

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Kristina Sovová

Bakterie rodu *Asaia* a *Wolbachia* u flebotomů

Bacteria genus *Asaia* and *Wolbachia* in sandflies

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Petr Volf, Csc.

Konzultant: RNDr. Magdaléna Jančařová, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne.....

.....

Na tomto místě bych chtěla především poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Petrovi Volfovi za to, že mi dal možnost se stát členem jeho týmu, za jeho laskavost, cenné rady během experimentů a při sepisování této práce. Dále bych chtěla moc poděkovat RNDr. Magdě Jančařové, Ph.D, za její trpělivost, podporu a množství času, které mi věnovala. Moc si toho vážím.

RNDr. Kateřině Růžickové, Ph.D, děkuji za první seznámení s prostředím laboratoře. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Vítkovi Dvořákovi, Ph.D, který mi byl oporou během zpracování terénních vzorků, a v neposlední řadě také děkuji RNDr. Táně Spitzové, Ph.D, a doc. RNDr. Jovaně Sádlové, Ph.D, za pomoc se statistickým zpracováním dat. Dále také děkuji celému týmu hmyzích vektorů za spolupráci a za to, že všichni vytváříte skvělý kolektiv.

Nakonec mé největší poděkování věnuji svým rodičům, sestře, rodině, nejbližším a skvělým přátelům, kteří mi nikdy nepřestali věřit, a díky nimž jsem to dopracovala až sem. Jsem Vám všem moc vděčná, děkuji.

Abstrakt

Flebotomové jsou prokázanými přenašeči řady patogenů, včetně parazitů rodu *Leishmania*. Vývoj leishmanií probíhá ve střevě přenašeče, které je zároveň kolonizováno řadou dalších mikroorganismů tvořících společenství nazývané střevní mikrobiota. Přítomnost a složení střevní mikrobioty může mít vliv na mortalitu flebotomů, ale také na vývoj přenášeného patogena. Na rozdíl od komárů je tato problematika u flebotomů málo prozkoumána. Předložená diplomová práce se zaměřuje na bakterie rodu *Asaia* a *Wolbachia* a jejich možný vliv na vývoj leishmanií ve střevě přenašeče.

Práce přináší první informace o výskytu bakterií *Asaia* sp. a *Wolbachia* sp. u flebotomů z Balkánského poloostrova – ohniska viscerální leishmaniózy a onemocnění působených fleboviry. U 237 jedinců z podrodu *Larroussius* byly *Asaia* sp. a *Wolbachia* sp. detekovány s prevalencí 2,5 % a 8,4 %. Zároveň byly na přítomnost těchto bakterií prostudovány laboratorní kolonie flebotomů. Z dvanácti studovaných kolonií byl pouze u jedné (*Phlebotomus perniciosus*) detekován pouze rod *Wolbachia*. Následovaly pokusy o eliminaci *Wolbachia* sp. z této laboratorní kolonie, s cílem budoucího využití *Wolbachia*-negativních flebotomů při experimentálních infekcích s leishmaniemi.

Závěrečná část diplomové práce byla věnována bakteriím rodu *Asaia*, konkrétně druhu *A. krungthepensis*, jejich experimentální infekci flebotomů *Phlebotomus duboscqi* a superinfekci s *Leishmania major*. Bakterie rodu *Asaia* kolonizovaly střevo flebotomů a ovlivnily lokalizaci leishmanií ve střevě. Toto zjištění může být důležité pro přenos a epidemiologii leishmanióz.

Klíčová slova: *Lutzomyia*, *Phlebotomus*, *Asaia*, *Wolbachia*, *Leishmania*

Abstract

Phlebotomine sand flies are proven vectors of many pathogens including parasites of genus *Leishmania*. *Leishmania* develop in sand fly midgut which is colonized also by many others microorganisms, creating rich community known as gut microbiota. The presence and composition of gut microbiota affect sand fly mortality, but also development of transmitted pathogens. In contrast to mosquitoes, sand fly gut microbiota is not well studied. This thesis focuses on bacteria of the genera *Asaia* and *Wolbachia* and their potential impact on *Leishmania* in sand fly midgut.

