis* smatrao je „stadijima u mirovanju“ od vrste *Crithidia subulata*, koje je LEGER (1904.) opisao iz iste vrste obada. NÖLLER nije smatrao bičaše monoksenima, već je smatrao da su to metaciklički stadiji *T. theileri* u posredniku. Bičaše izolirane iz obada, u kulturi nije mogao razlikovati od *T. theileri*. Točan opis oblika iz kulture dao je NÖLLER (1917a.).

2.4.2.2. Rasprostranjenost i prevalencija

Ova vrsta je kozmopolitski parazit goveda s visokom incidencijom na svakom kontinentu osim Antarktika (HOARE, 1972.; WELLS, 1972.). PETRICH (1976.) je dokazao prevalenciju od 46% u goveda u sjevernoj Njemačkoj. Osim nosioca domaćeg goveda, ostali nosioci mogu biti: Zebu govedo (*Bos indicus*), europski bizon (*Bison bosanus*) i vodeni bivol (*Bubalus bubalus*). Također je ista tripanosoma pronađena i u različitih afričkih antilopa (HOARE, 1972.).

HERBERT (1964.) je zabilježio 65 slučajeva *T. theileri* na svim kontinentima. WELLS (1976.) i SCHLAFER (1979.) su revidirali i osvježili podatke o pojavnosti *T. theileri* u cijelom svijetu. Nakon tih preglednih radova *T. theileri* je i dalje pronalažena u goveda u Europi (VERLOO i sur., 2000.; GRECO i sur., 2000.), Africi (TARIMO-NESBITT i sur., 1999.), sj. Americi (KENNEDY, 1988.; FARRAR i KLEI, 1990.) i Aziji (SAMAD i SHAHIDULLAH, 1985.).

U južnoj Americi, ova vrsta je opisana u Argentini, Urugvaju, Kolumbiji i Brazilu gdje je nakon svog prvog opisa (cit. HERBERT, 1964.), i dalje sporadično pronalažena (OGASSAWARA i sur., 1981.).

Nasuprot opisima *T. theileri* u goveda, postoji samo nekoliko zabilježenih slučajeva bivola. Taj parazit je po prvi puta opisan početkom 20. stoljeća u azijskog bizona (*Bubalus bubalis*-vodenog bivola) na Filipinima i u Indiji. Ta vrsta je 1958. godine opisana po prvi puta u afričkih bivola (*Syncerus caffer*) u Keniji (cit. u HERBERT, 1964.; WELLS, 1976.). Nakon toga je *T. theileri* sličan parazit zabilježen u vodenih bivola iz Indonezije (SISWANSYAH i TARMUDJI, 1989.) i Brazila (NUNES i OSHIRO, 1986.).

2.4.2.3. Ponašanje *T. (Megatrypanum) theileri* u nosiocu

Niti razvojni ciklus *T. theileri* unutar sisavca niti njegov odnos prema nosiocu do sada nisu u potpunosti razjašnjeni. Ova vrsta se u krvi razmnožava binarnom diobom u epimastigotnom obliku (REICHENOW, 1940.). Osim epimastigota i velikih tripomastigota u perifernoj cirkulaciji, bičaše su također pronađeni u limfnim čvorovima, bubrezima, slezeni i mozgu (TIZARD, 1980.; SUDARTO i sur., 1990.;

BRAUN i sur., 2002.). Iako su „amastigotima slični“ oblici opisani u goveđim staničnim kulturama limfocita (GRIEBEL i sur., 1989.), postojanje intracelularnih oblika *T. theileri* u tkivu prirodno invadiranih kralježnjaka nije do sada pronađeno. Detektabilna parazitemija je uglavnom posljedica neke druge bolesti, što upućuje na to da je imunosni sustav nosioca uključen u kontrolu parazita (TOWNSEND i DUFFUS, 1982.). Iako generalno smatrana apatogenom, opisani su brojni slučajevi bolesti koji ukazuju na to da bi se *T. theileri mogla* smatrati potencijalno patogenom. Postoji korelacija *T. theileri* s limfocitozom (SCHLAFER, 1979.) te u tom slučaju aktivacija faktora virulencije u prisutnosti nekih interkurentnih infekcija, stresa, poroda ili slabog hranidbenog stanja (RISTIC i TRAGER 1958.; KINGSTON i sur., 1982b.; KALRA i sur., 1984.; WARD i sur., 1984.; HUSSAIN i sur., 1985.; DOHERTY i sur., 1993; SEIFI, 1995.).

Isto tako, *T. theileri* može uzrokovati i pobačaje (KINGSTON i sur., 1981.; 1982b.; LEVINE i sur., 1987.; LANEVSCHI-PIETERSMA i sur., 2004.; MATSUMOTO i sur., 2011.). Krave prirodno invadirane s *T. theileri* pate od povećane opasnosti od pobačaja (47%, nego ineinvadirane (2,5%) (KINGSTON i sur., 1982b.).

Smatra se da je vertikalni prijenos uzrokovao tripanosomozu u 3 dana starog telića bivola koji je bio invadiran s *T. theileri* (LANEVSCHI-PIETERSMA i sur., 2004.).

Bolest ili čak i uginuće kao posljedica invazije je češće povezano sa stresiranim govedima ili konkomitantnim infekcijama, kao što je to goveđa leukoza. (CARMICHAEL, 1926.; CROSS i sur., 1971.; MAMMERICXS i DEKEGEL, 1975.; MATSUMOTO i sur., 2011.; VAIRAMUTHU i sur., 2011.). *T. theileri* je također povezana s upalnim stanjima kao što je to peritonitis ili submandibularni edemi. (CROSS i sur., 1971.; MURALEEDHARAN i sur., 1985.; LANEVSCHI-PIETERSMA i sur., 2004.; SOOD i sur., 2011.).

Invazija s *T. theileri* u bovida može trajati godinama bez ikakvih kliničkih simptoma, te se ne može se dijagnosticirati u krvnim razmazima, čak i prilikom korištenja mikrohematokrit metode. Izolacija *T. theileri* iz krvi inokulacijom u laboratoriju u laboratorijske glodavce je isto tako isključena zbog specifičnosti za vrstu nosioca.

Obično invazija prolazi inaparentno i samo dovodi do niske parazitemije. Pojavljuje se u područjima umjerene klime sa sezonalnim varijacijama s vidljivim maksimumom vrijednosti za vrijeme ljeta (BEHN, 1910.; KNUTH 1910.; SAISAWA, 1933.; WELLS,

1971.) Dokazano je i višegodišnje trajanje invazije (WELLS, 1971.) Invazije životinja s *T. theileri* javljaju se u životinja svih dobnih kategorija, no u mladih životinja nešto rjeđe (KNUTH, 1910.; PETRICH, 1976.). Životinje držane isključivo stajskim načinom držanja obično nisu invadirane (PETRICH, 1976.).

Do sada, dijagnostika ove vrste se temelji na izolaciji u hranjivim podlogama, što relativno kompliciranо, zahtijeva određeni vremenski period i što je skupo. Ne postoji razvijena serološka dijagnostika za *T. theileri*.

2.4.2.4. Posrednici

2.4.2.4.1. Obadi

Posrednici *T. theileri* su uglavnom insekti pripadnici reda dvokrilaca (Diptera). Smatra se da su od svih mogućih posrednika, oni najznačajniji posrednici.

Postoje mnogobrojni izvještaji o nalazu bičaša u obada (Tabanida). S obzirom da se radilo o uhvaćenim jedinkama često su postojale dvojbe o etiologiji invazije. Tako većina autora nije mogla razlučiti radi li se o monoksenim tripanosomatidima ili o razvojnim stadijima tripanosoma sisavaca. Pri tome se moglo raditi o dva ili tri roda *Trypanosoma* prisutna u obada iz porodice Trypanosomatidae (WALLACE, 1962.).

Kod roda *Crithidia* radi se o monoksenim parazitima obada i ostalih člankonožaca pri čemu nema mogućnosti zamjene s drugim tripanosomatidima. U crijevu obada, paraziti se nalaze ili slobodni u lumenu ili prikačeni za epitel. Mali hoanomastigotni stadiji vrsti iz roda *Crithidia* mogu se morfološki jednostavno razlikovati od stadija iz druga dva roda (WALLACE, 1966.).

Kod roda *Blastocrithidia* ponajprije monoksenih parazita, opisani su uglavnom epimastigotni oblici. Oni se ne mogu morfološki razlikovati od stadija iz roda *Trypanosoma* (WALLACE, 1962.; MOLYNEUX i ASHFORD 1983.). Također i *T. theileri*, pored metacikličkih oblika, tvori uglavnom epimastigotne oblike (HOARE, 1972.).

Sve vrste iz roda *Blasticrithidia* opisane u obada razvijaju se kao epimastigotni oblici, isto kao i vrste iz roda *Trypanosoma* koje parazitiraju i sisavaca. Pregled o nalazu bičaša i obada dao je WALLACE (1962.; 1966.). S obzirom na gore navedene razloge i zbog

djelomično potpunih i netočnih opisa nije moguće sve do sada pronađene bičaše svrstati u određeni rod ili vrstu, u Tablici 1 su izdvojena istraživanja u kojima autori navode nalaze bičaša.

Tablica 1. Bičaši pronađeni u obada

LEGER (1904.)	*Tabanus glaucopis Haematopota italica*	južna Francuska
PATTON (1909.)	*T. hilarius, Tabanus sp.*	Indija
KNUTH i RAUCHBAAR (1910.)	*H. pluvialis, Tabanus sp*	Njemačka
NOLLER (1916.)	*T. glaucopis, T. bromius*	Njemačka
	T. bromius	Poljska
JEGEN (1924.)	*H. pluvialis*	Švicarska
NOLLER (1925.)	*H. pluvialis*	Njemačka
NIESCHULZ (1931.)	*T. rubidus, T. striatus. T. rufiventris*	Java
KRANEVELD (1931.)	*T. sriatus, T. rubidus T. rufiventris, T. brunnipennis, T. basalis, H. javana*	Java
PACKCHANIAN (1957.)	*T. atratus, Chrysops sp.*	SAD
PAGE (1972.)	*Lepiselega crassipes*	Kolumbija
KRINSKY i PECHUMAN (1975.)	*Chrysops 10 spp., Hybomitra 7 spp, Tabanus 7spp.*	SAD
ELGER i BUSCHER (1984.)	*H. bimaculata, H. micans, Haematopota pluvialis, H. italica, H. Subcylindrica, T. maculicornis, T. bromius*	Njemačka

2.4.2.4.2. Krpelji

O nalazu bičaša u krpeljima postoji vrlo malo podataka. O'FARRELL (1913.) je opisao *Crithidia hyalommae* iz krpelja *Hyalomma aegypticum*, kao monoksenog parazita s transovarijalnim prijenosom. Opisao je razvojni ciklus s preflagelarnim, flagelarnim i postflagelarnim stadijima. CARPANO (1932.) je smatrao O'Farrelove opisane parazite tek stadijima *T. theileri* u posredniku. Naknadno se ne može zaključiti da li se ovdje radi stvarno o stadijima *T. theileri* ili o vrstama iz roda *Blastocrithidia*. Nakon nekog

vremena su pronađeni u razmazima hemolimfe epimastigotni i tripomastigotni oblici tripanosomatida (AESCHLIMANN i sur., 1979.). Autori su interpretirali taj nalaz kao slučajni nalaz i smatraju krpelje u svakom slučaju od malene važnosti u prijenosu *T. theileri*. Drugi autori (SCHASTRI i DESHPANDE, 1981.) su vidjeli i druge razvojne oblike te su stoga smatrali da se u tim slučajevima radi o cikličkom razvoju u krpeljima. SCHASTRI i DESPHANDE (1981.) proveli su u Indiji testove prijenosa s krpeljima. Dopustili su velikom broju laboratorijski uzgojenih krpelja hranjenje na odraslom biku s visokom parazitemijom. Jedan dio krpelja je nakon toga bio invadiran tripanosomama. Pozitivne krpelje su autori stavili na uši dvjema mladim telićima. Istovremeno je s/c inokulirana suspenzija krpelja koja je sadržavala tripanosome. Obadvije životinje su nakon nekog vremena bile invadirane s *T. theileri*. Pozitivan ishod invazije prikazan je kao dokaz razvoja metacikličkih stadija *T. theileri* u krpeljima.

MORZARIA i sur. (1986.) dokazali su u krpeljima *Hyalomma anatolicum anatolicum* tripanosomatide koji su morfološki sličili *T. theileri*. Pokusnim invazijama nisu uspjeli dokazati siguran prijenos na sve ispitivane životinje.

2.4.2.4.3. Ostali člankonošci

Već u svom prvom izvješću o otkrivenoj, novoj vrsti tripanosome, THEILER (1903.) je tvrdio da su posrednici krpuše iz porodice Hippoboscidae, te uspio i dokazati prijenos. NÖLLER (1925.) je opisao da je visoka prevalencija *T. theileri* i tamo gdje ima vrlo malo krpuša ili ih nema uopće. S obzirom da THEILER (1903.) nije isključio čisti mehanički prijenos, a nije koristio metode *in vitro* kultivacije za dijagnostiku u *T. theileri* u pokusnih životinja, postoji mogućnost da su posrednici već prije bili invadirani (WELLS, 1972.) pa su stoga rezultati smatrani dvojbenim, a kasnije i odbačeni.

U jednom istraživanju u sjevernoj Njemačkoj pronašli su ELGER i BUSCHER (1984.) tripanosomatide u jednoj od osam hipoboscida koje su skupili sa goveda.

Ostali člankonošci su opisivani vrlo rijetko kao potencijalni posrednici *T. theileri*. JEGEN (1924.) je opisao bičaše koje je pronašao u muha peckara *(Stomoxys calcitrans),* dok su MARSHALL i HERBERT (1979.) pokušali invadirati *S. calcitrans* preko hrane.

2.4.3. *T.(Megatrypanum)* tripanosome u cervida

Tripanosome skupine Sterkorarija koje su dokazane u cervida pripadaju podrodu *T. (Megatrypanum)* i morfološki sliče *T. theileri*. Stoga se opisane vrste u engleskom jeziku vrlo često nazivaju i *T. theileri*-sličnima (*T. theileri*-like) (D'ALESSANDRO i WELLS, 1971.; AYALA i sur., 1973.). Vrsta *Trypanosoma mazamarum* opisana je u mazama vrsta u južnoj Americi (MAZZA i sur., 1932; DEANE, 1961.). Morfološko razlikovanje između vrste *T. mazamarum* i *T. theileri* u goveda iz južne Amerike nije moguće. Te se stoga opisivanje vrste temeljilo samo na pojavnosti morfološki sličnih bičaša *T theileri* u neuobičajenih vrsta (HOARE, 1972.).

Trypanosoma mazamarum, pronađena u jelena roda *Mazama* u južnoj Americi je slična *T. theileri* (MAZZA i sur., 1932; HOARE, 1972). Zanimljivo je da unatoč pronalasku *T. theileri* i *T. theileri*-sličnih parazita u različitim nosiocima, nije bilo moguće unakrižno invadirati divlje ungulate s nepatogenim tripanosomama goveda i obrnuto, kao što je to bilo moguće napraviti u malih preživača s *T. theileri* (HOARE, 1972.; WELLS, 1976., BÖSE i sur., 1987a.; BÖSE i sur., 1987b.).

2.4.3.1.Povijest i razvojni ciklus

O *Megatrypanum* tripanosomama iz sjevernoameričkih cervida izvijestili su KINGSTON i MORTON (1975b.) gdje su iz kanadskog jelena *(Cervus canadensis)* izolirali tripanosome i proglasili ih novom vrstom, *Trypanosoma cervi.* Opis vrste utemeljili su na odstupanjima morfoloških karakteristika krvnih oblika od *T. theileri, T. mazamarum i T. ingens.* Osim toga pokušaji prijenosa pune krvi s invadiranih kanadskih jelena na goveda nisu urodili patentnom invazijom.

Temeljem morfoloških osobina vrste tripanosome pronađene iz crnorepog jelena *Odocileus hemionus*, (MATTHEWS i sur., 1977.), bjelorepog jelena *(O. virginianus)* (KINGSTON i CRUM, 1977.), sobova *(Rangifer tarandus)* (KINGSTON i sur., 1982a.) i losa *(Alces alces)* (KINGSTON i sur., 1981; KINGSTON i sur., 1985b.) navedeni autori proglasili su također *T. cervi.*

Tripomastigoti *T. cervi* su dužine od 25-30 pa do 60-70 μm (KINGSTON i MORTON, 1975b.). *T. cervi* se razlikuje od *T. theileri* u kraćem slobodnom biču, izraženijom

undulirajućom membranom i većom granuliranom jezgrom smještenom više prema stražnjem kraju tijela (KINGSTON i MORTON, 1975b.). Kinetoplast *T. cervi* je velik i obično je smješten marginalno i iza jezgre. I tripomastigoti *T. cervi* i *T. theileri* posjeduju izduženi usmjereni stražnji kraj.

2.4.3.2. Rasprostranjenost i prevalencija

Prvi dokaz tripanosoma iz skupine sterkorarija u cervida starog svijeta potječe od FRIEDHOFFA i sur. (1984.). Autori su dokazali *Megatrypanum* – tripanosome u jelena običnog *(Cervus elaphus),* jelena lopatara *(Cervus dama)* i u srna *(Capreolus capreolus)*. HOFFMANN i sur. (1984.) izolirali su iste tripanosome iz cervida istih vrsta i dali uvid u morfološke vrijednosti krvnih oblika. Rezultati nisu omogućili opisivanje novih vrsti kao što je to bio slučaj u *T. cervi,* jer su se tripomastigotni oblici tih triju vrsta jelenske divljači značajno razlikovali i nije bilo moguće odjeljivanje od *T. theileri*. S obzirom da su se morfološki podaci tripanosoma unutar jedne jelenje vrste značajno razlikovali, tj. bili su nehomogeni, smatrali su HOFFMAN i sur. (1984.) da morfometrija nije dostatna kao zasebno sredstvo za razlikovanje vrste.

Daljnji dokazi o *Megatrypanum* – tripanosomama u cervida u starog svijeta postoje u jelena i losa (KINGSTON i sur., 1985a.) te u srna (KINGSTON i BOBEK, 1985.) u Poljskoj.

KINGSTON i MORTON (1975b.) su pronašli tripanosome u kanadskog jelena (*Cervus elaphus canadensis)* u državi Wyoming u SAD-u i pri tome ju razlikovali od *T. theileri.* Nazvali su novu vrstu *Trypanosoma cervi*. Od toga vremena je *T. cervi* (KINGSTON i MORTON, 1975b.), pronađena u SAD-u u uzgajanih prerijskih bjelorepih jelena *(Odocoileus hemionus),* crno-repog jelena *(Odocoileus hemionus columbianus),* losa *(Alces alces shirasi),* bjelorepog jelena *(Odocoileus virginianus)* i u soba *(Rangifer tarandus)* (MORTON i KINGSTON, 1976.; KINGSTON i sur., 1975.; 1981.; 1982a.; 1985.; DAVIDSON i sur., 1985.; LEVINE i sur., 1987.; TELFORD i sur., 1991.). *T. cervi* je pronađena po cijelom svijetu u običnog jelena *(Cervus elaphus),* losa *(Alces alces),* jelena lopatara *(Dama dama),* i europske srne *(Capreolus capreolus)* (DIRIE i sur., 1990a.; WITA i KINGSTON, 1999.).

T. theileri je primarno pronađena u goveda *(Bos taurus),* no i ostali pripadnici porodice Bovidae mogu biti invadirani, kao što su bivol *(Bison bison)* i vodeni bivol *(Bubalus bubalis)* (KINGSTON i sur., 1986.; RODRIGUES i sur., 2003.; LANEVSCHI-PIETERSMA i sur., 2004.). Invazije u srna i europskog losa s *T. theileri*, te invazije s *T. theileri*-sličnim u jelena i antilope su zabilježeni, ali samo temeljem parazitske morfologije (HOARE, 1972.; WELLS, 1976.; SCHLAFER, 1979.; RODRIGUES i sur., 2003.; GIBSON i sur., 2010.; GARCIA i sur., 2011.; NEUMULLER i sur., 2012.).

Prije pojave genetskih metoda tripanosome su originalno identificirane prema morfologiji i/ili vrsti nosioca. Kada su identificirani genetski markeri i razvijena njihova primjena, pojavio se i točniji pristup identifikaciji tih bičaša (RODRIGUES i sur., 2010b.; GARCIA i sur., 2011.; AUTY i sur., 2012.).

Molekularne metode omogućile su detaljnije filogenetske studije tripanosoma, a integracija genetskih informacija i morfoloških osobina pomogla je usavršiti shvaćanja evolucijskih i taksonomskih odnosa (HAMILTON i sur., 2004.; RODRIGUES i sur., 2006.; 2010b.; GARCIA i sur., 2011.).

Iako morfološki iste, moguće je da su pronađene i identificirane tripanosome kao *T. cervi* u različitim nosiocima genetski različite, kao što je to poznato i u slučaju *T. theileri* iz goveda i bivola (RODRIGUES i sur., 2010a).

Temeljem dosadašnjih istraživanja ne može se reći i upitno je da li će se moći, jesu li pretraživani genotipovi ikako povezani s originalnom *T. cervi* KINGSTON i MORTON (1975b.) opisanom u prerijskog bjelorepog jelena i kanadskog jelena.

2.4.3.3. Ponašanje *Megatrypanum* tripanosoma u nosiocu

Dok za ostale tripanosome podroda *Megatrypanum* iz ostalih cervida ne postoje podaci o ponašanju u nosiocu, o *T. cervi* postoje nekakvi podaci.

Uobičajeno niska parazitemija je sezonskog karaktera kao i kod *T. theileri* s najvišim vrijednostima u ljetu (DAVIDSON i sur., 1983.; MORTON i KINGSTON, 1976.). Prilikom pretraživanja različitih organa kanadskog jelena pronađene su redovito tripanosome u slezenama i njihovi stadiji u diobi (KINGSTON i MORTON, 1975a.). Autori su pretpostavljali da se dioba odvija u tome organu. Također su opisani i epimastigotni oblici *T. cervi* u stadiju diobe u perifernoj cirkulaciji (KINGSTON i

CRUM, 1977.; MATTHEWS i sur., 1977.; KINGSTON i sur., 1975.) Iako se smatra *T. cervi* kao nepatogena za divlje cervide, smatrana je najvjerojatnijim uzrokom horoidnog pleksitisa u bjelorepog jelena u New Yorku (LEVINE i sur., 1987.). Patogene osobitosti *T. cervi* nisu poznate.

Dokaz vertikalnog prijenosa uključuje izvješća o invaziji različitih fetusa i novorođenčadi od invadiranih majki, kao što je to slučaj invazije fetusa iz pozitivne bijelorepe košute (KINGSTON i sur., 1981).

2.4.3.4. Posrednici

Vrste podroda *T.(Megatrypanum)* prenose artropodi. Obadovi se smatraju najvažnijim posrednicima *T. theileri*, a *T. cervi* isto se tako može prenesti vrstama iz te grupe (KRINSKY i PECHUMAN, 1975., FOIL, 1989.).

CLARK (1972.) je pronašao u Novom Meksiku (SAD) kod 11 pretraženih obada tripanosome s krvi nosioca u prednjem crijevu i samo tripanosome u stražnjem crijevu. Crnorepi jeleni *(O. hemionus)* iz istog područja su bili invadirani s tripanosomama. DAVIES i CLARK (1974.) pronašli su bičaše u 29 od 31 obada iz roda *Hybomitra*. Oblici u *in vitro* kulturama iz tih uzoraka nisu se mogli razlikovati od tripanosoma izoliranih iz cervida. Stoga su autori ustvrdili da su obadi posrednici tripanosoma kanadskog i crnorepog jelena u sjevernoj Americi. KRINSKY i PECHUMAN (1975.) pretražili su mnogobrojne vrste obada i SAD-u i utvrdili prevalenciju od 27%. Pronašli su u *in vitro* kulturama, među ostalim češćim oblicima i poneke tripomastigotne oblike i zaključili da ti oblici koji pripadaju rodu *Trypanosoma*, moraju potjecati ili od goveda ili od cervida. Obadi potrebuju vodeni ili vlažni okoliš za razvoj, a ekstremni vremenski uvjeti mogu ometati aktivnost imaga, te je stoga i sam značaj obada kao posrednika u vrlo toplim klimatskim podnebljima upitna. Drugo objašnjenje za invazije nosioca s tripanosomama je dugogodišnje trajanje latentne invazije (VAN HENNEKELER i sur., 2011.).

Za krpušu *Lipoptena mazamae* se implicira kao posrednika *T. cervi*, a uobičajeni je insekt koji siše krv na bjelorepom jelenu, antilopama, te ostalim egzotičnim jelenima i govedima centralne, južne Amerike i južnom dijelu SAD-a (DRUMMOND, 1966.; SAMUEL i TRAINER, 1972.; SAMUEL i sur., 2001.). Istraživanja u južnoj Floridi

pokazala su da je incidencija jelenjih krpuša bila niža u listopadu nego u mjesecu ožujku, lipnju i kolovozu, te da su pojačane oborine povećale njihov broj (SAMUEL i sur., 2001.). Činjenica je da bi klimatski uvjeti u južnom Teksasu mogli odgovarati bjelorepom jelenu kao rezervoaru tripanosoma i *L. mazamae* kao posredniku. Na tome podneblju bjelorepih jelena ima u velikom broju, a invazija bjelorepih jelena s jelenjim krpušama povećava se s njihovom starošću i same invazije su učestalije tijekom toplijeg vremenskog perioda (SAMUEL i TRAINER, 1972.).

KRINSKY i BURGDORFER (1976.) dokazali su tripanosome u krpeljima vrste *Amblyoma americanum* koji su potjecali s bjelorepog jelena *(O. virginianus),* no smatraju da krpelji nemaju neku značajnu ulogu u prijenosu tripanosoma. DAVIDSON i sur. (1983.) zaključno nisu mogli uspostaviti korelaciju između invazije bjelorepog jelena s krpeljima i tripanosomama. *T. theileri*-slični bičaši su pronađeni u populacijama krpelja *Rhicephalus microplus* u Argentini, Brazilu, and Meksiku, no prijenos na nosioca do sada još nije dokazan, a ni molekularna identifikacija nije napravljena (RIBEIRO i sur., 1988.; GAIDO i sur., 1989.; RODRIGUES i sur., 2003.; MARTINS i sur., 2008.).

2.4.4. *Trypanosoma (Megatrypanum) theodori*

T. theodori pronađena je u koze (*Capra hircus*). Kozja krpuša (*Lipoptena capreoli*), posrednik je *T. theodori*, te pripada isto kao i ovčja krpuša porodici *Hippoboscidae*. *L. capreoli* se pojavljuje na slijedećim područjima: Balkanski poluotok, Sirija, Izrael, Cipar, sjeverno-zapadna Indija. Sama pojavnost *T. theodori* je vezana za proširenost posrednika (HOARE, 1972.). Razvojni ciklus *T. theodori* sličan je onome *T. melophagium*. Inače, *T. theodori* uzrokuje inaparentne invazije. U eksperimentalno invadiranih koza, tripanosome su bile prisutne u krvi 3 tjedna nakon invazije. Trajanje invazije je kao i kod ovce ovisno o prisutnosti posrednika i reinvazija. Parazitemija je procijenjena na jednu tripanosomu u mililitru krvi (THEODOR, 1928.).

2.5. *T. rotatorium* i tripanosome u žaba

2.5.1. Povijest i razvojni ciklus

Tripanosome (Euglenozoa, Kinetoplastida, Trypanosomatidae) su ekstracelularni, krvni paraziti koji se mogu pronaći u svih kralješnjaka (HOARE, 1972.). Prenose ih hematofagni insekti i pijavice, koji imaju funkciju i nosioca i posrednika tripanosoma. Hematofagni insekti i krpelji uglavnom su posrednici tripanosoma sisavaca i ptica, dok su pijavice posrednici tripanosoma akvatičnih organizama (MARTIN i sur., 2002.).

Vodozemci spadaju u redove Anura i Caudata i dugo je poznato da mogu biti invadirani tripanosomama. Prve tripanosome u žaba su otkrivene 1842. godine u Europi u krvi zelene žabe (*Rana esculenta)* i nazvane *Amoeba rotatoria*. Godinu kasnije vrstu je preimenovao Gruby u *Trypanosoma rotatorium* i pri tome stvorio rod *Trypanosoma*.

Proučavanjem do onda opisanih literaturnih podataka, DIAMOND (1965.) je opisao 26 vrsta tripanosoma u žaba diljem svijeta. Kako je vrijeme prolazilo BARDSLEY i HARMSEN (1973.) su pažljivo proučili do tada opisanih 68 vrsta žabljih tripanosoma i većinu su smatrali nevažećima. Oni su predložili ključeve za identifikaciju vrsta koji su uključivali morfologiju, zemljopisno područje nosioca i posrednika, razvojni stadij i biokemijske osobine. MIYATA (1978.) nije to uzeo u obzir i prepoznao je 34 vrste, uključujući novih 6 baziranih na opisima morfologije.

U literaturi je prisutan veliki broj proturječnosti glede umnažanja tripanosoma u nosiocu, razlog tome je činjenica da je svaki autor radio s različitim izolatima i s različitim vrstama tripanosoma, a nisu mogli sa sigurnošću utvrditi o kojoj je vrsti riječ. Kod *T. rotatorium* opisana je kombinacija dvojne i mnogostruke diobe što se može uočiti u različitim fazama njezinog razvojnog ciklusa u nosiocu (FANTHAM i sur., 1942.). Umnažanje se odvija u koštanoj srži (TANABE, 1931.), bubrezima (IVANIČ, 1936.) te povremeno perifernoj krvi (FANTHAM i sur., 1942.). Dvojna dioba je prisutna tijekom početne faze invazije, a mnogostruka kasnije kod stalne invazije odraslih žaba (IVANIČ, 1936.).

Razmnožavanje tripanosoma u beskralježnjacima, tj. u pijavicama, odvija se dvojnom i mnogostrukom diobom u crijevu u kojem će se moći uočiti i različiti razvojni oblici. Tu se razvoj odvija ciklički, odnosno tripomastigotni oblici se naglo dijele u epimastigotne

oblike koji se kasnije preobraze u metatripanosome (NÖLLER, 1913.). Samo pojedini tripomastigotni oblici, nakon što budu krvnim obrokom uneseni u tijelo pijavice, se razviju dok ostali oblici degeneriraju neposredno nakon obroka (BUTTNER i BOURCART, 1955.).

Tripanosome punoglavaca morfološki se razlikuju od uobičajenih tipova izoliranih iz odraslih žaba (NÖLLER, 1917b.). Ova pojava nastaje kao posljedica djelovanja čimbenika okoliša u kojima živi punoglavac odnosno kojima je izložena odrasla žaba. Promjene koje nastaju tijekom metamorfoze nosioca budu najvjerojatnije u konačnici odgovorne za promjene morfologije. Na to ukazuje činjenica da tek metamorfozirane žabe imaju oblike tripanosoma karakteristične punoglavcima, dok ih odrasle nemaju (NÖLLER, 1917b.).

2.5.2. Rasprostranjenost i prevalencija

Tripanosome žaba su pronalažene na svim kontinentima (BARDSLEY i HARMSEN, 1973.): Kanadi i SAD-u (WERNER i WALEWSKI, 1976.; LEVINE i NYE, 1977.; WOO i BOGART, 1984.; BARTA i DESSER, 1984.), Kini i Japanu (MIYATA, 1978.; WERNER, 1993), Europi (BARTA i sur. 1989.; ZICKUS, 2002.) i Kostarici u centralnoj Americi (DESSER, 2001.), u južnoj Americi tripanosome vodozemaca pronađene su Venezueli, Kolumbiji, Argentini, Peruu i Brazilu (BARDSLEY i HARMSEN, 1973.).

2.5.3. Morfologija i klasifikacija

Temeljem morfoloških osobina i morfometrijskih parametara koji obuhvaćaju ukupnu duljinu tijela uključujući slobodni bič, opis undulirajuće membrane, oblik, širinu i duljinu jezgre, položaj kinetoplasta, te relativan odnos jezgre i kinetoplasta, opisivane su sve vrste tripanosoma (MARTIN i sur., 2002.).

Tripanosome vodozemaca iz različitih zemljopisnih područja i različitih vrsta nosioca mogu biti morfološki isti (BARDSLEY i HARMSEN, 1973.; WERNER i WALEWSKI, 1976.; REILLY i WOO, 1982b.; WOO i BOGART, 1984.; MARTIN i DESSER 1991a.; DESSER, 2001.; MARTIN i sur. 2002.).

Morfološka raznolikost (polimorfizam) podrazumijeva postojanje dva ili više fenotipa unutar biološke vrste. Na to nam kod tripanosoma ukazuje velika raznolikost oblika pronađenih u nosioca i posrednika. Istraživanja su pokazala da na morfološke osobine tripanosoma vodozemaca osim vrste nosioca, koja predstavlja samo jedan od čimbenika, mogu utjecati i mnogi drugi, npr. hormon rasta (BARDSLEY i HARMSEN, 1973.). Prilikom determinacije tripanosoma ovakav je opis, za većinu vrsta, zbunjujući i to upravo zbog velike morfološke raznolikosti unutar jedinki iste vrste, zatim zbog činjenice da je u istom nosiocu moguće istovremeno pronaći više vrsta tripanosoma u različitim stadijima razvojnog ciklusa. Temeljem zaključaka FERREIRE i sur. (2007a.)., pronađeno je do toga vremena mnogo vrsta tripanosoma od kojih su mnoge svrstavane u različite, a zapravo su istraživanjem dokazali da su pripadnici iste vrste. Stoga je odbačen način identifikacije vrsta temeljen na morfologiji, vrsti nosioca i zemljopisnom porijeklu. Veliki pleomorfizam epimastigota iz hranjivih podloga isto tako isključuje mogućnost identifikacija vrsta na temelju njihove morfologije.

Zbog prvotnih problema klasifikacije žabljih tripanosoma na temelju morfoloških osobina, znanstvenici su je svrstali u *Trypanosoma rotatorium* kompleks (BARDSLEY i HARMSEN, 1969.). *T. rotatorium* kompleks sastoji se od četiri oblika. **Prvi oblik** ima jedan kraj tijela tup, dok je drugi kraj šiljat i uzak. Bič i undulirajuća membrana mogu se uočiti. **Drugi oblik** ima okruglo i široko tijelo, a slobodni bič se ne može uočiti. Undulirajuća membrana vidljiva je samo na jednom kraju tijela. Za **treći oblik** specifično je usko tijelo sa šiljatim krajevima, pri tome je širina tijela gotovo jednaka na svim njegovim dijelovima. Jezgra je slabo vidljiva za razliku od undulirajuće membrane i slobodnog biča koji su jasno uočljivi. Kod **četvrtog oblika** krajevi tijela su šiljati kao i kod trećeg, ali je širina prednjeg dijela tijela znatno veća od one na stražnjem dijelu. Undulirajuća membrana i slobodni bič se dobro uočavaju, a jezgra je vrlo dobro izražena (ZICKUS, 2002.).

Sjeverno američka vrsta *T. rotatorium* ne odgovara opisima i crtežima prve izvorno opisane europske vrste (DIAMOND, 1965.), i vrlo je slična drugoj euroazijskoj vrsti tripanosome koja dolazi u žaba roda Rana - *Trypanosoma loricatum*. Unatoč očitim razlikama u izgledu *T. loricatum* je više okrugla (DIAMOND, 1965.), obadvije vrste nemaju slobodni bič i dijele sličnu građe jezgre i kinetoplasta (BARTA i sur., 1989.). Jedan od razloga tadašnjeg različitog opisa vrsta te svrstavanje može biti isto tako i

trajanje bojanja mikroskopskih preparata. U svakom slučaju, u budućnosti bi molekularni podaci o *T. loricatum*, sjeverno američkoj vrsti *T. rotatorium* i *T. rotatorium* lokalnog podrijetla trebale eventualno razriješiti taksonomsku konfuziju.

Iako se žablje tripanosome javljaju diljem cijelog svijeta i već dugo su uzgajane u hranjivim podlogama, nije tako puno izolata i dostupno iz istih te je većina istraživanja ograničena samo na neke od vrsta tripanosoma kao što su *T. chattoni, T. fallisi, T. rotatorium* i *T. ranarum* iz sjeverne Amerike, *T. neveulemairei* iz Europe i *T. mega* iz Afrike. Filogenetska istraživanja temeljena SSU rDNA sekvencama otkrila su da su ove navedene vrste vrlo usko srodne s iznimkom *T. chattoni*, koja je daleko pozicionirana od žabljih tripanosoma (MARTIN i sur. 2002.).

Prvotna prirodna i laboratorijska istraživanja govore da se neke tripanosome evoluirale i sposobne su zamijeniti nosioce, tako da mogu prijeći sa žaba iz porodice Ranidae na žabe iz porodice Bufonidae. Potencijal zamjene nosioca proporcionalan je s evolucijskom udaljenošću nosioca (REILLY i WOO, 1982a.; MARTIN i DESSER, 1991b.; MARTIN i sur. 1992.; 2002.).

