

Generalità sulle simbiosi in parassiti e in artropodi vettori, con alcuni riferimenti alle applicazioni in campo medico-veterinario

INTRODUZIONE

Secondo una visione comune, proposta da diversi libri di testo di parassitologia, la selezione naturale tende a ridurre la virulenza dei parassiti, portando a uno stato di convivenza tra ospite e parassita. In realtà, i biologi evoluzionisti ritengono che la riduzione della virulenza di un parassita possa realizzarsi, ma solo in determinate condizioni ecologiche e in relazione alle caratteristiche del ciclo biologico del parassita e delle modalità attraverso cui il parassita esplica la sua azione patogena. In primo luogo, la modalità di trasmissione dei parassiti è ritenuta essere un fattore determinante nell'evoluzione della virulenza. Ad esempio, si ritiene che la virulenza possa aumentare nei casi in cui ci sia alta probabilità di trasmissione orizzontale del parassita e alta probabilità che un ospite venga infettato contemporaneamente da ceppi diversi del parassita, soprattutto nei casi in cui l'aumento di fecondità e di probabilità di trasmissione a un nuovo ospite implicino un aumento di virulenza. D'altra parte, se i parassiti sono trasmessi verticalmente (dai genitori alla progenie), con bassa o nulla probabilità di trasmissione orizzontale, il successo riproduttivo sia dell'ospite che del parassita sono strettamente collegati, e la selezione dovrebbe favorire ceppi di parassiti più benigni. In queste condizioni, la selezione naturale potrebbe anche promuovere la comparsa di azioni benefiche esercitate dall'agente infettivo ereditario sull'ospite. In questo senso, la trasmissione verticale può essere indicata come uno dei fattori che possono portare allo sviluppo di interazioni mutualistiche. Negli animali, i parassiti e i simbiotici a trasmissione verticale seguono, nella maggior parte dei casi, la via materna

* *Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano*

(dalla madre alla progenie) e sono, in generale, microrganismi, eucariotici o procariotici; vengono spesso indicati come microrganismi ereditari (per una introduzione ad alcuni aspetti della biologia evoluzionistica delle simbiosi, vedi Bandi et al., 2001).

I MICRORGANISMI A TRASMISSIONE EREDITARIA E LA MANIPOLAZIONE DELLA RIPRODUZIONE DEGLI OSPITI

È ovvio aspettarsi che i microrganismi ereditari abbiano interessi in comune con il loro ospite; in realtà, essendo generalmente ereditati per via materna, gli interessi di questi microrganismi coincidono in modo particolare con quelli dell'ospite di sesso femminile. Le pressioni selettive sugli elementi a ereditarietà materna differiscono da quelle sul genoma dell'ospite. In primo luogo, la selezione sui microrganismi ereditari dovrebbe selezionare in modo diretto gli effetti positivi verso il sesso ospitante responsabile della trasmissione (cioè, in generale, le femmine); gli effetti benefici sui maschi potrebbero svilupparsi indirettamente, ma non si ritiene che siano una conseguenza diretta della selezione. Nei fatti, esistono numerosi tipi di simbiosi in cui microrganismi ereditari determinano una riduzione della fitness degli individui non coinvolti nella loro trasmissione (maschi, o anche femmine non infette), contestualmente a un aumento della fitness nelle femmine portatrici. Pertanto, oltre a favorire fenotipi benigni (soprattutto nei confronti degli ospiti responsabili della loro trasmissione, come le femmine infette), la selezione sui microrganismi ereditari può favorire la diffusione di fenotipi che sono dannosi per gli ospiti non coinvolti nella loro trasmissione (maschi o femmine non infette). Pertanto, i microrganismi a trasmissione ereditaria non sono coinvolti solo in forme di simbiosi mutualistica (benefica per l'ospite), ma anche in forme particolari di simbiosi, in cui si assiste a una riduzione della fitness delle femmine non infette (attraverso il fenomeno dell'incompatibilità citoplasmatica), o ad alterazioni del rapporto sessi a favore delle femmine (attraverso fenomeni di partenogenesi, morte di embrioni maschili, o sviluppo in senso femminile di maschi genetici). I microrganismi ereditari in grado di esercitare questi effetti sugli ospiti vengono indicati come manipolatori (o parassiti) della riproduzione. I microrganismi manipolatori della riproduzione sono diffusi nel phylum degli artropodi, e vengono studiati in modo particolare negli insetti, anche in relazione alle loro potenzialità applicative. Fra i diversi manipolatori della riproduzione il più noto è probabilmente *Wolbachia*, un batterio intracellulare dell'ordine Rickettsiales, diffuso negli artropodi e in alcune linee