Thesis reports the first finding of *Asaia* sp. and *Wolbachia* sp. in sand flies from Balkan peninsula – hotspot for visceral leishmaniasis and phleboviruses. In 273 individuals from subgenera *Larroussius* were *Asaia* sp. and *Wolbachia* sp. detected with infection prevalence 2,5 % and 8,4 %, respectively. In addition, laboratory-reared sand flies were tested for presence of these bacteria: from twelve studied colonies, only *Phlebotomus perniciosus* was infected by *Wolbachia* sp. Then, we focussed on elimination of *Wolbachia* sp. from this laboratory colony with the aim to use *Wolbachia*-negative sand flies in future experiments with *Leishmania*.

The final part of the thesis was dedicated to bacteria of the genus *Asaia* (specifically *A. krungthepensis*), their experimental infection of *Phlebotomus duboscqi* and superinfection with *Leishmania major*. *Asaia* were capable to colonize sand fly midgut and affect *Leishmania* localization during superinfection. This finding might be important for *Leishmania* transmission and epidemiology of leishmaniases.

Key words: *Lutzomyia*, *Phlebotomus*, *Asaia*, *Wolbachia*, *Leishmania*

Obsah

1	Úvod a cíle práce	1
2	Literární přehled	3
2.1	Flebotomové jako přenašeči lidských onemocnění na Balkánském poloostrově	3
2.2	Střevní mikrobiota flebotomů	8
2.3	Střevní mikrobiota flebotomů a její interakce s <i>Leishmania</i> sp.	10
2.4	Bakterie rodu <i>Asaia</i>	13
2.5	Bakterie rodu <i>Wolbachia</i>	15
3	Materiál a metodika	19
3.1	Složení použitých roztoků a příprava materiálu	19
3.2	Detekce bakterií <i>Asaia/Wolbachia</i> sp. u flebotomů z Balkánského poloostrova	20
3.2.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR) a elektroforéza	22
3.2.2	Příprava vzorků na sekvenční analýzu	23
3.3	Detekce bakterií <i>Wolbachia</i> sp. u laboratorně chovaných samic flebotomů	23
3.3.1	Frekvence výskytu bakterií rodu <i>Wolbachia</i> u <i>Phlebotomus perniciosus</i>	24
3.3.2	Tkáňová specifita bakterií rodu <i>Wolbachia</i> u <i>P. perniciosus</i>	24
3.4	Experimentální eliminace bakterií rodu <i>Wolbachia</i> z populace <i>P. perniciosus</i>	25
3.4.1	F0 generace flebotomů: podávání antibiotik v roztoku cukru	25
3.4.2	F1 generace flebotomů: podávání antibiotik v roztoku cukru	27
3.4.3	F0 generace flebotomů: podávání antibiotik do krve	28
3.4.4	F0 generace flebotomů: podávání antibiotik v cukru a krvi	29
3.5	Detekce bakterií <i>Asaia</i> sp. u laboratorně chovaných samic flebotomů	30
3.6	Experimentální infekce flebotomů bakterií <i>Asaia krungthepensis</i>	30
3.6.1	Stanovení infekční dávky bakterií	31
3.6.2	Příprava infekčního roztoku cukru s bakteriemi	32
3.6.3	Experimentální infekce a přežívání <i>A. krungthepensis</i> ve flebotomech	33
3.6.4	Detekce bakterií ve střevě samic <i>P. duboscqi</i> pomocí PCR a plotnové metody	34
3.7	Flebotomové s bakterií <i>A. krungthepensis</i> a jejich experimentální superinfekce s <i>Leishmania major</i>	36
3.7.1	Kultivace leishmanií	36
3.7.2	Infekční sání	36
3.7.3	Pitvy střev samic	37
3.7.4	Měření morfologickým forem leishmanií	37
3.8	Společná kultivace bakterií a leishmanií <i>in vitro</i>	38
3.9	Statistické vyhodnocení	38