Nedavna filogenetska istraživanja su otkrila da su žablje tripanosome smještene zajedno s ribljima u akvatičko koljeno. Ono obuhvaća vrste tripanosoma koje invadiraju vodene kralježnjake (ribe, kornjače i kljunaše) i smatra se da ih prenose pijavice koje i omogućuju jednostavnu zamjenu nosiocaa (GIBSON i sur. 2005.) s obzirom na to da one nisu vrsno specifične. Molekularna istraživanja su pokazala da tradicionalna taksonomija nije bila dovoljna za ispravno pokaže genetsku raznolikost i filogenetske odnose između žabljih tripanosoma. (MARTIN i DESSER, 1991b.; DESSER, 2001.; MARTIN i sur. 2002.).

Stoga se sada smatra da su tradicionalni taksonomski parametri kao što je morfološka karakterizacija, vrsta nosioca i ponašanje u nosiocu nepouzdani za identifikaciju vrste.

2.5.4. Ponašanje *T. rotatorium* u nosiocu

T. rotatorium može izazvati uginuće punoglavaca dok za odrasle žabe nije patogena (DOFLEIN, 1910.) osim u slučaju teških invazija i superinvazija, koje se manifestiraju odbijanjem hrane, letargijom te konačno smrću, a mogu se uočiti teške promjene na bubrezima (NÖLLER, 1917b.). Tripanosome je moguće pronaći u perifernoj krvi žaba

samo tijekom proljeća i ljeta. Kao jedan od uzroka ovakvih sezonskih oscilacija navodi se klima ili točnije promjena temperature (BOLLINGER i sur., 1969.).

Parazitemija će dostići svoj vrhunac tijekom proljeća, a početkom jeseni počinje padati unatoč tome što su temperature okoliša i dalje visoke (BARDSLEY, 1969.; BOLLINGER i sur., 1969.). Pretpostavlja se da su upravo promjene u krvi nosioca odgovorne za varijacije u perifernoj parazitemiji s obzirom da okoliš na parazita djeluje indirektno - preko krvi nosioca.

Ubrizgavanje hiperglikemičnih agenata (glukagon i glukoza) u nosioca uzrokuje povećanje parazitemije (BARDSLEY i HARMSEN, 1970.). Zbog sezonske oscilacije koncentracije glukoze u krvi i aktivnosti žlijezda koje ju kontroliraju (osobito nadbubrežna žlijezda), pretpostavlja se da su vjerojatno katekoalamini i glukoza odgovorni za sezonski ciklus bičaša. Tom zaključku pridonosi činjenica da drugi agensi, također sezonskog karaktera, nisu imali učinak na povećanje parazitemije. Porast parazitemije će se pojaviti i prilikom stresa (BARDSLEY i HARMSEN, 1970.). Spol neće imati utjecaja na parazitemiju (BARDSLEY i HARMSEN, 1969.; BOLLINGER i sur., 1969.). Najčešći obrazac rasta i razvoja krvnih oblika tripanosoma na jednoj od standardnih hranjivih podloga uključuje pojavu epimastigotnih, amastigotnih, tripomastigotnih i promastigotnih oblika. Pojava i učestalost određenih oblika ovisi o hranjivoj podlozi i drugim čimbenicima, kao što su oni vezani uz okoliš, npr. temperatura (BUTTNER i BOURCART, 1955.).

2.5.5. Posrednici

Žabe mogu živjeti cijeli svoj život u vodenom okolišu gdje mogu biti invadirane pijavicama (MARTIN i DESSER, 1991a.; SIDDALL i DESSER, 1992.).

Eksperimantalne invazije su potvrdile prijenos tripanosoma pijavicama (BARTA i sur., 1989.; DESSER i sur., 1975.; DESSER i sur., 1973.; MARTIN i DESSER 1991a.; SIDDALL i DESSER, 1992.). Kod vodenih žaba, koje veći dio života provode u vodi, glavni su posrednici pijavice (BARDSLEY i HARMSEN, 1973.; DESSER i sur., 1973.; 1975.; FERREIRA i sur., 2008.).

Također, žabe mogu biti i plijen člankonožaca kao što su papatači i komarci (ANDERSON i AYALA, 1968.; AYALA, 1970.; DESSER i sur. 1973.; 1975.) te čak i

kopnenih pijavica (HAMILTON i sur. 2005.). Smatra se da tripanosome mogu biti prenesene putem insekata i u vodozemaca (BARDSLEY i HARMSEN, 1973.). To se uglavnom odnosi na kopnene i šumske žabe.

Posrednici *T. rotatorium* za žabe iz porodice Ranide su vodene pijavice, za Hylidae i Leptodactylidae su komarci (DESSER i sur., 1973.; 1975., MARTIN i DESSER 1991a.; SIDDALL i DESSER, 1992.). RAMOS i URDANETA-MORALES (1977.) su i dokazali da su komarci bili sposobni prenijeti *T. rotatorium* na ranide iz kojih su tripanosome i izolirane, a ne i iz bufonida.

2.6. *In vitro* uzgoj bičaša podroda *T. (Megatrypanum)* i *T. rotatorium*

Postoji nekoliko poteškoća u istraživanju parazita: njihova priroda ih čini nemogućima za istraživanje u prirodnom okolišu jer su vrlo usko povezani sa svojim nosiocima. To je posebice tako kada su radi o ponašanju parazita, fiziološkim i biokemijskim istraživanjima i kad se rade istraživanja lijekova, te imunogenih svojstava metaboličkih produkata parazita. Mnogi od tih fenomena mogu se jedino istraživati *in vitro* (TAYLOR i BAKER, 1968.)

Paraziti porodice Trypanosomatidae su jedni od prvih protozoa uzgojenih *in vitro*, a sigurno su prvi uzgojeni u akseničnim hranjivim podlogama (MCNEAL i NOVY, 1903.).

Akseničan uzgoj je obligatan jer niti jedna vrsta neće rasti u prisutnosti bakterijske ili gljivične kontaminacije. Kako bi se to spriječilo vrlo često se koriste različiti antibiotici. Niti streptomocin niti penicilin nemaju neki značajni toksičan učinak na te parazite. Iznimka je *L. tarnetolae*, gdje je autor pokazao da čak i male količine imaju inihibitorni učinak (33-133µg/ml) (KRASSNER, 1965.). Za pročišćavanje kontaminiranih hranjivih podloga preporučuje se 1000 IU penicilina i streptomicina, jer čini se da nemaju štetan učinak u toj koncentraciji (SENECA i sur., 1949.), no za rutinski uzgoj koriste se manje količine za prevenciju rasta bakterija i gljivica. Vrlo često, dikseni tripanosomatidi (*Leishmania* i *Trypanosoma*) se uzgajaju *in vitro* na temperaturi 22-28°C, što se i smatra temperaturama u posredniku, što u konačnici predstavlja simulaciju razvoja u posredniku (RAZGHA 1929.).

2.6.1. Izolacija i uzgoj tripanosoma

Uspješna izolacija i uzgoj tripanosoma su preduvjet za pripremu dovoljno materijala za daljnja biokemijska i molekularna istraživanja. Većina istraživanja o uzgoju provodila se uglavnom na patogenim vrstama tripanosoma. O vrstama podroda *Megatrypanum* i *T. rotatorium* postoje ne tako detaljni podaci, što je posljedica njihovog relativno malenog značaja, tj. njihove nepatogenosti. Hranjive podloge korištene za njihov uzgoj uglavnom su adaptacija hranjivih podloga originalno korištenih za uzgoj patogenih tripanosoma (SCHUSTER i SULLIVAN, 2002.).

2.6.2. NNN-hranjiva podloga (NNN-kosi krvni agar)

Ova hranjiva podloga je najviše upotrebljavana hranjiva podloga za uzgoj tripanosoma na inače prirodnoj temperaturi posrednika. Prvi kosi krvni agar razvijen je još 1903. godine i originalno korišten za uzgoj *T. lewisi* da bi kasnije bio iskorišten za *T. brucei* (NOVY i MCNEAL, 1904.). Nekoliko godina poslije modificirao ga je Nicolle, da bi naposljetku dobio ime NNN-kosi krvni agar (TAYLOR i BAKER, 1968.) NNN-hranjiva podloga je dobra za izolaciju, dugoročan uzgoj, ali ne i za efikasan uzgoj (HENDRICKS, 1978.).

2.6.3. Tekuće hranjive podloge bez stanica

Prednost tekućih hranjivih podloga je da paraziti mogu hranjive tvari dobro resorbirati i da ih se može jednostavno izdvojiti iz hranjive podloge.
NCTC 109 je korišten za izolaciju i uzgoj *T. theileri* (SOLLOD i SOULSBY, 1968.; HOFFMANN i sur., 1984.). Za uzgoj tripanosoma na temperaturi posrednika mogu se koristiti dvije hranjive podloge koje su originalno razvijene za uzgoj stanica insekata, Grace-ova hranjiva podloga i Schneider-ova - drozofila hranjiva podloga (SCHNEIDER, 1964.).
Kad se usporede ove dvije hranjive podloge s hranjivom podlogom 199 (Medium 199) koji se koristi za uzgoj parazita rodova *Leishmania* i *Trypanosoma*, ove dvije hranjive podloge pružaju osobito dobar rast parazita i jednostavnije su za rukovanje od onih baziranih na krvnog agaru. Svakoj toj hranjivoj podlozi dodaje se 30% FCS-a (HENDRICKS i sur., 1978.).
Graceova i Schneiderova – drozofila hranjiva podloga s dodatkom 20% FCS-a uspoređene su u uzgoju tripanosoma roda *Herpetosoma* s hranjivim podlogama RPMI-1640, Medium 199, te hranjivim podlogama baziranim na krvnom agaru. Također i u tim istraživanjima su se pokazale izvrsnima za dugoročan uzgoj (MOHAMED i MOLYNEUX, 1987.). Također su te dvije hranjive podloge korištene za uzgoj *Megatrypanum* tripanosoma (DIRIE i sur., 1990a.; 1990b.). Detaljni podaci o autorima i

hranjivim podlogama na kojima su uzgajane iste vrste tripanosoma koje su uzgajane u ovom istraživanju prikazani su u Tablicama 2. i 3.

Tablica 2. Uzgoj tripanosoma na temperaturi posrednika (22-28 °C) Većina ovdje navedenih hranjivih podloga jesu različite vrste kosog krvnog agara (Nicolle, 1907., modificirano prema Novy i McNeal, 1904.).

Autori	Krvni agar	Ostale hranjive podloge	Izolacija	Serijske pasaže (subkultivacija)
KNUTH i RAUCHBAAR (1910.)		Goveđi bujon	+	
BEHN (1911.)	Goveđi krvni agar		+	
TEAGUE i CLARK (1918.)		Nutrient broth	+	
NOLLER (1925.)	kozji krvni agar s glukozom		+	+
PACKCHANIAN (1934.)	NN		+	+
HERBERT (1961.)	Oxoid nutrient agar i 20% krvi		+	+
HERBERT (1965a.)		Modificiran prema BONE i STEINERTU (1956.)	+	
DIAMOND (1965.)	SNB-9			
GRAY i NIXON (1967.)	Kunićji krvni agar (modificiran prema TOBIE i sur., 1950.)		+	
WELLS i sur. (1968.)	Modificiran prema HERBERTU (1961.)		+	
REID i sur. (1970.)	Modificiran prema WELLSU i sur. (1968.)		+	
WOO i sur. (1970.)	Modificiran prema TOBIE i sur. (1950.)		+	
JULIAN (1971.)	Modificiran prema WELLSU i sur. (1968.)		+	
FÖLSCH (1971.)	BHI agar i 10% krvi			+
WELLS (1971.)	Prema WELLSU i sur. (1968.)		+	+
CHANDER i GILMAN (1975.)	Modificiran prema TOBIE i sur. (1950.)		+	
LU (1975.)	MMMT			
DIRIE i sur. (1990a.)	Ljudski krvni agar	Schneiderov drozofila medij i 20% FCS	+	

DIRIE i sur. (1990b.)	Ljudski krvni agar	Schneiderov drozofila medij i 20% FCS	+	
BÖSE i sur. (1993.)		Schneiderov drozofila medij i 20% FCS		+
LEFEBVRE i sur. (1997.)		Medium 199 i 20% FCS	+	
WITA i KINGSTON (1999.)		VIM	+	
VERLOO i sur. (2000.)		KIVI (prema AERTSU i sur., 1992.)	+	
VERLOO i sur. (2000.)		RPMI 1640, 15%FCS-a i mišje stanice slezene	+	
RODRIGUES i sur. (2003.)	BabB-LIT s 15% kunićje krvi i 15% FCS-a		+	+
RODRIGUES i sur. (2003.)		RPMI 1640 i 15%FCS-a	+	
RODRIGUES i sur. (2003.)		LIT i 15% FCS-a	+	
FERREIRA i sur (2007a.)		LIT i 10% FCS-a		
GIBSON i sur. (2010.)		Schneiderov drozofila medij, 10% FCS-a i stanice insekata (*Anopheles gambiae*)	+	

Tablica 3. Uzgoj tripanosoma na temperaturi nosioca (37 °C)

Autori	Tekuća hranjiva podloga	Stanične kulture	Ostale hranjive podloge	Izolacija	Serijske pasaže (subkultivacija)
RISTIC i TRAGER (1958.)			lizat goveđe krvi	+	+
SIMPSON i GREEN (1959.)			lizat goveđe krvi	+	
LUNDHOLM i sur. (1959.)		Fetalne stanice bubrega		+	
MALAMQUIST (1965.)		Goveđi leukociti		+	+
SPLITTER i SOULSBY (1967.)	NCTC-109			+	+
CROSS i sur. (1968.)	NCTC-109 (modificirano prema SPLITTER	Goveđi leukociti		+	+

	i SOULSBY, 1967.)				
SOLLOD i SOULSBY (1968.)	Djelomično definirana hranjiva podloga	Goveđi leukociti, stanice slezene goveđeg embrija			+
VAN DER MAATEN i MALMQUIST (1969.)				+	+
MEREDITH i CROSS (1970.)	Krvni agar u NCTC-109				+
WELLS (1971.)		Goveđi leukociti			+
CROSS i sur. (1971.)	NCTC-109	Lactalbumin hidrolizat		+	
FÖLSCH (1971.)	NCTC-109			+	
WOO i LIMEBEER (1971.)		Fetalne stanice slezene i bubrega		+	+
METZLER (1975.)	RPMI 1640 (modif. prema SPLITTER i SOULSBY (1967.)			+	
MAMMERICKX i DEKEGEL (1975.)		Goveđi leukociti		+	
KINGSTON i sur. (1975.)		fetalne stanice goveđe koštane srži, stanice goveđih limfnih čvorova, stanice goveđe koštane srži			+
DIRIE i sur. (1990a.)	RPMI 1640 i 20% FCS	Embrionalne stanice mišjih fibroblasta			+
DIRIE i sur. (1990b.)	RPMI 1640 i 20% FCS	Embrionalne stanice mišjih fibroblasta			+
LEFEBVRE i sur. (1997.)	Medium 199 i 20% FCS			+	
HATAMA i sur. (2007.)	Eagle's MEM i 20% FCS	stanice jelenjih bubrega		+	+
GIBSON i sur. (2010.)	MEM, 10% konjskog ili janjećeg seruma	Embrionalne stanice mišjih fibroblasta			+

2.7. Proteomska analiza bičaša porodice Trypanosomatidae

Tradicionalna Edmanova kemija i jednodimenzionalna SDS gel elektroforeza su do nedavno bile glavne metode za strukturalnu i masenu karakterizaciju peptida i proteina. Uvođenjem dvodimenzionalne gel elektroforeze (2DE) stvorena je strategija koja je pružila nove uvide u složenost bioloških sustava. Cilj je bio istraživati produkte gena, dakle proteina, koji su odgovorni za fenotip. Proteomika služi za detaljan opis strukture, funkcije i kontrole bioloških sustava, a njezine tehnike i tehnologije dopuštaju proširivanje istraživanja od pojedinačnih proteina pa sve do cijelih proteoma. Sekvencioniranje genoma patogenih tripanosomatida *L. major*, *T. cruzi* i *T. brucei* (engl., the TriTryps) nedavno je završeno, a podaci su dostupni na web stranici: (http://tritrypdb.org/tritrypdb/). Zbog nedostatka homologije s ostalim sekvencioniranim organizmima, polovica proteina nema poznatu funkciju te su stoga svrstani u tzv. hipotetske, tj. pretpostavljene proteine. Različiti proteomski pristupi pružaju mogućnost eksperimentalnog dokazivanja TriTryp ekspresije gena na razini proteina, dodajući tako potencijalne funkcije hipotetskim proteinima, identificirajući nove dijagnostičke markere, determinirajući potencijalna ciljna mjesta za lijekove i vakcine te otkrivajući specifične mehanizme biologije tripanosomatida (CUERVO i sur., 2010.). Do sada je napravljena proteomska karakterizacija *T. cruzi, T. brucei*, *Leishmania* spp, dok za apatogene tripanosomatide uglavnom nema interesa. Posljedica toga vidi se i u dostupnosti proteina u proteinskim bazama podataka s time da proteomski profil tripanosoma navedenih u tablici nikad nije napravljen (Tablica 4.).

Tablica 4. Pretraživanjem NCBI baze podataka ukupno je pronađen malen broj proteina

Vrsta tripanosoma (ukupni broj proteina)	protein	gen
T.theileri (3)	cathepsin L-like protein	cathepsin L-like protein (CATL) gene
	cytochrome b	cytochrome b (cytb) gene
		cytochrome b-like (cytb) gene
	glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	gGAPDH gene for glycosomal glyceraldehyde phosphate
T. melophagium (1)	glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) gene
T.sp. D30 (2)	cathepsin L-like protein	cathepsin L-like protein gene
	glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	gGAPDH gene for glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
T. rotatorium (1)	glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	gGAPDH gene for glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Bičaši roda *Trypanosoma* su prošireni po cijelom svijetu, na svim kontinentima (HOARE, 1972.). Do nedavno nije bilo podataka o pojavnosti tripanosoma u Republici Hrvatskoj (MARTINKOVIĆ i sur., 2012.). S obzirom da nema podataka za Republiku Hrvatsku o morfološkoj karakterizaciji bičaša *T. rotatorium* kompleksa, cilj ovoga istraživanja je po prvi puta u Republici Hrvatskoj detaljno opisati morfološke osobitosti pojedinih krvnih oblika *T. rotatorium* kompleksa.

Zbog potrebe za istraživanjem antigenih komponenata, metaboličkih i biokemijskih puteva te osjetljivosti tripanosoma na lijekove zanimanje za uzgoj tripanosoma umjetnim putem, na hranjivim podlogama, razvilo se još na početku 20.-og stoljeća. Do sada je razvijen velik broj različitih vrsta hranjivih podloga za *in vitro* uzgoj tripanosoma koje podržavaju uzgoj razvojnih stadija prisutnih u posredniku i nosiocu, tj. uzgoj na sobnoj temperaturi što predstavlja temperaturu posrednika i na 37°C što prestavlja temperaturu nosioca (TAYLOR i BAKER, 1988.; ATLAS, 1997.). Kako bi se dokazala uspješnost nove, razvijene, hranjive podloge u *in vitro* uzgoju, cilj je prikazati vitalnost i morfološke osobitosti izolata bičaša iz roda *Trypanosoma* u novoj hranjivoj podlozi. S praktičnog stajališta navedene spoznaje bit će korisne u postavljanju modela efikasne i jeftine hranjive podloge za izolaciju i uzgoj analognih izolata

Za seroepizootiološka istraživanja se koristi antigen od uzgojenih tripanosoma. Kod patogenih vrsta tripanosoma primjereniji antigen za dijagnostiku su krvni oblici tripanosoma. Cilj je uzgojiti adekvatan antigen kako bi bilo moguće jednostavnije pratiti pojavnost tripanosoma u Republici Hrvatskoj. U literaturnim podacima ne postoje informacije o serološkim istraživanjima apatogenih tripanosoma korištenih u ovoj disertaciji.

Osim uzgoja *in vitro*, koji je temelj za dobivanje dovoljnih količina parazita, za istraživanje antigenih komponenata se koristi i proteomska analiza parazitskih oblika. Razvojem tehnologije, a istovremeno i problema bolesti i terapije, identificirani su proteini kod patogenih vrsta iz roda *Trypanosoma*. (PABA i sur., 2004.; URBANIAK i sur., 2012.). U literaturnim podacima ne postoje konkretni podaci o imunosnom odgovoru nosioca, tj. pojavi protutijela kod invazije vrstama *T. theileri*, *T.*

melophagium, *Trypanosoma* sp. iz jelena i *T. rotatorium*, kao niti podaci o proteomskoj analizi vrsta *T. melophagium*, *T. theileri*, *Trypanosoma* sp. iz jelena i *T. rotatorium*. Proteomskom analizom navedenih izolata tripanosoma utvrditi će se njihova sličnost, tj. različitost te dobivene vrijednosti usporediti s proteinima poznatih tripanosoma pohranjenim u proteinske baze. Dobiveni rezultati dat će uvid u vjerojatne razloge apatogenosti istraživanih tripanosoma za njihove nosioce.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Područje istraživanja

Istraživanje je provedeno na 50 arhivskih uzoraka krvnih razmaza jestivih zelenih žaba *(Pelophylax esculentus),* arhivskim izolatima bičaša iz roda *Trypanosoma*, koji potječu iz životinja s područja Republike Hrvatske.

4.2. Podrijetlo uzoraka

Arhivski uzorci krvnih razmaza potječu iz jestivih zelenih žaba *(P. esculentus)*. Arhivski izolati bičaša iz roda *Trypanosoma* potječu iz ovčje krpuše *(Melophagus ovinus)*, goveda *(Bos taurus)*, jelena običnog *(Cervus elaphus)* te jestive zelene žabe *(P. esculentus).*

4.3. Prikupljanje arhivskih uzoraka

Arhivski uzorci krvnih razmaza i arhivski izolati tripanosoma su prikupljeni u sklopu rutinske determinacije parazita (*T. melophagium* (TCC 1993) iz crijeva ovčjeg ektoparazita – ovčje krpuše, *Trypanosoma* sp. (TCC 1959) iz krvi jelena običnog, *T. rotatorium* (TCC-1984, TCC 2179) iz krvi jestive zelene žabe, te *T. theileri* (TCC-1992) kao kontaminant hranjivih podloga koje su sadržavale goveđu krv) dopremljenih na Zavod za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom.
Svi navedeni izolati bičaša korišteni u ovom istraživanju pohranjeni su u centralnoj bazi izolata tripanosoma (Trypanosomatid Culture Collection), u tekućem dušiku na Zavodu za parazitologiju, Instituta za biomedicinu II, Sveučilišta u Sao Paolu, Brazil, te u hranjivim podlogama na Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

4.4. Morfološka karakterizacija *T. rotatorium*

Uzorci krvnih razmaza su obojeni po Giemsi i mikroskopirani s Olympus Bx51, a svaka pronađena jedinka tripanosoma, kojoj je bilo moguće izmjeriti njezine morfometrijske parametre, zabilježena je mikroskopskom kamerom Artcam 300MI i analizirana softverom QuickPHOTO MICRO 2.3.

4.4.1. Bojanje arhivskih krvnih razmaza po Giemsi

Arhivski krvni razmazi su pripremljeni nanošenjem 10 µl krvi pojedinih jedinki zelenih žaba na predmetnice, osušeni na sobnoj temperaturi, fiksirani apsolutnim metanolom 5 minuta, ponovno osušeni, te pospremljeni u arhivu. Prije izvođenja istraživanja, arhivski uzorci su obojeni metodom po Giemsi po standardnom protokolu (1ml Giemsa otopine i 9ml destilirane vode), te ostavljeni tako 60 minuta. Nakon bojanja razmazi su isprani tekućom destiliranom vodom i osušeni na sobnoj temperaturi. Obojeni preparati su potom pregledani na prisutnost bičaša, te pronađeni bičaši po potrebi fotografirani i pospremljeni na medij za pohranu podataka.

4.4.2. Analiza morfometrijskih parametra

Morfometrijski parametri obuhvaćaju ukupnu duljinu tijela uključujući slobodni bič, širinu tijela, opis undulirajuće membrane, oblik, širinu i duljinu jezgre, položaj kinetoplasta, te relativan odnos jezgre i kinetoplasta (LEMOS i sur., 2008.).
Mjerenje morfometrijskih parametara provedeno je na slijedeći način:

1) udaljenost od stražnjeg kraja tijela do kinetoplasta (PK) – povučena je podužna neravna crta po sredini tijela od stražnjeg kraja tijela do kinetoplasta (PK).
2) udaljenost od prednjeg kraja tijela do kinetoplasta (AK) - povučena je podužna neravna crta po sredini tijela od prednjeg kraja tijela do kinetoplasta (AK).
3) udaljenost od sredine jezgre do prednjeg kraja tijela (NA) – povučena je podužna neravna crta po sredini tijela od sredine jezgre do prednjeg dijela tijela.

4) udaljenost od stražnjeg kraja tijela do sredine jezgre (PN) - povučena je podužna neravna crta po sredini tijela od sredine jezgre do stražnjeg dijela tijela (što je ustvari zbroj PK i KN).
5) udaljenost od kinetoplasta do sredine jezgre (KN) – povučena je podužna neravna crta po sredini tijela sredine jezgre do sredine kinetoplasta.
6) dužina slobodnog biča (F) – povučena je neravna podužna crta duž cijele duljine biča.
7) širina tijela (W) - povučena je neravna podužna crta od jednog kraja do drugog kraja kraćeg dijela tijela bičaša kroz centar jezgre.
8) LN-dužina jezgre
9) WN-širina jezgre
10) ukupna dužina tijela uključujući slobodni bič (L) - povučena je neravna podužna crta duž cijelog tijela bičaša, tj. Od stražnjeg kraja tijela do završetka slobodnog biča (zbroj PK, KN, NA i F)
11) NI=PN/NA

4.5. Statistička obrada podataka

Rezultati morfoloških vrijednosti su obrađeni uobičajenim statističkim metodama, uz pomoć računalnog programa MedCalc verzija 12.7 i Statistica 8 (StatSoft 2008).
Izračunata je srednja vrijednost, maksimalne i minimalne vrijednosti te standardna devijacija.

4.6. In vitro uzgoj, vitalnost i morfologija izolata bičaša iz roda *Trypanosoma* u hranjivim podlogama

Uzorci izolata *Trypanosoma*, ukupno 4 izolata, uzeti su iz arhive i inokulirani u dvije hranjive podloge: vlastitu hranjivu podlogu tj., bifazični čokoladni agar za tripanosomatide (BCAT - Biphasic Chocolate Agar Medium for Trypanosomatids (MARTINKOVIĆ i sur., 2012.) i kontrolnu - Liver Infusion Tryptose (LIT), (ATLAS, 1997.).

4.6.1. Pripema hranjivih podloga

4.6.1.1. BCAT

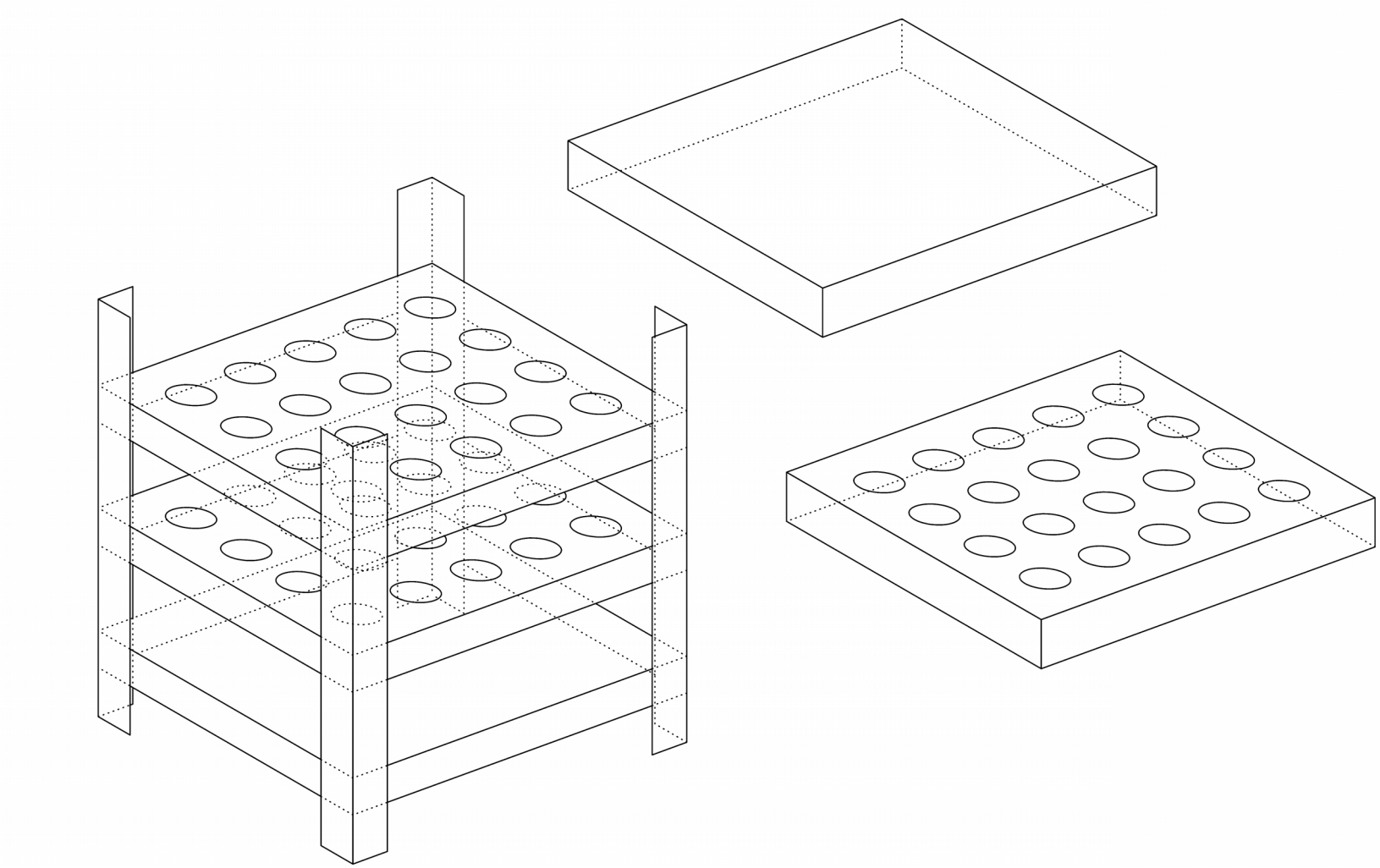
Bifazični čokoladni agar za tripanosomatide je pripremljen prema uputama MARTINKOVIĆA i sur. (2012.). Ukratko, ta hranjiva podloga se sastoji od krutog i tekućeg dijela.

A) Kruti dio, kojeg čini čokoladni agar pripremljen je tako da je 3g baze za krvni agar (Blood Agar Base, BD BBL) te 1.0 mg streptomicina/ml, i 1,000 IU penicilina/ml (Sustrepen ®, Genera) pomiješano s 100ml destilirane vode (dH2O). Dobivena suspenzija je zatim zagrijavana dok se agar u potpunosti nije otopio. Nakon toga je smjesa stavljena da se ohladi na oko 55°C (hlađeno je do onog trenutka kada je bilo moguće držati Erlenmayerovu tikvicu za dno bez zaštitnih rukavica). Nakon toga u smjesu je dodano 10% krvi i raspodijeljeno u svaku staklenu epruvetu po 5ml. Potom su epruvete začepljene gumenim čepovima i prebačene u posebno izrađeni stalak za autoklaviranje običnih staklenih epruveta bez navoja (Slika 3.). Stalak je prebačen u autoklav (MELAtronic 23 EN - MELAG), koji je namješten na „Gentle program“ (što znači da će se sterilizacija odvijati na temperaturi od 121°C i pritisku od 1,1 bar) i pokrenut. Nakon završetka autoklaviranja, stalak je izvađen iz autoklava, a autoklavirane hranjive podloge su stavljene da se hlade u kosom položaju od 45° dok se agar tako ne skrutne (cca 30 minuta). Nakon hlađenja, kruti dio je pospremljen u hladnjak na +4°C.

B) Tekući dio hranjive podloge se sastoji od mješavine slijedećih stavki otopljenih u litri dH2O:

1) 15g peptonske vode (BD Difco),
2) 2.5g kvaščevog ekstrakta (BD Difco),
3) 8g NaCl (Kemika),
4) 7.5g Na_2HPO_4 (Kemika),
5) 1 g glukoze (Kefo),
6) 0.4 g KCl (Kemika),
7) 0.06 g $Na_2HPO_4.12H_2O$ (Riedel de Haën),
8) 0.06 g KH_2PO_4 (Kemika),
9) 0.1 g $MgSO_4.7H_2O$ (Kemika),
10) 0.1 g $MgCl_2.6H_2O$ (Kemika),
11) 0.15 g $CaCl_2.2H_20$ (Kemika)
12) 1.0 mg streptomicina/ml, i 1,000 IU penicilina/ml (Sustrepen ®, Genera)

Nakon što su se sastojci otopili, tekućina je autoklavirana u staklenoj boci za autoklaviranje (PIREX) pod istim uvjetima kao i kruti dio BCAT-a. Nakon autoklaviranja, boca s tekućim dijelom je ostavljena da se ohladi 1h. Potom je smjesi, umjesto uobičajenog sastojka hranjivih podloga - fetalnog telećeg seruma, dodano 5% svježeg sterilnog ljudskog urina, koji je steriliziran kroz mikrobiološki filter veličine pora 0,44μm (Sartorius, MinisartCA, 0.45μm). To je sve skupa promiješano i raspodijeljeno u svaku staklenu epruvetu s gumenim čepom po 5ml. Tako pripremljene podloge su pospremljene u hladnjak na +4°C.



Slika 3. Stalak za autoklaviranje krutog dijela BCAT-a.

4.6.1.2. LIT

Ova hranjiva podloga je monofazna (tekuća) podloga, a pripremljena je prema uputama ATLASA (1997.) i CAMARGA (1964.) s malim izmjenama, tako da su dolje navedeni sastojci izvagani i izmiješani u 900ml dH2O:

1) Beef liver, infusion from (BD Difco) 5.0g
2) Na_2HPO_4 (Kemika) 8.0g
3) Triptoza (Fluka) 5.0g
4) Glukoza (Kefo) 1.0g
5) NaCl (Kemika) 1.0g
6) K_2HPO_4 (Kemika) 0.5g
7) KCl (Kemika) 0.4g
8) Hemin (Sigma-Aldrich) 10.0mg
9) 1.0 mg streptomicina/ml, i 1,000 IU penicilina/ml (Sustrepen ®)

Nakon što su se komponente otopile, pH smjese je namješten na oko pH 7.2 ± 0.2 na 25°C. Boca s hranjivom podlogom je stavljena na autoklaviranje pod istim uvjetima kao i tekući dio BCAT-a. Po završetku autoklaviranja, hranjiva podloga je ostavljena da se ohladi na sobnoj temperaturi 1h. Potom je smjesi, dodano 100ml fetalnog telećeg seruma (Fetal bovine serum, heat inactivated – FCS, Gibco). Sadržaj je promiješan i raspodijeljen u sterilne epruvete.

4.6.2. Uzgoj tripanosoma na hranjivim podlogama

4.6.2.1. Uzgoj tripanosoma na hranjivim podlogama na sobnoj temperaturi

Neposredno prije inokulacije parazita, kako bi dobili kompletni BCAT, sadržaj epruvete s tekućim dijelom BCAT-a je preliven u epruvetu s krutim dijelom BCAT-a.
U BCAT i LIT su nanesene određene količina živih tripanosoma. Hranjive podloge su inkubirane na sobnoj temperaturi (18-24°C) 25°C, a svaki dan je praćena vitalnost i morfologija tripanosoma idućih 14 dana. Zbog uniformnosti rezultata, postupak je ponovljen minimalno 3 puta.

4.6.2.2. Uzgoj tripanosoma na hranjivim podlogama na 37°C

Sedam dana nakon uzgoja na sobnoj temperaturi 25°C, kada su tripanosome ušle u stacionarnu fazu, hranjive podloge su premještene u inkubator na temperaturu od 37°C i inkubirane slijedećih 14 dana.

4.6.3. Morfologija i vitalnost

Svaki dan tijekom praćenja morfologije i vitalnosti tripanosoma, iz svake hranjive podloge različitih izolata je mikropipetom odpipetirano u sterilnim uvjetima 1ml hranjive podloge. Jedan dio uzorka (100µl) je izdvojen i tretiran Ewansovim plavilom. Ostatak uzorka je, kako bi se odstranili ostaci hranjive podloge, ispran centrifugiranjem u sterilnom PBS-u pri sobnoj temperaturi (20 ^{o}C) tri puta po 10 minuta. Supernatant je nakon završetka prvog centrifugiranja odliven, a u dobiveni talog, u kojem su se nalazili bičaši, je naliven sterilni PBS, pazeći pri tome da se dobro pomiješa s talogom, tj. da se dobije fina suspenzija. Postupak je ponovljen još dva puta. Sterilni PBS je pripremljen filtriranjem kroz mikrobiološke filtere veličine pora 0,44µm (Sartorius).