filogenetiche di nematodi, fra cui le filarie. *Wolbachia* ha attirato l'attenzione della ricerca applicata per diverse ragioni. In primis, è in grado di determinare incompatibilità citoplasmatica, una sorta di sterilizzazione delle femmine non infette nella popolazione ospite, innescata dall'accoppiamento con maschi infetti. La sterilizzazione (o comunque la ridotta fecondità) delle femmine non infette implica un più alto tasso riproduttivo per le femmine infette, dal che deriva la diffusione di *Wolbachia* nella popolazione ospite (garantita dalla trasmissione verticale). *Wolbachia* è quindi in grado di diffondersi nelle popolazioni degli insetti ospiti. Laddove l'infezione di un insetto da parte di *Wolbachia* sia associata a effetti utili dal punto di vista applicativo (ad esempio una riduzione della capacità vettoriale nei confronti di patogeni animali o vegetali), possono derivare interessanti ricadute applicative. Ne è un esempio una nuova strategia sviluppata in Australia per il controllo del Dengue, attraverso la diffusione di *Wolbachia* nelle popolazioni di zanzare (Hoffman et al., 2011). Un altro effetto determinato da *Wolbachia* che potrebbe essere utilizzato a fini applicati è l'induzione della partenogenesi telitoca: le vespe parassitoidi utilizzate nel biocontrollo potrebbero essere rese partenogenetiche attraverso l'infezione da parte di *Wolbachia*, con generazione di popolazioni interamente femminili (e quindi senza maschi, di per sé inutili ai fini delle applicazioni nel biocontrollo). Per una rassegna della letteratura relativa agli argomenti trattati in questo paragrafo, vedi Bandi et al. (2001).

SIMBIOSI MUTUALISTICHE NEGLI INSETTI EMATOFAGI

Diversi artropodi di interesse medico-veterinario, siano essi vettori di agenti patogeni o semplici parassiti ematofagi, vivono in simbiosi con microrganismi che incidono fortemente sulla loro biologia. Nel paragrafo precedente ci siamo concentrati su simbionti a trasmissione ereditaria in grado di manipolare la riproduzione degli ospiti. Nei due paragrafi seguenti tratteremo alcuni esempi di simbiosi in insetti ematofagi, vettori di importanti malattie degli animali e dell'uomo. In generale si ritiene che le simbiosi di tipo mutualistico siano particolarmente diffuse in animali la cui dieta sia sbilanciata, ad esempio dal punto di vista della composizione amminoacidica, o per quanto riguarda carenze di vitamine/cofattori. Secondo l'interpretazione corrente, i simbionti degli insetti ematofagi avrebbero un ruolo importante nella produzione di vitamine di cui il sangue è carente, ad esempio vitamine del gruppo B. In questo senso i simbionti mutualistici sarebbero particolarmente utili per insetti la cui dieta sia esclusivamente ematofaga. I pidocchi dell'uomo,

ad esempio, sono ematofagi a livello di tutti gli stadi vitali, e vivono in simbiosi obbligata con batteri del genere *Riesia*. Questi batteri, trasmessi per via materna alla progenie, avrebbero un ruolo importante nella produzione di molecole necessarie all'insetto ospite. L'essenzialità di questa simbiosi nel pidocchio è tale che, secondo dati pur aneddotici ottenuti da pazienti umani, la somministrazione di antibiotici attivi sul simbionte porterebbe alla risoluzione dell'infestazione (per una rassegna della letteratura relativa alla simbiosi nei pidocchi, vedi Perotti et al., 2009). In altre specie di insetti in cui il ciclo biologico prevede stadi vitali non dipendenti dall'alimentazione ematofaga, ad esempio in insetti olometaboli quali i ditteri, o comunque in insetti emimetaboli che non siano esclusivamente ematofagi, l'associazione simbiotica può presentarsi in forme meno integrate rispetto a quanto osservato negli ematofagi obbligati.