4	Výsledky	39
4.1	Prevalence výskytu bakterií <i>Asaia/Wolbachia</i> sp. u flebotomů z Balkánského poloostrova	39
4.2	Detekce bakterií <i>Wolbachia</i> sp. u laboratorně chovaných samic flebotomů	40
4.2.1	Prevalence a tkáňová specifita bakterií rodu <i>Wolbachia</i> u <i>P. perniciosus</i>	41
4.3	Experimentální eliminace bakterií rodu <i>Wolbachia</i> z populace <i>P. perniciosus</i>	42
4.3.1	Podávání antibiotik v roztoku cukru	42
4.3.2	Podávání antibiotik v krvi	44
4.3.3	Kombinace podávání antibiotik v cukru a krvi	45
4.4	Detekce bakterií <i>Asaia</i> sp. u laboratorně chovaných samic flebotomů	46
4.5	Experimentální infekce flebotomů bakterií <i>A. krungthepensis</i> u samic <i>P. duboscqi</i>	46
4.5.1	Stanovení infekční dávky bakterií	46
4.5.2	Experimentální infekce a přežívání <i>A. krungthepensis</i> ve flebotomech	48
4.6	Vliv infekce bakterií <i>A. krungthepensis</i> na vývoj <i>L. major</i> u samic <i>P. duboscqi</i>	48
4.6.1	Morfologické formy leishmanií	50
4.7	Vliv bakterií na růst leishmanií <i>in vitro</i>	51
5	Diskuze	53
6	Závěr	61
7	Seznam použité literatury	62

1 Úvod a cíle práce

Onemocnění přenášená hmyzími vektory jsou zodpovědná za více než 17% infekčních chorob na světě, a ročně zapříčiní přibližně 700 000 lidských úmrtí (WHO, 2020a). Mezi významné přenašeče patří i flebotomové, kteří jsou vektory leishmanióz, ale i virových či bakteriálních onemocnění. Medicínsky významnými rody flebotomů jsou *Lutzomyia*, vyskytující se v Novém světě, a *Phlebotomus*, který je rozšířen ve Starém světě (shrnutí v Maroli et al., 2013).

Za místa výskytu flebotomů v Evropě byly dlouhou dobu považovány pouze jižní státy, ale díky řadě faktorů, jako jsou například klimatické změny, dochází postupně k posouvání hranic výskytu flebotomů na sever a začínají se objevovat i v zemích, jako je Německo, Rakousko, Švýcarsko, Maďarsko či Slovensko. Spolu s rozšiřováním flebotomů dochází také k rozšiřování onemocnění, které přenášejí (shrnutí v Moriconi et al., 2017).

Jednou z tradičních oblastí výskytu nemocí přenášených flebotomy v Evropě je Balkánský poloostrov (shrnutí v Maroli et al., 2013; a v Ayhan & Charrel, 2018); v mnoha jeho zemích je doložen výskyt viscerální leishmaniózy, avšak v některých oblastech Řecka a jeho přilehlých ostrovů se můžeme setkat i s její kutánní formou. Dalšími významnými patogeny, kolujícími v této oblasti, jsou viry patřící především do rodu *Phlebovirus* a čeledi *Phenuiviridae* (Ayhan & Charrel, 2018). Po mnoho let však byly některé balkánské státy sužovány válečnými konflikty, což mělo dopad na celkový vývoj této oblasti, ať už ve sférách politických, ekonomických, či společenských. Kombinace těchto okolností, spolu s finančně a logisticky náročnou prací v terénu, byla důvodem, proč nebyla dlouhou dobu provedena žádná rozsáhlejší entomologická studie mapující oblast Balkánského poloostrova. V roce 2014 však vznikl mezinárodní projekt VectorNet, který se zaměřil na výzkum v této oblasti a umožnil také získat vzorky, které jsou v této práci zpracovány.