Kako bi bilo moguće prikazati značajne razlike u morfologiji uzgajanih tripanosoma, izabrane su slijedeće vremenske točke uzorkovanja koje će biti prikazane u rezultatima:

a) morfologija tripanosoma 3 dana uzgoja u BCAT, LIT/sobnoj temperaturi
b) morfologija tripanosoma 7 dana uzgoja u BCAT, LIT/sobnoj temperaturi
c) morfologija tripanosoma 10 dana uzgoja u BCAT, LIT/sobnoj temperaturi
d) morfologija tripanosoma 14 dana uzgoja u BCAT, LIT/sobnoj temperaturi
e) morfologija tripanosoma 24h uzgoja u BCAT, LIT/37°C
f) morfologija tripanosoma 3 dana uzgoja u BCAT, LIT37^{o}C
g) morfologija tripanosoma 5 dana uzgoja u BCAT, LIT /37°C
h) morfologija tripanosoma 10 dana uzgoja u BCAT, LIT/37°C

4.6.3.1 Bojanje bičaša iz hranjive podloge po Giemsi

Nakon trokratnog ispiranja u sterilnom PBS-u, uzorci tripanosoma su naneseni na predmetnice, napravljeni su razmazi, te posušeni na sobnoj temperaturi. Potom su pripremljeni razmazi uzgojenih tripanosoma fiksirani s apsolutnim metanolom 1 minutu, te bojani s 5% otopinom Giemse pet minuta. Bojanje je u ovom slučaju bilo kraće od uobičajenog stoga što bi bičaši prilikom standardnog bojanja po Giemsi vezali na sebe previše boje i bilo bi inače nemoguće pratiti njihovu morfologiju.
i, a drugi dio bojan po Giemsi. Tako pripremljeni uzorci su mikroskopirani uređajem Olympus Bx51, pod imerzijskim povećanjem (1000x), a slike zabilježene mikroskopskom kamerom Artcam 300MI i obrađene softverom QuickPHOTO MICRO 2.3.

4.6.3.2. Provjera vitalnosti

Jedan dio izolata bičaša (100µl) je tretiran s Ewansovim plavilom u svrhu određivanja vitalnosti. U slučaju živih tripanosoma boja nije ulazila u stanicu, a u slučaju da su u uzorku bile mrtve stanice, boja bi ušla, te bi se te stanice obojale u plavo.

4.7. Preoteomska analiza

4.7.1 Izolacija proteina iz bičaša roda *Trypanosoma*

Za proteinsku analizu korišteni su izolati bičaša podroda *Trypanosoma (Megatrypanum)*: *T. melophagium*, *T. theileri*, *Trypanosoma* sp. iz jelena te dva morfološki različita izolata *T. rotatorium*.

Korišteni izolati, starosti 7 dana (vrijeme prijelaza logaritamske u stacionarnu fazu rasta), isprani su centrifugiranjem u sterilnom PBS-u pri sobnoj temperaturi (20 ^{o}C) na jednaki način kao i za praćenje morfologije. Nakon zadnjeg ispiranja, supernatant je odliven, dok je talog u kojem su se nalazile tripanosome otopljen u 1ml pufera za lizu koji je sadržavao 7M urea/2M tiourea (Sigma-Aldrich-Aldrich), 4% (w/v) CHAPS (Sigma-Aldrich-Aldrich), 0,2 % (w/v) smjesa amfolita pH 3-10 (BIO-RAD, SAD), 1% (w/v) ditiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich-Aldrich, SAD) i 1x koktel inhibitora proteaza (Roche, Švicarska).

Navedenim postupkom prikupljeni lizat, podvrgnut je sonikaciji 4 mm sondom, snage 6 W, četiri puta po 10 sekundi (Microson^{TM}, PGC Scientifics, SAD). Nakon soniciranja uzorcima je dodano po 10 µl smjese nukleaza (Amersham, SAD), uzorci su zatim inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi uz protresanje na termomješalici (Eppendorf, Njemačka), a nakon toga su centrifugirani 45 minuta na 13 200 rpm i 20°C (Eppendorf, Njemačka) . Dobiveni supernatant pohranjen je na -20°C.

4.7.2 Određivanje koncentracije proteina u lizatu

U čiste plastične epruvete (Eppendorf, Njemačka) odvojeno je 3x15 µl uzorka iz lizata tripanosoma te dodano četiri volumena čistog acetona (Kemika, Hrvatska) ohlađenog na -20°C. Kako bi se uklonile ionske nečistoće i lipidi te proteini koncentrirali taloženjem, smjesa je ostavljena da stoji preko noći na -20°C. Nakon toga su uzorci ponovno centifugirani, 10 minuta na 4°C i 13 200 rpm (Eppendorf, Njemačka). Aceton je zatim uklonjen, a talog je najprije osušen u koncentratoru nakon čega mu je dodano 15 µl pufera za kvantifikaciju proteina (0.125 M Tris-Cl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol (sve kemikalije su od Sigma-Aldrich-Aldrich, SAD). Uzorak je potom inkubiran na 30°C do potpunog otapanja.

U lizatu je koncentracija proteina određivana pomoću komercijalnog kompleta za kvantifikaciju proteina (DC Protein Assay Kit, BIO-RAD, SAD), koji se bazira na reakciji proteina sa lužnatom otopinom bakrovog tartarata (reagens A'), koji potom reducira Folinov reagens (reagens B) (Lowry, O. i sur., 1951). Na mikrotitracijsku ploču sa 96 jažica u triplikatu je naneseno po 5 µL standarda albumina goveđeg seruma u pet različitih koncentracija (0.2, 0.6, 0.8, 1.2 i 1.5 mg cm^{-3}). U ostale jažice je naneseno također po 5 µl uzoraka, različitog razrjeđenja koje je dobiveno dodavanjem određenog volumena (5, 25 i 50 µl) pufera za kvantifikaciju proteina. Zatim je u svaku jažicu dodan reagens A' u količini od 25 µl. Reagens A' je dobiven miješanjem reagensa S i reagensa A. Nakon toga u svaku jažicu dodano je po 200 µl reagensa B. Ploče su zatim inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je pomoću spektrofotometra (Thermolab Systems, SAD) očitana apsorbancija na 750 nm. Baždarna krivulja ovisnosti apsorbancija o koncentraciji konstruirana je na osnovu očitanih vrijednosti apsorbancija standarda, a iz krivulje je, ekstrapolacijom na X-osi, izračunata koncentracija proteina u uzorku.

4.7.3. Dvodimenzionalna gel - elektroforeza

Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE) tehnika je koja se koristi za analizu složenih proteinskih smjesa iz stanica, tkiva, tjelesnih tekućina ili drugih bioloških uzoraka. 2-DE objedinjuje dvije elektroforetske metode: izoelektrično fokusiranje (IEF) i SDS-poliakrilamidnu gel-elektroforezu.

4.7.4. Izoelektrično fokusiranje – IEF

Izoelektrično fokusiranje (IEF) se provodi u tzv. imobiliziranom gradijentu pH (*engl*. immobilized pH gradient, IPG) koji se komercijalno dobiva kovalentnom ugradnjom gradijenta kiselih i bazičnih puferirajućih grupa u poliakrilamidni gel u trenutku njegove polimerizacije. Ovako pripremljeni gel, izljeva se na plastičnu podlogu, te se nakon ispiranja katalizatora polimerizacije i nepolimeriziranih monomera suši i reže na 3 mm široke trakice – tzv. trakice IPG (*engl*. IPG strips). Trakice se koriste za izoelektrično fokusiranje. U gradijentu pH, protein će se pod utjecajem električnog polja početi kretati

prema elektrodi sa suprotnim nabojem, te će tijekom migracije ili primati ili otpuštati protone. Posljedica toga je promjena ukupnog naboja proteina te smanjenje njegove pokretljivosti. Točka u gradijentu pH gdje će se protein zaustaviti je ona kod koje je njegov ukupni naboj jednak nuli (izoelektrična točka, pI). Taj tzv. fokusirajući učinak koji koncentrira proteine na njihovim izoelektričnim točkama omogućava razdvajanje proteina s obzirom na vrlo male razlike u naboju.

Proteinski lizati za izoelektrično fokusiranje pripremljeni su taloženjem u acetonu jednako kao i za kvantifikaciju. Nakon uklanjanja acetona i sušenja taloga, talog je otopljen u radnom puferu, (7M urea, 2 M tiourea (Sigma-Aldrich-Aldrich), 4%(w/v) CHAPS (Sigma-Aldrich-Aldrich); 400 µl pufera na 1000 µg proteina) kojem je dodan w/ v) 1% DTT-a (Sigm-Aldrich) te inhibitori proteaza na 1 ml radnog pufera (Roche, Švicarska), inkubacijom u termomješalici (Eppendorf, Njemačka) na 30°C. U otopljeni uzorak dodano je bromfenol modrilo, te je uzorak uz pomoć pipete nanesen uzduž kanala uređaja za fokusiranje (*engl.* focusing tray).

Na uzorak je zatim pažljivo položena trakica IPG (17 cm, pH 3-10NL, BIO-RAD, SAD) sa gradijentnim gelom okrenutim prema dolje, a nastali mjehurići zraka uklonjeni su laganim podizanjem i spuštanjem trakica u kanale. Kako bi se spriječilo isušivanje i kontaminacija, na IPG trakice je dodano 4-5 ml mineralnog ulja, te su podvrgnute aktivnoj rehidrataciji (PROTEAN IEF cell, BIO-RAD, SAD) pri 50 V na 20°C 14 sati.

Nakon rehidratacije, ispod svake trakice su na obje elektrode položeni navlaženi filtar-papirići te je dalje provođeno izoelektrično fokusiranje prema uvjetima navedenim u Tablici 5.

Tablica 5. Uvjeti izoelektričnog fokusiranja za analitičke gelove 2-DE pH 3-10 NL (ukupno je korišteno 1000 µg istaloženih proteina).

KORAK	PORAST NAPONA	OSTVARENI NAPON/V	TRAJANJE/ h	TRAJANJE/ VOLT SAT (V·h)
S1	BRZI	250	0:15	/
S2	SPORI	5000	2:00	/
S3	BRZI	10000	-	65000
S4	SPORI	500	24:00	/

Nakon završetka izoelektričnog fokusiranja, trakice su ocijeđene od mineralnog ulja i pohranjene na -20°C do daljnje analize.

4.7.5. Ekvilibracija trakica IPG

Ekvibliracija IPG trakica provedena je sa ekvilibracijskim puferom (50 mM Tris-HCl pH 8.8 (Sigma-Aldrich, SAD), 6M urea (Sigma-Aldrich, SAD), 30% w/v glicerol (Sigma-Aldrich, SAD), 2% w/v SDS (Sigma-Aldrich, SAD), bromfenol modrilo kojem je dodano 1% w/v ditiotreitola (Sigma-Aldrich, SAD), te su lagano protresane 15 minuta na vodoravnoj mješalici. Postupak je ponovljen s ekvilibracijskim puferom kojem je dodano 25 g dm^{-3} jodoacetamida (IAA), (Sigma-Aldrich, SAD). DTT vrši redukciju disulfidnih mostova, a IAA alkiliranje sulfhidrilne grupe na proteinima i sprječavanje njihove reoksidacije tijekom elektroforeze, na taj način spriječava neželjene interakcije između cisteinskih ostataka, a to je izuzetno važno za daljnju identifikaciju proteina uz pomoć spektrometrije masa.

4.7.6. Poliakrilamidna gel - elektroforeza – 2 DE

Nakon izoelektričnog fokusiranja, proteini se u drugoj dimenziji razdvajaju prema relativnoj molekulskoj masi (M_r) pomoću elektroforeze na uspravnom poliakrilamidnom gelu koji sadrži natrijev laurilsulfat (*engl*. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE). Pore SDS-poliakrilamidnog gela djeluju kao molekularno sito koje razdvaja proteine prema veličini, a ne njihovom naboju. Naime, SDS vezanjem na proteine (otprilike 1.4 g SDS/ g proteina) stvara anionske komplekse. Niz je čimbenika (veličina gela, gradijent pH i upotrijebljena metoda bojanja gela) koji utječu na moć razdvajanja proteina tijekom 2-DE. Smatra se kako je pomoću dvodimenzionalne elektroforeze moguće razdvojiti 2000 - 5000 proteina istovremeno, a detektirati i kvantificirati se može < 1 ng proteina po proteinskoj točki.

Za svrhe ove disertacije pripremljena je smjesa za 12 %-tni gel, debljine 1 mm i dimenzija 20 x 18 cm od 33.5 mL destilirane vode, 25 mL 1.5M Tris-HCl pH 8.8, 1 mL 10% (w/v) SDS, 40 mL otopine akrilamid/bisakrilamid (30.8% T; 2.7% C_{bis}) (Sigma-Aldrich, SAD), 500 μL 10% (w/v) amonij-persulfata (APS) (Sigma-Aldrich, SAD) i 50

μL TEMED (Fluka, Sigma-Aldrich, SAD). Smjesa je pažljivo izlivena u prethodno složena stakla za gelove i potom prekrivena n-butanolom (Kemika, Hrvatska) da bi se spriječila oksidacija na površini gela. Nakon polimerizacije gelova, n-butanol je uklonjen s njihove površine višekratnim ispiranjem destiliranom vodom. Staklene ploče s gelovima pričvršćene su zatim na jedinicu za hlađenje sustava za vertikalnu elektroforezu (PROTEAN II XL cell, BIO-RAD, SAD) i umetnute u komoru za elektroforezu. S površine gelova uklonjena je preostala voda te su između stakala umetnute trakice IPG koje su prethodno ekvilibrirane i kratko isprane u puferu za elektroforezu (25 mmol dm^{-3} Tris, 192 mmol dm^{-3} glicin, 10 g dm^{-3} SDS, pH=8,3). Prilikom umetanja trakica, laganim pritiskom su uklonjeni svi zaostali mjehurići zraka. Potom su trakice prekrivene otopinom agaroze koja je pripremljena otapanjem 0,5 g agaroze (Sigma-Aldrich, SAD) i 200 μl $2*10^{-6}$ g dm^{-3} bromfenol modrila u 100 ml pufera za elektroforezu. U komoru je stavljen pufer za elektroforezu (25 mM tris, 192 mM glicin, 0.1% SDS, pH 8.3), jedinica za hlađenje se spojena je na vodu, sustav je poklopljen te je pokrenuta elektroforeza pri uvjetima 15 mA/gelu 30 min., a potom 20 mA/gelu dok bromfenol modrilo ne doputuje do ruba gela (otprilike 5 sati). Gelovi su obojani bojom Coomassie Brilliant Blue nakon završene elektroforeze..

4.7.8. Bojanje gelova

Za bojanje gelova 2-DE korištena je modificirana metoda po Neuhoff-u. Pripremljena je ponajprije matična (engl. stock) otopina koloidne Coomassie boje sljedećeg sastava: 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (BIO-RAD, SAD), 2% (v/v) H3PO4 (Kemika, Hrvatska) i 10% (w/v) amonijevog sulfata (Kemika, Hrvatska), koja je stabilna nekoliko tjedana na sobnoj temperaturi. Neposredno nakon završetka elektroforeze pripremi se radna otopina za bojanje miješanjem matične otopine i metanola (Kemika, Hrvatska) u omjeru 4:1. U njoj se gelovi inkubiraju preko noći na sobnoj temperaturi uz lagano potresanje, pri čemu se gelovi istovremeno i fiksiraju i boje. Gelovi se potom se sustavno ispiru u redestiliranoj vodi dok ne nestane intenzivno plavo boja pozadine gela. Obojani se gelovi čuvaju u redestiliranoj vodi na + 4ºC.

4.7.8. Računalna analiza gelova i rezanje spotova

Obojani gelovi su snimljeni i denzitometrijski analizirani uređajem za analizu gelova (VersaDoc Imaging System, model 4000, BIO-RAD, SAD). Vrijeme ekspozicije iznosilo je 10 sekundi. napravljena je kvalitativna analiza pomoću specijaliziranog računalnog programa za analizu 2-DE gelova (PDQuest SW, verzija 7.4.0, BIO-RAD, SAD). Neposredno prije analize gelovi su normalizirani metodom ukupne gustoće na slici gela (*engl*. total density in gel image). Kod te se metode zbrajaju vrijednosti optičkih gustoća svih točaka unutar slike. Usporedbom zbrojenih vrijednosti dobivena je osnova za normalizaciju. Analizom u programu PDQuest odabrane su proteinske točke na gelovima koje su ručno izrezane pomoću nastavka pipetora i to na taj način da je vrh nastavka ovisno o veličini točke na gelu odrezan škarama. Izrezani komadići gela stavljeni su u čiste 1,5 ml plastične epruvete (Eppendorf, Njemačka) s 1 ml otopine za uklanjanje boje (40% metanola, 10% octene kiseline, sve Kemika, Hrvatska) te su ostavljeni na termomješalici (Eppendorf, Njemačka) preko noći a minimalno 12 sati na sobnoj temperaturi da bi se uklonila vezana boja.

4.8. Spektrometrija masa

Pomoću metode spektrometrije masa moguće je razdvojiti ionizirane atome ili molekule s obzirom na omjer njihove mase i naboja (m/z). Zato se ova metoda koristi za kvantifikaciju atoma ili molekula te za dobivanje kemijske i strukturne informacije o analiziranim molekulama. Osnovni dijelovi spektrometra masa su: ionizator, analizator masa i ionski detektor. U spektrometru masa analizirani uzorak se uvodi u izvor iona u tekućem ili plinskom stanju gdje se fragmentira i ionizira. Nastali ioni najprije putuju u analizator masa gdje se razdvajaju prema omjeru njihove mase i naboja m/z, a potom odlaze u detektor koji registrira broj iona pri svakoj vrijednosti m/z što rezultira stvaranjem spektra masa. Postoji više različitih metoda ionizacije među kojima su ionizacija elektro-raspršenjem (*engl*. electrospray ionization, ESI) i matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (*engl*. matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) najčešće korištene u analizi proteina i peptida.

ESI stvara ione direktno iz otopine, stoga je povezan s uređajima za tekućinsku kromatografiju ili kapilarnu elektroforezu. Uzorak se raspršuje u aerosol kojeg tvore

nabijene kapljice u prisutnosti snažnog električnog polja, nakon čega se kapljice počinju smanjivati zbog isparavanja otapala pri čemu se višestruko nabijeni ioni otpuštaju s kapljica i odlaze u analizator. Kod MALDI-tehnike, uzorak se pomiješa sa spojem koji absorbira UV-zračenje, tzv. matricom (*engl*. matrix), poput npr. α-cijano-4-hidroksi-trans-cimetne kiseline i sinapinske kiseline, stavi na metu (*engl*. target plate) i kristalizira. Zatim se smjesa pobuđuje laserom što uzrokuje isparavanje matrice uslijed čega ona prenosi molekule uzorka u plinsku fazu, rezultirajući indirektnim isparavanjem uzorka. Ioni uzorka (protonirane molekule) nastaju uslijed razmjene elektrona i protona između uzorka i pobuđene matrice.

Analizatori masa ključna su točka u MS - analizi. Četiri su najčešće korištena analizatora u proteomskim istraživanjima: četveropol (*engl*. quadrupole), analizator vremena leta (*engl*. time-of-flight, TOF), ionska stupica (*engl*. ion trap) i Fourier transformirana ionska ciklotronska rezonancija (*engl*. Fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR). MALDI je obično povezan s TOF analizatorima koji mjere masu intaktnih peptida, a ESI s analizatorima ionskih stupica i trostrukim četveropolnim analizatorima. Nadalje, disocijacijom izazvanom sudarima (*engl*. collision-induced dissociation, CID) s molekulama inertnog plina moguće je dobiti spektre ionskih fragmenata nastalih iz izabranih iona-preteča. Ukoliko je potrebna veća rezolucija (moć razdvajanja) iona nastalih iz molekule nepoznatog uzorka s ciljem strukturne identifikacije uzorka, koristi se tandemski spektrometar masa (MS/MS) koji ima dva ili tri analizatora odvojena tzv. stanicom za sudare (*engl*. collision cell).

Identifikacija proteina na temelju određivanja masa njihovih peptidnih fragmenata (*engl*. peptide mass fingerprinting, PMF) je najjednostavnija metoda za strukturnu analizu proteina u proteomskim istraživanjima. Nepoznati protein se izreže iz 2-DE gela i pocijepa s tripsinom, proteazom koja specifično cijepa proteine na karboksilnom kraju argininskih i lizinskih ostataka.

Tako pocijepani proteini različitog amino-kiselinskog slijeda stvaraju seriju masa peptida koja se može detektirati pomoću MALDI-TOF spektrometra masa. Spektar dobivenih masa peptida jedinstven je za svaki pojedini protein poput otiska prsta (tzv. mass fingerprint). Usporedbom izmjerenih masa peptidnih fragmenata nepoznatog proteina sa in silico generiranim, pretpostavljenim masama peptida dobivenih teoretskom digestijom proteina s tripsinom u dostupnim proteinskim bazama podataka

(npr. Swiss-Prot, http://www.expasy.org/sprot) moguće je identificirati nepoznati protein. Ukoliko se protein ne uspije identificirati na opisani način (npr. mali kiseli proteini koji ne daju dovoljno peptida nakon digestije tripsinom), tada se jedan ili više peptida fragmentiraju te se im se određuje slijed kratkog amino-kiselinskog odsječka pomoću MS/MS (najčešće spektrometra masa s kvadrupolom i analizatorom vremena leta, Q-TOF MS).

4.8.1. Priprema uzoraka za analizu na MALDI – TOF/TOF spektrometru masa

Nakon što su odbojeni, komadići gela se prebace u 500 μL 50mM amonij-hidrogenkarbonata (pH 7.8) (Kemika, Hrvatska) kako bi gel omekšao. Inkubiraju se 2 puta po 5 min. na termomješalici (500 rpm, Eppendorf, Njemačka), pri čemu se svaki put ukloni otopina amonij-hidrogenkarbonata. Slijedi ispiranje, ponovno u 500 μL amonij-hidrogenkarbonata (pH 7.8) u vremenu od pola sata na termomikseru (Eppendorf, Njemačka) pri 500 rpm. Ostatak otopine se ukloni, a u svaku epruvetu s komadićem gela se doda po 500 μL otopine 50% 50mM amonij-hidrogenkarbonata (pH 7.8) i 50% aceto-nitrila (MeCN) (J.T. Baker, Nizozemska) te se stavi na termomikser 30 min. na 500 rpm uz povremeno miješanje preko noći. Nakon uklanjanja ostatka, u epruvete se doda po 100 μL aceto-nitrila u količini koja će potpuno prekriti gel. Takvi se uzorci stave 5 min. na termomikser (Eppendorf, Njemačka) pri 500 rpm. Ostatak se baci, a uzorak suši u uređaju za sušenje (Speed Vac, Eppendorf, Njemačka). Zatim se u svaki uzorak doda približno 20 μL tripsina (Merck, SAD) tako da se prethodno pripremi 20 μg/mL otopina tripsina (Merck, SAD) u amonij-hidrogenkarbonatu. Čitav se postupak izvodi u malim kivetama od 200 μL. Uzorci se zatim inkubiraju 18 sati na 37ºC. Iz uzorka se potom izdvoji tripsinski pufer i na vakuum pumpi se liofilizira, a u preostale komadiće gela se u svaku epruvetu doda po 50 μL otopine 5%-tne otopine triflouroctene kiseline (TFA) (Merck, SAD) i 50% aceto-nitrila (MeCN) (J.T. Baker, Nizozemska), inkubira se 15 min. u ultrazvučnoj kupelji te 15 min. na termomikseru. Postupak se ponovi dva puta. Ekstrakti se spoje i liofiliziraju u vakuum pumpi na 20ºC. Uzorci se zatim otope u 10 μL 0.1%-tne TFA i pročiste kroz posebne tipseve (Zip Tip, Eppendorf, Njemačka). Funkcija Zip Tip je odvajanje soli, komadića gela, ostataka boje, APS, TFA, MeCN i ostalih soli od peptida. Kolone se pripreme tako da se po tri

puta u nastavak sa kolonom unese i ispusti 10 µL 80% MeCN (J.T. Baker, Nizozemska), 20% H_2O s 0.1% TFA (Merck, SAD). Nakon toga se ispiru tri puta sa 10 µL 50% MeCN, 50% H_2O s 0.1% TFA. Zadnji korak pripreme kolone je ispiranje tri puta sa 10 µL 0.1% TFA. Slijedi vezanje uzorka, koji je otopljen u 0.1% TFA, tako da se 10 puta provuče gore dolje kroz pripremljenu kolonu. Naime, na taj se način peptidi vežu na kolonu. Kolona se zatim ispere 5 puta sa po 10 µL 0.1% TFA. Uzorak se eluira tako sa u kolonu uvuče 10 µL 80% MeCN, 20% H_2O s 0.1% TFA i otpipetira u novu epruvetu (Eppendorf, Njemačka). Postupak se ponovi 10 puta, nakon čega se uzorak osuši u vakum pumpi, nakon čega je poprima liofiliziranu fomu. Uzorak se potom pomiješa sa matricom (CHCA) (Waters, SAD) i nanese na pločicu. Ukupno se dodaje 5 µL matrice, a na pločicu se nanosi 1 µL.

4.8.2. Analiza spektrometrom masa MALDI TOF/TOF

Analiza uzoraka izvršena je pomoću spektrometra masa MALDI TOF/TOF (4800 plus MALDI TOF/TOF™, Applied Biosystems, SAD). Najprije su podešeni standardni kalibracijski parametri na uređaju, potom su snimljeni spektri svih uzoraka nanesenih na MALDI pločicu. Nakon toga je provedena interna kalibracija pomoću signala peptida nastalih autolizom tripsina (Tablica 6.).

Tablica 6. Signali peptida nastalih autolizom tripsina

Teoretski izračunata monoizotopna masa *(m/z)*	**Naboj $[M + H]^+$**	**Molekulska formula**
515,3305	1	$C_{22}H_{42}N_8O_6$
842,5100	1	$C_{37}H_{67}N_{11}O_{11}$
1045,5642	1	$C_{43}H_{76}N_{14}O_{16}$
2211,1046	1	$C_{96}H_{151}N_{27}O_{33}$
2283,1807	1	$C_{101}H_{163}N_{27}O_{31}S$
3161,4957	1	$C_{135}H_{217}N_{35}O_{46}S_3$

4.8.3. Identifikacija proteina uz pomoć baza podataka

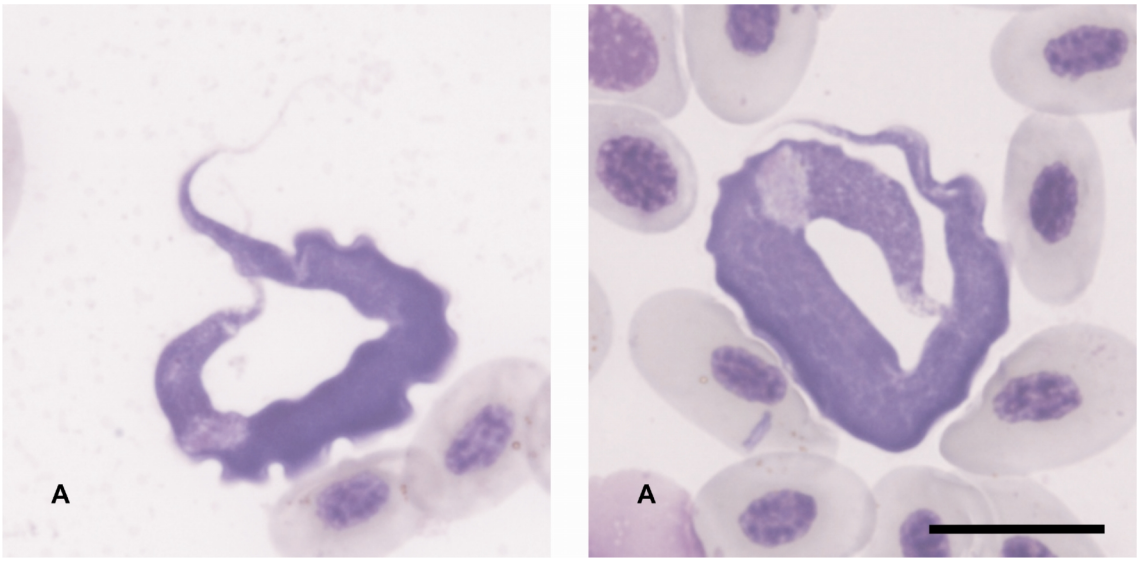
Pomoću dobivenih MS i MS/MS spektara, pretraživane su baze podataka pomoću specijaliziranog računalnog programa Mascot verzija 2.1 (Matrix Science). Pretražene su baze SwissProt, MSDB i NCBInr. Uvjeti pretraživanja bili su $p<0,05$, a pozitivnim nalazom se smatrala vrijednost veća od 50, čija je granica određena kao signifikantna vrijednost vjerojatnosti prema Mowse rezultatu (*engl*. Probability Based Mowse Score).

5. REZULTATI

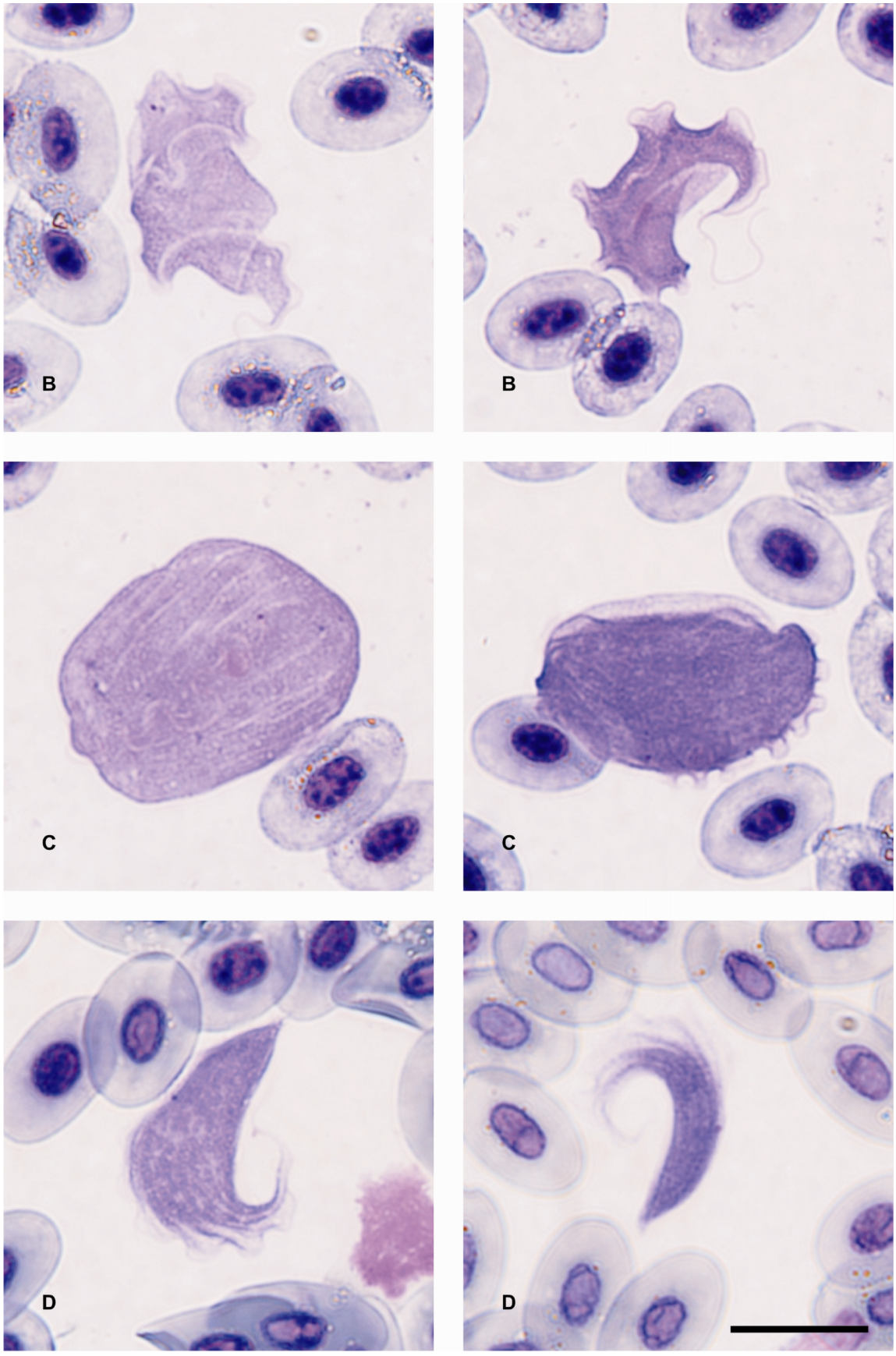
5.1. Morfološka karakterizacija *T. rotatorium*

Pregledano je 50 obojanih preparata arhivskih krvnih razmaza jestivih zelenih žaba (*P. esculentus*) Uz tripanosome su pronađeni i drugi paraziti uključujući protozoa (*Hepatozoon*) i metazoa (Nematoda: Filarioidea). Tripanosome su bile smještene ekstracelularno, među eritrocitima, zajedno s razvojnim oblicima oblića, a protozoa (*Hepatozoon*) su bili smješteni unutar eritrocita.

Pronađena su 4 morfološka oblika tripanosoma (Slika 4.). Prvi oblik (Slika 4B.) ima jedan kraj tijela tup, dok je drugi kraj šiljat i uzak. Bič i undulirajuća membrana mogu se uočiti. Drugi oblik ima okruglo i široko tijelo, a slobodni bič se ne može uočiti. Undulirajuća membrana vidljiva je samo na jednom kraju tijela (slika 4C.). Za treći oblik specifično je usko tijelo sa šiljatim krajevima, pri tome je širina tijela gotovo jednaka na svim njegovim dijelovima. Jezgra je slabo vidljiva za razliku od undulirajuće membrane i slobodnog biča koji su jasno uočljivi (slika 4A.). Kod četvrtog oblika krajevi tijela su šiljati kao i kod trećeg, ali je širina prednjeg dijela tijela znatno veća od one na stražnjem dijelu. Undulirajuća membrana i slobodni bič se dobro uočavaju, a jezgra je vrlo dobro izražena (slika 4D.). Morfološki parametri analizirani su kako je to opisano u poglavlju Materijali i metode. Sumarni podaci morfoloških parametara, zajedno s podacima drugih autora, nalaze se u Tablici 7.



Slika 4. Morfološki oblici *T. rotatorium,* skala=20µm.



Slika 4. Morfološki oblici *T. rotatorium* (nastavak s prethodne stranice), skala=20µm.

Tablica 7. Prikaz rezultata morfoloških parametara. Vrijednosti su izražene u μm, raspoređene idućim slijedom: srednja vrijednost, ± standardna devijacija i raspon (od najniže do najviše vrijednosti).