RHODOCOCCUS, SIMBIONTE DELLE CIMICI TRIATOMINAE

La sottofamiglia Triatominae della famiglia Reduviidae (Rhynchota) include le cimici ematofaghe dei generi *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, che sono i principali vettori del protozoo *Trypanosoma cruzi*, l'agente eziologico della malattia di Chagas (Vallejo et al., 2009). Le triatomine sono fondamentali nel ciclo di vita di *T. cruzi*, sia per il loro ruolo vettoriale, sia come stazione di moltiplicazione di questo parassita. Queste cimici consumano il loro pasto di sangue soprattutto di notte, o comunque quando l'ospite sta dormendo. Se l'ospite è infetto, la cimice può acquisire il protozoo, permettendo a esso di moltiplicarsi e di completare il suo ciclo di vita e di essere rilasciato con le feci. Durante il pasto di sangue la cimice tende infatti a defecare, e può quindi contaminare la cute dell'ospite. Grazie alla loro motilità flagellare i tripanosomi presenti nelle feci possono raggiungere le microlesioni causate dal morso della cimice, o penetrare attraverso le mucose, o attraverso microlesioni generate dal grattamento. Oltre ad acquisire tripanosomi attraverso il pasto di sangue, le cimici triatomine possono infettarsi attraverso il consumo di feci infette depositate da altre cimici, o attraverso il cannibalismo.

Le triatomine generalmente infestano baracche e case mal costruite, e questo rende la malattia di Chagas endemica nelle zone rurali e povere del Centro e Sud America, dove si stima che siano infette 8-11 milioni di persone; più di 90 milioni sarebbero a rischio di contrarre l'infezione (WHO 2012). Il Chagas è una malattia cronica con un corso altamente invalidante, che porta all'insorgenza di alterazioni al sistema cardiovascolare (e.g. cardiomiopatia di-

latativa), digestivo (e.g. mega-esofago e mega-colon) e del sistema nervoso. La malattia causa una grave disabilità e una riduzione significativa dell'aspettativa di vita dei pazienti. *T. cruzi* ha una bassa specificità d'ospite: può infettare diversi specie di animali (cane, opossum, armadillo, ecc.), che rappresentano il serbatoio della malattia. Si tratta quindi di una tipica zoonosi di interesse sia medico che veterinario, la cui eradicazione risulta difficilmente realizzabile (Rabinovich et al., 2011). Per questi motivi, il controllo della malattia di Chagas può essere raggiunto solo attraverso la progettazione di un approccio integrato che preveda azioni per contenere le popolazioni di insetti e per ridurre le loro capacità vettoriali.

La comunità microbica dell'intestino delle cimici triatomine è stata studiata per oltre cinquanta anni (Baines, 1956). Di particolare interesse sono i batteri del genere *Rhodococcus* (ad esempio *R. rhodnii*, *R. corynebacteroides*, *R. triatomae*), che si ritiene diano un contributo importante per il metabolismo degli insetti, ad esempio attraverso la sintesi di vitamine del gruppo B, carenti nel sangue (Beard et al., 1992). La prima fase ninfale della cimice è priva di simbionti (aposimbiotica), che sono poi acquisiti tramite coprofagia, che permette quindi di acquisire sia i simbionti rilasciati da altri insetti, sia, quando presenti, i tripanosomi.

Il sistema simbiotico triatomine-*Rhodococcus* è particolarmente interessante per lo sviluppo di una strategia di controllo della tripanosomiasi di tipo paratransgenico (Beard et al., 1992). L'approccio paratransgenico prevede la manipolazione genetica di un simbionte associato a un determinato vettore di una malattia infettiva, al fine di rendere il simbionte ingegnerizzato capace produrre molecole che interferiscano con l'agente infettivo. *Rhodococcus* può infatti essere coltivato in terreni acellulari e geneticamente modificato per esprimere stabilmente proteine che esercitano azioni dannose nei confronti di *T. cruzi*. Inoltre, simbionti e tripanosomi colocalizzano nell'intestino dell'insetto vettore, e il metodo naturale di acquisizione dei simbionti attraverso l'ingestione di materiale fecale ha permesso di prevedere una strategia per favorire l'ingestione dei batteri geneticamente modificati da parte dell'insetto, attraverso pellets di materiale organico.