Kontrola flebotomů je ve srovnání s komáry mnohem složitější díky jejich biologii; larvy se vyvíjejí terestricky a často v neznámých místech. Proto se někteří vědci zaměřili na studium alternativních nebo biologických metod kontroly flebotomů, včetně identifikace bakterií a dalších složek střevní mikrobioty přenašečů (Schlein et al., 1985). Identifikace jednotlivých složek střevní mikrobioty a jejich detailní pochopení komplexních interakcí s přenašeči může vést k vyvinutí nových metod jak redukovat výskyt samotných vektorů a/nebo chorob, jež přenášejí.

Jednou z možných kontrolních strategií je tzv. paratransgeneze, kdy pomocí genetické manipulace symbiotických bakterií a jejich zpětného podání hmyzímu hostiteli dochází k negativnímu ovlivnění přenášeného patogena (Wilke & Marrelli, 2015). Tato metoda byla již použita u komárů, u kterých je obecně téma střevní mikrobioty a její interakce s vektorem a patogenem prozkoumáno podrobněji, než je tomu u flebotomů (Bongio & Lampe, 2015; Wilke & Marrelli, 2015; Shane et al., 2018). Mezi hlavní kandidáty k využití v boji s patogeny přenášenými komáry patří bakterie rodu *Asaia* a *Wolbachia*. Schopnost těchto bakterií ovlivnit přenos patogena u komárů, a také nulové znalosti o jejich interakci s leishmaniemi, byly důvodem pro podrobnější zkoumání těchto dvou rodů bakterií v předložené diplomové práci.

Cílem této diplomové práce proto bylo:

- Zjistit prevalenci bakterií rodu *Asaia* a *Wolbachia* u flebotomů z vybraných zemí Balkánského poloostrova.
- Detekovat bakterie *Asaia* sp. a *Wolbachia* sp. u laboratorních kolonií flebotomů.
- Eliminovat bakterie rodu *Wolbachia* u laboratorní populace *Phlebotomus perniciosus*, s cílem studovat vliv wolbachii na vývoj leishmanií v přenašeči.
- Zjistit zda superinfekce bakteriemi *Asaia* sp. má nějaký vliv na vývoj *Leishmania major* v přenašeči *Phlebotomus duboscqi*

2 Literární přehled

2.1 Flebotomové jako přenašeči lidských onemocnění na Balkánském poloostrově

Flebotomové jsou drobný dvoukřídlý krevsající hmyz z podřádu Nematocera, čeledi Psychodidae, podčeledi Phlebotominae, a vyskytují se v různých habitatech, od tropického deštného lesa až po aridní oblasti. Obě pohlaví flebotomů se živí cukernými šťávami, a samice navíc sají krev na různých obratlovcích včetně člověka, což jim poskytuje dostatečné množství proteinů pro vytvoření vajíček. Samice kladou svá vajíčka do substrátu bohatého na organické látky, který slouží vyhlídnutým larvám jako potrava (shrnutí v Killick-Kendrick, 1999; a v Maroli et al., 2013).

Balkánský poloostrov je regionem ležícím na hranici jihovýchodní Evropy. Jak už bylo řečeno v úvodu, toto území se v minulosti stalo dějištěm mnoha válek a sporů, což ovlivnilo jeho politické, ale i společenské uspořádání. Vzhledem ke komplikovanému politicko-geografickému vymezení této oblasti, je Balkánský poloostrov v předložené diplomové práci vymezen jako území, jehož severní hranice vedou řekami Dunaj, Sáva a Soča, ale jsou sem zahrnuty i celé státy, které se alespoň částečně nachází pod touto hranicí. Jižní hranice vedou až na území pevninského Řecka a evropskou část Turecka (Fňukal, 2008; Rosenberg, 2020). Evropská část Turecka (oblast Thrákie) zabírá pouze malou část celkové rozlohy, a proto nebude v této práci dále zmiňována. Je sem tedy zahrnuto 11 balkánských států, a to; Albánie, Bosna a Hercegovina, Bulharsko, Černá Hora, Chorvatsko, Kosovo, Rumunsko, Řecko, Severní Makedonie, Slovinsko a Srbsko (Obr. 1).