Autori	**Ovo istraživanje**	**LEMOS i sur. (2008.)**	**ZICKUS (2002.) ***	**FANTHAM i sur. (1942.)**	**MIYATA (1978.)**	**WERNER (1993.) ***
Država porijekla	Republika Hrvatska	Brazil	LITVA	Kanada	Japan	Kina, SAD
Nosioc	*Pelophylax esculentus*	*Leptodactylus chaquensis*	*Rana temporaria, Pelophylax esculentus, Bufo bufo*	*Rana clamitans*	*Rana rugosa*	*Bufo gargarizans, Rana limnocharis, Rana nigromaculata, Rana clamitans*
Parazit (n=broj parazita)	*Trypanosoma rotatorium*-kompleks (n=200)	*Trypanosoma rotatorium*-kompleks	*Trypanosoma rotatorium*-kompleks (n=99)	*Trypanosoma rotatorium*	*Trypanosoma rotatorium (n=8)*	*Trypanosoma rotatorium (n=85)*
L	36.9±9.20 (20.3-64.2)	42.25±3.57 (39-48)	15.9-63.7	(47.4-72.6)	39.1 (34.8-45)	18-73
W	18.3± 5.68 (9.8-39.5)	23±4.1 (18-29)	6.2-23.9	(3-26.7)	11 (8.4-12.6)	9-35
WN	3.8±0.85 (1.5-5.5)	3±1 (2-4)		(2.2-5.9)	-	2-7
LN	4.9±1.90 (2-12.7)	9.66±0.57 (9-10)		(3-6.6)	13.4 (10.8-16.8)	5-27
AN	20±6.82 (7.1-36.8)	21.33±1.15 (20-22)		-	-	12-46
PN	17.9±3.99 (8.5-27.2)	23.33±2.88 (20-25)		-	-	7-29
KN	7.3±2.79 (2.6-15.8)	1.33±0.57 (1-2)		-	1.2 (0.6-1.8)	2-16
AK	28.7±12.05 (9.3-54.4)	28.28±2.43 (23-30)		-	-	-
PK	9±5.43 (1-19.8)	12.71±1.68 (8-19)		-	4.4 (3.6-6.0)	1-21
F	14.3±6.96 (3.3-30.3)	-		-	-	7-22
NI	1.1±0.60 (0.3-2.7)	-		-	-	-

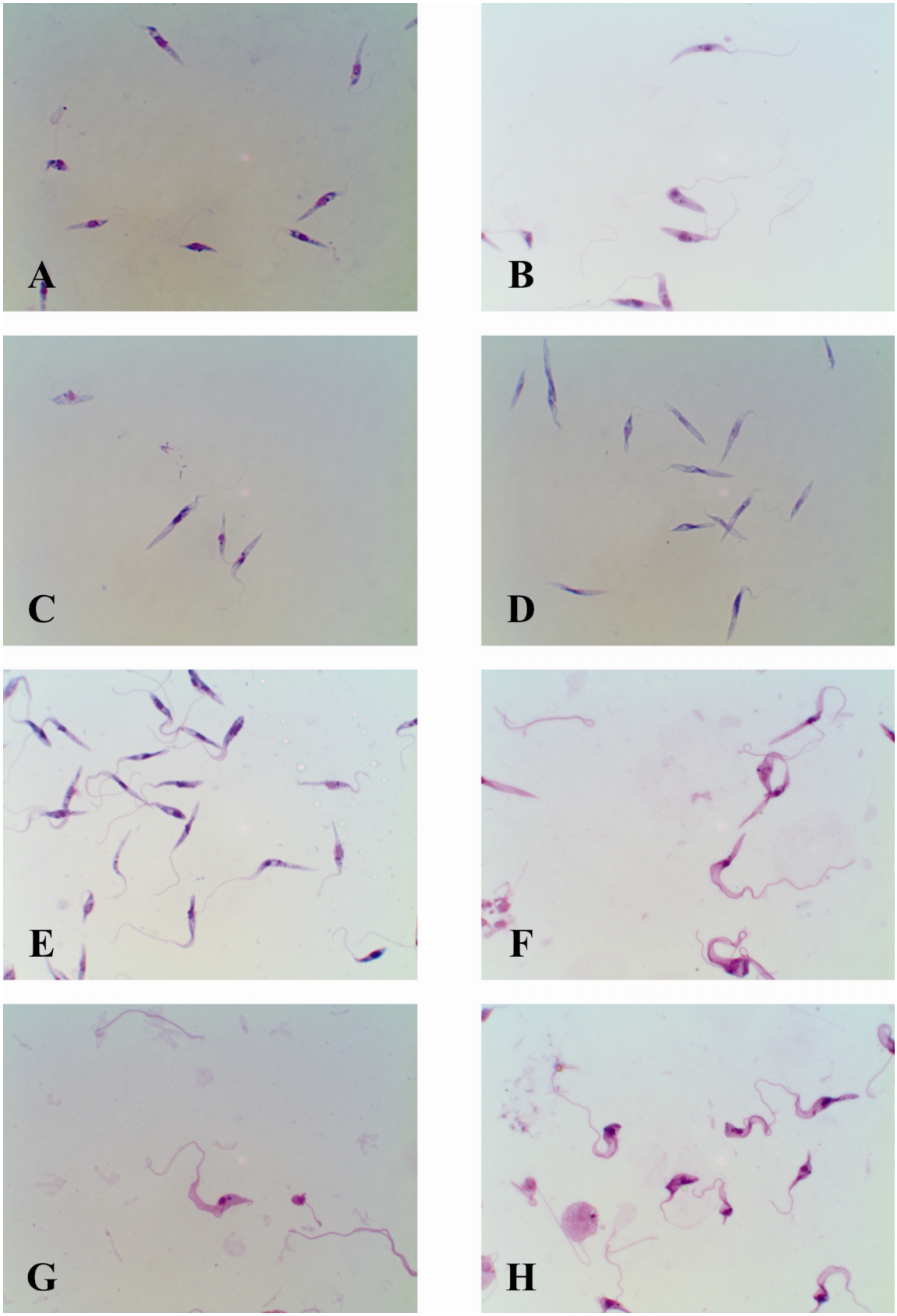
* zbirni rezultati mjerenja tripanosoma koje potječu iz različitih nosioca

5. 2. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *T. melophagium* na 25°C u BCAT-u

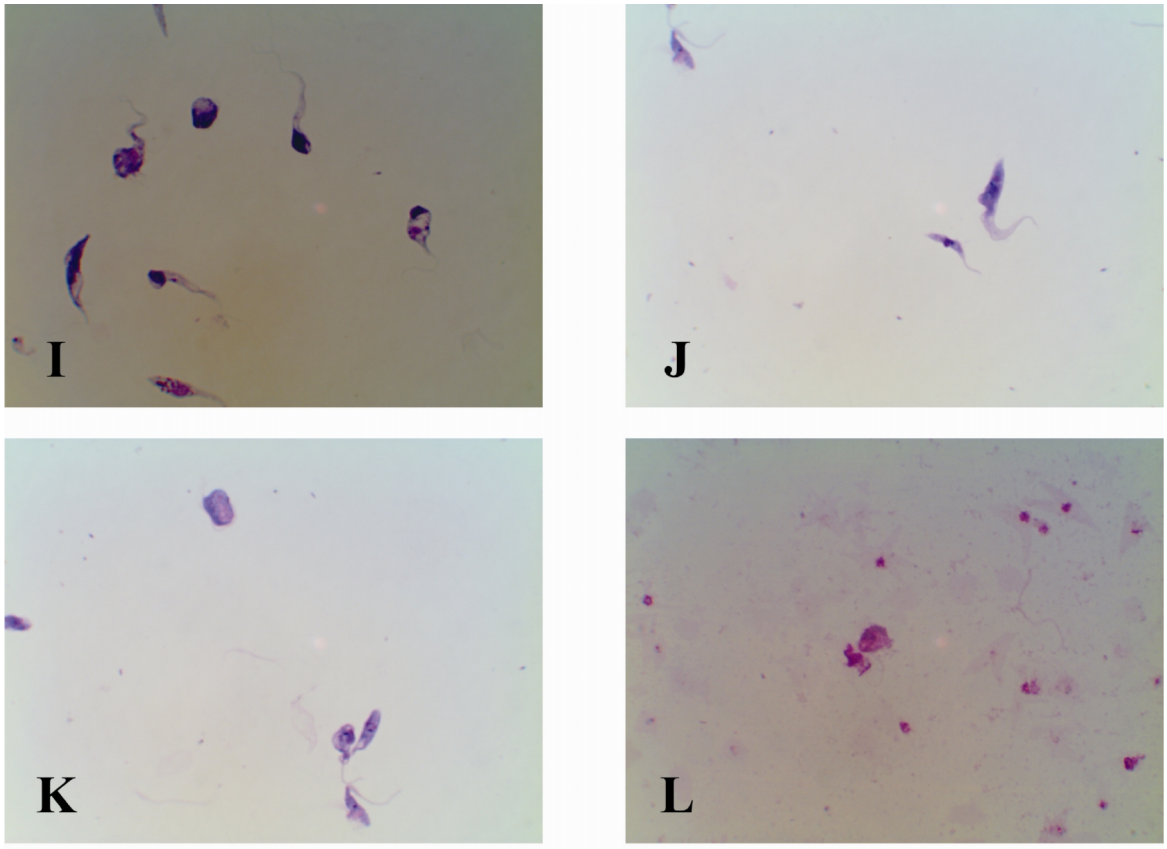
Izolatu *T. melophagium* je tijekom cijelog vremenskog perioda vitalnost ostala očuvana. Niti u jednom slučaju nisu primijećeni mrtvi bičaši. Treći dan su zabilježeni mali (Slika 5A.) i veliki epimastigoti. Tripomastigoti nisu viđeni. Na početku stacionarne faze (7. dan), u hranjivim podlogama su zabilježeni epimastigoti i tripomastigoti (Slika 5B.). Desetog dana po inokulaciji u hranjivim podlogama su primijećeni mali epimastigoti, veliki epimastigoti i tripomastigoti. Na velikim epimastigotima i tripomastigotima jasno je vidljiva undulirajuća membrana (Slika 5C. i 5D.). Zadnji dan praćenja morfologije (Slika 5E.), u hranjivim podlogama su uz male epimastigote i velike epimastigote s dobro razvijenom undulirajućom membranom, pronađeni i tripomastigoti koji podsjećaju na krvne oblike. Razlika među njima je u slabije razvijenoj undulirajućoj membrani. U nekih jedinki su primijećena intracitoplazmatska zrnca.

5. 3. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *T. melophagium* na 37°C u BCAT-u

Tijekom vremenskog perioda inkubacije hranjivih podloga na 37°C vitalnost je padala s obzirom na dužinu inkubacije. Prvi dan je zabilježeno najmanje mrtvih stanica (jedna mrtva stanica na 10 vidnih polja mikroskopa), dok je zadnji dan zabilježeno najviše mrtvih stanica u vidnom polju mikroskopa (jedna stanica po vidnom polju mikroskopa). Odnos broja mrtvih i živih stanica nije određivan. Prvi dan inkubacije na 37°C primijećeni su uz epimastigote i pravi krvni tripomastigoti, koji imaju usmjeren stražnji kraj tijela, dobro razvijenu undulirajuću membranu i dugačak slobodni bič (Slika 5F.). Trećeg dana inkubacije pojavili su se manji tripomastigoti koji su zadržali dobro razvijenom undulirajućom mebranom i dugi slobodni bič. Petog dana inkubacije tripomastigoti su se još više skratili. Ti oblici odgovaraju metacikličkim, invazivnim oblicima u krvi (Slika 5G.). Desetog dana inkubacije uz metacikličke tripomastigote, primijećene su okrugle forme tripanosoma (5I.).



Slika 5. Prikaz bičaša *T. melophagium* uzgojenih u BCAT-u i LIT-u.



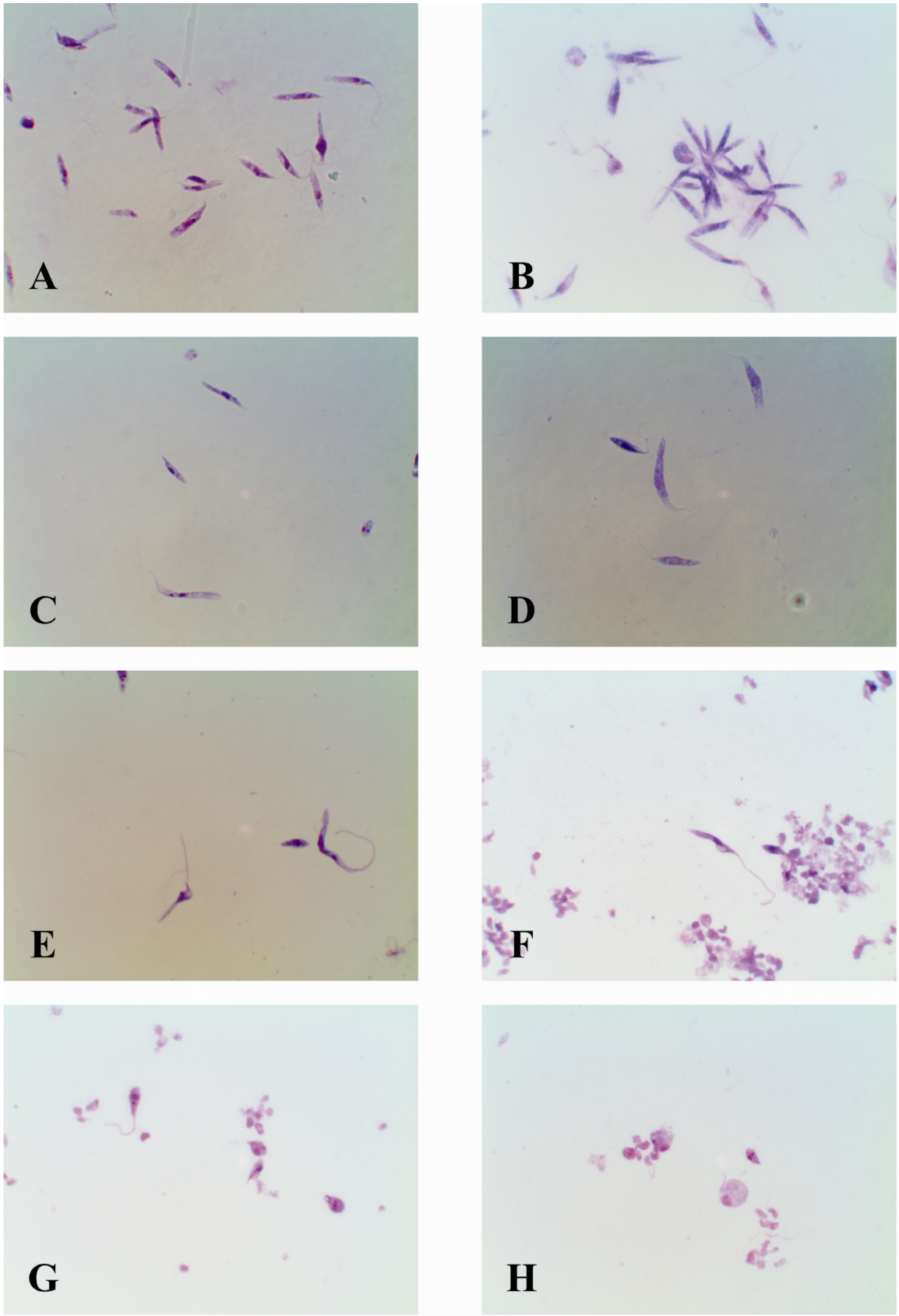
Slika 5. Prikaz bičaša *T. melophagium* uzgojenih u BCAT-u i LIT-u (nastavak s prethodne stranice), skala=20µm.

5.4. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *T. melophagium* na 37°C u LIT-u

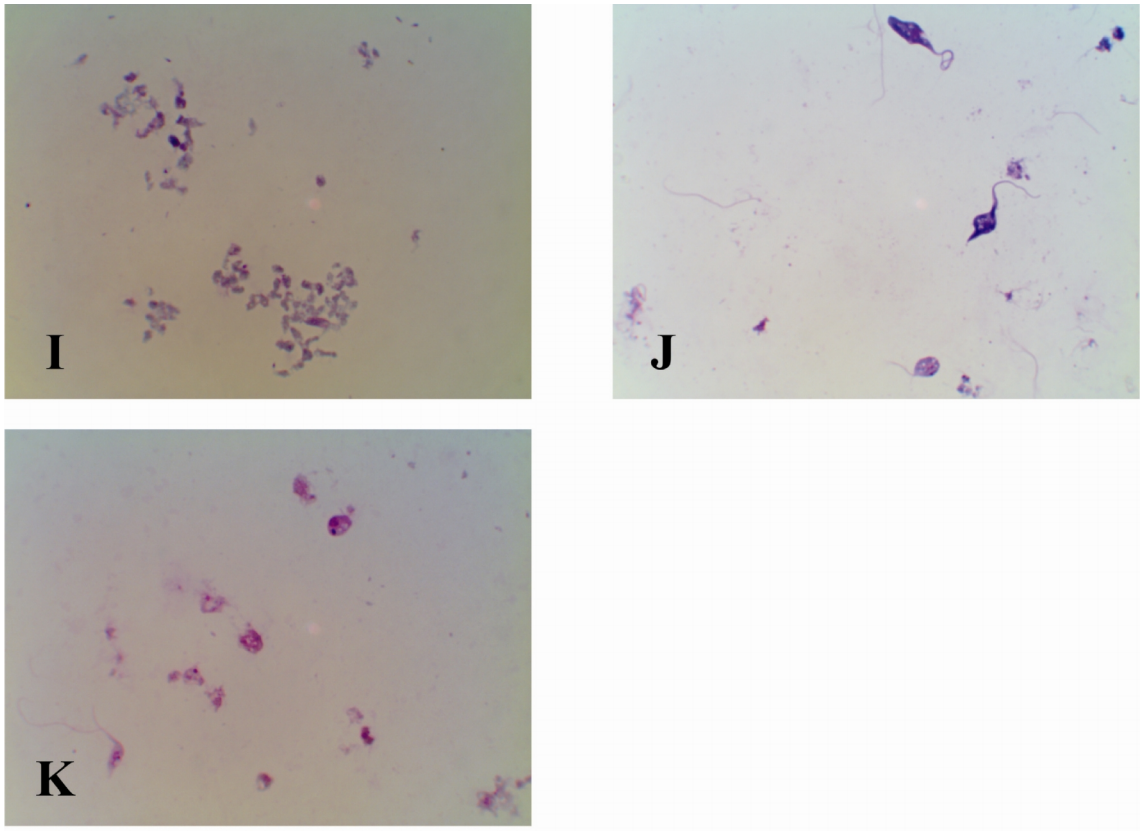
Prvi dan su pronađeni mali epimastigoti i tripomastigoti s kratkim bičem uz, mnoštvo uginulih jedinki tripanosoma (Slika 5J.). Treći dan metaciklički tripomastigoti, amastigoti i mnoštvo uginulih tripanosoma (Slika 5K.). Peti dan sve tripanosome uginule (Slika 5L.).

5.5. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *Trypanosoma* sp. iz jelena na 25°C u BCAT-u

Izolatu *Trypanosoma* sp. iz jelena je tijekom cijelog vremenskog perioda vitalnost ostala očuvana. Niti u jednom slučaju nisu primijećeni mrtvi bičaši. Treći dan su zabilježeni mali (Slika 6A.) i veliki epimastigoti. Tripomastigoti nisu viđeni. Na početku stacionarne faze (7. dan), u hranjivim podlogama su zabilježeni mali i veliki epimastigoti (Slika 6B.). Desetog dana po inokulaciji u hranjivim podlogama su



Slika 6. Prikaz bičaša *Trypanosoma* sp. iz jelena uzgojenih u BCAT-u i LIT-u.



Slika 6. Prikaz bičaša *Trypanosoma* sp. iz jelena uzgojenih u BCAT-u i LIT-u (nastavak s prethodne stranice), skala=20µm.

primijećeni mali epimastigoti, veliki epimastigoti i amastigoti (Slika 6C. i 6D.). Zadnji dan praćenja morfologije, u hranjivim podlogama su uz amastigote, male epimastigote, viđeni i veliki epimastigoti s dobro razvijenom undulirajućom membranom. Intracitoplazmatska zrnca su primijećena (6E).

5.6. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *Trypanosoma* sp. iz jelena na 37°C u BCAT-u

Prvi dan inkubacije na 37°C primijećeno je mnoštvo mrtvih stanica okruglog oblika. Uz njih, pronađeni su kratki epimastigoti, te epimastigoti s dobro razvijenom undulirajućom membranom i dugačkim slobodnim bičem. (Slika 6F i 6G.). Trećeg dana inkubacije viđeni su amastigoti i mnoštvo mrtvih stanica (Slika 6H.). Petog dana inkubacije nije više bilo živih tripanosoma (Slika 6I.).

5.7. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *Trypanosoma* sp. iz jelena na 37°C u LIT-u

Prvi dan mnoštvo mrtvih i mali epimastigoti (Slika 6J.). Treći dan svi uginuli (Slika 6K.)

5.8. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *T. theileri* na 25°C u BCAT-u

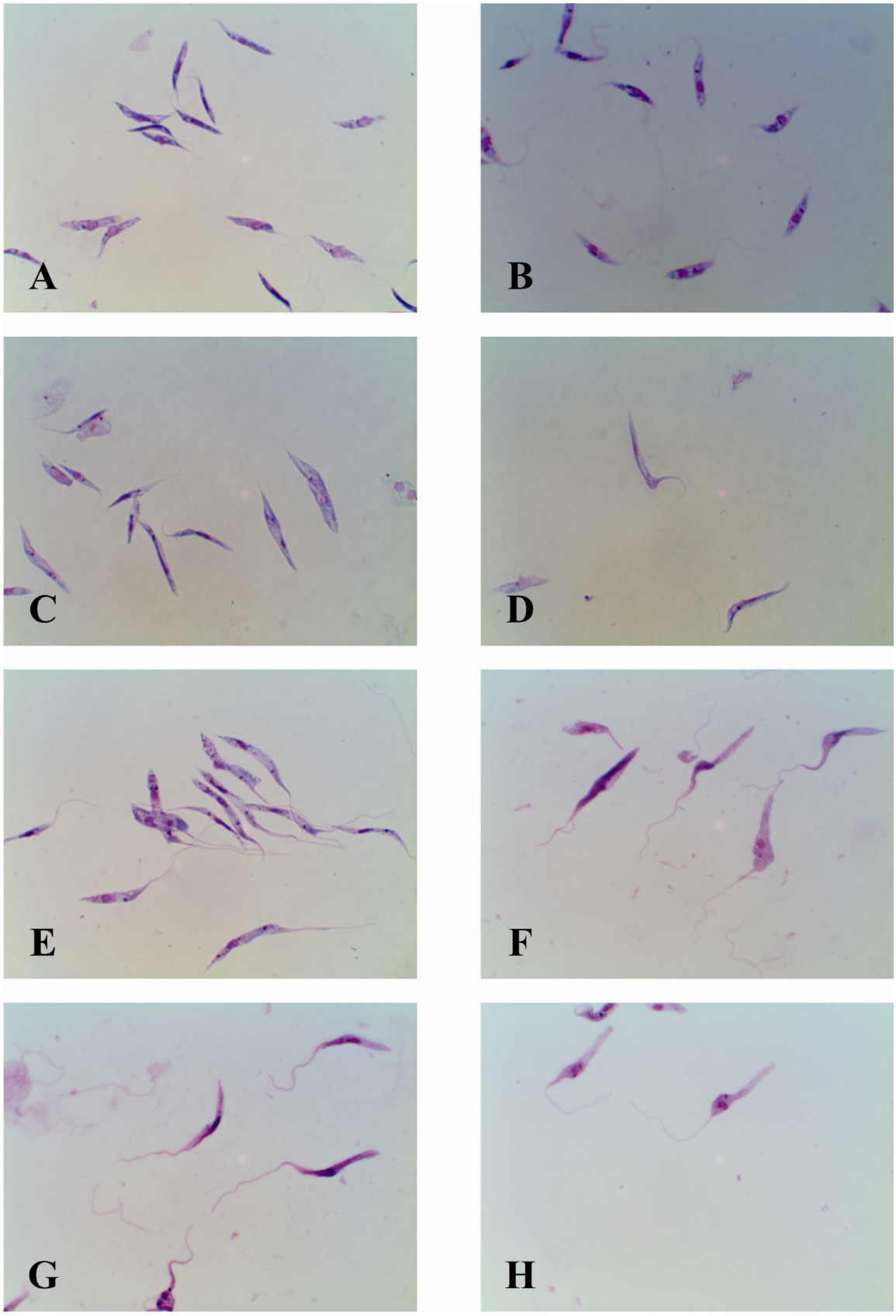
Izolatu *T. thelieri* je tijekom cijelog vremenskog perioda vitalnost ostala očuvana. Niti u jednom slučaju nisu primijećeni mrtvi bičaši. Treći dan su zabilježeni mali (Slika 7A.) i veliki epimastigoti. Tripomastigoti nisu viđeni. Na početku stacionarne faze (7. dan), u hranjivim podlogama su zabilježeni epimastigoti (Slika 7B.). Desetog dana po inokulaciji u hranjivim podlogama su primijećeni mali epimastigoti i veliki epimastigoti. Na velikim epimastigotima jasno je vidljiva undulirajuća membrana (Slika 7C. i 7D.). Zadnji dan praćenja morfologije, u hranjivim podlogama su uz male epimastigote pronađeni su i veliki epimastigoti. U većine jedinki su primijećena intracitoplazmatska zrnca (Slika 7E.).

5.9. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *T. theileri* na 37°C u BCAT-u

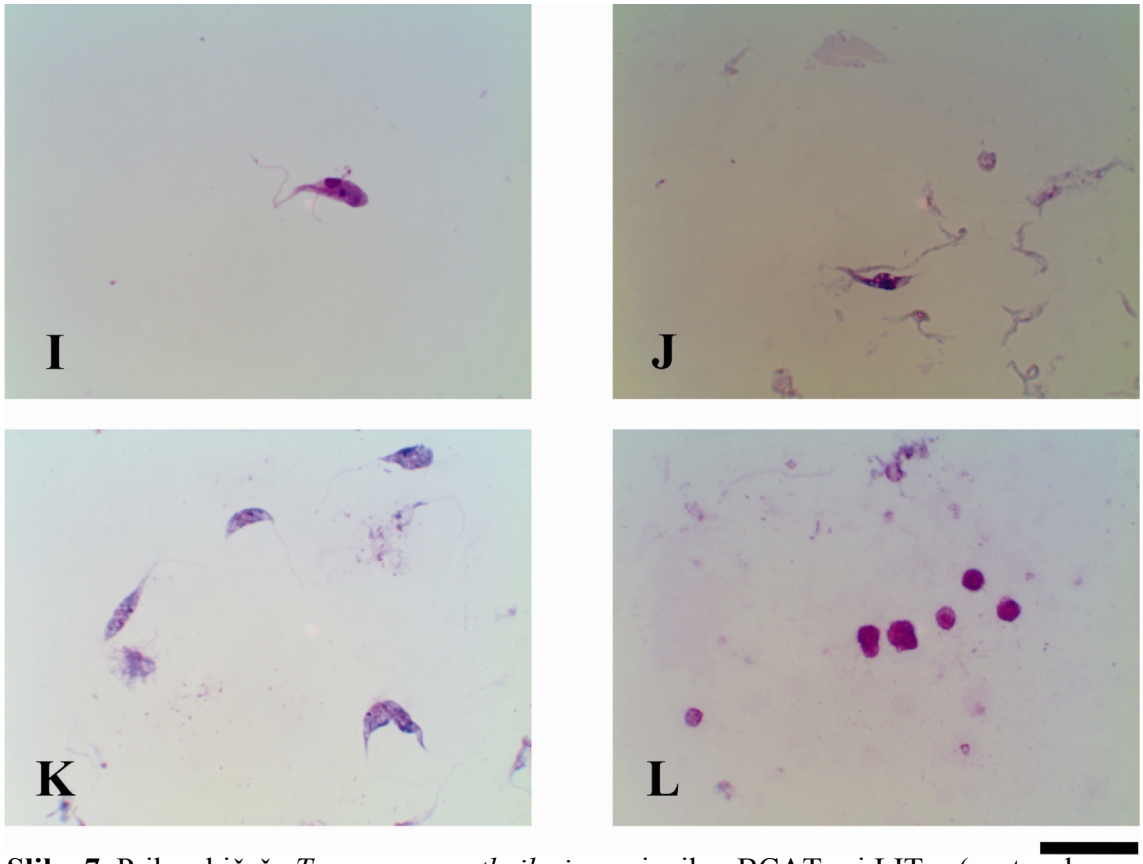
Prvi dan inkubacije na 37°C primijećeni su uz male epimastigote i veliki epimastigoti s dobro razvijenom undulirajućom membranom i dugačkim slobodnim bičem. (Slika 7F.). Trećeg dana inkubacije nađeni su dugi epimastigoti s dugim slobodnim bičem (Slika 7G.). Petog dana inkubacije viđeni su prvi tripomastigoti (Slika 7H.), te kratki tripomastigoti koji odgovaraju izgledom metacikličkim oblicima tripanosoma (Slika 7I.). Desetog dana inkubacije nije više bilo živih tripanosoma (Slika 7J.).

5.10. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *T. theileri* na 37°C u LIT-u

Prvi dan mnoštvo mrtvih jedinki tripanosoma i mali epimastigoti (Slika 7K.). Treći dan sve tripanosome uginule (Slika 7L.).



Slika 7. Prikaz bičaša *Trypanosoma theileri* uzgojenih u BCAT-u i LIT-u.



Slika 7. Prikaz bičaša *Trypanosoma theileri* uzgojenih u BCAT-u i LIT-u (nastavak s prethodne stranice), skala=20µm.

5.11. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *Trypanosoma rotatorium* na 25°C u BCAT-u

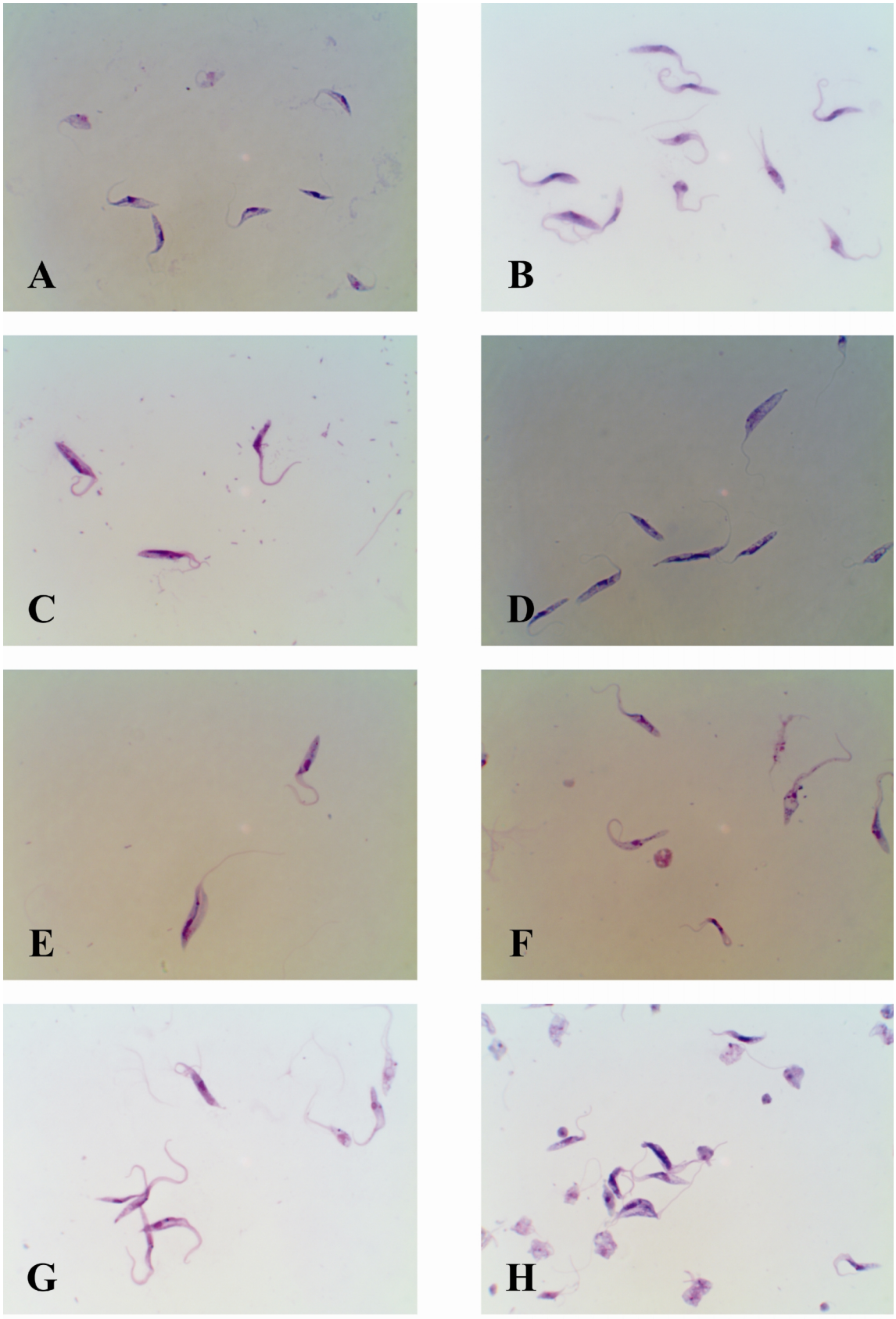
Izolatu *T. rotatorium* je tijekom cijelog vremenskog perioda vitalnost ostala očuvana. Niti u jednom slučaju nisu primijećeni mrtvi bičaši. Treći dan su zabilježeni mali (Slika 8A.) epimastigoti. Na početku stacionarne faze (7. dan), u hranjivim podlogama su zabilježeni epimastigoti otprilike jednake veličine (Slika 8B i 8C.). Desetog dana po inokulaciji u hranjivim podlogama su primijećeni mali epimastigoti i veliki epimastigoti (Slika 8D. i 8E.). Zadnji dan praćenja morfologije, u hranjivim podlogama su uz amastigote, male epimastigote, viđeni i veliki epimastigoti s dobro razvijenom undulirajućom membranom. U nekih jedinki su viđena intracitoplazmatska zrnca (Slika 8F i 8G.).

5. 12. Vitalnost i *in vitro* uzgoj *Trypanosoma rotatorium* na 37°C u BCAT-u i LIT-u

Prvi dan inkubacije na 37°C sve stanice su bile mrtve.

5. 13. Vitalnost i *in vitro* uzgoj tripanosoma na 25°C u LIT-u

Vitalnost svih ispitivanih izolata tripanosoma tijekom cijelog vremenskog perioda bila je očuvana. Morfologija se nije značajno razlikovala od svih jedinki uzgojenih u BCAT-u sve do 7. dana. Tada su uz zdrave stanice, koje su zadržale svoj normalni oblik, primijećene okrugle stanice. Mnoge od njih nisu imale jezgru (Slika 8H.). Deset i 14. dana nakon inokulacije taj se broj s trajanjem inkubacije povećao.



Slika 8. Prikaz bičaša *Trypanosoma rotatorium* uzgojenih u BCAT-u i LIT-u, skala=20µm.

5.14. Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE)

Jedan od ciljeva istraživanja bio je i dobiti uvid u proteomski profil *T. theileri*, *T. melophagium*, *Trypanosoma.* sp iz jelena, te vrste *T. rotatorium*. Cilj je bio identificirati one proteinske točke koje su kvalitiativno eksprimirane između pojedinih vrsta tripanosoma. Međusobno je uspoređen protomski profil tripanosoma podroda *Megatrypanum,* te dva morfološki različita izolata *T. rotatorium*.

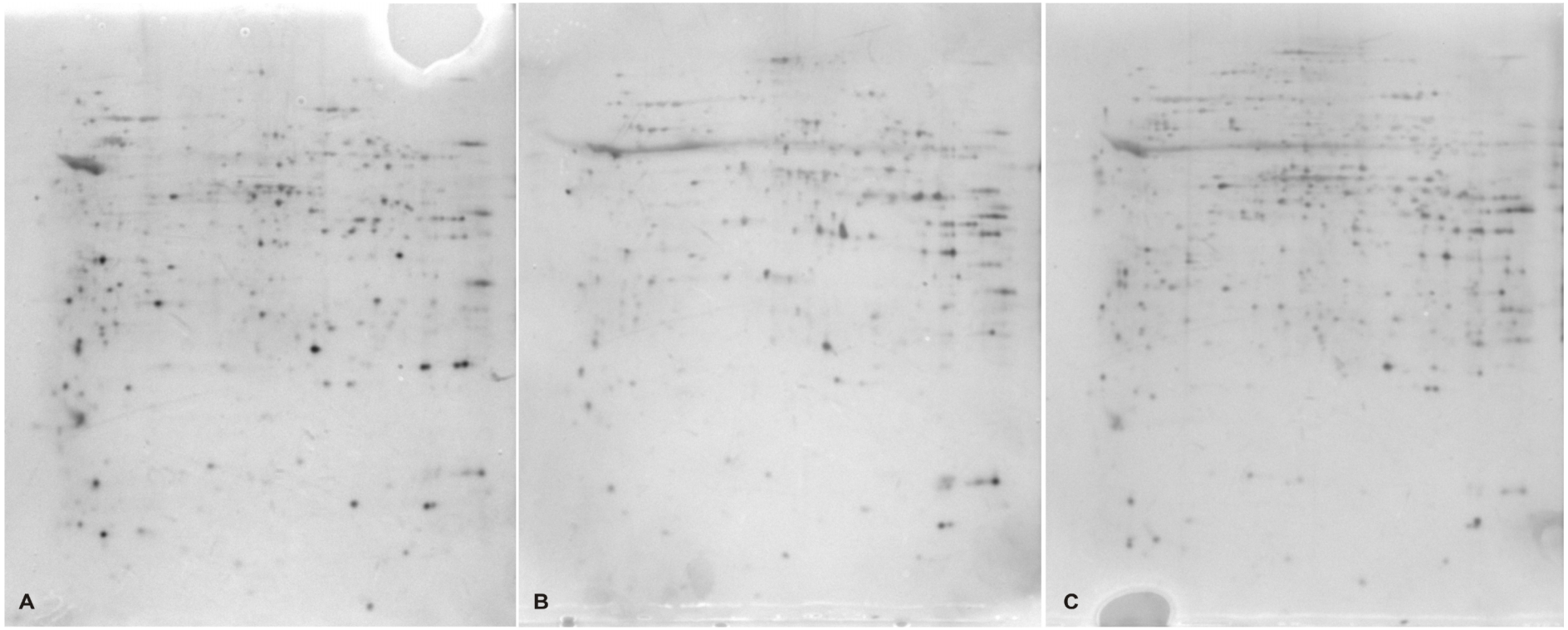
Za potrebe ovog istraživanja ukupno je analizirano pet poliakrilamidnih gelova dobivenih nakon 2-DE, pri čemu svaki gel predstavlja proteomski profil jednog izolata tripanosoma.

Analiza je provedena uz pomoć računalnog programa PDQuest (BIO-RAD, SAD) kao što je opisano u poglavlju 4. Materijali i metode.

5.15 Proteomska analiza bičaša podroda *T. (Megatrypanum)*

Nakon provedene dvodimenzionalne elektroforeze i bojanja gelova (Slika 9.), provedena je analiza proteinskih točaka računalnim softverom PDQuest te je izabrano ukupno 160 točaka u *T. theileri*, 90 točaka u *T. melophagium* i 97 točaka u *Trypanosoma sp* iz jelena. Točke su procesuirane na analizu na MALDI-TOF/TOF MS/MS. Na osnovi dobivenih MS i MS/MS spektara, pretraživane su baze podataka uz pomoć specijaliziranog računalnog programa Mascot verzija 2.1. Pri identifikaciji proteina korišteni su sljedeći minimalni granični parametri: jedan peptid po proteinu je smatran značajnim, sekvenca peptida od 95% te protein potvrđen i sekvencioniran s minimalno 50% potvrdivosti. Kvalitativne analize proteomskog profila svih vrsta *T. (Megatrypanum)* ukazale su na ukupno 283 diferencijalno eksprimirane proteinske točke. Kada je uspoređen proteomski profil svih vrsta međusobno dobiveni su slijedeći rezultati:

a) usporedbom: proteinskog profila *T. theileri* s *T. melophagium* utvrđeno 83 razlikovnih proteina.
b) usporedbom proteinskog profila *T. melophagium* s *T. theileri* utvrđeno je 42 razlikovna proteina.