Il primo passo verso l'applicazione di questa strategia è stata la dimostrazione della possibilità di ridurre la carica batterica nell'intestino di cimici "wild-type" mediante l'inclusione di antibiotici nei pellets, e quindi di promuovere la colonizzazione da parte di batteri resistenti agli antibiotici, tramite alimentazione delle cimici con pellets contenenti i batteri resistenti (Beard et al., 1992). Il passo successivo è stato quello di alimentare le cimici con batteri antibiotico-resistenti geneticamente manipolati per essere in grado

di produrre fattori anti-tripanosoma (ad esempio cecropina A; Durvasula et al., 1997). Questo ha permesso di ottenere la colonizzazione dell'insetto con batteri "tossici" per il protozoo, riducendo in modo significativo la capacità vettoriale degli insetti. Gli studi su questo sistema sono continuati nel corso degli anni, con la determinazione dell'efficacia di diverse molecole anti-tripanosoma (apidaecina, magainina II, melittina), ma anche attraverso la creazione di pellets "anti-tripanosoma" utilizzabili in esperimenti di campo (Cruziguard[®]; Hurwitz et al., 2011). Ad oggi, non è ancora possibile lanciare campagne su larga scala per il controllo della malattia di Chagas utilizzando questa strategia, ma i risultati pubblicati sono certamente incoraggianti, e rendono il modello simbiotico triatomine-*Rhodococcus* uno dei sistemi di controllo mediante paratransgenesi più avanzati e più vicini all'applicazione.

I SIMBIONTI DELLE MOSCHE TSE-TSE: *WIGGLESWORTHIA* E *SODALIS*

Le mosche appartenenti al genere *Glossina* (Diptera: Glossinidae) sono vettori delle tripanosomiasi africane, la cui forma più nota è la malattia del sonno dell'uomo. Negli esseri umani, questa malattia è causata da protozoi appartenenti a due sottospecie di *Trypanosoma brucei*. Il *T. b. rhodesiense* (malattia del sonno dell'Africa orientale) è localizzato principalmente nella parte orientale e sud-orientale dell'Africa, dove ogni anno causa centinaia di nuovi casi umani. La maggior parte dei casi di malattia del sonno, circa 7.000-10.000 nuovi casi per anno, sono causati dalla seconda sottospecie, il *T. b. gambiense* (malattia del sonno dell'Africa centro-occidentale; Malvy e Chappuis, 2011). Inoltre, i tripanosomi della sottospecie *T. b. brucei* sono gli agenti eziologici di una malattia di grande importanza in ambito veterinario, il nagana. Questa malattia colpisce i bovini e altri ruminanti, e rende l'allevamento di questi animali virtualmente impossibile in vaste zone dell'Africa centrale, con gravissime conseguenze socio-economiche (Jordan, 1986).

Le malattie causate dai tripanosomi del gruppo *T. brucei* (con l'eccezione di *T. b. rhodesiense* nell'uomo) progrediscono in genere lentamente, portando a quadri cronici caratterizzati da profonda alterazione della risposta immunitaria (da cui possono derivare infezioni secondarie/opportunistiche) e da un quadro di risposta infiammatoria a livello del sistema nervoso centrale, con eventuali danni a livello della guaina mielinica. Nell'uomo, dopo una prima fase della durata di 1-2 anni, la malattia del sonno progredisce, coinvolgendo il sistema nervoso centrale, portando a cambiamenti di personalità, sonnolenza diurna, alterazioni del ciclo veglia/sonno, e progressiva confusione, fino

alla possibile morte del paziente (Malvy e Chappuis, 2011). Nelle mandrie di animali infettati il nagana porta a significative riduzioni di produttività e di fertilità.

Le glossine, note anche come mosche tse-tse, pungono durante le ore diurne; sia il maschio che la femmina possono trasmettere il *Trypanosoma*. Nella savana dell'Africa orientale le glossine vivono prevalentemente nelle zone rurali, nei boschi e nelle zone ricche di cespugli. Nell'Africa centrale e occidentale, questi ditteri vivono nelle foreste e vicino ai margini dei fiumi.