Obr. 1: Státy Balkánského poloostrova (mapa upravena a převzata z www.d-maps.com).

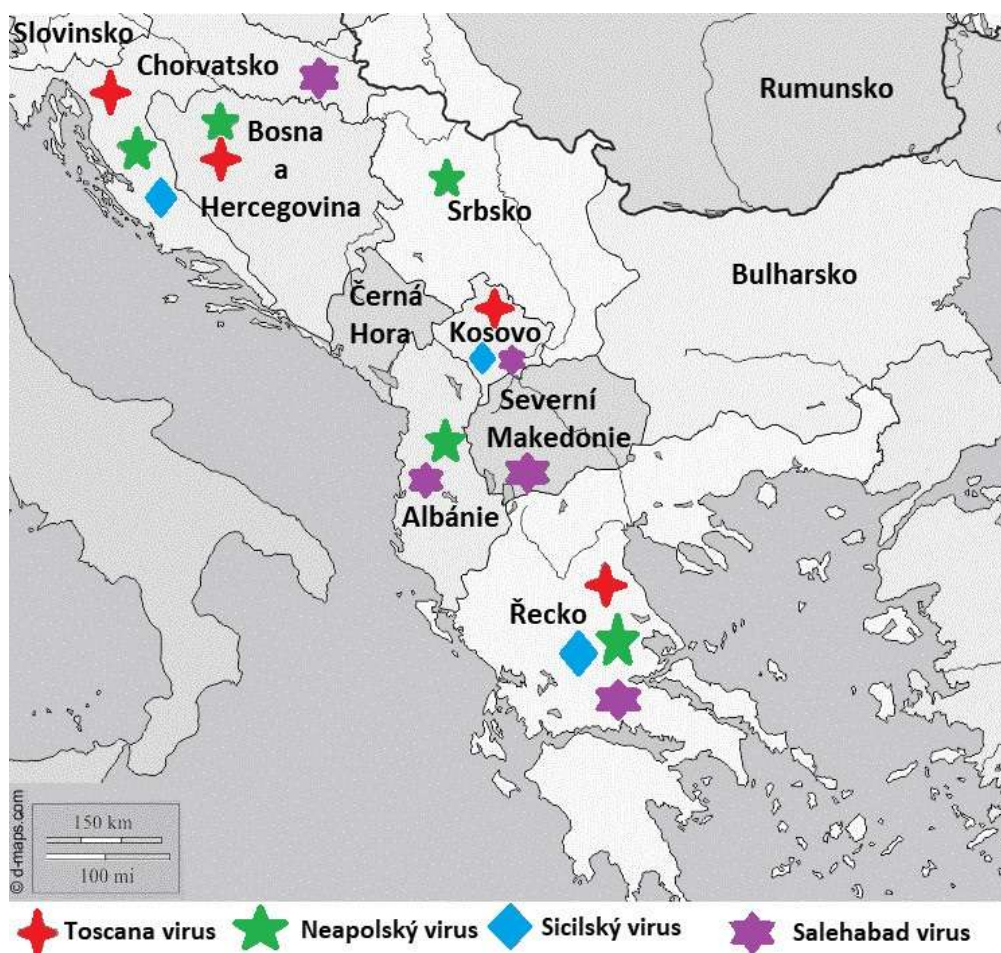
Území Balkánského poloostrova je významnou endemickou oblastí pro výskyt viscerální leishmaniózy a lidských virových onemocnění, které jsou přenášeny flebotomy (shrnutí v Depaquit et al., 2010; a v Alvar et al., 2012). Tato oblast je důležitá nejen z epidemiologického, ale také z biogeografického hlediska, jelikož se zde střetávají areály výskytu západo/východo mediteránních druhů flebotomů. Zároveň odsud může, díky lidské činnosti a změnám klimatu, docházet k rozšíření flebotomů do nových oblastí výskytu v Evropě (shrnutí v Maroli et al., 2013; Medlock et al., 2014).