Slika 9. Reprezentativne slike 2-DE gelova dobivenih razdvajanjem smjese ukupnih proteina tripanosoma iz podroda *T. (Megatrypanum)*: (A) *Trypanosoma* sp iz jelena, (B) *T. melophagium* (C) *T. theileri.* Dobiveni gelovi su obojani sa Coomassie Brilliant Blue G-250 bojom.

c) usporedbom proteinskog profila *T. theileri* s *Trypanosoma* sp. iz jelena utvrđeno je 77 razlikovnih proteina.
d) usporedbom proteinskog profila *Trypanosoma sp.* iz jelena s *T. theileri* utvrđeno je 48 razlikovnih proteina.
e) usporedbom proteinskog profila *T. melophagium* s *Trypanosoma* sp. iz jelena utvrđeno je 48 razlikovnih proteina.
f) usporedbom proteinskog profila *Trypanosoma* sp. iz jelena s *T. melophagium* utvrđeno je 49 razlikovnih proteina.

Prema bazama podataka, od 283 proteinske točke, njih 268 (94,69%) je bilo lažno pozitivnih, a 15 (5.3%) proteina je uspješno identificirano.
Prikaz svih proteina identificiranih pomoću baze podataka, nalazi se u Prilogu, Tablici 11. Prikaz uspješno identificiranih proteina s pristupnim brojevima bazi podataka, molekulskom masom, izoelektričnom točkom i postotkom združivanja, nalazi se u Tablici 8.

Tablica 8. Prikaz značajnih razlikovnih proteina između izolata podroda *T.(Megatrypanum).*

Broj proteina	Izolat	Ime proteina	Pristupni broj prema bazi podataka	Molekulska masa (kDa)	*Postotak združivanja (*engl.* protein score)
2	KO/Tt	ISG75.- *Trypanosoma equiperdum*	Q1WKA1_TRYEQ	58176.5	53
3	KO	Chaperonin, putative (T-complex protein 1 (Theta subunit), putative).- *Leishmania major*	Q4Q063_LEIMA	58147.8	57
6	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q38CI0_9TRYP	62735.7	68
9	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4E2G8_TRYCR	21793.1	51
16	KO	ISG75 [*Trypanosoma equiperdum*]	Q1WKA2_TRYEQ	58108.5	52
23	KO	40S ribosomal protein S12 [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener]	Q4DW69_TRYCR	15954.1	52
26	KO	elongation factor 2 [*Trypanosoma cruzi*]	gi|205278864	86005.5	58

64	Tt	dnaK-type molecular chaperone precursor, mitochondrial - *Leishmania major*	S33575	68287.8	54
71	Tt	ISG75.- *Trypanosoma brucei gambiense*.	Q1WKA4_TRYBG	58139.5	58
76	Tt	Galactokinase, putative (EC 2.7.1.6).- *Trypanosoma cruzi.*	Q4DFH6_TRYCR	51302.1	105
99	Tt	tubulin beta chain - *Trypanosoma brucei rhodesiense* Beta tubulin (Fragment).- *Trypanosoma grayi.*	UBUTB Q1PCI8_9TRYP	49671.7 42806.9	58 55
124	Tt	40S ribosomal protein S12, putative.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4CQG0_TRYCR	15887.1	64
186	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D4R6_TRYCR	27739.8	62
229	Tt	Mannose-1-phosphate guanyltransferase, putative (EC 2.7.7.13).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CU94_TRYCR	42029	62
271	Tm	Mitochondrial malate dehydrogenase, putative (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*. Malate dehydrogenase, putative (EC 1.1.1.37).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D4A0_TRYCR Q4DXL5_TRYCR	31494.4 33330.4	119 119

* Postotak združivanja (*engl.* protein score) se odnosi na kombinirane postotke svih zabilježenih spektara masa koji se mogu pridružiti aminokiselinskim sljedovima unutar pojedinog proteina. Što je viša vrijednost postotka združivanja, to je pouzdanija identifikacija proteina. Pristupni broj proteina određen je prema bazi podataka NCBI. KO – *Trypanosoma* sp. iz jelena, Tt – *Trypanosoma theileri*, Tm- *Trypanosoma melophagium*.

Detaljnom analizom značajnih proteina utvrđena je njihova pojavnost kod različitih vrsta podroda *T. (Megatrypanum)* (Tablica 9.).

Od 15 identificiranih proteina, tri su bila pretpostavljena (hipotetska). Pretraživanjem bioloških funkcija u NCBI Gene (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) i UniProtKB/Swiss-Prot (http://www.uniprot.org/uniprot/) bazama podataka, ustanovljeno je da diferencijalno eksprimirani proteini spadaju u metaboličke i strukturne proteine: Malat dehidrogenaza sudjeluje u metabolizmu i sastavni je dio glikosoma i mitohondrija, 40 S ribosomalni protein sudjeluje u sintezi proteina,

galaktokinaza sudjeluje u metabolizmu galaktoze, te ISG 75, faktor elongacije 2 i tubulin spadaju u strukturne proteine.

Tablica 9. Prikaz pojavnosti značajnih proteina u izolata podroda *T.(Megatrypanum)*

T. theileri	***T. melophagium***	***Trypanosoma* sp. iz jelena**	**Redni broj proteina u Tablici 8.**	**Ime proteina**
-	+	+	271	Mitochondrial malate dehydrogenase, putative (Fragment) - Trypanosoma cruzi. Malate dehydrogenase, putative (EC 1.1.1.37) - Trypanosoma cruzi.
+	-	+	229	Mannose-1-phosphate guanyltransferase, putative (EC 2.7.7.13) - Trypanosoma cruzi.
+	+	-	64	dnaK-type molecular chaperone precursor, mitochondrial - Leishmania major
+	+	-	71	ISG75 - Trypanosoma brucei gambiense.
+	+	-	124	40S ribosomal protein S12, putative - Trypanosoma cruzi.
+	+	+	2	ISG75 - Trypanosoma equiperdum
-	+	+	16	ISG75 - Trypanosoma equiperdum
-	+	+	23	40S ribosomal protein S12 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]
-	+	+	26	elongation factor 2 Trypanosoma cruzi
+	-	+	186	Hypothetical protein - Trypanosoma cruzi.
+	-	-	9	* Hypothetical protein - Trypanosoma cruzi.
-	+	-	6	* Hypothetical protein - Trypanosoma brucei
+	-	-	99	* tubulin beta chain - Trypanosoma brucei rhodesiense Beta tubulin (Fragment) - Trypanosoma grayi.
+	-	-	76	* Galactokinase, putative (EC 2.7.1.6) - Trypanosoma cruzi.
-	-	+	3	* Chaperonin, putative (T-complex protein 1 (Theta subunit), putative) - Leishmania major

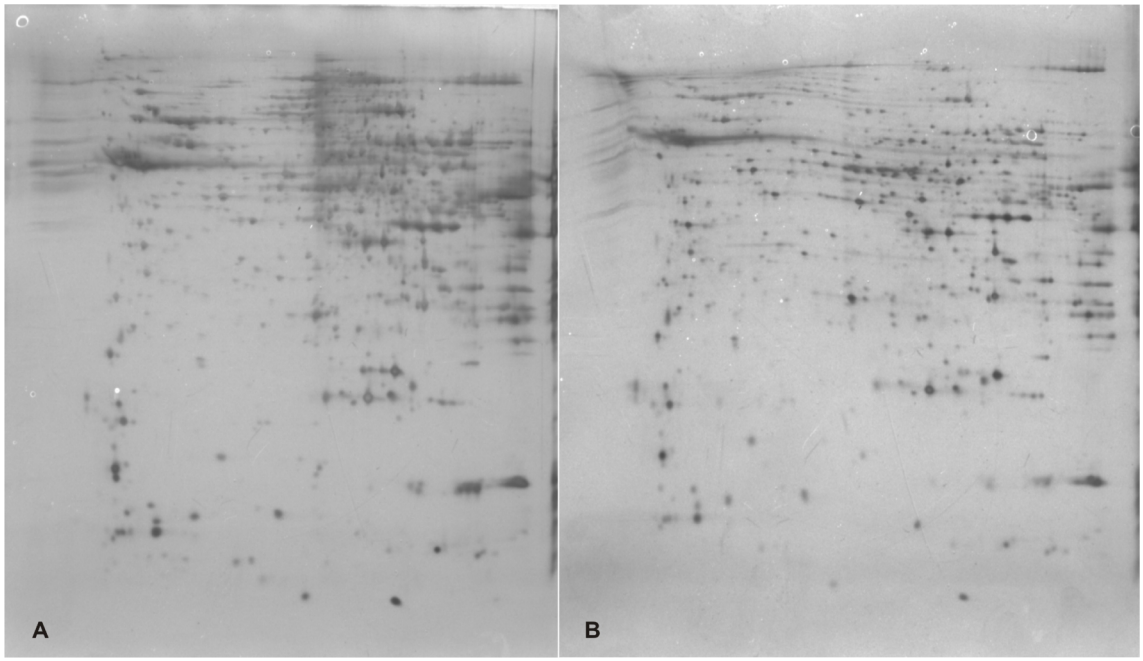
* Rezultati prikazuju protein pronađen samo u jedne vrste tripanosoma

5.16. Proteomska analiza bičaša *T. rotatorium*

Temeljem pretraživanja krvnih razmaza pronađena su dva morfološki različita izolata *T. rotatorium*. Izolati su izvađeni iz arhive uzoraka u hranjivim podlogama, uzgojeni i pripremljeni za dvodimenzionalnu elektroforezu.

Nakon dvodimenzionalne elektroforeze i bojanja gelova, dobiven je proteomski profil (Slika 10.). Nadalje, analizom PDQuest softverom, izabrano je ukupno 13 razlikovnih proteinskih točaka, četiri iz jednog izolata (OR2) te devet iz drugog izolata (PR2). Točke su procesuirane na analizu na MALDI-TOF/TOF MS/MS, a kod identifikacije proteina korišteni su identični parametri kao i za bičaše podroda *T.(Megatrypanum).*

Temeljem dobivenih MS i MS/MS spektara, pretraživane su baze podataka uz pomoć specijaliziranog računalnog programa Mascot verzija 2.1. Ukupno je identificirano 13 proteina od čega je 9 (69,23%) bilo lažnih (Prilog, Tablica 12.) U Tablici 10. prikazani su značajni proteini dva izolata *T. rotatorium*.



Slika 10. Reprezentativne slike 2-DE gelova dobivenih razdvajanjem smjese ukupnih proteina dva izolata *T. rotatorium*: A – izolat PR2, B - izolat OR2. Dobiveni gelovi su obojani sa Coomassie Brilliant Blue G-250 bojom.

Prema bazama podataka uspješno su identificirana samo 4 proteina (30,76%), od kojih su tri bila iz jednog izolata (PR), a jedan iz drugog izolata (OR). Od ta četiri proteina

dva su bila pretpostavljena (hipotetska). Ostala dva proteina karakteristična su samo za izolat PR.

Pretraživanjem bioloških funkcija u NCBI Gene (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) i UniProtKB/Swiss-Prot (http://www.uniprot.org/uniprot/) bazama podataka, ustanovljeno je da diferencijalno eksprimirani proteini identificirani nakon 2-DE analize sudjeluju u oksidativno-redukcijskim procesima, te razgradnji glicina. MaoC dehidrataza sudjeluje u oksidoredukcijskim procesima, a aminometiltransferaza sudjeluje u razgradnji glicina.

Tablica 10. Prikaz značajnih razlikovnih proteina između dva izolata *T. rotatorium*

Broj proteina	Izolat	Ime proteina	Pristupni broj prema bazi podataka	Molekulska masa kDa	Izoelektrična točka proteina	*Postotak združivanja (*engl.* protein score)
2	OR	hypothetical protein [*Trypanosoma brucei* TREU927]	gi|72392361	62264.4	7.95	52
6	PR	aminomethyltransferase, putative [*Trypanosoma brucei gambiense* DAL972]	gi|261334973	41156.2	8.17	61
9	PR	maoC-like dehydratase [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener]	gi|71656824	22161.4	8.3	55
12	PR	hypothetical protein [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener]	gi|71407195	32664.6	4.86	53

* Postotak združivanja (*engl.* protein score) se odnosi na kombinirane postotke svih zabilježenih spektara masa koji se mogu pridružiti aminokiselinskim sljedovima unutar pojedinog proteina. Što je viša vrijednost postotka združivanja, to je pouzdanija identifikacija proteina.

Pristupni broj proteina određen je prema bazi podataka NCBI. OR-izolat OR, PR-izolat PR.

6. RASPRAVA

6.1. Morfologija *T. rotatorium*

Temeljem istraživanja drugih autora poznat je polimorfizam *T. rotatorium* (MACHADO, 1911.; FANTHAM, 1942.; DIAMOND, 1965.; BARDSLEY i HARMSEN, 1973.; MIYATA, 1978.; BARTA i sur., 1989.; WERNER, 1993.; DESSER, 2001.; ŽIČKUS, 2002.). Morfometrijskom analizom WERNERA (1993.) kinetoplast je bio smješten pokraj stražnjeg kraja dok su LEMOS i sur. (2008.) utvrdili da je kinetoplast pokraj jezgre, što se i slaže s ovdje provedenim istraživanjima. Prema MACHADU (1911.), tripanosome su pre-reproduktivnom periodu, jer u toj fazi razvojnog ciklusa kinetoplast migrira prema jezgri. Temeljem istraživanja WERNERA i WALEWSKOG (1976.), *T. rotatorium* se smatra čak i sinonimom *T. chattoni*. Autori pretpostavljaju da su okrugli morfotipovi *T. chattoni* formirani zaokruživanjem citoplazme, te retrakcijom undulirajuće membrane i gubitkom slobodnog biča. U svom istraživanju u Litvi, ŽIČKUS (2002.) je pronašao tripanosome *T. rotatorium* kompleksa u tri vrste žaba. Visoka prevalencija je bila u livadne smeđe žabe (*Rana temporaria,* koja svoj život provede daleko od vodenih površina osim za vrijeme mrijesta, zatim u jestive zelene žabe (*P. esculentus*), a niska u obične krastače (*Bufo bufo*). Vektori *T. rotatorium* kompleksa u žaba su pijavice. Temeljem toga, jestiva zelena žaba ima veću mogućnost kontakta s vektorima, iako postoje eksperimentalna istraživanja gdje je dokazano da pijavice ne vole tvrdu kožu odraslih žaba, već sišu krv jedino punoglavcima (NÖLLER, 1917b.). Morfologija tripanosoma u punoglavaca različita je od morfologije tripanosoma u odraslih žaba. U ovom istraživanju su pronađeni tipični oblici koji se inače javljaju u odraslih žaba što i ukazuje na staru invaziju (TANABE, 1931.; MACHADO, 1911.). Morfometrijski parametri *T. rotatorium* kompleksa ovog istraživanja podudarali su se s istraživanjima WERNERA (1993.) i ŽIČKUSA (2002.) cijelim rasponom, dok su se s istraživanjima drugih autora podudarali sam djelomice (LEMOS i sur., 2008.; FANTHAM i sur., 1942.; MIYATA, 1978.). Tako je MIYATA (1978.) izmjerio samo osam jedinki tripanosoma, a LEMOS i sur. (2008.) i FANTHAM i sur. (1942.) nisu čak ni naveli broj izmjerenih tripanosoma. Temeljem dostupnih crteža i fotografija vidi se da navedeni autori nisu pronašli sve morfotipove *T. rotatorium*

kompleksa već samo neke, što je i rezultiralo nepotpunim preklapanjem raspona morfometrijskih parametara. U svakom slučaju morfometrijski parametri ovog istraživanja podudarali su se s dosadašnjim istraživanjima drugih autora s obzirom na morfotipove koji su tamo pronađeni. BARDSLEY i HARMSEN (1973.) smatraju da sve pleomorfne tripanosome žaba prenosive pijavicama i koje se ne umnažaju u krvi, treba svrstati u *T. rotatorium* kompleks. U ovom istraživanju su opisane visoko polimorfne jedinke tripanosoma bez ikakvog naznake diobe u perifernoj cirkulaciji. Temeljem BARDSLEYA i HARMSENA (1973.), tripanosome pronađene u ovom istraživanju su svrstane u *T. rotatorium* kompleks. Nekadašnji način sistematiziranja tripanosoma žaba temeljen na morfologiji krvnih oblika i vrsti nosioca, te njihovoj geografskoj lokaciji, rezultirao je generalnim konfuzijama. Dakle, tripanosome koje su pripadale različitim vrstama u stvari su vjerojatno pripadale istoj i obrnuto. Tako su FERREIRA i sur. (2007.) pronašli isti genotip tripanosoma u različitim fenotipovima (morfološkim oblicima) unutar iste skupine žaba i različite genotipove tripanosoma unutar istog fenotipa. Primjerice, autori su pronašli morfotipove *T. rotatorium* i *T. chattoni* u istih vrsta žaba, a temeljem genotipizacije se radilo o samo jednom genotipu, s time da su molekularnim tehnikama isto tako isključili i mogućnost miješane invazije. Kako bi se riješio problem polimorfizma i eventualnig razlučivanja ovdje istraživanih tripanosoma iz *T. rotatorium* kompleksa potrebna su daljnja istraživanja i primjena molekularnih tehnika (FERREIRA i sur., 2007a.). Ovo istraživanje stoga predstavlja temelj za buduća molekularna istraživanja, koja će uvelike pridonijeti saznanjima o stvarnoj pripadnosti vrsta tripanosoma u žaba *T. rotatorium* kompleksa u Republici Hrvatskoj.

6.2. *In vitro* uzgoj tripanosoma

Unatoč činjenici da su tripanosome među prvim protozoima koje su bile uzgojene u čistoj kulturi još prije više od 100-njak godina, još uvijek se ne zna sve o njihovim zahtjevima rasta izuzimajući činjenicu da su krv ili krvni produkti obvezatni za njihovo preživljavanje. Relativno je jednostavno razviti hranjivu podlogu koja je korisna prilikom izolacije tripanosoma iz nosioca i u kojoj će se izolirani bičaši razmnožavati u primarnoj pasaži. Takve hranjive podloge rijetko podržavaju kontinuirani uzgoj, jer

bičaši vrlo često uginu i to uglavnom prilikom prvog pokušaja pasaže (HERBERT, 1964.). Ako je pronađena hranjiva podloga na kojoj bičaši mogu biti izolirani iz svog nosioca i u kojoj mogu biti kontinuirano subkultivirani, onda je ostvarena startna točka za daljnja istraživanja i razvijanja kemijski više definirane hranjive podloge. Prema tome, hranjive podloge za izolaciju su relativno jednostavne za sastaviti, dok je daljnji uzgoj na istoj hranjivoj podlozi upitan. Stoga, u takvim istraživanjima, određena hranjiva podloga se gradira s obzirom na njezinu sposobnost da podržava izolaciju bičaša iz nosioca, njihovo preživljavanje i razmnožavanje tijekom jedne ili više serijskih pasaža (HERBERT, 1965b.). Napredak se može postići korištenjem staničnih kultura, no specifičan cilj ovog istraživanja je bio prikazati morfologiju i vitalnost na novoj hranjivoj podlozi bez stanica.

U svih uzgoja, tripanosome prolaze svoj populacijski razvoj sličan kao i u ostalih mikroorganizama sa zaostajanjem u rastu različitih razmjera prije logaritamske faze rasta. Trajanje sporog rasta ovisi o starosti i uvjetima inokuliranih organizama. Tako da kad su organizmi u logaritamskoj fazi rasta, ne moraju rasti sporo. Period negativne akceleracije prati logaritamski rast, a to je dalje praćeno fazom ugibanja (HERBERT, 1965a.). Bez obzira koliko pažnje se posvetilo inokulumu (broju tripanosoma stavljenih u hranjivu podlogu) u uzgoju u hranjivoj podlozi, teško je usporediti aktualan broj tripanosoma za što se misli da su identične kulture (duplikati, triplikati). Kad se istraživanja rade u različito vrijeme, izračunate standardne pogreške između replikata istog pokusa napravljene u isto ili različito vrijeme, poprilično su visoke i dobrano izvan normalnih pouzdanih granica (HERBERT, 1965a.). Stoga nije niti bio cilj ovog istraživanja pratiti njihov broj, nego samo pratiti preživljavanje i morfologiju.

Analiza tripanosoma izdvojenih iz bilo kojeg medija koji sadrži krv ili krvne produkte je temeljena na određenoj grešci. Naime tijekom jednostavnog postupka ispiranja, na dnu epruvete uvijek ostanu eritrociti, a zajedno s njima i tripanosome, što je neprikladno, jer nije moguće u potpunosti odvojiti tripanosome od takvih produkata (HERBERT, 1965a.). Hranjiva podloga temeljena na zagrijavanom krvnom agaru za rast nekih vrsta *Leishmania* i *T. cruzi* gdje su se mogli izdvojiti bičaši iz hranjive podloge i isprati za daljnja citokemijska istraživanja opisana je još prije oko 50 godina (NEAL i MILES, 1963.). Kada su autori autoklavirali hranjivu podlogu, samo je jedna od testiranih vrsta tripanosomatida rasla neograničeno serijskim pasažama, a kada su samo kratkotrajno

grijali NNN hranjivu podlogu, uspješno su uzgajali čak 12 izolata tripanosomatida. Grijanje krvnog agara duže vrijeme rezultira smanjenjem koncentracije proteina što ima za posljedicu progresivno slabiji rast. Nakon autoklaviranja pod standardnim uvjetima (15 minuta, 1 atmosfera), još uvijek ima nešto proteina, što ima i za posljedicu smanjeni rast tripanosoma. Prednost te podloge je u tome što samo kratkotrajno grijana hranjiva podloga podržava dobar rast, gotovo analogan po broju onome u NNN-u, a suspenzija bičaša je slobodna od eritrocita (NEAL i MILES, 1963.). Prema HERBERTU (1965a.), niti jedan od izolata *T. theileri* i *T. melophagium* nisu mogli rasti na zagrijavanom krvnom agaru, iako neke od afričkih patogenih izolata jesu (HERBERT, 1965a.). U ovom istraživanju je dokazano suprotno. Svi izolati tripanosoma su rasli dobro na temperaturi od 25°C u BCAT-u. Osim toga količina tekućeg dijela koji su koristili NEAL i MILES (1963.), je u BCAT-u nekoliko puta veća. BCAT je podržala rast i preživljavanje svih tripanosoma do zadnjeg dana planiranog istraživanja, bez degeneriranih oblika. Na dnu epruvete je primijećen talog, ali on nije sadržavao tripanosome već su to bili ostaci neotopljene suspenzije antibiotika. Prilikom serijskih pasaža tripanosoma s BCAT-a na BCAT, nije zabilježeno zaostajanje u rastu.

BCAT je uspješno podržao razvoj svih tripanosoma na 25°C, što prema NOLLERU (1917.) nije optimalna temperatura za uzgoj *T. melophagium*. U njegovom mediju je bila optimalna temperatura 30°C, te je on tvrdio da *T. melophagium* neće rasti na nižim temperaturama. U istraživanju LU (1975.) *T. melophagium* je izolirana iz srednjeg crijeva ovčje krpuše u NNN-u inkubiranom na 27°C. HERBERT (1961.; 1965a.) je također izolirao i održavao ovčje tripanosome na obogaćenom NNN mediju na 28°C. Rezultati istraživanja LU (1975.) potvrđuju NÖLLEROVE tvrdnje da je optimalna temperatura inkubacije *T. melophagium* u MMMT na 30°C.

Izolat *T. rotatorium* prvih 24h NI na 37°C je uginuo. I nosioci i posrednici *T. rotatorium* su poikilotermni organizmi, što znači da njihova tjelesna temperatura nikad nije 37°C, što je i rezultiralo osjetljivošću *T. rotatorium* na tako visoke temperature. Vrsta *T. melophagium* korištena u ovom istraživanju nakon 10 dana inkubacije na 37°C te premještanja u svježu hranjivu podlogu na 25°C se oporavila uz malo sporiji rast, dok su *T. theileri* i *Trypanosoma* sp. preživljavale kraće. Praćenjem vitalnosti i bojanjem razmaza tripanosome su preživljavale s obzirom na duljinu inkubacije na 37°C, što se podudara s prijašnjim istraživanjima (LU, 1975.). RISTIC i TRAGER (1958.) te

SIMPSON i GREEN (1959.) izolirali su *T. theileri* na monofaznoj hranjivoj podlozi koja je sadržavala liziranu punu krv inkubirajući je na 37 °C. RISTIC i TRAGER (1958.) su uspjeli održavati serijske pasaže na toj istoj hranjivoj podlozi, dok SIMPSON i GREEN (1959.) nisu konkretno naveli, da li je njihova hranjiva podloga podržavala serijske pasaže ili ne. Pokušaji da se tripanosome korištene u ovom istraživanju kontinuirano uzgajaju serijskim pasažama, u hranjivim podlogama na 37°C, su propali pri čemu postoje pretpostavljeni određeni razlozi. Jedan od razloga da je za kontinuirani uzgoj krvnih oblika potreban dodatak stanica (GIBSON i sur., 2010.; HATAMA i sur., 2007.; DIRIE i sur., 1990b.), a drugi da autori često navode u svojim istraživanjima samo istinite činjenice. Dakle, vrlo često se dešava da neka hranjiva podloga podržava rast tripanosoma, ali ne i serijske pasaže što autori ne navode (NALBANTOGLU i KARAER, 2008.; HERBERT, 1964.). Temperatura se čini da je važan faktor u diferencijaciji tripanosoma iz epimastigota u tripomastigote. Kad je *T. melophagium* rasla na 37°C epimastigoti su se transformirali u tripomastigote iako pokušaji da se to napravi nisu uvijek rezultirali uspjehom (NOLLER, 1920.). Metaciklički tripomastigoti uzgajani u MMMT-u su rijetko viđani. Skoro svi ti tripomastigoti bili su nezreli, što je vjerojatno zbog prekratkog 20-dnevnog perioda koji nije bio dovoljan za metaciklogenezu (LU, 1975.) To se ne podudara s našim istraživanjima, gdje su u izolata *T. melophagium* primijećeni svi razvojni stadiji koji se javljaju u krvi. Kod ostalih izolata nisu zabilježeni svi razvojni stadiji koji se javljaju u nosiocu, te je s time simulacija ponašanja u posredniku i nosiocu propala za *T. rotatorium*, *T. theileri* i *Trypanosoma* sp. iz jelena.

Nedavno su FERREIRA i sur (2007a.) izolirali različite tripanosome iz žaba diljem različitih brazilskih bioma koristeći LIT koji je razvijen za održavanje tripanosoma sisavaca (CAMARGO, 1964.). FERREIRA i sur. (2007a.) su primijetili da neki izolati nisu prošli privikavanje na hranjivu podlogu, što se podudara i s ovdje provedenim istraživanjem. Izolati svih tripanosoma su rasli dobro na sobnoj temperaturi (25°C) u LIT-u sve do početka stacionarne faze rasta. Stacionarna faza rasta nastupila je 6-7 dan NI. U LIT-u su nakon brzog umnažanja tripanosome počele naglo degenerirati, a i kasnije ugibati. Praćenjem vitalnosti nije se moglo zaključiti jesu li one degenerirane, nego samo jesu li žive, s obzirom na to da boja, Evansovo plavilo, nije ušla u stanice. Degeneracija stanica se mogla jedino zasigurno vidjeti u obojenim razmazima uzgojenih

tripanosoma u vidu sačuvanih stanica bez jezgre i pri kraju 14-dnevnog istraživanja u vidu okruglih tvorbi bez jezgri. Zadnji dan praćenja morfologije u LIT-u, na dnu epruvete je bio značajno vidljiv talog koji je predstavljao uginule i raspadnute tripanosome, a u vidnom polju mikroskopa je bilo svega nekoliko vitalnih tripanosoma što se podudara s dosadašnjim istraživanjima na MMMT –u (LU, 1975.). Kada je provedena subkultivacija istraživanih tripanosoma s LIT-a na LIT, redovito se pojavio fenomen zaostajanja u rastu. S obzirom da je postupak ponavljan zbog ponovljivosti rezultata, u nekim slučajevima bi se, nakon faze zaostajanja u rastu, tripanosome počele umnažati da bi u idućoj pasaži redovito sve uginule. U drugim slučajevima bi tripanosome uginule odmah nakon prve pasaže s LIT-a na LIT. Objašnjenje za to je pojava degeneriranih stanica u hranjivoj podlozi pri kraju logaritamske faze, tj. na početku stacionarne faze rasta, odnosno mnoštvo na kraju istraživanja. Kada su tripanosome uzgajane na 37°C, preživljavale su kraće vrijeme nego one inkubirane BCAT-u. Simulacija ponašanja tripanosoma u nosiocu i posredniku pomoću LIT-a nije uspjela za niti jednu tripanosomu korištenu u ovom istraživanju, što se ne slaže s istraživanjima FERREIRA i sur. (2007b.) koji su uspješno proveli diferencijaciju *T. cruzi* u LIT-u.

6.3. Urin kao alternativni dodatak u hranjive podloge

In vitro uzgoj nekih tripanosomatida je ograničen poteškoćama standardizacije hranjivih podloga i nedostatkom detaljnih informacija o hranidbenim potrebama tih protozoa. Neke hranjive podloge korištene za uzgoj nekih vrsta tripanosomatida (HENDRICKS i sur., 1978; CHILDS i sur., 1979.) potrebuju dodatak visokih koncentracija FCS-a, koji je vrlo skupi dodatak hranjivoj podlozi te nedefiniranog i varijabilnog sastava. Znanstvenici su dodavali različite dodatke hranjivim podlogama pokušavajući djelomično ili u potpunosti zamijeniti FCS. U hranjive podloge su dodavali razne dodatke kao što su amino kiseline, vitamine, hormone, goveđi serumski albumin, govođe, bivolje i kozje mlijeko (CHAUDHURI i sur., 1986.; O'DALY i RODRIGUEZ 1988.; KAR i sur., 1990.; ALI i sur., 1998.; MERLEN i sur., 1999.; MUNIARAJ i sur., 2007.). Upotreba natrijevog urata, mokraćne kiseline, cisteinske kiseline, inače poznatih sastojaka mokraće posrednika, za *in vitro* rast i diferencijaciju bičaša *Leishmania*

donovani motivirala je znanstvenike da počnu koristiti ljudsku mokraću kao sastojak u hranjivim podlogama za uzgoj *Leishmania donovani, Leishmania braziliensis* (HOWARD i sur., 1987.; ARMSTRONG i PATTERSON, 1994.; SHAMSUZZAMAN i sur., 1999.) te vrste *Trypanosoma. cruzi* i *Trypanosoma rangeli* (FERREIRA i sur., 2007b.). Ljudski urin je kompleksan dodatak hranjivoj podlozi te mu je zbog svoje složenosti isto tako teško odrediti i izolirati sastav, te s time još teže i sastojke koji utječu na rast tripanosomatida. Paraziti roda *Trypanosoma* posjeduju receptor za epidermalni faktor rasta (epidermal growth factor – EGF), što je uobičajeni protein ljudske mokraće (HIDE i sur., 1989.) i za kojeg se smatra da upravo on stimulira *in vitro* rast parazita. Sposobnost ljudskog urina da stimulira rast parazita *in vitro* nije izgubljena ni nakon denaturacije uzorka urina (FERREIRA i sur., 2007b.). Jedan drugi potencijalni faktor stimulacije rasta je biopterin, enzimski ko-faktor za kojeg se zna da je esencijalan za rast parazita (TRAGER, 1969.) i nađen je u zdravih individua (SLAZYK i SPIERTO 1990.). Isto tako postoje podaci o tzv. „triatominskoj mokraći" kao dodatku u hranjivu podlogu gdje je zajedno s prolinom inducirala metaciklogenezu *T. cruzi* (CONTRERAS i sur., 1985.). Jedan od glavnih čimbenika rasta tripanosomatida u urinu je ksantin. Naime, pročišćavanjem mokraće od ksantina mokraća je značajno izgubila svoj stimulirajući učinak na umnažanje promastigota *L. major* u hranjivim podlogama. Ponovnim dodavanjem 10 mM komercijalnog pripravka ksantina učinak se vratio (WARBURG i sur., 2008.).

FERREIRA i sur. (2007b.) prikazali su rezultate gdje je količina parazita *T. rangeli* uzgojena u LIT hranjivoj podlozi s ljudskim urinom 10 puta veća nego ona dobivena uzgojem u Eagle-ovom mediju obogaćenom s L-glutaminom i 20% FCS-om. Također su dokazali da je umnažanje *T. rangeli* u LIT hranjivoj podlozi s ljudskim urinom i FCS-om bilo isto samo za dva izolata, dok su drugi testirani izolati rasli bolje u LIT-FCS-u, što se razlikuje od dosadašnjih istraživanja provedenih na lišmanijama gdje je rast parazita bio otprilike jednak u hranjivim podlogama s FCS-om i ljudskim urinom (ARMSTRONG i PATTERSON, 1994.; SHAMSUZZAMAN i sur., 1999.). Neki od testiranih izolata *T. cruzi* su rasli dobro i u LIT-FCS-u i LIT-urinu, dok su ostali izolati pokazali značajno viši broj u hranjivoj podlozi obogaćenoj ljudskim urinom. To sve skupa ukazuje na razlike u hranidbenim potrebama različitih parazita i sposobnosti da rastu *in vitro,* što je već i poznato (ENGEL i sur., 1982.).

Nedavno su ALLAHVERDIJEV i sur. (2011.) testirali utjecaj ljudskog urina na invazivnost različitih vrsta bičaša roda *Leishmania* za makrofage. Dodatak ljudskog urina značajno je pojačao invazivnost parazita. Poznato je da uzgojem na hranjivim podlogama tripanosomatidi izgube svoju invazivnost, tj. sposobnost metaciklogeneze. Unatoč tome što su sve vrste tripanosoma u ovom istraživanje uzgajane u istim uvjetima, vjerojatno je jedino *T. melophagium* zadržala sposobnost metaciklogeneze s obzirom na njezine hranidbene zahtjeve.

6.4. Usporedba BCAT-a i LIT-a

Za vrste tripanosoma podroda *T. (Megatrypanum)* je tipična pojava niske parazitemije, koja može iznositi samo jednu tripanosomu u nekoliko mililitara krvi. Temeljem dosadašnjih istraživanja, (MARTINKOVIĆ, 2011.) nisu pronađene tripanosome u jelena ni u obojenim krvnim razmazima ni metodom dijagnostike hematokritom, dok je BCAT podržala njihovu izolaciju. Izolati tripanosoma korišteni u ovom istraživanju uzgajani su serijskim pasažama u BCAT-u od prvog dana njihove izolacije (MARTINKOVIĆ, 2011.; MARTINKOVIĆ i sur., 2012.), što znači da je za *T. theileri* napravljeno preko 450, za *T. melophagium* preko 400, za *Trypanosoma* sp. i *T. rotatorium* preko 200 serijskih tjednih pasaža. Temeljem provedenog istraživanja ova hranjiva podloga pokazala se kvalitetnijom od LIT-a, zbog očuvanja vitalnosti tripanosoma, te mogućnosti simulacije ponašanja jedne vrste, *T. melophagium,* u posredniku i nosiocu. Simulacija u posredniku i nosiocu pruža mogućnost proizvodnje antigena za daljnja serološka istraživanja, bio to antigen epimastigota ili tripomastigota. Nadalje, podloga kao dodatak koristi ljudski urin, koji je besplatan te je to čini izuzetno jeftinijom s obzirom na LIT kojem se dodaje FCS. Stalak za autoklaviranje staklenih epruveta pri pripremi krute faze hranjive podloge adaptiran je terenskim uvjetima tako da se može pripremati i u običnom ekspres loncu. LIT se nije pokazao dobrim za subkultivaciju, već bi mogao poslužiti samo za proizvodnju epimastigota kao antigena u seroepizootiološkim istraživanjima Pretraživanjem literature nisu pronađene fotografije razvoja analognih tripanosoma u hranjivim podlogama, već samo crteži, te će stoga fotografije uvelike pridonijeti saznanjima o stvarnoj morfologiji analognih tripanosoma u hranjivim podlogama.