La mosca tse-tse ospita due distinte popolazioni di batteri simbiotici: un simbiote primario (e quindi necessario per la sopravvivenza della mosca) chiamato *Wigglesworthia* e un simbiote secondario appartenente al genere *Sodalis*. I batteri del genere *Wigglesworthia* vivono all'interno di cellule specializzate (chiamate batteriociti) che insieme formano un organo (batterioma) situato nell'intestino. Ogni batterioma contiene circa 100 milioni di cellule di *Wigglesworthia* che popolano il citoplasma dei batteriociti. La funzione principale di questo simbiote può essere meglio compresa se si considera la particolare forma di riproduzione della mosca tse-tse. Le glossine sono infatti vivipare e la femmina produce un solo uovo, che trattiene all'interno dell'utero, dove la larva si sviluppa fino al terzo stadio di sviluppo. Al termine dello sviluppo larvale, la femmina depone una larva matura che si trasforma in pupa. Lo sviluppo intrauterino della larva è reso possibile dalla disponibilità di vitamine/cofattori prodotti dal simbiote primario, *Wigglesworthia*, che vengono utilizzati dalla larva grazie alle secrezioni della ghiandola del latte.

Ad oggi, sono stati sequenziati i genomi di due specie di questo simbiote, *W. glossinidia* e *W. morsitans* (Akman et al., 2002; Rio et al., 2012); presentano molte caratteristiche interessanti, la maggior parte delle quali comuni a entrambe le specie. I genomi hanno una dimensione di circa 700 Kb. Nonostante le ridotte dimensioni, il genoma di *Wigglesworthia* contiene oltre 60 geni necessari per sintetizzare una notevole varietà di vitamine, essenziali per integrare la dieta dell'ospite, qualitativamente carente. Un'altra prova indiretta del rapporto di mutualista obbligato di *Wigglesworthia* verso *Glossina* può essere ottenuta con ceppi aposimbiotici (cioè privi di simbiotici), ottenuti trattando l'insetto con antibiotici. Le mosche private dei loro simbiotici primari mostrano un ritardo nello sviluppo e una riduzione quasi totale dell'attività riproduttiva (Nogge, 1976). Questa situazione può essere in parte risolta alimentando le mosche aposimbiotiche con un pasto di sangue addizionato con vitamine del gruppo B (Nogge, 1981).

Il simbiote secondario delle glossine è il batterio *Sodalis glossinidius*. Questo simbiote colonizza l'intestino, i muscoli, i corpi grassi, l'emolinfa,

la ghiandola del latte e le ghiandole salivari (Dale et al., 2001). I meccanismi della relazione simbiotica di *Sodalis* con *Glossina* non sono ancora chiari: si tratterebbe di una situazione al limite tra commensalismo e simbiosi mutualistica facoltativa. Infatti, l'eliminazione di questo simbionte non produce alcuna riduzione significativa della capacità riproduttiva e di sviluppo delle mosche tse-tse. La presenza di *Sodalis* non risulta quindi essere essenziale per l'ospite (a differenza *Wigglesworthia*). *S. glossinidius* viene coltivato in vitro ed è stato possibile produrre ceppi ricombinanti in grado di esprimere la proteina verde fluorescente (GFP) come marcatore. Questi batteri marcati, iniettati nell'emolinfia di femmine gravide, sono stati acquisiti dalla larva intrauterina e quindi trasmessi alla generazione successiva, continuando a esprimere il marcatore GFP anche negli adulti (Weiss et al., 2006). Sono in atto progetti finalizzati a generare ceppi del simbionte capaci di interferire con lo sviluppo dei tripanosomi responsabili della malattia del sonno e del nagana. Ad esempio, *S. glossinidius* è stato modificato geneticamente per l'espressione di un anticorpo anti-*Trypanosoma* a singolo dominio diretto verso la proteina variante di superficie del parassita (De Vooght et al., 2012). La riduzione della capacità di trasmissione del tripanosoma attraverso un approccio di tipo paratransgenico rappresenterebbe un'importante strategia di controllo, che potrebbe integrare quelle già esistenti (tecnica dell'insetto sterile, trappole a feromoni, insetticidi, ecc.) nelle zone in cui la malattia del sonno e il nagana sono endemiche.