6.5. Proteomska analiza

Usporedne analize proteoma istraživane u srodnih, patogenih bičaša iz porodice Trypanosomatidae očitovale su veliki broj zajedničkih točaka među različitim razvojnim stadijima parazita. Tako su VAN DEURSEN i sur. (2003.) pronašli veliki postotak (92,4%) identičnosti proteina između krvnih i procikličkih stadija *T. cruzi*. EL FAKHRY i sur. (2002) otkrili su oko 60 različito eksprimiranih proteina među amastigotima i promastigotima *L. infantum*. U provedenom istraživanju PABA i sur. (2004.) također su otkriveni različito eksprimirani proteini među tri razvojna stadija *T. cruzi*. Svi različiti razvojni stadiji istih vrsta su uzgajani u različitim uvjetima, dok su u ovom istraživanju različite vrste tripanosoma držane u istim uvjetima. Vrste podroda *T. (Megatrypanum)* očitovale su ukupno 283 kvalitativno različito eksprimirane proteinske točke, te taj podatak ukazuje na njihovu vrsnu različitost. Kod dva uspoređena izolata *T. rotatorium* kompleksa pronađeno je samo 13 različito eksprimiranih proteina što ukazuje na to da bi uzgojeni izolati mogli pripadati istoj vrsti. Različito kvalitativno eksprimirani proteini *T. rotatorium* ukazuju na varijabilnost izolata unutar iste vrste.

S obzirom na sve kombinacije slijeda aminokiselina u proteinu koje su teoretski moguće, samo jedan malen dio sekvence proteina je i moguć u prirodi te je stoga samo mala sekvenca peptida već visoko specifična. To se očituje tako da postojeće baze proteina, temeljene na pretpostavljenim bilješkama spektara peptida, dovode do identifikacije proteina na visokom stupnju pouzdanosti samo podacima temeljenim na djelomičnoj sekvenci (SEIDLER i sur., 2010.). Stoga je identifikacija proteina postojećim bazama vrlo učinkovita, ali isključuje prepoznavanje peptida koji nisu prisutni u referentnoj bazi podataka. Sekvencioniranje ispočetka (engl., *de novo* sequencing) je stoga još uvijek esencijalno u nekim situacijama, kao što je npr., analiza proteina u organizama s nesekvencioniranim genomom (SEIDLER i sur., 2010.).

U ovom istraživanju nije pronađen niti jedan protein koji pripada vrstama ovdje istraživanih tripanosoma, a u bazi podataka ih je prisutno svega nekoliko (Tablica 4.). Ti proteini nisu kod nas pronađeni vjerojatno što ih imaju sve ovdje istraživane tripanosome. Zbog sličnog proteinskog aminokiselinskog slijeda, pomoću baze podataka su identificirani proteini patogenih vrsta tripanosoma (Tablica 8. i Tablica 10.). Pretraživanjem baze podataka, u tripanosoma podroda *T. (Megatrypanum)*

pronađeni su značajni proteini koji spadaju u metaboličke i strukturne proteine (Tablica 8.). Tako su identificirani malat dehidrogenaza koja sudjeluje u metabolizmu i sastavni je dio glikosoma i mitohondrija, 40 S ribosomalni protein koji sudjeluje u sintezi proteina, galaktokinaza koja sudjeluje u metabolizmu galaktoze, te ISG 75, faktor elongacije 2 i tubulin koji spadaju u strukturne proteine. Prilikom istraživanja pojavnosti proteina među pojedinim vrstama podroda *T. (Megatrypanum),* galaktokinaza i tubulin su utvrđeni samo u *T. theileri*, a šaperonin samo u *Trypanosoma* sp. iz jelena (Tablica 9.). Ti proteini bi mogli poslužiti kao markeri vrste. Svi značajni identificirani proteini *T. rotatorium* kompleksa spadaju u skupinu metaboličkih proteina (Tablica 10.). Tako MaoC dehidrataza sudjeluje u oksidoredukcijskim procesima, a aminometiltransferaza sudjeluje u razgradnji glicina.

Ništa do sada nije bilo poznato o površinskom omotaču tripanosoma kao što je *T. theileri* koja također živi u perifernoj cirkulaciji sisavaca, ali ne koristi standardnu antigenu varijaciju za zaštitu (SCHWEDE i CARRINGTON, 2010.). Jedan od strukturalnih proteina, ISG75, je pronađen u svih vrsta podroda *T.* (*Megatrypanum),* a specifičan je za tripanosome skupine salivarija. Dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost promjene pripadnosti skupini sterkorarija ili stvaranje nove skupine u koju će biti svrstane *T (Megatrypanum).* Strukturni protein ISG 75 se fizički nalazi ispod VSG proteina, varijabilnog površinskog proteina, faktora virulencije u *Trypanosoma* skupine salivarija (SCHWEDE i CARRINGTON, 2010.). Osim što promjenom svoje antigene strukture izbjegava imunosni odgovor nosioca, on fizički štiti strukturalne proteine jedinke od utjecaja protutijela. Manje značajni proteini (Tablica 11.), s faktorom združivanja manjim od 50, ukazuju na to da neki proteini dijele vrlo sličan aminokiselinski slijed s faktorima virulencije u patogenih tripanosoma. Faktor združivanja je obično nizak kod nesekvencioniranih proteina. Kako bi dobili uvid u stvarnu sliku proteoma dotičnih vrsta, potrebno je sekvencioniranje proteina ispočetka.

U ovom istraživanju je po prvi puta prikazan proteomski profil *T. (Megatrypanum) melophagium, T. (Megatrypanum) theileri, T. rotatorium* i *T. (Megatrypanum)* sp. iz jelena u svijetu. Svakako treba uzeti u obzir da broj detektiranih proteina predstavlja samo maleni dio cijelog seta proteina eksprimiranih od strane parazita. Nadalje očekuje se da će slijedeći pokušaji proteomske analize i sekvencioniranja ispočetka pružiti bolje shvaćanje biologije ovih bičaša.

7. ZAKLJUČCI

1. Temeljem 11 morfometrijskih parametara bičaša *Trypanosoma rotatorium* kompleksa izdvojenog iz zelene žabe može se zaključiti da se istraživanja podudaraju s dosadašnjim istraživanjima ostalih autora iz različitih zemalja svijeta.
2. U istraživanju prikladnosti različitih hranjivih podloga za uzgoj, očuvanje vitalnosti i morfologije bifazični čokoladni agar (BCAT) se pokazao boljim od LIT-a.
3. BCAT se pokazao idealnim za proizvodnju adekvatnog antigena za daljnja seroepizootiološka istraživanja.
4. Provedenom proteomskom analizom bičaša *Trypansoma theileri*, *Trypanosoma melophagium* i *Trypanosoma* sp. iz jelena utvrđene su 283 različite proteinske točke, a kod dva izolata *Trypanosoma rotatorium* kompleksa utvrđeno je 13 razlikovnih proteinskih točaka.
5. Proteomskom analizom utvrđena je sličnost s patogenim vrstama iz porodice Trypanosomatidae: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma equiperdum*, *Trypanosoma brucei gambiense* i *Leishmania major*.
6. Na temelju proteomske analize pronađeni su potencijalni markeri iz skupine strukturnih proteina i enzima, kojima se mogu međusobno razlikovati vrste *Trypanosoma theileri, Trypanosoma melophagium* i *Trypanosoma* sp iz jelena.
7. Enzim galaktokinaza i strukturni protein tubulin, jedino su prisutni u *T. theileri,* a haperonin u tripanosome jelena, te su s time potencijalan marker za određivanje vrsta *T. theileri* i *Trypanosoma* sp. iz jelena.
8. Potrebno je sekvencioniranje ispočetka kako bi dobili uvid u stvarnu sliku proteina *Trypanosoma theileri, Trypanosoma melophagium* i *Trypanosoma* sp iz jelena, te *Trypanosoma rotatorium* kompleksa.

8. POPIS LITERATURE

AESCHLIMANN A., W. BURGDORFER, H. MATILE, O. PETER, R. WYLER (1979): Aspects noveaux du role de vector joue par *Ixodes ricinus* L. en Suisse. Acta Trop. 36, 181-191.

ALLAHVERDIYEV A. M., M. BAGIROVA, S. ELCICEK, R. C. KOC, O. N. OZTEL (2011): Effect of human urine on cell cycle and infectivity of *Leismania* species promastigotes *in vitro*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 85, 639-643.

ALI S. A., J. IQBAL, B. AHMAD, M. MASOOM (1998): A semisynthetic fetal calf serum-free liquid medium for *in vitro* cultivation of *Leishmania* promastigotes. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59, 163–165.

ANDERSON J. R., S. C. AYALA (1968): Trypanosome transmitted by *Phlebotomus*: First report from the Americas. Science 161, 1023–1025.

ARMSTRONG T. C., J. L. PATTERSON (1994):. Cultivation of *Leishmania braziliensis* in an economical serum-free medium containing human urine. J. Parasitol. 80, 1030–1032.

ATLAS R. M. (1997): Handbook of Microbiological Media, 2nd ed., CRC Press, 1712 str.

AUTY H., N. E. ANDERSON, K. PICOZZI, T. LEMBO, J. MUBANGA, R. HOARE, R. D. FYUMAGWA, B. MABLE, L. HAMILL, S. CLEAVELAND, S. C. WELBURN (2012): Trypanosome diversity in wildlife species from the Serengeti and Luangwa valley ecosystems. PLoS Neglect. Trop. Dis. 6, e1828.

AYALA S. C. (1970): Two new trypanosomes from California toads and lizards. J. Protozool. 17, 370–373.

AYALA S. C., A. D'ALESSANDRO, R. MACKENZIE, D. ANGEL (1973): Hemoparasite infections in 830 wild animals from Eastern Llanos of Colombia. J. Parasitol. 59, 52-59.

BAKER J. R. (1967): A review of the role played by the Hippoboscidae (Diptera) as vectors of endoparasites. J. Parasitol. 53, 412-418.

BARDSLEY J. E., R. HARMSEN (1969): The trypanosomes of Ranidae. I. The effects of temperature and diurnal periodicity on the peripheral parasitaemia in the bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw). Can. J. Zool. 47, 283-288.

BARDSLEY J. E., R. HARMSEN (1970): The trypanosomes of Ranidae. II. The effects of excitation and adrenalin on the peripheral parasitaemia in the bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw). Can. J. Zool. 48, 1317-1319.

BARDSLEY J. E., R. HARMSEN (1973): The trypanosomes of Anura. Adv. Parasitol. 11, 1-73.

BARRETT M. P., R. J. BURCHMORE, A. STICH, J. O. LAZZARI, A. C. FRASCH, J. J. CAZZULO, S. KRISHNA (2003): The Trypanosomiases. Lancet. 362, 1469-1480.

BARTA J. R., S. S DESSER (1984): Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. J. Wildl. Dis. 20, 180–189.

BARTA J. R., Y. BOULARD, S. S. DESSER (1989): Blood parasites of *Rana esculenta* from Corsica: Comparison of its parasites with those of eastern North American ranids in the context of host phylogeny. Trans. Am. M. Soc. 108, 6–20.

BEHN K. (1911): Wachstum von Bluttrypanosomen aus deutschen Rindern auf Blutagar. Berl. Tierärztl. Wochenschr. 27, 307.

BEHN P. (1910): Über Entwicklungsformen des *Trypanosoma franki*. Berl. Tieräztl. Wochenschr. 26, 809-810.

BEQUAERT J. C. (1952): The Hippoboscidae or louse-flies (Diptera) of mammals and birds. Part I. Structure, physiology and natural history. Entomol. Am. 32, 1–209.

BOLLINGER R. R., J. R. SEED, A. A. GAM (1969): Studies on frog trypanosomiasis. II. Seasonal variations in the parasitemia levels of *Trypanosoma rotatorium* in *Rana clamitans* from Louisiana. Tulane Stud. Bot. Zool. 15, 64-69.

BÖSE R., K. T. FRIEDHOFF, S. OLBRICH, G. BÜSCHER, I. DOMEYER (1987a): Transmission of *Trypanosoma theileri* to cattle by *Tabanidae*. Parasitol. Res. 73, 421–424.

BÖSE R., K. T. FRIEDHOFF, S. OLBRICH (1987b): Transmission of *Megatrypanum* trypanosomes to *Cervus dama* by *Tabanidae.* J. Protozool. 34, 110–113.

BÖSE R., N. C. HEISTER (1993): Development of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri* in tabanids. J. Eukaryot. Microbiol. 40, 788–792.

BÖSE R., K. PETERSEN (1991): *Lipoptena cervi* (Diptera), a potential vector of *Megatrypanum* trypanosomes of deer (Cervidae). Parasitol Res. 77, 723-725.

BRAUN U., E. ROGG, M. WALSER (2002): *Trypanosoma theileri* in the cerebrospinal fluid and brain of a heifer with suppurative meningoencephalitis. Vet. Rec. 150, 18–19.

BÜSCHER G., K. T. FRIEDHOFF (1984): The morphology of ovine *Trypanosoma melophagium* (zoomastigophorea: kinetoplastida). J. Protozool. 31, 98-101.

BUTTNER A., N. BOURCART (1955): Sur certaines particularitis biologiques d'un trypanosome de la grenouille verte, *Trypanosoma inopinatum* Sergent, 1904. Ann. Parasit. Hum. Comp. 30, 431-445.

CAMARGO E. P. (1964): Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 6, 93–100.

CARMICHAEL J. (1926): Rinderpest serum and the pathogenicity of *Trypanosoma theileri*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 20, 303–304.

CARPANO M. (1932): Localisation du *Trypanosoma theileri* dans les organes internes des bovins. Son cycle evolutif. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 10, 305-322.

CHANDER S., J. P. W. GILMAN (1975): Bovine leucosis IV. Trypanosomiasis, lymphocytosis and DNA synthesis. Can. J. Comp. Med. 39, 94–100.

CHAUDHURI G., K. GHOSHAL, S. PAL, S. SEN, A. B. BANERJEE (1986): A new medium for large scale production of *Leishmania donovani* promastigotes for biochemical studies. Indian J. Med. Res. 84, 457–460.

CHILDS G. E., M. J. MCROBERTS, M. A. MOUSSA (1979): Systems for the *in vitro* large-scale propagation of New World *Leishmania*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 73, 395–396.

CONTRERAS V. T., J. M. SALLES, N. THOMAS, C. M. MOREL, S. GOLDENBERG (1985): *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. Mol. Biochem. Parasitol. 16, 315–327.

COSTA J. O., W. DOS SANTOS LIMA, A. C. LEITE, M. P. GUIMARÃES, L. D. TORRES (1983): *Melophagus ovinus* and *Trypanosoma (Megatrypanum) melophagium* in ovines in the State of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 78, 101-103.

CROSS R. F., D. R. REDMAN, E. H. BOHL (1968): Trypanosomes associated with bovine lymphocytosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 153, 571–575.

CROSS R. F., C. K. SMITH, D. R. REDMAN (1971): Observations on *Trypanosoma theileri* infection in cattle. Can. J. Comp. Med. 35, 12–17.

CUERVO P., G. B. DOMONT, J. B. DE JESUS (2010): Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. J. Prot. 73, 845-867.

D'ALESSANDRO A., E. A. WELLS (1971): Trypanosome infection in the family *Cervidae*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 65, 845-846.

DAVIDSON W. R., C. B. CROW, J. M. CRUM., R. R. GERRISH (1983): Observations on *Theileria cervi* and *Trypanosoma cervi* in white-tailed deer *(Odocoileus virginianus)* from the Southeastern United States. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 50, 165-169.

DAVIDSON W. R., J. M. CRUM, J. L. BLUE, D. W. SHARP, J. H. PHILLIPS (1985): Parasites, diseases, and health status of sympatric populations of fallow deer and white-tailed deer in Kentucky. J. Wildl. Dis. 21, 153–159.

DAVIES R. B., G. G. CLARK (1974): Trypanosomes from elk and horse flies in New Mexico. J. Wildl. Dis. 10, 63-65.

DEANE L. M. (1961): Trypanosomideos de mamiferos da Regiao Amazonica. I. Algunos flagelados encontados no sangue de mamiferos silvestres do Estrado do Para. Rev. Inst Med. Trop. Sao Paulo 3, 15-28.

DESSER S. S., S. B. MCIVER, A. RYCKMAN (1973): Culex territans as a potential vector of *Trypanosoma rotatorium*. I. Development of the flagellate in the mosquito. J. Parasitol. 2, 353-358.

DESSER S. S., S. B. MCIVER, D. JEZ (1975): Observations on the role of simuliids and culicids in the transmission of avian and anuran trypanosomes. Int. J. Parasitol. 5, 507-509.

DESSER S. S. (2001): The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. J. Parasitol. 87, 152–160.

DIAMOND L. S. (1965): Studies on the morphology, biology and taxonomy of the trypanosomes of Anura. Wild. Diseases 44, 1–77.

DIRIE M. F., S. BORNSTEIN, K. R. WALLBANKS, D. H. MOLYNEUX, M. STEEN (1990a): Comparative studies on *Megatrypanum* trypanosomes from cervids. Trop. Med. Parasitol. 41, 198–202.

DIRIE M. F., S. BORNSTEIN, K. R. WALLBANKS, D. H. MOLYNEUX, M. STEEN (1990b): Zymogram and life-history studies on trypanosomes of the subgenus *Megatrypanum*. Parasitol. Res. 76, 669–674.

DOFLEIN F. (1910): Studien zur Naturgischichte der Protozoen VI. Experimentelle Studien uber die Trypanosomen des Frosches. Arch. Protistenk. 19, 207-231.

DOHERTY M. L., H. WINDLE, H. P. VOORHEIS, H. LARKIN, M. CASEY, D. CLERY, M. MURRAY (1993): Clinical disease associated with *Trypanosoma theileri* infections in a calf in Ireland. Vet. Rec. 26, 653–656.

DRUMMOND R. O. (1966): *Lipoptena mazamae Rondani* (Diptera: *Hippoboscidae*), a louse fly of deer, on cattle in southwestern Texas. J. Parasitol. 52, 825.

EL FAKHRY Y., M. OUELLETTE, B. A. PAPADOPOULOU (2002): proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. Proteomics. 2, 1007-1017.

ELGER D., G. BUSCHER (1984): Tabaniden und Hippobosciden als Wirte von Trypanosomatiden in Norddeutschland. In: 11. Tag. der Dtsch. Ges. Parasitol. u. Fachgr. Parasitol. d. Dtsch. Vet. Med. Ges., 10.04-14.04.84., Bad Harzburg.

ENGEL J. C., J. A. DVORAK, E. L. SEGURA, M.S. CRANE (1982): *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of 19 clones derived from two chronic chagasic patients. I. Growth kinetics in liquid medium. J. Protozool. 29, 555–560.

FANTHAM H. B., A. PORTER, L. R RICHARDSON (1942): Some haematozoa observed in vertebrates in eastern Canada. Parasitology 34, 199-226.

FARRAR R. G., T. R. KLEI (1990): Prevalence of *Trypanosoma theileri* in Lousiana cattle. J. Parasitol. 76, 734–736.

FERREIRA R. C., M. CAMPANER, L. B. VIOLA, C. S. A. TAKATA, G. F. TAKEDA, AND M. M. G. TEIXEIRA (2007a): Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. Parasitology 134, 1623–1638.

FERREIRA K. A., P. E. LEMOS-JÚNIOR, E. LAGES-SILVA, L. E. RAMÍREZ, A. L. PEDROSA (2007b): Human urine stimulates *in vitro* growth of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Parasitol. Res. 101, 1383-1388.

FERREIRA R. C., A. A. DE SOUZA, R. A. FREITAS, M. CAMPANER, C. S. A. TAKATA, T. V. BARRETT, J. J. SHAW, M. M. G. TEIXEIRA (2008): A Phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (*Trypanosomatidae, Kinetoplastida*) of anurans and sand flies (*Psychodidae, Diptera*) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. J. Eukaryot. Microbiol. 55, 427-435.

FOIL L. D.(1989): Tabanids as vectors of disease agents. Parasitol. Today 5, 88–96.

FÖLSCH D. N. (1971): Vereinfachter, kontaminationsfreier, kultureller Nachweis von *Trypanosoma theileri* LAVERAN, 1902. aus Rinderblut in Norddeutschland. Isolation und Kultur. Acta Tropica 28, 169–174.

FRIEDHOFF K. T., J. PETRICH, M. HOFFMANN, G. BÜSCHER (1984): Trypanosomes in cervidae in Germany. Zentralbl. Bakteriol. Hyg. A, 256, 286-287.

GAIDO A. B., A. J. MANGOLD, D. H. AGUIRRE, A. A. GUGLIELMONE (1989): Hallazgo de *Trypanosomatidae* en la garrapata *Boophilus microplus* en la Argentina. Rev. Med. Vet. 70, 134–137.

GARCIA H. A., A. C. RODRIGUES, F. MARTINKOVIC, A. H. MINERVINO, M. CAMPANER, V. L. NUNES, F. PAIVA, P. B. HAMILTON, M. M. TEIXEIRA (2011): Multilocus phylogeographical analysis of *Trypanosoma (Megatrypanum)* genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. Int. J. Parasitol. 41, 1385–1396.

GIBSON W. C., J. LOM, H. PECKOVA, V. R. FERRIS, P. B. HAMILTON (2005): Phylogenetic analysis of freshwater fish trypanosomes from Europe using SSU rRNA gene sequences and random amplification of polymorphic DNA. Parasitology 130, 405–412.

GIBSON W., J. G. PILKINGTON, J. M. PEMBERTON (2010): *Trypanosoma melophagium* from the sheep ked *Melophagus ovinus* on the island of St Kilda. Parasitology 137, 1799–1804.

GRAY A. R., J. NIXON (1967): Observations on the incidence and importance of *Trypanosoma theileri* in Nigeria. Ann. Trop. Med. Parasitol. 61, 251–260.

GRECO A., G. R. LORIA, S. DARA (2000): First isolation of *Trypanosoma theileri* in Sicilian cattle.Vet. Res. Commun. 24, 471–475.

GRIEBEL P. J., A. A. GAJADHAR, L. A. BABIUK, J. R. ALLEN (1989): *Trypanosoma theileri* associated with T-lymphocytes isolated from a latently infected cow. J. Protozool. 36, 415–421.

HAMILTON P. B., J. F STEVENS, M. W. GAUNT, J. GIDLEY, W. C. GIBSON (2004): Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. Int. J. Parasitol. 34, 1393–1404.

HAMILTON P. B., J. R. STEVENS, J. GIDLEY, P. HOLZ, W. C. GIBSON (2005): A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (*Haemadipsidae*). Int. J. Parasitol. 35, 431–443.

HATAMA S., T. SHIBAHARA, M. SUZUKI, K. KADOTA, I. UCHIDA, T. KANNO (2007.): Isolation of a *Megatrypanum* trypanosome from sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan. Vet. Parasitol. 149, 56-64.

HENDRICKS L. D., D. E. WOOD, M. E. HAJDUK (1978): *Haemoflagellate*s: commercially available liquid media for rapid cultivation. Parasitology 76, 309-316.

HERBERT I. V. (1961): Bovine trypanosomiasis due to *Trypanosoma theileri*, LAVERAN, 1902. and its occurence in Eire. Ir. Vet. J. 15, 230-236.

HERBERT I. V. (1964): *Trypanosoma theileri*, Laveran, 1902. a cosmopolitan parasite of cattle.Vet. Bull. 34, 563–570.

HERBERT I. V. (1965a): Some observations on the isolation and *in vitro* culture of two mammalian trypanosomes, *Trypanosoma theileri,* LAVERAN, 1902. and *T. melophagium* FLU, 1908. with special reference to *T. theileri*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 59, 277–293.

HERBERT I. V. (1965b): Cytoplasmic inclusions and organelles of *in vitro* cultured *Trypanosoma theileri* and *Trypanosoma melophagium* and some speculations on their functions. Exp. Parasitol. 17, 24-40.

HIDE G., A. GRAY, C. M. HARRISON, A. TAIT (1989): Identification of an epidermal growth factor receptor homologue in trypanosomes. Mol. Biochem. Parasitol. 36, 51–59.

HOARE C. A. (1923): An experimental study of the sheep trypanosoma (*Trypanosoma melophagium*, Flu, 1908) and its transmission by sheep ked (*Melophagus ovinus*). Parasitology 15, 365-424.

HOARE C. A. (1931): Studies on *Trypanosoma grayi.* 3. Life-cycle i the tsetse-fly and in the crocodile. Parasitology 23, 449-484.

HOARE C. A. (1964): Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision of the systematics. J. Protozool. 11, 200–207.

HOARE C. A. (1972): The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Edinburg, str. 768.

HOFFMANN M., G. BÜSCHER, K. T. FRIEDHOFF (1984): Stercorarian trypanosomes from deer (Cervidae) in Germany. J. Protozool. 31, 581-584.

HOWARD M. K., G. SAYERS, M. A. MILES (1987): *Leishmania donovani*. metacyclic promastigotes: transformation *in vitro*, lectin agglutination, complement resistance, and infectivity. Exp. Parasitol. 64, 147–156.

HUSSAIN K., B. BRODIE, R. S. OTT, F. MONTEALEGRE (1985): Prevalence of *Trypanosoma theileri* in cows and fetuses at slaughters. Am. J. Vet. Res. 46, 1256–1258.

IVANIČ M. (1936): Structure du noyau au repos et sa division au debut de la division multiple (schizogonie) chez le *Trypanosoma rotatorium* Mayer. Cellule 44, 349-366.

JEGEN G. (1924): Die protozoäre Parasitenfauna der Stechfliege *Stomoxys calcitrans*. Zool. Jahrb. (Abt. Anat. Ontog. Tiere) 46, 389-472.

JULIAN R. J. (1971): The isolation of trypanosomes from cattle in Ontario. Can. J. Med. 35, 192–194.

KALRA I. S., K. B. SINGH, B. P. SINGH, R. P. SINGH, D. C. NAURYIAL, A. P. GALHOTRA (1984): *Trypanosoma theileri* infection in cows. Indian Vet. J. 61, 612-614.

KAR K., K. MUKERJI, K. NASKAR, A. BHATTACHARYA, D. K. GHOSH (1990): *Leishmania donovani*: a chemically defined medium suitable for cultivation and cloning of promastigotes and transformation of amastigotes to promastigotes. J. Protozool. 37, 277–279.

KATIĆ R. V. (1940): Researches on *Trypanosoma melophagium* and its Incidence in Yugoslavia. Yug. Vet. Rec. 20, 373-384.

KENNEDY M. J. (1988): *Trypanosoma theileri* in cattle of central Alberta. Can. Vet. J. 29, 937–938.

KINGSTON N., J. K. MORTON, M. MATTHEWS (1975): Trypanosomes from mule deer, *Odocoileus hemionus*, in Wyoming. J. Wildl. Dis. 11, 519-521.

KINGSTON N., J. K. MORTON (1975a): Recovery and multiplication stages of *Trypanosoma cervi* Kingston and Morton, 1975, in elk spleen. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 42, 179-181.

KINGSTON N., J. K. MORTON (1975b): *Trypanosoma cervi* sp. n. from elk (*Cervus canadensis*) in Wyoming. J. Parasitol. 61, 17–23.

KINGSTON N., J. CRUM (1977): *Trypanosoma cervi* Kingston and Morton, 1975 in white-tailed deer, *Odocoileus virginianus*, in the Southeastern United States. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 44, 179-184.

KINGSTON N., T. THORNE, G. M. THOMAS, L. McHOLLAND, M. S. TRUEBLOOD (1981): Further Studies on trypanosoma in game animals in Wyoming II. J. Wildl. Dis. 17, 539-546.

KINGSTON N., J. K. MORTON, R. DIETRICH (1982a): *Trypanosoma cervi* from alaskan reindeer, *Rangifer tarandus*. J. Protozool. 29, 588-591.

KINGSTON N., B. SWIFT, G. NELMS (1982b): Experimental and natural transplacental transmission of *Trypanosoma theileri* and its possible effects on the bovine fetus. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 49, 161-164.

KINGSTON N., B. BOBEK (1985): A Trypanosome in roe deer, *Capreolus capreolus*, in southern Poland. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 52, 143.

KINGSTON N., J. DROZDZ, M. RUTKOWSKA (1985a): *Trypanosoma* sp. in red deer *(Cervus elaphus)* and elk *(Alces alces)* in Poland. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 52, 144-145.

KINGSTON N., A. FRANZMANN, L. LAKI (1985b): Redescription of *Trypanosoma cervi* (Protozoa) in moose, *Alces alces* from Alaska and Wyoming. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 52, 54-59.

KINGSTON N., G. THOMAS, L. McHOLLAND, E. S. WILLIAMS, M. S. TRUEBLOOD, L. MAKI (1986): Experimental transmission of *Trypanosoma theileri* to bison. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 53, 198–203.

KNUTH P. (1910): Über die in deutschen Rindern gefundenen Trypanosomen. Berl. Tierärztl. Wochenschr. 26, 810-811.

KNUTH P., G. RAUCHBAAR (1910): Weitere Nachforschungen nach Trypanosomen beim Rinde im Kreise Oberwesterwald nebst einem Beitrag zur Kenntnis der in Deutschen Stechfliegen (Spezies: *Tabanus* und *Haematopota*) parasitierenden Flagellaten. Z. Infektionskr. 8, 140–154.

KRASSNER S. M. (1965): Effect of temperature on growth and nutritional requirements of *Leishmania tarentolae* in defined medium. J. Protozool. 12, 73-78.

KRANEVELD F. C. (1931): Enkele overbrengingsproeven van *Trypanosoma theileri* Laveran 1902 met tabaniden. Ned. Indische Blad. Diergeneeskd. 43, 132-152.

KRINSKY W. L., L. L. PECHUMAN (1975): Trypanosomes in horse flies and deer flies in central New York state. J. Parasitol. 61, 12-16.

KRINSKY W. L., W. BURGDORFER (1976): Trypanosomes in *Amblyomma americanum* from Oklahoma. J. Parasitol. 62, 824-825.

LANEVSCHI-PIETERSMA A., O. OGUNREMI, A. DESROCHERS (2004): Parasitaemia in a neonatal bison calf. Vet. Clin. Path. 33, 173–176.

LEFEBVRE M. F., S. S. SEMALULU, A. E. OATWAY, J. W. NOLAN (1997): Trypanosomiasis In Woodland Caribou Of Northern Alberta. J. Wildl. Dis. 33, 271-277.

LEGER L. (1904): Sur un nouveau Flagelle parasite des Tabanides. Compt. Rend. Soc. Biol. 56, 613-615.

LEMOS M., D. H. MORAIS, V. T. CARVALHO, M. D'AGOSTO (2008): First record of *Trypanosoma chattoni* in Brazil and occurrence of other *Trypanosoma* species in Brazilian frogs (Anura, Leptodactylidae). J. Parasitol. 94, 148-151.

LEVINE N. D., R. R. NYE (1977): A survey of blood and other tissue parasites of leopard frogs Rana pipiens in the United States. J. Wildl. Dis. 13, 17–23.

LEVINE S., D. FISH, L. A. MAGNARELLI, J. F. ANDERSON (1987): Choroid Plexitis in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in southern New York State. Vet. Pathol. 24, 207.

LU S. C. (1975): Culture and morphological observations on *Trypanosoma melophagium*. Chin. J. Microbiol. 8, 20-35.

LUNDHOLM B. D., J. STORZ, D. G. McKERCHER (1959): *Trypanosoma theileri* as a contaminant tissue origin in cultures of fetal bovine kidney cells in vitro. Virology 8, 394–396.

MACHADO A. (1911): Zytologische Untersuchungen über *Trypanosoma rotatorium* Gruby. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 3, 108-132.

MACKERRAS M. J. (1959): The haematozoa of Australian mammals. Aust. J. Zool. 7, 105–135.

MALMQUIST W. A. (1965): Trypanosomes in leucocyte cultures. Vet. Rec. 77, 350.

MAMMERICKX M., D. DEKEGEL (1975): Studies on the relationship between persistent lymphocytosis, infection with C-type particles and presence of *Trypanosoma theileri*, associated with bovine enzootic leukosis. Zentralbl. Veterinärmed. Reihe B 22, 411–419.

MANSFIELD J. M. (1977): Taxonomy, kinetoplastids, and flagellates of fish. Parasitic Protozoa 1, 310–315.

MARSHALL J., W. J. HERBERT (1979): An attempt to infect the stable fly *Stomoxys calcitrans* with *Trypanosoma theileri*. Br. Vet. J. 135, 416-419.

MARTIN D. S., A. D. G. WRIGHT, J. R. BARTA, S. S. DESSER, (2002): Phylogenetic position of the giant anuran trypanosomes *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveulemairei*, and

Trypanosoma ranarum inferred from 18S rRna gene sequences. J. Parasitol. 88, 566-571.

MARTIN D. S., S. S. DESSER (1991a): Development of *Trypanosoma fallisi* in the leech, *Desserobdella picta*, in toads (*Bufo americanus*), and *in vitro*. A light and electron microscopic study. Parasitol. Res. 77, 18–26.

MARTIN D. S., S. S. DESSER (1991b): Infectivity of cultured *Trypanosoma fallisi* (Kinetoplastida) to various anuran species and its evolutionary implications. J. Parasitol. 77, 498–500.

MARTIN D. S., S. S. DESSER, H. HONG, H. (1992): Allozyme comparison of three *Trypanosoma* species (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) of toads and frogs by starch–gel electrophoresis. J. Parasitol. 78, 317–322.

MARTINKOVIĆ F. (2011): Isolation of Trypanosomes from animals in Croatia. Parasitology Days In Croatia. Second International Conference of Southeastern and Eastern European Parasitological Society. 14-15 July., Zagreb, Croatia.

MARTINKOVIĆ F., K. MATANOVIĆ, A. C. RODRIGUES, H. A. GARCIA, M. M. TEIXEIRA (2012): *Trypanosoma (Megatrypanum) melophagium* in the Sheep Ked *Melophagus ovinus* from Organic Farms in Croatia: Phylogenetic Inferences Support Restriction to Sheep and Sheep Keds and Close Relationship with Trypanosomes from Other Ruminant Species. J. Eukaryot. Microbiol. 59, 134-144.

MARTINS J. R., R. C. LEITE, R. L. DOYLE (2008): Tripanosomatides like *Trypanosoma theileri* in the cattle tick *Boophilus microplus*. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 17, 113–114.

MATTHEWS M. J., N. KINGSTON J. K. MORTON (1977): *Trypanosoma cervi* Kingston and Morton, 1975 from mule deer, *Odocoileus hemionus*, in Wyoming. J. Wildl. Dis. 13, 33-39.

MATSUMOTO Y., A. SATO, M. HOZUMI, H. OHNISHI, M. KABEYA, M. SUGAWARA, H. TAKAISHI (2011): A case of a Japanese Black cow developing trypanosomosis together with enzootic bovine leukosis. J. Jpn. Vet. Med. Assoc. 64, 941–945.

MAZZA S., C. ROMANA, A. FIORA (1932): Algunos hemoparasitos de mamiferos del norte. VII Reunion Soc. Argent. Patol. Reg. Norte 2, 993-997.

McNEAL W. J., F. G. NOVY (1903): On the cultivation of *Trypanosoma lewisi*. In Contribution to medical research dedicated to Victor Clarence Vaughan. 549-577.

MEHLHORN H., J. D'HAESE, N. MENCKE, O. HANSEN (2001): *In vivo* and *in vitro* effects of imidacloprid on sheep keds (*Melophagus ovinus*): a light and electron microscopic study. Parasitol. Res. 87, 331-336.

MEREDITH W. E., R. F. CROSS (1970): *In vitro* continous cutivation of *Trypanosoma theileri* utilizing a modified Splitter's medium. J. Parasitol. 56, 107.

MERLEN T., D. SERENO, N. BRAJON, F. ROSTAND, J. L. LEMESRE (1999): *Leishmania* spp: completely defined medium without serum and macromolecules (CDM/LP) for the continuous *in vitro* cultivation of infective promastigote forms. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60, 41–50.

METZLER A. (1975): Kultureller Nachweis von *Trypanosoma theileri* - ähnlichen Trypanosomen beim Braunvieh der Ostschweiz. Schweiz. Arch.Tierheilkd. 117, 113–117.

MIYATA A. (1978): Anuran trypanosomes in Kyushu and Ryukyu islands, with descriptions of six new species. Trop. Med. 20, 51–80.

MOHAMED H. A., D. H. MOLYNEUX (1987): *In vitro* cultivation of *Herpetosoma* trypanosomes in insect cell tissue culture media. Parasitol. Res. 73, 9-14.

MOLYNEUX D. H. (1975): *Trypanosoma (Megatrypanum) melophagium*: modes of attachment of parasites to mid-gut, hindgut and rectum of the sheep ked, *Melophagus ovinus*. Acta Trop. 32, 65-74.

MOLYNEUX D. H. (1977): Vector relationships in the Trypanosomatidae. Adv Parasitol. 15, 1-82.

MOLYNEUX D. H., M. SELKIRK, D. LAVIN (1978): *Trypanosoma (Megatrypanum) melophagium* in the sheep ked, *Melophagus ovinus*. A scanning electron microscope (SEM) study of the parasites and the insect gut wall surfaces. Acta Trop. 35, 319-328.

MOLYNEUX D. H., R. W. ASHFORD (1983): The biology of the *Tyrpanosoma* and *Leishamania* parasites of man and domestic animals. Taylor and Francis, London.

MORTON J. K., N. KINGSTON (1976): Further studies on trypanosomes in game animals in Wyoming. J. Wildl. Dis. 12, 233–236.

MORZARIA S. P., A. A. LATIF, F. JONGEJAN, A. R. WALKER (1986): Transmission of a *Trypanosoma* sp. to cattle by the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. Vet. Parasitol. 19, 13-21.

MUNIARAJ M., C. S. LAL, S. KUMAR, P. K. SINHA, P. DAS (2007): Milk of Cow (*Bos taurus*), Buffalo (*Bubalus bubalis*), and Goat (*Capra hircus*): a Better Alternative than Fetal Bovine Serum in Media for Primary Isolation, *In Vitro* Cultivation, and Maintenance of *Leishmania donovani* Promastigotes. J. Clin. Microbiol. 45, 1353–1356.

MURALEEDHARAN K., U. K. BHASKAR, K. KRISHNAMURTI (1985): *Trypanosoma theileri* infection in a bullock - a case report. Curr. Res. 14, 61–62.

NALBANTOĞLU S., Z. KARAER (2008): *Trypanosoma melophagium* in blood cell culture. Üniv. Vet. Fak Derg. 55, 173-176.

NEAL R. A., R. A. MILES (1963): Heated blood agar medium for the growth of the *Trypanosoma cruzi* and some species of *Leishmania*. Nature 198, 210.

NEUMULLER M., K. NILSSON, C. PAHLSON (2012): *Trypanosoma* spp. in Swedish game animals. Parasitol. Res. 110, 135–139.

NELSON W. A. (1981): *Melophagus ovinus* (Pupipara: Hippoboscidae): confirmation of the nonpathogenicity of *Trypanosoma melophagium* for sheep keds. J. Invertebr. Pathol. 37, 284-289.

NIESCHULZ O. (1931): Über Darmflagellaten von Tabaniden in Java. Z. Parasitenkd. 3, 267-268.

NÖLLER W. (1913): Die Blutprotisten des Wasserfrosches un ihre Übertragung. Arch. Protistenkd. 28, 313-316 (Vorlaufige Mitteilung).

NÖLLER, W. (1916): Die Übertragung des *Trypanosoma theileri* Laveran 1902. Berl. Tierärztl. Wochensch. 32, 457-460.

NÖLLER W. (1917a): Blut- und Insektenflagellatenzüchtung auf platten. Arch. Schiffs- u. Trop. –Hyg. 21, 53-94.

NÖLLER W. (1917b): Die Blutprotisten des Wasserfrosches un ihre Übertragung. Arch. Protistenkd. 31, 169-240.

NÖLLER W. (1925): Der Nachweis des Überträgers des gemeinen Rindertrypanosomas, *T. theileri*, mit Hilfe des Kulturverfahrens (Ein Beitrag zur Methodik der Trypanosomenforschung). Zentralbl. Bakteriol. Abt. 1, Ref. 7a, 133–142.

NOVY F. G., W. J. McNEAL (1904): On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. J. Inf. Dis. 1, 1–30.

NUNES V. L. B., E. T. OSHIRO (1986): *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri* Laveran, 1902 em *Bubalus bubalis* no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. In: Proceedings of the XX Congress on Bras. Med. Vet., vol. 78.

O'DALY J. A., M. B. RODRIGUEZ (1988): Differential growth requirements of several *Leishmania* spp. in chemically defined culture media. Acta Trop. 45, 109–126.

O'FARRELL W. R. (1913): Hereditary infection with special reference to its occurence in *Hyalomma aegyptium* infected with *Crithidia hyalommae*. An. Trop. Med. Parasitol. 7, 545-556.

OGASSAWARA S., S. BENASSI, J. L. D'ANGELINO, W. P. ARAUJO, A. C. GOUVEIJA (1981): Observações sobre *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri* Laveran, 1902 em bovino no Estado de São Paulo. Rev. Microbiol. 12, 17–21.

PABA J., J. M. SANTANA, A. R. TEIXEIRA, W. FONTES, M. V. SOUSA, C. A. RICART (2004): Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. Proteomics 4, 1052-1059.

PAGE W. A. (1972): Feeding behaviour and trypanosomatid infections of some tabanids and culicidae in Columbia. J. Entomol. Series A, 47, 1-13.

PACKCHANIAN A. A. (1934): On the cultivation of seven species of trypanosomes *in vitro*. Science 80, 407–408.

PATTON W. S. (1909): The lifecycle of a species of *Crithidia* parasitic in the intestinal tracts of *Tabanus hilarius* and *Tabanus* sp. Arch. Protistenkd. 15, 333-361.

PETRICH J. (1976): Kultureller Nachweis von *Trypanosoma theileri* bei Rindern in Norddeutschland. Hannover, Tierärztl. Hochsch. Diss.

PFEIFFER E. (1905): Über trypanosomenänliche Flagellaten im Darm von *Melophagus ovinus*. Z. Hyg. Infektkr. 50, 324-330.

RAMOS B., S. URDANETA-MORALES (1977): Hematophagous insects as vectors for frog trypanosomes. Rev. Biol. Trop. 25, 209–217.

RAZGHA VON A. (1929): Über die Züchtung der menschpathogenen *Trypanosomen*. Z. Parasitenkd. 2, 55-56.

REICHENOW E. (1940): Ostafrikanische Beobachtungen an trypanosomatiden. Arch. Protistenkd. 94, 267-287.

REID H. W., M. J. BURRIDGE, N. B. PULLAN, R. W. SUTHERST, E. B. WAIN (1970): Survey for trypanosome infections in domestic cattle and wild animals in areas of East Africa. IV. Stercorarian trypanosome infections in cattle and wild animals in East Africa. Br. Vet. J. 126, 642–647.

REILLY B. O., P. T. K. WOO (1982a). The *in vivo* and *in vitro* development of *Trypanosoma andersoni* Reilly and Woo, 1982 and *Trypanosoma grylli* Nigrelli, 1944 (*Kinetoplastida*). Can. J. Zool. 60, 124–133.

REILLY B. O., P. T. K WOO. (1982b): The biology of *Trypanosoma andersoni* n. sp. and *Trypanosoma grylli* Nigrelli, 1944 (*Kinetoplastida*) from *Hyla versicolor* LeConte, 1825 (Anura). Can. J. Zool. 60, 116–123.

RIBEIRO M. F. B., LIMA J. D., GUIMARAES A. M. (1988): Ocorręncia de *Trypanosoma theileri*, Laveran 1902, em *Boophilus microplus*, no Estado de Minas Gerais. Arch. Brasil Med. Vet. Zoot. 40, 65–68.

RISTIC M., W. TRAGER (1958): Cultivation at 37°C of a trypanosoma *(Trypanosoma theileri)* from cows with depressed milk production. J. Protozool. 5, 146-148.

ROBERTS L., J. JANOVY, P. SCHMIDT (2004): Foundations of Parasitology, 7 th ed., McGraw-Hill Higher Education, 61-88.

RODRIGUES A. C., M. CAMPANER, C. S. TAKATA, A. DELL'PORTO, R. V. MILDER, G. F. TAKEDA, M. M. G. TEIXEIRA (2003): Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. Vet. Parasitol. 116, 185–207.

RODRIGUES A. C., F. PAIVA, M. CAMPANER, J. R. STEVENS, H. A. NOYES, M. M. G. TEIXEIRA (2006): Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. Parasitology 132, 215–224.

RODRIGUES A. C., H. A. GARCIA, J. S. BATISTA, A. H. MINERVINO, G. GOES-CAVALCANTE, F. M. DA SILVA, R. C. FERREIRA, M. CAMPANER, F. PAIVA, M. M. G. TEIXEIRA (2010a): Characterization of spliced leader genes of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: phylogeographical analysis of Brazilian isolates from cattle supports spatial clustering of genotypes and parity with ribosomal markers. Parasitology 137, 111–122.

RODRIGUES A. C., H. A. GARCIA, P. A. ORTIZ , A. P. CORTEZ, F. MARTINKOVIC, F. PAIVA, J. S. BATISTA, A. H. MINERVINO, M. CAMPANER, E. M. PRAL, S. C. ALFIERI, M. M. G. TEIXEIRA (2010b): Cysteine proteases of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. Parasitol. Int. 59, 318–325.

SAISAWA K., K. TAISE, K. KANEKO (1933): Study on *Trypanosoma theileri*. Jap. J. Exp. Med. 11, 101-106.

SAMAD M. A., M. SHAHIDULLAH (1985): *Trypanosoma theileri* infection in cattle of Bangladesh. Ind. Vet. J. 62, 903–905.

SAMUEL W. M., D. O. TRAINER (1972): *Lipoptena mazamae rondani*, 1870 (Diptera: Hippoboscidae) on white-tailed deer in Southern Texas. J. Med. Entomol. 9, 104–106.

SAMUEL W. M., A. A. KOCAN, M. J. PYBUS, J. W. DAVIS (Eds.) (2001): Parasitic Diseases of Wild Mammals. Iowa State University Press, Ames, 559 str.

SCHLAFER D. H. (1979): *Trypanosoma theileri*: a literature review and report of incidence in New York cattle. Cornell Vet. 69, 411–425.

SCHNEIDER I. (1964): Differentiation of larval Drosophila eye-antennal discs *in vitro*. J. Exp. Zool. 156, 91-104.

SCHUSTER, F. L., J. J. SULLIVAN (2002): Cultivation of clinically significant hemoflagellates. Clin. Microbiol. Rev. 15, 374-389.

SCHWEDE A., M. CARRINGTON (2010): Bloodstream form Trypanosome plasma membrane proteins: antigenic variation and invariant antigens. Parasitology. 137, 2029-2039.

SEIDLER J., N. ZINN, M. E. BOEHM, W. D. LEHMANN (2101): De novo sequencing of peptides by MS/MS. Proteomics. 10, 634-649.

SENECA H., E. HENDERSEN, M. HARVEY (1949): Purification of hemoflagellate cultures with antibiotics. Am. J. Trop. Med. 29, 41.

SEIFI H. A. (1995): Clinical trypanosomosis due to *Trypanosoma theileri* in a cow in Iran. Trop. Anim. Health Prod. 27, 93–94.

SHAMSUZZAMAN S. M., M. FURUYA, M. KORENAGA, K. IMAMURA, Y. HASHIGUCHI (1999): Use of urine samples from healthy humans, nephritis patients or other animals as an alternative to foetal calf serum in the culture of *Leishmania (L.) donovani* in vitro. Ann. Trop. Med. Parasitol. 93, 613–620.

SHASTRI U. V., DESHPANDE P. D. (1981): *Hyalomma anatolicum anatolicum* (Koch, 1844) as a possible vector for transmission of *Trypanosoma theileri*, Laveran, 1902 in cattle. Vet. Parasitol. 9, 151–155.

SIDDALL M. E., S. S. DESSER (1992): Alternative leech vectors for frog and turtle trypanosomes. J. Parasitol. 78, 562–563.

SIMPSON C. F., J. H. GREEN (1959): Cultivation of *Trypanosoma theileri* in liquid medium at 37°C. Cornell Vet. 49, 192-193.

SISWANSYAH D. D., I. TARMUDJI (1989): Prevalence of trypanosomiasis in cattle and buffaloes in south Kalimantan, using the haematocrit method. Penyakit-Hewan 21, 118–122.

SLAZYK W. E., F. W. SPIERTO (1990): Liquid-chromatographic measurement of biopterin and neopterin in serum and urine. Clin. Chem. 36, 1364–1368.

SMALL R. W. (2005): A review of *Melophagus ovinus*, the sheep ked. Vet. Parasitol. 130, 141-155.

SOOD N. K., L. D. SINGLA, R. S. SINGH, S. K. UPPAL (2011): Association of *Trypanosoma theileri* with peritonitis in a pregnant cross-bred cow: a case report. Vet. Med. (Prague) 56, 82–84.

SOLLOD A. E., E. J. L. SOULSBY (1968): Cultivation of *Trypanosoma teileri* at 37°C in partially defined media. J. Protozool. 15, 463–466.

SPLITTER E. J., E. J. L. SOULSBY (1967): Isolation and continous cultivation of *Trypanosoma theileri* in media containing tissue culture fluids. Exp. Parasitol. 21, 137–148.

SUDARTO M. W., H. TABEL, D. M. HAINES (1990): Immunohistochemical demonstration of *Trypanosoma evansi* in tissues of experimentally infected rats and a naturally infected water buffalo (*Bubalus bubalis*). J. Parasitol. 76, 162–167.

TANABE M. (1931): Studies on the blood inhabiting Protozoa of the frog. Keijo J. Med. Japan 2, 53-71.

TARIMO-NESBITT R. A., T. K. GOLDER, M. F. CHAUDHURY (1999): Trypanosome infection rate in cattle at Nguruman, Kenya. Vet. Parasitol. 81, 107–117.

TAYLOR A. E. R., J. R. BAKER (1968): The cultivation of parasites *in vitro*. Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford, United Kingdom, 392 pp.

TEAGUE O., H. CLARK (1918): A trypanosome of Panamian cattle and a method for concentrating trypanosomes in peripheral blood. J. Inf. Dis. 22, 154–158.

TELFORD S. R., D. J. FORRESTER, S. D. WRIGHT, M. E. ROELKE, S. A. FERENC, J. W. McCOWN (1991): The identity and prevalence of *Trypanosoma* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from South Florida. J. Helminthol. Soc. Wash. 58, 19–23.

THEODOR O. (1928): Über ein nicht pathogenes Trypanosoma aus der Ziege und seine Übertragung durch *Lipoptena caprina* Aust. Z. Parasitenkd. 1, 283-330.

TIZARD I. R. (1980): Studies on the generation of biologically active substances by *Trypanosoma theileri* in vitro. Res. Vet. Sci. 28, 178–184.

TOWNSEND J., P. H. DUFFUS (1982): *Trypanosoma theileri*: antibody-dependent killing by purified populations of bovine leucocytes. Clin. Exp. Immunol. 48, 289–299.

TRAGER W. (1969): Pteridine requirement of the hemoflagellate *Leishmania tarentolae*. J. Protozool. 16, 372–375.

TURNER A. W., D. MURNANE (1930): On the presence of the non-pathogenic *Trypanosoma melophagium* in the blood of Victorian sheep and its transmissiom by Melophagus ovinus. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 7, 5–8.

URBANIAK M. D., M. L. GUTHER, M. A. FERGUSON (2012): Comparative SILAC proteomic analysis of *Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic lifecycle stages. PLoS One. 2012, 7, e36619.

VAIRAMUTHU S., C. BALACHANDRAN, N. PAZHANIVEL, K. SENTHIL KUMAR, M. RAMAN (2011): Occurrence of *Trypanosoma theileri* Laveran, 1902 in a Holstein Friesian cross-bred cow. Indian J. Anim. Res. 45, 324–325.

VAN DER MAATEN M. J., W. A. MALMQUIST (1969): Elimination of *Trypanosoma theileri* from cell cultures by Amphotericin B treatment. Am. J. Vet. Res. 30, 2013-2015.

VAN DEURSEN F. J., D. J. THORNTON, K. R. MATTHEWS (2003): A reproducible protocol for analysis of the proteome of *Trypanosoma brucei* by 2-dimensional gel electrophoresis. Mol. Biochem. Parasitol. 128, 107-110.

VAN HENNEKELER K., R. E. JONES, L. F. SKERRATT, M. O. MUZARI, L. A. FITZPATRICK (2011): Meteorological effects on the daily activity patterns of tabanid biting flies in northern Queensland, Australia. Med. Vet. Entomol. 25, 17–24.

VERLOO D., BRANDT J., VAN MEIRVENNE N., BÜSCHER P. (2000): Comparative *in vitro* isolation of *Trypanosoma theileri* from cattle in Belgium. Vet. Parasitol. 89, 129–132.

VILLA A., C. GUTIERREZ, E. GRACIA, B. MORENO, G. CHACÓN, P. V. SANZ, P. BÜSCHER, L TOURATIER (2008): Presence of *Trypanosoma theileri* in Spanish Cattle. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1149, 352-354.

VOTÝPKA J., M. OBORNÍK, P. VOLF, M. SVOBODOVÁ, J. LUKES (2002): *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. Parasitology 125, 253-263.

WALLACE F. G. (1962): The trypanosomatid parasites of horseflies with the description of *Crithidia rileyi* n. sp. J. Protozool. 9, 53-58.

WALLACE F. G. (1966): The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. Exp. Parasitol. 18, 124-193.

WARBURG A., S. GELMAN, J. DEUTSCH (2008): Xanthine in urine stimulates growth of *Leishmania* promastigotes *in vitro*. J. Med. Microbiol.57, 136-138.

WARD W. H., M. W. M. HILL, I. D. MAZLIN, C. K. FOSTER (1984): Anaemia associated with a high parasitemia of *Trypanosoma theileri* in a dairy cow. Aust. Vet. J. 61, 324.

WELLS E. A., W. H. R. LUMSDEN, G. J. C. McNEILLAGE (1968): Isolation of trypanosomes of the section Stercoraria from cattle in Nigeria and the United Kingdom. Br. Vet. J. 124, 382–392.

WELLS E. A. (1971): Studies on *Trypanosoma theileri*- like trypanosomes of cattle. I. Culture and storage of isolations. II. The characteristics of infection in a single Ayshire cow. Br. Vet. J. 127, 466-475.

WELLS E. A. (1972): Infections of cattle with trypanosomes of the subgenus *Megatrypanum* (Hoare 1964). C. A. B. (Commonwealth Bureau of Animal Health) Review Series 10.

WELLS E. A. (Ed.) (1976): Biology of the Kinetoplastida. Academic Press, London, pp. 257–275.

WERNER J. K., K. WALEWSKI (1976): Amphibian trypanosomes from the McCormick forest, Michigan. J. Parasitol. 62, 20–25.

WERNER J. K. (1993): Blood parasites of amphibians from Sichuan Province, People's Republic of China. J. Parasitol. 79, 356–363.

WITA I., N. KINGSTON (1999): *Trypanosoma cervi* in red deer, *Cervus elaphus*, in Poland. Acta Parasitol. 44, 93–98.

WOO P. T. K., M. A. SOLTYS, A. C. GILLICK (1970): Trypanosomes in cattle in southern Ontario. Can. J. Comp. Med. 34, 142–147.

WOO P. T. K., R. L. LIMEBEER (1971): Evidence of intrauterine transmission of a trypanosome in cattle. Acta Trop. 28, 61–63.

WOO P. T. K., P. BOGART (1984): *Trypanosoma* spp. (Protozoa: Kinetoplastida) in Hylidae (Anura) from eastern North America, with notes on their distribution and prevalences. Can. J. Zool. 62, 820–824.

WOODCOCK H. M. (1910): On certain parasites of the Chaffinch *(Fringilla, coelebs)* and the Redpoll *(Linota rufescens).* Quart. Journ. Micro. Sci. 60, 641. [On sheep-trypanosome— footnote on p. 713.]

ŽIČKUS T. (2002): The first data on the fauna and distribution of blood parasites of amphibians in Lithuania. Acta Zool. Lituan. 12, 197–202.

9. ŽIVOTOPIS

Franjo Martinković, dr. med. vet. rođen je 1976. godine u Koprivnici. Osnovnu školu je završio u Ferdinandovcu, a Srednju gospodarsku školu - smjer veterinarski tehničar, u Križevcima. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 1995. godine. Započinje s volonterskim radom na Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti kao apsolvent 2000, godine Od tada sudjeluje u nastavnim, znanstvenim i kliničkim aktivnostima Zavoda. Diplomirao je 30.05.2007. godine na Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom s temom naslova „Protutijela protiv protozoona *Leishmania* unakrižno reagiraju sa protozoonom *Crithidia luciliae*".

Od 01.10.2007. do 01.02.2008. zaposlen je kao stručni suradnik, a od 01.02.2008. postaje znanstveni novak na projektu 053-05322652251 („Vakcinacijski potencijal oblića *Trichinella nativa* u zaštiti svinja od trihineloze") na Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom, voditelja projekta prof. dr. sc. Alberta Marinculića. Od tada sudjeluje u nastavnim, znanstvenim i kliničkim aktivnostima Zavoda. Poslijediplomski doktorski studij iz Veterinarskih znanosti, upisao je akad. godine 2008/2009.

Sudjeluje na znanstveno-stručnim usavršavanjima u Zagrebu (23. travanj 2009. Tečaj „Osnove rada u sustavu Merlin (A100)", predavač Tona Perišić, Sveučilišni računski centar, Sveučilište u Zagrebu), Italiji (10 svibanj do 15 svibanj 2010. 1st training Shool „Diagnosis of GI strongyles in goats: from animal to the lab", Centro Regionale Monitoraggio Parassitosi – CReMoPAR, Eboly, Italy) i Brazilu (31. kolovoz do 09 listopada 2009. i 01. rujan do 01. prosinac 2010. Instituto de Ciencias Biomedicas, Departamento de Parasitologia, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil).

Aktivno sudjeluje u domaćim (Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa: Vakcinacijski potencijal oblića *Trichinella nativa* u zaštiti svinja od trihineloze (053-05322652251), voditelj prof. dr. sc Albert Marinculić) i europskim projektima (Znanstvenoistraživački hrvatsko-slovenski bilateralni projekt: Uvođenje seroloških dijagnostičkih metoda u procjenu invadiranosti jelenske divljači s *Fascioloides magna* i *Fasciola hepatica* na području Republike Hrvatske i Republike Slovenije, voditelji prof. dr. sc. Zdravko Janicki i doc. dr. sc. Gorazd Vengušt).

Od 2008. godine pa do danas sudjeluje u provedbi praktičnog dijela nastave na Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu iz predmeta „Parazitologija i invazijske bolesti“, te na Biološkom odjelu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, školske godine 2010/2011 u provedbi praktičnog dijela nastave iz predmeta „Parazitologija“.

Tijekom akademske godine 2011/2012 sudjeluje u studentskom vrednovanju iz obveznog predmeta „Parazitologija i invazijske bolesti“, gdje je pozitivno ocijenjen. Iste godine mentor je studentskog rada “Morfološka karakterizacija bičaša *Trypanosoma rotatorium* te njegova unakrižna reaktivnost s protutijelima protiv bičaša *Leishmania infantum*“, koji dobiva Rektorovu nagradu, kao jedan od najboljih studentskih radova znanstvenog sadržaja.

POPIS OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

Znanstveni radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u tercijarnim publikacijama (Current Contents):

1. GOUZELOU E., C. HARALAMBOUS, M. ANTONIOU, V. CHRISTODOULOU, **F. MARTINKOVIĆ**, T. ŽIVIČNJAK, D. SMIRLIS, F. PRATLONG, J. P. DEDET, Y. OZBEL, S. O. TOZ, W. PRESBER, G. SCHÖNIAN, K. SOTERIADOU (2013): Genetic diversity and structure in *Leishmania infantum* populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis. Parasit. Vectors. 6, 342, doi: 10.1186/1756-3305-6-342.

2. **MARTINKOVIĆ F.**, K. MATANOVIĆ, A. C. RODRIGUES, H. A. GARCIA, M. M. G. TEIXEIRA (2012): *Trypanosoma (Megatrypanum) melophagium* in the Sheep Ked *Melophagus ovinus* from Organic Farms in Croatia: Phylogenetic Inferences Support Restriction to Sheep and Sheep Keds and Close Relationship with Trypanosomes from Other Ruminant Species. Journal of eukaryotic microbiology 59, 134-144.

3. SEVERIN, K., T. MAŠEK, Z. JANICKI, D. KONJEVIĆ, A. SLAVICA, A. MARINCULIĆ, **F. MARTINKOVIĆ**, G. VENGUŠT, P. DŽAJA (2012): Liver enzymes and blood metabolites in a population of free-ranging red deer *(Cervus elaphus)* naturally infected with *Fascioloides magna*. Journal of helminthology 86 (2012), 190-196.

4. GARCIA A. HERAKLES, C. A. RODRIGUES, **F. MARTINKOVIĆ**, H. A. MINERVINO, M. CAMPANER, V. L. B. NUNES, F. PAIVA, B. P. HAMILTON, M. M. TEIXEIRA (2011): Multilocus phylogeographical analysis

of *Trypanosoma (Megatrypanum)* genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. International journal for parasitology 41, 1385-1396.

5. RODRIGUES A. C., H. A. GARCIA, P. A. ORTIZ, A. P. CORTEZ, **F. MARTINKOVIĆ**, F. PAIVA, J. S. BATISTA, A. H. MINERVINO, M. CAMPANER, E. M. PRAL, S. C. ALFIERI, M. M. G. TEIXEIRA (2010): Cysteine proteases of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. Parasitology international 59, 318-325.

6. BECK, A. R. BECK, J. KUSAK, A. GUDAN, **F. MARTINKOVIĆ**, B. ARTUKOVIĆ, M. HOHŠTETER, Đ. HUBER, A. MARINCULIĆ, Ž. GRABAREVIĆ (2008): A Case of Visceral Leishmaniosis in a Gray Wolf *(Canis lupus)* from Croatia. Journal of Wildlife Diseases 44, 451-456.

7. MATANOVIĆ K., K. SEVERIN, **F. MARTINKOVIĆ**, M. ŠIMPRAGA, Z. JANICKI, J. BARIŠIĆ (2007): Hematological and biochemical changes in organically farmed sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. Parasitology Research 101, 1657-1661.

8. **MARTINKOVIĆ F.**, A. MARINCULIĆ (2006): Antibodies against *Leishmania* cross-react with *Crithidia luciliae*: indirect immunofluorescence and Dot-ELISA study in dogs. Parasitology Research 98, 378-80.

9. ŽIVIČNJAK T., **F. MARTINKOVIĆ**, A. MARINCULIĆ, V. MRLJAK, N. KUČER, V. MATIJATKO, Ž. MIHALJEVIĆ, R. BARIĆ-RAFAJ (2005): A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniosis among apparently healthy dogs in Croatia. Veterinary Parasitology 131, 35-43.

Znanstveni radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u tercijarnim publikacijama (Science Citation Indeks – Expanded)

1. DOLENČIĆ ŠPEHAR I., **F. MARTINKOVIĆ**, J. HAVRANEK, A. MARINCULIĆ, M. TUDOR KALIT, S. KALIT (2013): Detection of cathepsin D in ewe milk by Western Blotting method. Mljekarstvo 63, 36-41.

2. ŽIVIČNJAK, T., **F. MARTINKOVIĆ**, C. KHOURY, G. BONGIORNO, S. BOSNIĆ, D. LUKAČEVIĆ, M. MAROLI (2011): Serological and entomological studies of canine leishmaniosis in Croatia. Veterinarski arhiv 81, 99-110.

3. BECK, R., A. MARINCULIĆ, Ž. MIHALJEVIĆ, M. BENIĆ**, F. MARTINKOVIĆ** (2010): Seroprevalence and potential risk factors of

Neospora caninum infection in dairy cattle in Croatia. Veterinarski arhiv 80, 163-171.

Znanstveni radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u sekundarnim publikacijama

1. DŽAJA, P., J. KOS, **F. MARTINKOVIĆ**, Z. PERIĆ (2006): Odgovornost veterinara prilikom parenteralne aplikacije lijekova. *Hrvatski veterinarski vjesnik* 29, 125-131.

Znanstveni radovi, recenzirani, objavljeni u zborniku radova s međunarodnog znanstvenog skupa

1. DŽAJA, P., M. ČULJAK, J. BAGARIĆ, V. VRKIĆ, K. RUKAVEC, **F. MARTINKOVIĆ**, E. ŠATROVIĆ, M. RADAČIĆ, I. VRANJEŠ, A. LOKIN, I. SEMREN (2008): Neka svojstva sirovih goveđih koža. XVI. kongres Mediteranske federacije za zdravlje i produktivnost preživača (XVI. Congress of the Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants : Proceedings). Ivica Harapin, Ivica ; Kos, Josip (ur.). Zagreb, Veterinarski fakultet sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska veterinarska komora, 2008., 345-350.

2. ŽIVIČNJAK, T., **F. MARTINKOVIĆ**, D. LUKAČEVIĆ, V. MRLJAK, B. GOLJAK, V. KUTIČIĆ, Z. BAČETIĆ (2008). Serološki monitoring lišmanioze pasa u Hrvatskoj: opcija ili nužnost? Četvrti hrvatski veterinarski kongres s međunarodnim sudjelovanjem (Fourth Croatian Veterinary Congress with International Participation : Proceedings). Harapin, Ivica (ur.). Zagreb, Hrvatska veterinarska komora, Veterinarski fakultet u Zagrebu, 2008., 267-272.

SUDJELOVANJE NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

Sudjelovanje na međunarodnim znanstvenim skupovima – sažeci kongresnih priopćenja

1. MATANOVIĆ K., S. PINTARIĆ, H. BALL, **F. MARTINKOVIĆ**, M. MARTINEC, B. ŠEOL MARTINEC (2013): Comparison of antigen capture ELISA and PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples. European Mycoplasma Meeting: Mycoplasmas – A Practical Approach / Matanović, K.;

Ayling, R.; Martinković, F.; Šeol Martinec B. (ur.). Zagreb : Medicinska naklada, 2013. 37-37.

2. GOUZELOU. E., C. HARALAMBOUS, **F. MARTINKOVIĆ**, F. PRATLONG, J. DEDET, V. CHRISTODOULOU, M. ANTONIOU, Y. ÖZBEL, S. Ö. TOZ, W. PRESBER, G. SCHÖNIAN, K. S. SOTERIADOU (2013): Inference of the Population Structure of *Leishmania infantum* from Southeastern Europe focusing on Cyprus Greece and Turkey. The Fifth World Congress on Leishmaniasis, Abstract Book, World Leish 5, Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil, 13-17 May 2013. 105-106.

3. DOLENČIĆ ŠPEHAR I., **F. MARTINKOVIĆ**, J. HAVRANEK, A. MARINCULIĆ, M. TUDOR KALIT, S. KALIT (2012): Detekcija katepsina D u ovčjem mlijeku. 40. simpozij mljekarskih stručnjaka s međunarodnim sudjelovanjem. Zbornik sažetaka. Lovran, 21 – 24. 10. 2012. 71-72. Vera Volarić, dipl.inž. (ur.). Zagreb: Hrvatska mljekarska udruga , 2012. 71-72.

4. **MARTINKOVIĆ F.** (2012): The potential use of apathogenic Trypanosomatids as alternative source of antigen for serological screening of leishmaniasis in dogs. European Multicolloquium Of Parasitology XI, Program and Abstract Book, EMOP XI, Cluj-Napoca, Romania, 25 – 29 July 2012. 414-414.

5. **MARTINKOVIĆ F.**, S. VUČINIĆ, A. HORVATIĆ (2012): Proteomic approach for comparison of in vitro cultured trypanosomatids *Crithidia luciliae* and *Leishmania infantum*. European Multicolloquium Of Parasitology XI, Program and Abstract Book, EMOP XI, Cluj-Napoca, Romania, 25 – 29 July 2012. 374-374.

6. **MARTINKOVIĆ F.** (2011): Isolation of Trypanosomes from animals in Croatia. PARASITOLOGY DAYS IN CROATIA. Second International Conference of Southeastern and Eastern European Parasitological Society 2011, Zagreb, 14th and 15th June 2011, Hotel Dubrovnik.

7. SEVERIN, K., **F. MARTINKOVIĆ**, A. MARINCULIĆ, Z. JANICKI, D. KONJEVIĆ, A. SLAVICA, G. VENGUŠT, D. ŽELE, T. MAŠEK, P. DŽAJA (2011): Evaluation of different diagnostic techniques for the diagnosis of fascioloidosis in red deer. PARASITOLOGY DAYS IN CROATIA. Second International Conference of Southeastern and Eastern European Parasitological Society 2011, Zagreb, 14th and 15th June 2011, Hotel Dubrovnik.

8. STEFANOVSKA, J.. I. NALETOSKI, G. NIKOLOVSKI, Z. KOCHEVSKI, T. ŽIVIČNJAK, **F. MARTINKOVIĆ** (2011): Prevalence of visceral leishmaniasis among urban dogs in skopje, R. Macedonia. PARASITOLOGY DAYS IN CROATIA. Second International Conference of Southeastern and Eastern European Parasitological Society 2011, Zagreb, 14th and 15th June 2011, Hotel Dubrovnik

9. **MARTINKOVIĆ, F.**, A. MARINCULIĆ, T. ŽIVIČNJAK, R. BECK, L. VOJTA (2009): Effect of *Plantago major* extracts against *Leishmania infantum* promastigotes *in vitro*. Fourth World Congress on Leishmaniasis (WorldLeish4) : Abstract Book. 2009. 30-30.

10. **MARTINKOVIĆ F.**, K. MATANOVIĆ, A.C. RODRIGUES, M. M. G. TEIXEIRA (2009): Occurrence, culture, morphological characterization and phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) melophagium* from sheep keds in Croatia. Proceedings of the XIII International Congress of Protistology. 2009. 301-301.

11. **MARTINKOVIĆ F.**, A. C. RODRIGUES, M. LADAVAC, M. M. G. TEIXEIRA, A. MARINCULIĆ (2009): First identification, isolation in culture and molecular characterization of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* in Croatia // Proceedings of the XIII International Congress of Protistology. 2009. 142-142.

12. ŽIVIČNJAK T., **F. MARTINKOVIĆ**, R. BECK (2009): Allopurinol: the shortlisted candidate. Abstract Book of the Fourth World Congress on Leishmaniasis. 2009. 255-255.

13. ŽIVIČNJAK T., **F. MARTINKOVIĆ**, C. KHOURY, G. BONGIORNO, S. BOSNIĆ, D. LUKAČEVIĆ, M. MAROLI (2009): Outcome of Canine Leishmaniasis control measures suspension in Croatia : serological and entomological studies in Dalmatia region. Fourth World Congress on Leishmaniasis (WorldLeish4) : Abstract Book. 2009. 99-99.

14. MARINCULIĆ A., S. LUČINGER, Z. JANICKI, K. SEVERIN, T. FLORIJANČIĆ, B. UROŠEVIĆ, **F. MARTINKOVIĆ**, L. VOJTA, R. BECK (2008): Spread of fascioloidosis in deer in Croatia. Proceedings of the "Xth European Multicolloquium Of Parasitology". Pariz : Société Française de Parasitologie, 2008. 198-198.

15. **MARTINKOVIĆ F.**, A. MARINCULIĆ, M. PILAT, A. BECK, L. VOJTA, R. BECK (2008): Unusual location of adults of *Dirofilaria repens* in the heart of the dog. Proceedings of the "Xth European Multicolloquium Of Parasitology". Pariz : Société Française de Parasitologie, 2008. 193-193.

16. FLORIJANČIĆ T., R. BECK, J. TONČIĆ, **F. MARTINKOVIĆ**, T. ŽIVIČNJAK, S. LUČINGER, B. ANTUNOVIĆ, A. GAŠPAR, I. BOŠKOVIĆ, A. MARINCULIĆ, A. GROSS-BOŠKOVIĆ, P. DRAGIČEVIĆ, B. UROŠEVIĆ (2007): Trichinellosis in wild boars in Croatia. XII International Conference of Trichinellosis. Croatia, National Park Plitvice Lakes, 25th – 30th September 2007. 78-78.

17. ŽIVIČNJAK T., **F. MARTINKOVIĆ**, R. BECK, A. MARINCULIĆ (2007): Canine Leishmaniosis Spread in Croatia: Feasibilities of PCR-Based and Serological Monitoring Activities. International Meeting on Emerging Diseases

and Surveillance (IMED) 2007. Wiena, Austria. February 23– 25, 2007. 118-118.

18. PILAT M., **F. MARTINKOVIĆ**, R. BECK, A. MARINCULIĆ (2007): *Dirofilaria repens* in the subcutaneous nodule of the dog. 1st European Dirofilaria Days, 22-25 February, 2007, Zagreb, Croatia. 37-37.

19. ŽIVIČNJAK T., **F. MARTINKOVIĆ**, R. BECK (2007): Canine Dirofilariosis in Croatia: Let's face it. 1st European Dirofilaria Days, 22-25 February, 2007, Zagreb, Croatia. 35-35.

20. JURIĆ B., R. BECK, **F. MARTINKOVIĆ**, A. MILOSAVLJEVIĆ, S. PAHOVIĆ,A. MATIĆ, A. MARINCULIĆ (2007): The prevalence of *Dirofilaria* infection among truffle dogs in Istria, Croatia. 1st European Dirofilaria Days, 22-25 February, 2007, Zagreb, Croatia. 36-36.

21. **MARTINKOVIĆ F.**, A. MARINCULIĆ (2006): The potential of *Crithidia luciliae* antigen in the serological diagnostics of leishmaniosis. 5th Croatian Congress on Infectious Diseases with International Participation, 23-27 September, 2006, Zadar, Croatia. 86-86.

22. ŽIVIČNJAK, T., **F. MARTINKOVIĆ**, R. BECK (2006): Canine Dirofilariosis in Croatia: Spread and Public Health Impact. 5th Croatian Congress on Infectious Diseases with International Participation, 23-27 September, 2006, Zadar, Croatia. 99-99.

23. ŽIVIČNJAK, T., **F. MARTINKOVIĆ**, R. BECK (2006): Canine Leishmaniosis in Croatia: Spread and Public Health Impact. 5th Croatian Congress on Infectious Diseases with International Participation, 23-27 September, 2006, Zadar, Croatia. 84-85.

24. BECK, R., A. MARINCULIĆ, Ž. MIHALJEVIĆ, M. BENIĆ, **F. MARTINKOVIĆ**, P. DŽAJA (2005): Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in Croatia. *ICOPA XI*. Glasgow, Scotland, 2006.

25. **MARTINKOVIĆ, F.**, A. MARINCULIĆ, R. BECK, P. DŽAJA, M. ŠIMPRAGA, K. MATANOVIĆ (2006): Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* in free raising sheep herds in Croatia. *ICOPA XI*. Glasgow, Scotland, 2006.