LA SIMBIOSI DI *WOLBACHIA* CON I NEMATODI FILARIDI

I nematodi filaridi sono importanti parassiti dell'uomo e degli animali. Nell'uomo sono responsabili di malattie tropicali altamente invalidanti, come l'elefantiasi (causata da *Wuchereria bancrofti* e *Brugia malayi*) e la cecità dei fiumi (*Onchocerca volvulus*). Nel cane, anche nelle aree a clima temperato, *Dirofilaria immitis* causa la filariosi cardiopolmonare, malattia che può portare a una significativa riduzione dell'aspettativa di vita dell'animale (la malattia può interessare anche il gatto, seppur con minore frequenza). Diversi nematodi filaridi, fra cui *O. volvulus*, *W. bancrofti*, *B. malayi*, *Mansonella* spp. e *D. immitis*, ospitano batteri simbiotici intracellulari del genere *Wolbachia*. Studi di microscopia elettronica hanno mostrato la presenza di *Wolbachia* nel citoplasma delle cellule delle corde laterali sia dei maschi che delle femmine (Sironi et al., 1995). Nelle femmine di filaria, i batteri sono altresì presenti negli oogoni, negli oociti e negli embrioni; *Wolbachia* è stata anche osservata

nelle microfilarie e nelle larve all'interno degli insetti vettori. Il batterio risulta quindi trasmesso alla progenie per via transovarica (Bandi et al., 2001b).

Il trattamento con antibiotici come tetracicline e rifampicina, noti per essere attivi su tutte le rickettsiae inclusa la *Wolbachia* degli insetti, determina effetti deleteri sulle filarie associate in simbiosi con *Wolbachia*. Da una parte, il trattamento antibiotico porta a una significativa riduzione del carico in *Wolbachia* nel corpo del nematode. D'altra parte il nematode filaride sottoposto a trattamento antibiotico presenta un blocco dell'embrionogenesi e un blocco dello sviluppo da larva ad adulto. Inoltre, pur a distanza di settimane/mesi dal trattamento, i vermi adulti esposti all'antibiotico vanno incontro a morte (Bandi et al., 2001b). Questi studi indicano che la simbiosi tra *Wolbachia* e filarie sarebbe di tipo obbligato, soprattutto se si considera che trattamenti con i medesimi antibiotici effettuati su filarie prive di *Wolbachia* (come *Acanthocheilonema viteae*) non portano ad alcun effetto negativo sulle filarie (Bandi et al., 2001b). Per queste ragioni, *Wolbachia* è stata presa in considerazione come un target estremamente interessante per la cura delle più gravi forme di filariosi dell'uomo e degli animali.

RIASSUNTO

La simbiosi è un fenomeno biologico diffuso, ed è un importante forza evolutiva, che nel corso della storia ha modellato gli organismi, portando a sviluppi che non sarebbero spiegabili attraverso i modelli della teoria sintetica dell'evoluzione, ad esempio l'origine della cellula eucariotica. Le simbiosi sono osservate in tutti i gruppi di eucarioti, inclusi i diversi parassiti unicellulari e pluricellulari di piante e animali. Questo articolo è focalizzato sulla descrizione di alcuni esempi di simbiosi in parassiti e insetti vettori di interesse medico-veterinario, e sulle possibili strategie di controllo basate sull'utilizzo di organismi simbiotici, o sulla manipolazione del sistema ospite/simbionte nel suo complesso.

ABSTRACT

Symbiosis is a widespread biological phenomenon, and is an important evolutionary mechanism, that, during the history of life, has lead to major transitions, such as the origin of eukaryotic cell. Symbiotic associations are observed in all eukaryotic groups, from protists to higher metazoans, including unicellular and pluricellular parasites of plants and animals. This review is focussed on the description a few examples of symbiotic association in insect vectors and parasites of medical and veterinary importance, and on the possible strategies to exploit the symbionts for the control of human and animal diseases.