26. RODRIGURES A. C., J. S. BATISTA, **F. MARTINKOVIĆ**, M. CAMPANER, M. M. G. TEIXEIRA (2006): Trypanosomes of the subgenus *Megatrypanum*: parity between spliced leader and ribosomal sequences supported lineages divergence according to host restriction with artiodactyl species.. In: XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology / XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease, 2006, Caxambú. XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology / XXXIII Annual Meeting on

Basic Research in Chagas Disease. 6-8 November 2006., São Paulo, Brasil, p. 96-96.

27. ŽIVIČNJAK, T., **F. MARTINKOVIĆ,** R. BECK (2006): Lišmanioza pasa u Hrvatskoj: raširenost i mogućnosti suzbijanja // VIII. savjetovanje iz kliničke patologije i terapije životinja sa međunarodnim učešćem : knjiga sažetaka. 26-30. lipnja 2006. Neum. Bosna i Hercegovina.

28. **MARTINKOVIĆ, F.**, D. LUKAS, A. MARINCULIĆ, T. ŽIVIČNJAK, P. RAMADAN, N. DŽAKULA, D. STOJČEVIĆ (2001): Epidemiological Investigation of Leishmaniasis in Croatia. In: In: Abstract book. Croatian and Slovenian Symposium on Microbiology and Infectious Diseases with International Participation: Zoonoses Today and Tomorrow. 21 – 23 lipnja 2001. National Park Plitvice Lakes. Republika Hrvatska. 56-56.

Sudjelovanje na domaćim znanstvenim skupovima – sažeci kongresnih priopćenja

1. MANDAC Z, S. MIHOKOVIĆ, M. LUKAČ, D. HORVATEK TOMIĆ, **F. MARTINKOVIĆ**, E. PRUKNER-RADOVČIĆ, ESTELLA (2013): Field sampling of four - lined snakes (*Elaphe quatuorlineata*) from Cres Island. The 5th International Congress "Veterinary Science and Profession", Book of Abstract. Horvatek Tomić, D; Severin, K; Slavica, A (ur.). Zagreb. Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 2013. 69-69.

2. MIHOKOVIĆ S., Z. MANDAC, M. LUKAČ, D. HORVATEK TOMIĆ, **F. MARTINKOVIĆ**, E. PRUKNER-RADOVČIĆ (2013): Conservation of *Proteus anguinus* - role of veterinarians. The 5th International Congress "Veterinary Science and Profession", Book of Abstract. Horvatek Tomić, D ; Severin, K ; Slavica, A (ur.). Zagreb : Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 2013. 68-68.

3. ŽIVIČNJAK T., **F. MARTINKOVIĆ**, R. BECK (2007) Lišmanioza pasa u Hrvatskoj: značenje monitoringa i *status praesens* Veterinarska znanost i struka, Cvrtila, Ž., Konjević, D. (ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 26 listopad 2007. 49-49.

4. CEBALO LJ., **F. MARTINKOVIĆ**, A. MARINCULIĆ, A. MARKOTIĆ (2005): Aktivnost azitromicina tijekom infekcije humanih monocita/makrofaga s Leishmanijom infantum. Godišnji sastanak Hrvatskog Imunološkog društva, 29. rujan - 02. listopada 2005. Božava, Republika Hrvatska.

5. BECK A., R. BECK, J. KUSAK, B. ARTUKOVIĆ, A. GUDAN, M. HOHŠTETER**, F. MARTINKOVIĆ,** Đ. HUBER, A. MARINCULIĆ, P. DŽAJA, Ž. GRABAREVIĆ (2005): Visceralna lišmanioza u sivog vuka (*Canis lupus*) - Prvi slučaj u svijetu. Veterinarska znanost i struka. Zagreb, 2005. 25-26.

Prevodilaštvo

1. Veterinarska imunologija, Načela i primjena / Šeol Martinec, Branka; Herak Perković, Vlasta (ur.). Zagreb : Medicinska naklada, 2013 (monografija).

9. PRILOZI

Prilog 1. – Popis korištenih kratica

Prilog 2. – Tablica 11.

Prilog 3. - Tablica 12.

Prilog 1. POPIS KORIŠTENIH KRATICA

Kratica	Puni naziv
2DE	Two Dimensional Electrophoresis – dvodimenzionalna elektroforeza
AK	Aanterior to nucleus udaljenost od prednjeg kraja do kinetoplasta
BabB-LIT	Blood Agar Base + Blood + LIT
BCAT	Biphasic Chocolate Agar for Trypanosomatids – hranjiva podloga
BHI	Brain-Heart Infusion – hranjiva podloga
F	Free flagellum - dužina slobodnog biča
FCS	Fetal Calf Serum – fetalni teleći serum
KN	Kinetoplast to nucleus - udaljenost od kinetoplasta do jezgre
L	length-ukupna dužina tijela uključujući slobodni bič (zbroj PK, KN, NA i F)
LN	Nucleus length-dužina jezgre
LIBHIT	NNN agar + brain heart infusion + liver infusion tryptose - hranjivapodloga
LIT	Liver Infusion Tryptose – hranjiva podloga
MEM	Minimum Essential Medium-hranjiva podloga
MMMT	Modified Monophasic Medium for Trypanosomes-hranjiva podloga
NA	Nucleus to anter end - udaljenost od jezgre do prednjeg kraja
NCTC 109	Tissue Culture Section of National Cancer Institute
NI	nakon inokulacije
NI*	Nuclear index-jezgreni indeks NI=PN/NA
NN	Novy, McNeal – krvni agar
NNN	Novy, McNeal, Nicolle – krvni agar
PBS	Phosphate-Buffered Saline - fosfatom-puferirana otopina
PK	Posterior end to kinetoplast - udaljenost od stražnjeg kraja do kinetoplasta
PN	Posterior to nucleus - udaljenost od stražnjeg dijela tijela do jezgre (zbroj PK i KN)
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute – hranjiva podloga
SNB-9	Saline-neopeptone-blood – hranjiva podloga

VIM	Veal Infusion Medium – hranjiva podloga
W	width-širina tijela mjerena kroz centar jezgre
WN	Nucleus width-širina jezgre

Prilog 2.

Tablica 11. Tablica svih proteina *T. (Megatrypanum)* vrsta identificiranih pomoću računalnog programa Mascot verzija 2.1.

Broj proteina	Izolat	Ime proteina	Pristupni broj prema bazi podataka	Molekulska masa (kDa)	Izolektrična točka proteina	*Postotak združivanja (*engl.* protein score)
1	KO	Hypothetical protein (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*	Q4D5E8_TRYCR	15461	8.35	37
2	KO/Tt	ISG75.- *Trypanosoma equiperdum*	Q1WKA1_TRYEQ	58176.5	5.5	53
3	KO	Chaperonin, putative (T-complex protein 1 (Theta subunit), putative).- *Leishmania major*	Q4Q063_LEIMA	58147.8	5.23	57
4	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*	Q4E1L0_TRYCR	106049.1	9.17	43
5	Tm	Calpain-like cysteine peptidase, putative.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D066_TRYCR	12798.3	12798.3	41
6	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q38CI0_9TRYP	62735.7	7.67	68
7	Tt	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D9N3_TRYCR	93056	7.26	45
8	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DRP5_TRYCR	66389.4	5.61	42
9	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4E2G8_TRYCR	21793.1	11.26	51
10	KO	60S ribosomal protein L17, putative.- *Leishmania major*.	Q4QAX6_LEIMA	19071.1	10.67	25
11	KO	Surface protease GP63, [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener	Q4D336_TRYCR	36068.2	6.21	22
12	KO	hypothetical protein [*Trypanosoma brucei* TREU927]	Q586X8_9TRYP	16050.4	9.25	34
13	KO	hypothetical protein [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener]	Q4CPK5_TRYCR	27858	6.02	27
14	KO	hypothetical protein [*Trypanosoma cruzi* strain CLBrener]	Q4D658_TRYCR	86657.1	6	33
15	KO	hypothetical protein [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener]	Q4D567_TRYCR	28668.4	8.94	36
16	KO	ISG75 [*Trypanosoma equiperdum*]	Q1WKA2_TRYEQ	58108.5	5.5	52
17	KO	guanine nucleotide-binding protein subunit beta – like protein [*Trypanosoma brucei* TREU927]	Q383E1_9TRYP	34668.1	5.98	43
18	KO	invariant surface glycoprotein 75 - *Trypanosoma brucei*	B38145	58204.4	5.45	47
19	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q38EW5_9TRYP	4215.2	10.02	19
20	KO	hypothetical protein [*Trypanosoma brucei* TREU927	Q4GYN1_9TRYP	7011.5	8.33	24
21	KO	hypothetical protein [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener]	Q4DC62_TRYCR	86864.2	6.14	39

22	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D194_TRYCR	25380.6	9.17	32
23	KO	40S ribosomal protein S12 [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener]	Q4DW69_TRYCR	15954.1	5.07	52
24	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*	Q38FF2_9TRYP	8110.2	9.83	22
25	KO	ISG75.- *Trypanosoma equiperdum*	Q1WKA1_TRYEQ	58176.5	5.5	43
26	KO	elongation factor 2 [*Trypanosoma cruzi*]	gi|205278864	86005.5	5.73	58
27	KO	hypothetical protein [*Trypanosoma brucei* TREU927]	Q38FC1_9TRYP	5488.9	10.56	28
28	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*	Q385L4_9TRYP	25531.1	9.31	24
29	KO	hypothetical protein [*Trypanosoma brucei* TREU927]	Q57YN2_9TRYP	13294	9.47	9.47
30	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D194_TRYCR	25380.6	9.17	29
31	KO	hypothetical protein [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener]	Q4DAM2_TRYCR	16437.4	9.1	11
32	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4CQS2_TRYCR	14798.5	5.65	15
33	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q581P8_9TRYP	6766.3	4.84	22
34	KO	TcAG48 [*Trypanosoma cruzi*]	gi|148300619	6177.4	10.63	19
35	KO	hypothetical protein, unlikely [*Trypanosoma brucei gambiense* DAL972]	gi|261332646	12845.6	10.02	11
36	KO	hypothetical protein [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener]	Q4DYD2_TRYCR	24837	9.59	33
37	KO	Variant surface glycoprotein (VSG, atypical), putative.- *Trypanosoma brucei*.	Q4FKM3_9TRYP	52126.2	7.87	33
38	KO	Structural maintenance of chromosome 4, putative.- *Trypanosoma brucei.*	Q38CG6_9TRYP	154609	6.14	24
39	KO	hypothetical protein [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener]	Q4D658_TRYCR	Q4D658_TRYCR 86657.1	6	26
40	KO	Signal recognition particle protein SRP19.- *Trypanosoma brucei*.	Q6PW22_9TRYP	17120	9.57	20
41	KO	Small GTP-binding protein (Fragment).- *Trypanosoma brucei*.	Q26685_9TRYP	2782.4	7.98	30
42	KO	40S ribosomal protein S13 [*Trypanosoma brucei* TREU927]	Q586C2_9TRYP	17298.4	10.79	26
43	KO	hypothetical protein, unlikely [*Trypanosoma brucei gambiense* DAL972]	gi|261330051	12356.2	8.58	36
44	KO	hypothetical protein [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener]	Q4D658_TRYCR	86657.1	6	33

45	KO	hypothetical protein [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener]	Q4E577_TRYCR	115231.1	7.21	22
46	KO	hypothetical protein [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener]	Q4CZD5_TRYCR	22628.2	9.39	28
47	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CQ68_TRYCR	37199	8.56	18
48	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DIP4_TRYCR	16982.4	6.1	13
49	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei.*	Q38EZ1_9TRYP	5387.8	10.3	6
50	KO	Tryparedoxin peroxidase.- *Trypanosoma brucei brucei*.	Q71SQ4_TRYBB	22410.1	6.09	49
51	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4E418_TRYCR	66301.5	5.67	37
52	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei.*	Q57XE2_9TRYP	11215.7	8.93	23
53	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CRM2_TRYCR	12034.8	9.54	34
54	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q57UR5_9TRYP	17046.4	5.52	18
55	Tt	Fucose kinase, putative (Fragment).- *Trypanosoma cruzi.*	Q4DGV6_TRYCR	32736.6	7.12	21
56	Tt	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DY58_TRYCR	57454.7	6.56	35
57	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q4GZD3_9TRYP	10406.2	9.05	22
58	Tt	Beta galactofuranosyl glycosyltransferase, putative.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DD63_TRYCR	39226.1	9.06	30
59	Tt	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DZC9_TRYCR	78845.8	9.23	33
60	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*	Q4CY75_TRYCR	23985.4	10.98	33
61	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*	Q4DND0_TRYCR	18329.6	9.43	34
62	Tt	Flagellar protofilament ribbon protein, putative - *Trypanosoma cruzi*.	Q4CV35_TRYCR	46235.3	7.11	39
63	Tt	Dnaj-like protein.- *Leishmania major*.	Q4QCT3_LEIMA	74476.5	6.7	42
64	Tt	dnaK-type molecular chaperone precursor, mitochondrial - *Leishmania major*	S33575	68287.8	5.52	54
65	Tt	ISG75.- *Trypanosoma equiperdum*.	Q1WKA2_TRYEQ	58108.5	5.5	32
66	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4DQC7_TRYCR	27898.1	8.85	30
67	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CZE7_TRYCR	23995.4	10.73	42
68	Tt	Variant surface glycoprotein (VSG), putative.- *Trypanosoma brucei*.	Q4FKD2_9TRYP	59132.4	8.65	39
69	Tt	Hypothetical protein (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CNT0_TRYCR	15181.5	5.83	24
70	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DIY0_TRYCR	38687.2	9.43	39

71	Tt	ISG75.- *Trypanosoma brucei gambiense*.	Q1WKA4_TRYBG	58139.5	5.67	58
72	Tt	Sodium translocating P-type ATPase (Fragment) - *Trypanosoma cruzi*.	Q86QH8_TRYCR	38022.2	5.26	39
73	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CZE7_TRYCR	23995.4	10.73	46
74	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DDB4_TRYCR	49045.7	6.7	36
75	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*	Q4CZE7_TRYCR	23995.4	10.73	39
76	Tt	Galactokinase, putative (EC 2.7.1.6).-*Trypanosoma cruzi.*	Q4DFH6_TRYCR	51302.1	8.11	105
77	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DQC7_TRYCR	27898.1	8.85	35
78	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q4GY78_9TRYP	5923.2	10.54	13
79	Tt	Hypothetical protein (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CMD4_TRYCR	58994.7	6.77	35
80	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei.*	Q38BG1_9TRYP	25246.3	5.62	44
81	Tt	L-threonine 3-dehydrogenase (EC 1.1.1.103).- *Trypanosoma brucei*.	Q7YW97_9TRYP	36917.7	5.92	17
82	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4DXZ5_TRYCR	14783.4	9.3	25
83	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4E3G2_TRYCR	20907.1	9.3	19
84	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q582J9_9TRYP	26148.1	9.81	35
85	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DYJ4_TRYCR	23325.5	6.24	32
86	Tt	TBRPL1 NID: - *Trypanosoma brucei*	CAA91141	41859.5	11.6	21
87	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q57YD4_9TRYP	19273	10.56	45
88	Tt	Chaperone protein DNAJ, putative.- *Trypanosoma brucei.*	Q388D1_9TRYP	52498.8	7.12	29
89	Tt	60S ribosomal protein L17, putative.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4DC23_TRYCR	19102.2	10.86	27
90	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*	Q4DNV9_TRYCR	24879.5	9.27	15
91	Tt	Hypothetical protein (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D861_TRYCR	58999.7	9.82	29
92	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DWX3_TRYCR	26660.7	9.11	27
93	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DH16_TRYCR	21626.4	7	20
94	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4D9E5_TRYCR	16846.5	11.44	26
95	Tt	Tyrosine phosphatase, putative.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4DJW7_TRYCR	52115	5.77	23
96	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DC62_TRYCR	86864.2	6.14	32
97	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei.*	Q38CN5_9TRYP	8911.7	9.85	21
98	Tt	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase, putative.- *Trypanosoma brucei.*	Q384W7_9TRYP	14228.1	8.5	22

99	Tt	tubulin beta chain - *Trypanosoma brucei rhodesiense* Beta tubulin (Fragment).- *Trypanosoma grayi.*	UBUTB Q1PCI8_9TRYP	49671.7 42806.9	4.72 5.29	58 55
100	Tt	Signal recognition particle protein SRP19.- *Trypanosoma brucei.*	Q6PW22_9TRYP	17120	9.57	16
101	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei.*	Q389E2_9TRYP	11764.9	9.75	27
102	Tt	Histone H2A.- *Trypanosoma rangeli.*	Q9U9I7_TRYRA	14440.1	11.74	18
103	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4CZ14_TRYCR	25267.9	9.6	20
104	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei.*	Q389U0_9TRYP	20108.2	9.48	32
105	Tt	Protein phosphatase 2C, putative.- *Trypanosoma brucei.*	Q585I2_9TRYP	29970.8	5.63	22
106	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q38FC1_9TRYP	5488.9	10.56	16
107	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q4GYR4_9TRYP	5588.9	9.86	21
108	Tt	Mitochondrial RNA binding protein, putative.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DCA9_TRYCR	14910.2	9.88	14
109	Tt	Signal recognition particle protein SRP19.- *Trypanosoma brucei*.	Q6PW22_9TRYP	17120	9.57	11
110	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4E4B8_TRYCR	30883.7	9.42	15
111	Tt	Hypothetical protein.- *Leishmania major*.	Q4QIF6_LEIMA	121205	11.11	18
112	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei.*	Q38B03_9TRYP	18552.4	4.71	20
113	Tt	Hypothetical protein.- *Leishmania major*	Q4QIF6_LEIMA	121205	11.11	22
114	Tt	Hypothetical protein (Fragment).- *Trypanosoma brucei*.	Q57UG7_9TRYP	2884.4	7.82	16
115	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q38FC1_9TRYP	5488.9	10.56	20
116	Tt	Signal recognition particle protein SRP19.- *Trypanosoma brucei.*	Q6PW22_9TRYP	17120	9.57	10
117	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CZT4_TRYCR	16199.2	6.84	13
118	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei.*	Q38F12_9TRYP	5385.8	9.73	28
119	Tt	repetitive protein antigen 101 - *Trypanosoma cruzi* (fragment)	C60110	3351.9	11.7	12
120	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DW95_TRYCR	85560.9	5.45	31
121	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DC62_TRYCR	86864.2	6.14	28
122	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4E1L8_TRYCR	46291	6.33	22
123	Tt	ESAG7 09 (Fragment).- *Trypanosoma brucei*.	Q4JL44_9TRYP	15996.1	7.82	17

124	Tt	40S ribosomal protein S12, putative.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4CQG0_TRYCR	15887.1	5.07	64
125	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*	Q4DVP8_TRYCR	37698.5	6.82	25
126	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei.*	Q38FC1_9TRYP	5488.9	10.56	8
127	Tt	Tuzin (Fragment).- *Trypanosoma cruzi.*	Q4DDC4_TRYCR	19113.9	9.71	26
128	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D658_TRYCR	86657.1	6	36
129	Tm	ESAG7 09 (Fragment).- *Trypanosoma brucei.* Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic, putative (EC 3.1.3.11).- *Trypanosoma cruzi.*	Q4JL44_9TRYP Q4DE31_TRYCR	15996.1 37911.2	7.82 7.72	37 37
130	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4D7B9_TRYCR	38881.6	6.54	27
131	Tm	Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic, putative (EC 3.1.3.11).- *Trypanosoma cruzi.*	Q4DE31_TRYCR	37911.2	7.72	23
132	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CKV2_TRYCR	22896.7	8.67	24
133	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei.*	Q38A21_9TRYP	13932.2	10.02	20
134	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4CXI8_TRYCR	104459.1	6.68	28
135	Tm	60S acidic ribosomal protein, putative.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4D991_TRYCR	10747.3	4.44	13
136	Tm	Hypothetical protein.- *Leishmania major.*	Q4Q070_LEIMA	8430.1	4.22	19
137	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CXI8_TRYCR	104459.1	6.68	27
138	Tm	Ribosome biogenesis protein, putative.- *Trypanosoma brucei.* Kinesin, putative.- *Trypanosoma brucei.*	Q388D6_9TRYP Q57XU6_9TRYP	35650.3 113282.2	9.6 6.48	26 26
139	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4DC62_TRYCR	86864.2	6.14	38
140	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4CS84_TRYCR	16816.3	9.73	28
141	Tm	Alkylated DNA repair protein (AlkB homolog), putative.- *Trypanosoma brucei.*	Q57US9_9TRYP	37631.9	5.59	15
142	Tm	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4D3Y9_TRYCR	14710.8	11.41	24
143	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DC62_TRYCR	86864.2	6.14	37
144	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4E2V4_TRYCR	40662.2	5.87	20
145	Tm	ESAG1 protein.- *Trypanosoma brucei.*	Q8MPG2_9TRYP	23864.8	6.73	27

146	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4CY75_TRYCR	23985.4	10.98	20
147	Tm	Chaperone protein DNAJ, putative.- *Trypanosoma brucei.*	Q389A5_9TRYP	65301.7	7.39	27
148	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4DYI4_TRYCR	10907.6	5.37	24
149	Tm	Monooxygenase, putative (Fragment).- *Trypanosoma cruzi.*	Q4CUR7_TRYCR	12741.5	9.64	18
150	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CS84_TRYCR	16816.3	9.73	27
151	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q57ZV7_9TRYP	20309.4	9.84	25
152	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4DNE2_TRYCR	39786.1	6.92	29
153	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4CV12_TRYCR	28578.3	9.22	18
154	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CXI8_TRYCR	104459.1	6.68	39
155	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4DQC4_TRYCR	37467.1	5.65	25
156	Tm	Nuclear movement protein, putative.- *Trypanosoma brucei*.	Q584U3_9TRYP	19654.7	5	26
157	Tm	60S ribosomal protein L32, putative.- *Trypanosoma brucei.*	Q38CL1_9TRYP	15386.4	11.32	21
158	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4D658_TRYCR	86657.1	6	25
159	Tm	RRNA processing protein, putative (Fragment).- *Trypanosoma cruzi.*	Q4D1M6_TRYCR	25204.1	9.57	20
160	Tm	GLP_336_51915_52550.- *Giardia lamblia* ATCC 50803.	Q7QWD1_GIALA	23617.9	8.8	34
161	Tm	Alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase, putative (EC 2.5.1.26).- *Trypanosoma cruzi.*	Q4DQH9_TRYCR	69336.7	7.62	18
162	Tm	Esag1.KC1 protein (Fragment).- *Trypanosoma brucei.*	Q26771_9TRYP	12209.2	5.58	25
163	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4DC62_TRYCR	86864.2	6.14	35
164	Tm	Ribosomal protein S19, putative.- *Trypanosoma brucei.*	Q583K7_9TRYP	18834.2	10.68	23
165	Tm	Small nuclear ribonucleoprotein, putative-*Trypanosoma cruzi.*	Q4CWR6_TRYCR	15208.2	10.05	17
166	Tm	Ribosomal protein S19, putative.- *Trypanosoma brucei*.	Q583K7_9TRYP	18834.2	10.68	21
167	Tm	Serine-arginine rich protein 1.- *Trypanosoma cruzi.*	Q95WZ9_TRYCR	29375.1	11.41	28
168	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei.*	Q38BG1_9TRYP	25246.3	5.62	36
169	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4CZE7_TRYCR	23995.4	10.73	27
170	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei.*	Q385M6_9TRYP	37381.4	5.82	31
171	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4DUT8_TRYCR	22412.7	8.74	20

172	Tm	AF189284 NID: - *Trypanosoma brucei* Nucleolar GTP-binding protein 1.- *Trypanosoma brucei*.	AAF01061 Q386J9_9TRYP	74750.6 74706.6	9.53 9.56	36 36
173	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DC62_TRYCR	86864.2	6.14	25
174	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CSW4_TRYCR	14791.3	5.07	22
175	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q584T4_9TRYP	14861.4	5.53	26
176	KO	Ubiquitin-conjugating enzyme, putative.- *Trypanosoma brucei.*	Q386I0_9TRYP	15643.8	6.41	23
177	KO	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D3Y9_TRYCR	14710.8	11.41	29
178	KO	Hypothetical protein (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D5L9_TRYCR	28667.4	5.21	29
179	KO	Variable surface glycoprotein basic copy (BC) (Fragment).- *Trypanosoma brucei*. Variable surface glycoprotein expression linked extra copy (ELC) (Variable surface glycoprotein IaT.	Q26037_9TRYP Q27221_9TRYP	6243.3 6164.2	5.77 6.75	21 21
180	KO	Zinc finger protein, conserved.- *Trypanosoma brucei*.	Q584Z4_9TRYP	41552.1	8.68	15
181	KO	Ribosomal protein L3.- Trypanoplasma borreli.	Q9NHD6_TRYBO	47607.4	10.74	30
182	KO	Tubulin-tyrosine ligase-like protein, putative (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CPG7_TRYCR	36159.9	6.44	24
183	KO	40S ribosomal protein S12, putative.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CSL1_TRYCR	15760.2	4.97	19
184	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DR34_TRYCR	14679.6	8.93	23
185	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q386G2_9TRYP	87746.3	7.24	35
186	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D4R6_TRYCR	27739.8	5.31	62
187	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DV07_TRYCR	30244.5	9.9	20
188	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DJ65_TRYCR	66602.8	8.92	25
189	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DNV9_TRYCR	24879.5	9.27	26
190	KO	40S ribosomal protein S10, putative.- *Trypanosoma brucei*.	Q38B67_9TRYP	24521.4	9.91	30
191	KO	Aspartyl-tRNA synthetase, putative (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CU45_TRYCR	13845.2	9.68	29
192	KO	RRNA processing protein, putative.- *Trypanosoma cruzi.*	Q4DJZ0_TRYCR	27819.7	10.16	21
193	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DSU2_TRYCR	89582.4	8.69	37

194	KO	Type I topoisomerase.- *Trypanosoma cruzi*.	Q6Y634_TRYCR	77533.6	9.29	30
195	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CUV1_TRYCR	25588.8	7.85	25
196	KO	Ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative (EC 6.3.2.19).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CNN0_TRYCR	25619.6	4.55	22
197	KO	Aspartyl-tRNA synthetase, putative (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CU45_TRYCR	13845.2	9.68	23
198	KO	Hypothetical protein (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DAX4_TRYCR	18023.7	10.25	28
199	KO	Splicing factor TSR1.- *Trypanosoma brucei*.	Q57YE1_9TRYP	37447	11.66	31
200	KO	Aspartyl-tRNA synthetase, putative (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CU45_TRYCR	13845.2	9.68	23
201	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DV45_TRYCR	26932.9	9.44	22
202	KO	Beta galactofuranosyl glycosyltransferase, putative.- *Trypanosoma cruzi*. Mucin-associated surface protein (MASP), putative.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DQW3_TRYCR Q4DB85_TRYCR	20506.9 20424.2	9.15 5.3	21 21
203	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q4GZ32_9TRYP	6158.1	6.54	18
204	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q388C5_9TRYP	17963.5	10.42	16
205	KO	Protein G6 (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*.	Q5XXD5_TRYCR	28514.5	6.32	22
206	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q38DM3_9TRYP	13584.3	10.17	28
207	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DNV9_TRYCR	24879.5	9.27	26
208	KO	40S ribosomal protein S13, putative.- *Trypanosoma brucei*.	Q586C2_9TRYP	17298.4	10.79	23
209	KO	Gag-related protein (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*. 40S ribosomal protein S13, putative.- *Trypanosoma brucei*.	Q9Y028_TRYCR Q586C2_9TRYP	36918.2 17298.4	8.63 10.79	23 23
210	KO	Kinesin, putative (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D9S3_TRYCR	9002.5	11.89	23
211	KO	N-acetyltransferase subunit Nat1, putative.-*Trypanosoma cruzi*.	Q4D4R3_TRYCR	82808.5	6.55	18
212	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DIZ4_TRYCR	23305.4	6.24	40
213	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DW64_TRYCR	26352.9	7.66	17
214	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CZE7_TRYCR	23995.4	10.73	23
215	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DV77_TRYCR	12227.2	6.43	22
216	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D0P7_TRYCR	27635.7	5.43	30

217	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DNV9_TRYCR	24879.5	9.27	25
218	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CZD5_TRYCR	22628.2	9.39	26
219	KO	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CYD9_TRYCR	11324.4	11.67	17
220	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q4GYG2_9TRYP	19338	9.4	25
221	Tt	Kinesin, putative.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DIP9_TRYCR	82541.2	9.24	24
222	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*	Q38F59_9TRYP	14973.9	10.44	21
223	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q4GYK2_9TRYP	6504.5	10.29	31
224	Tt	Hypothetical protein (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CMD4_TRYCR	58994.7	6.77	27
225	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*. ESAG7 04 (Fragment).- *Trypanosoma brucei*.	Q4D3J1_TRYCR Q4JL49_9TRYP	25545.9 15872.2	4.9 8.68	24 23
226	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q38FK1_9TRYP	4600.3	8.37	33
227	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q38AJ8_9TRYP	15290.7	11.05	30
228	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q57Z10_9TRYP	15053.7	5.45	32
229	Tt	Mannose-1-phosphate guanyltransferase, putative (EC 2.7.7.13).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CU94_TRYCR	42029	6.97	62
230	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D0G1_TRYCR	18630.1	9.77	35
231	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DQS4_TRYCR	15289.7	9.18	17
232	Tt	Protein kinase C substrate protein, heavy chain, putative (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DXF6_TRYCR	23830.4	4.92	31
233	Tt	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4, putative (EC 5.2.1.8).- *Trypanosoma cruzi*. ESAG7 07 (Fragment).- *Trypanosoma brucei*.	Q4E641_TRYCR Q4JL46_9TRYP	13221.7 16029.2	9.43 8.36	23 22
234	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q57VQ5_9TRYP	51659.6	8.69	25
235	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q57ZB4_9TRYP	36475.6	7.66	27
236	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q38EW5_9TRYP	4215.2	10.02	27
237	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q38EW5_9TRYP	4215.2	10.02	27
238	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CX67_TRYCR	16953.4	8.93	28
239	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CSH5_TRYCR	20514.7	9.34	24
240	Tt	Beta galactofuranosyl glycosyltransferase, putative.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DQW3_TRYCR	20506.9	9.15	30
241	Tt	Calcium motive P-type ATPase TBCA2 (Fragment).- *Trypanosoma brucei*.	Q9XZJ8_9TRYP	37199.8	5.34	28

242	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DC62_TRYCR	86864.2	6.14	35
243	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*	Q385S6_9TRYP	30688.4	9.21	26
244	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q38FC1_9TRYP	5488.9	10.56	26
245	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CWU5_TRYCR	27736	5.56	22
246	Tt	Hypothetical protein (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*	Q4CZD6_TRYCR	29010.1	4.93	21
247	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q38A21_9TRYP	13932.2	10.02	35
248	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D4K1_TRYCR	53629.5	6.18	42
249	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q38EW5_9TRYP	4215.2	10.02	33
250	Tt	Beta galactofuranosyl glycosyltransferase, putative.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DFT4_TRYCR	39638.3	9.33	28
251	Tt	Chaperone protein DNAJ, putative.- Trypanosoma brucei.	Q389A5_9TRYP	65301.7	7.39	34
252	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D8P0_TRYCR	21864.1	11.23	30
253	Tt	ribosomal mobile element hypothetical 15.7K protein - *Trypanosoma brucei*	A21047	15702.6	9.59	29
254	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DR79_TRYCR	153963	5.48	35
255	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*. Tryparedoxin.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DC62_TRYCR Q8T8E0_TRYCR	86864.2 16057.1	6.14 5.27	44 39
256	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q38F59_9TRYP	14973.9	10.44	19
257	Tt	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DKR2_TRYCR	20932.4	9.23	26
258	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D658_TRYCR	86657.1	6	31
259	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D658_TRYCR	86657.1	6	41
260	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DYJ4_TRYCR	23325.5	6.24	42
261	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CR86_TRYCR	82536	5.41	36
262	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*. Paraflagellar rod component Par4, putative.- *Trypanosoma cruzi*. Fibrillarin, putative.- *Trypanosoma cruzi*.	Q383Q8_9TRYP O46353_TRYCR Q4DIZ5_TRYCR	107167 68185.5 30484.5	9.6 5.22 9.81	38 36 36
263	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DC62_TRYCR	86864.2	6.14	49
264	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*	Q4D658_TRYCR	86657.1	6	39
265	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DC62_TRYCR	86864.2	6.14	41

266	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DYJ4_TRYCR	23325.5	6.24	44
267	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma brucei*.	Q38BG1_9TRYP	25246.3	5.62	39
268	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*. Ubiquitin-conjugating enzyme, putative.- *Trypanosoma brucei*.	Q4D4K1_TRYCR Q386I0_9TRYP	53629.5 15643.8	6.18 6.41	31 30
269	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DU70_TRYCR	54381.8	6.18	47
270	Tm	40S ribosomal protein S13, putative.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CWD6_TRYCR	17218.3	10.54	18
271	Tm	Mitochondrial malate dehydrogenase, putative (Fragment).- *Trypanosoma cruzi*. Malate dehydrogenase, putative (EC 1.1.1.37).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D4A0_TRYCR Q4DXL5_TRYCR	31494.4 33330.4	7.62 8.44	119 119
272	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D658_TRYCR	86657.1	6	45
273	Tm	Small GTP-binding protein, putative.- *Trypanosoma brucei*.	Q580S0_9TRYP	20625.5	6.14	36
274	Tm	Structural maintenance of chromosome 4, putative.- *Trypanosoma brucei*.	Q38CG6_9TRYP	154609	6.14	41
275	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CTT3_TRYCR	17358.1	7.22	34
276	Tm	Structural maintenance of chromosome 4, putative.- *Trypanosoma brucei*.	Q38CG6_9TRYP	154609	6.14	33
277	Tm	Nitrilase, putative (EC 3.5.5.1).- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D9K8_TRYCR	30840.1	5.58	38
278	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4D194_TRYCR	25380.6	9.17	34
279	Tm	Tryparedoxin peroxidase.- *Trypanosoma brucei* brucei.	Q71SQ4_TRYBB	22410.1	6.09	49
280	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DEQ6_TRYCR	24294	9.2	31
281	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4CZE7_TRYCR	23995.4	10.73	34
282	Tm	Hypothetical protein.- *Trypanosoma cruzi*.	Q4DC62_TRYCR	86864.2	6.14	40
283	Tm	Type I topoisomerase.- *Trypanosoma cruzi*. *Trypanosoma cruzi*.	Q6Y634_TRYCR	77533.6	9.29	24

*Postotak združivanja (*engl.* protein score) se odnosi na kombinirane postotke svih zabilježenih spektara masa koji se mogu pridružiti aminokiselinskim sljedovima unutar pojedinog proteina. Što je viša vrijednost postotka združivanja, to je pouzdanija identifikacija proteina. Pristupni broj proteina određen je prema bazi podataka NCBI. KO – *Trypanosoma sp. iz jelena*, Tt – *Trypanosoma theileri*, Tm- *Trypanosoma melophagium*.

Prilog 3.

Tablica 12. Svi proteini dva izolata *T. rotatorium* kompleksa identificirani pomoću računalnog programa Mascot verzija 2.1.

Broj proteina	Izolat	Ime proteina	Pristupni broj prema bazi podataka	Molekulska masa kDa	Izolektrična točka proteina	* Postotak združivanja (*engl*. protein score)
1	OR	protein phosphatase 2C, putative [*Trypanosoma brucei gambiense* DAL972]	gi|261332598	66795	6.62	46
2	OR	hypothetical protein [*Trypanosoma brucei* TREU927]	gi|72392361	62264.4	7.95	52
3	OR	hypothetical protein [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener]	gi|71657689	31859.9	8.69	20]
4	OR	hypothetical protein [*Trypanosoma brucei* TREU927]	gi|71747264	25246.3	5.62	14
5	PR	hypothetical protein [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener]	gi|71663349	53721.2	10.34	43
6	PR	aminomethyltransferase, putative [*Trypanosoma brucei gambiense* DAL972]	gi|261334973	41156.2	8.17	61
7	PR	trans-sialidase [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener]	gi|71414982	73954	5.36	43
8	PR	kinesin, putative; kinesin-II 85 Kd subunit, putative [*Trypanosoma brucei gambiense* DAL972]	gi|261335442	127320.8	5.62	46
9	PR	maoC-like dehydratase [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener]	gi|71656824	22161.4	8.3	55
10	PR	surface protein-2 [*Trypanosoma cruzi*]	gi|148251376	77073.4	6.14	41
11	PR	cysteine proteinase type B [*Leishmania donovani infantum*]	gi|63003480	11461.3	8.5	16
12	PR	hypothetical protein [*Trypanosoma cruzi* strain CL Brener]	gi|71407195	32664.6	4.86	53
13	PR	hypothetical protein, conserved [*Trypanosoma brucei gambiense* DAL972]	gi|261328699	58742.3	7.49	32

*Postotak združivanja (*engl.* protein score) se odnosi na kombinirane postotke svih zabilježenih spektara masa koji se mogu pridružiti aminokiselinskim sljedovima unutar pojedinog proteina. Što je viša vrijednost postotka združivanja, to je pouzdanija identifikacija proteina. Pristupni broj proteina određen je prema bazi podataka NCBI. OR – Izolat OR, PR – Izolat PR.