BIBLIOGRAFIA

- AKMAN L., YAMASHITA A., WATANABE H., OSHIMA K., SHIBA T., HATTORI M., et al. (2002): *Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies*, *Wigglesworthia glossinidia*, «Nature Genetics», 32, pp. 402-407.
- BAINES S. (1956): *The role of the symbiotic bacteria in the nutrition of Rhodnius prolixus*, «Journal of Experimental Biology», 33, pp. 533-541.
- BANDI C., DUNN A.M., HURST G.D., RIGAUD T. (2001): *Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism*, «Trends in Parasitology», 17, pp. 88-94.
- BANDI C., TREES A.J., BRATTIG N.W. (2001): *Wolbachia in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases*, «Veterinary Parasitology», 12, pp. 215-238.
- BEARD C.B., MASON P.W., AKSOY S., TESH R.B., RICHARDS F.F. (1992): *Transformation of an Insect Symbiont and Expression of a Foreign Gene in the Chagas' Disease Vector Rhodnius Prolixus*, «American Journal of Tropical Medicine and Hygiene», 46, pp. 195-200.
- DALE C., TOUNG S.A., HAYDON D.T., WELBURN S.C. (2001): *The insect endosymbiont Sodalis glossinidius utilizes a type III secretion system for cell invasion*, «Proceedings of the National Academy of Science USA», 13, pp. 1883-8.
- DE VOOGHT L., CALJON G., STIJLEMANS B., DE BAETSELIER P., COOSEMANS M., VAN DEN ABEELE J. (2012): *Expression and extracellular release of a functional anti-trypanosome Nanobody® in Sodalis glossinidius, a bacterial symbiont of the tsetse fly*, «Microbial Cell Factories», 15 pp. 11-23.
- DURVASULA R.V., GUMBS A., PANACKAL A., KRUGLOV O., AKSOY S., MERRIFIELD R.B., RICHARDS F.F., BEARD C.B. (1997): *Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria*, «Proceedings of the National Academy of Science USA», 94, pp. 3274-3278.
- HOFFMANN A.A., MONTGOMERY B.L., POPOVICI J., ITURBE-ORMAETXE I., JOHNSON P.H., et al. (2011): *Successful establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission*, «Nature», 476, pp. 454-7.
- HURWITZ I., FIECK A., READ A., HILLESLAND H., KLEIN N., KANG A. et al. (2007): *Para-transgenic control of vector borne diseases*, «International Journal of Biological Sciences», 7, pp. 1334-1344.
- JORDAN A.M. (1986): *Trypanosomiasis Control and African rural Development*, Longman, London.
- MALVY D., CHAPPUIS F. (2011): *Sleeping sickness*, «Clinical Microbiology and Infections», 17, pp. 986-95.
- NOGGE G. (1976): *Sterility in tsetse flies (Glossina morsitans Westwood) caused by loss of symbionts*, «Experientia», 32, pp. 995-996.
- NOGGE G. (1981): *Significance of symbionts for the maintenance of an optimal nutritional state for successful reproduction in haematophagous arthropods*, «Parasitology», 82, pp. 101-104.
- PEROTTI M.A., KIRKNESS E.F., REED D.L., BRAIG H.R. (2009): *Endosymbionts of lice*. In: *Insect Symbiosis Volume 3*. Editors Bourtzis K. & Miller T. CRC Press, Boca Raton (FL), pp. 205-219.
- RABINOVICH J.E., KITRON U.D., OBED Y., YOSHIOKA M., GOTTDENKER N., CHAVES

- L.F. (2011): *Ecological patterns of blood-feeding by kissing-bugs* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), «Memórias do Instituto Oswaldo Cruz», 106, pp. 479-494.
- RIO R.V., SYMULA R.E., WANG J., LOHS C., WU Y.N., SNYDER A.K., et al. (2012): *Insight into the transmission biology and species-specific functional capabilities of tsetse* (Diptera: Glossinidae) *obligate symbiont* Wigglesworthia, «Mbio», 3 (1) e00240-11.
- SIRONI M., BANDI C., SACCHI L., DI SACCO B., DAMIANI G., GENCHI C. (1995): *Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont Wolbachia in a filarial worm*, «Molecular and Biochemical Parasitology», 74, pp. 223-227.
- VALLEJO G.A., GUHL F., SCHAUB G.A. (2009): Triatominae-Trypanosoma cruzi/T. rangeli: *Vector-parasite interactions*, «Acta Tropica», 110, pp. 137-147.
- WEISS B.L., MOUCHOTTE R., RIO R.V., WU Y.N., WU Z., HEDDI A, et al. (2006): *Inter-specific transfer of bacterial endosymbionts between tsetse fly species: infection establishment and effect on host fitness*, «Applied and Environmental Microbiology», 72, pp. 7013-7021.
- WHO (2011): *Chagas disease: control and elimination. Report by the Secretariat. Sixty-second World Health Assembly*: WHO [cited 2011 Nov 12], Available from: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/A62/A62_17-en.pdf.