Viscerální leishmanióza (kala-azar) je závažné onemocnění, které se na světě vyskytuje ve více než 80 zemích, a každý rok se objevuje 50 000 – 90 000 nových případů (WHO, 2020b). Primárními původci tohoto onemocnění jsou dva druhy leishmanií, *Leishmania infantum* a *L. donovani*, avšak existují i další druhy, které jsou schopné visceralizovat. Na Balkáně se setkáváme pouze s *L. infantum*, kde nemoc koluje jako zoonóza mezi rezervoárovými hostiteli (psy) a lidmi. Zároveň v některých balkánských státech byly leishmanie detekovány také u lišek, vlků, šakalů či zajíců, avšak role těchto hostitelů v možném přenosu na lidi nebyla doposud objasněna (Beck et al., 2008; Palatnik-de-Sousa & Day, 2011; shrnutí v Maroli et al., 2013; Čirović et al., 2014; Karayiannis et al., 2015). Onemocnění postihuje nejčastěji děti ve věku 1 - 4 let, ale můžeme se s ním setkat i u dospělých osob, zvláště pak u imunosuprimovaných jedinců, u kterých má nemoc těžší průběh. Může se projevit celou řadou symptomů, jako je například horečka, úbytek váhy, celková slabost a anorexie. V pozdějších fázích infekce však může docházet, v důsledku nahromadění mononukleárních fagocytů v napadených orgánech a sekundární hyperplázií buněk endoretikulárního systému, ke splenomegalii či hepatomegalii (shrnutí v Pace, 2014). V Řecku se dále můžeme ojedinele setkat i s kutánní leishmaniózou, jejímž původcem je *L. tropica* (shrnutí v Maroli et al., 2013).

Případy lidské viscerální leishmaniózy byly v historii evidovány ve všech státech, ležících na území Balkánského poloostrova. Na většině území byly první případy zaznamenány v první polovině 20. století. Ve druhé polovině 20. století bylo rozšíření leishmanióz ovlivněno celostátními programy, zabývajících se eradikací malárie, kdy byly hojně využívány DDT postřiky, díky čemuž v zemích jako je například Srbsko, Rumunsko, Slovinsko či Bulharsko došlo buď k úplné eradikaci onemocnění, či k rapidnímu snížení počtu případů. I přes to, že v některých státech byla po řadu let leishmanióza považována za eradikované onemocnění, v rámci nedávných epidemiologických nebo diagnostických studií byl potvrzen její návrat (Petrela et al., 2016; Bosilkovski et al., 2019; Cazan et al., 2019; shrnutí v Mihalca et al., 2019).

Flebotomové se na Balkánském poloostrově podílejí i na přenosu arbovirů. Původci těchto virových onemocnění jsou viry patřící do rodu *Phlebovirus* z čeledi *Phenuiviridae* a řádu Bunyavirales (Obr. 2). Komplex druhů označovaný jako Sandfly fever Naples virus zahrnuje, mimo jiné, Neapolský virus (SFNV), Toscana virus (TOSV) a Balkánský virus (BALKV). Dalším příkladem je Sicilský virus (Sandfly fever Sicilian virus, SFSV), jehož postavení v rámci této čeledi není momentálně ustáleno. SFNV a SFSV jsou původci onemocnění, které bylo dříve souhrnně označováno jako horečka papatači (Pappataci fever) či třídní horečka. Na základě klinických příznaků jsou od sebe tyto dva druhy virů neodlišitelné, jelikož oba způsobují horečnaté onemocnění, spolu s dalšími příznaky jako je bolest hlavy a svalů, nevolnost, fotofobie a retroorbitální bolest hlavy. Nejnebezpečnějším virem přenášeným

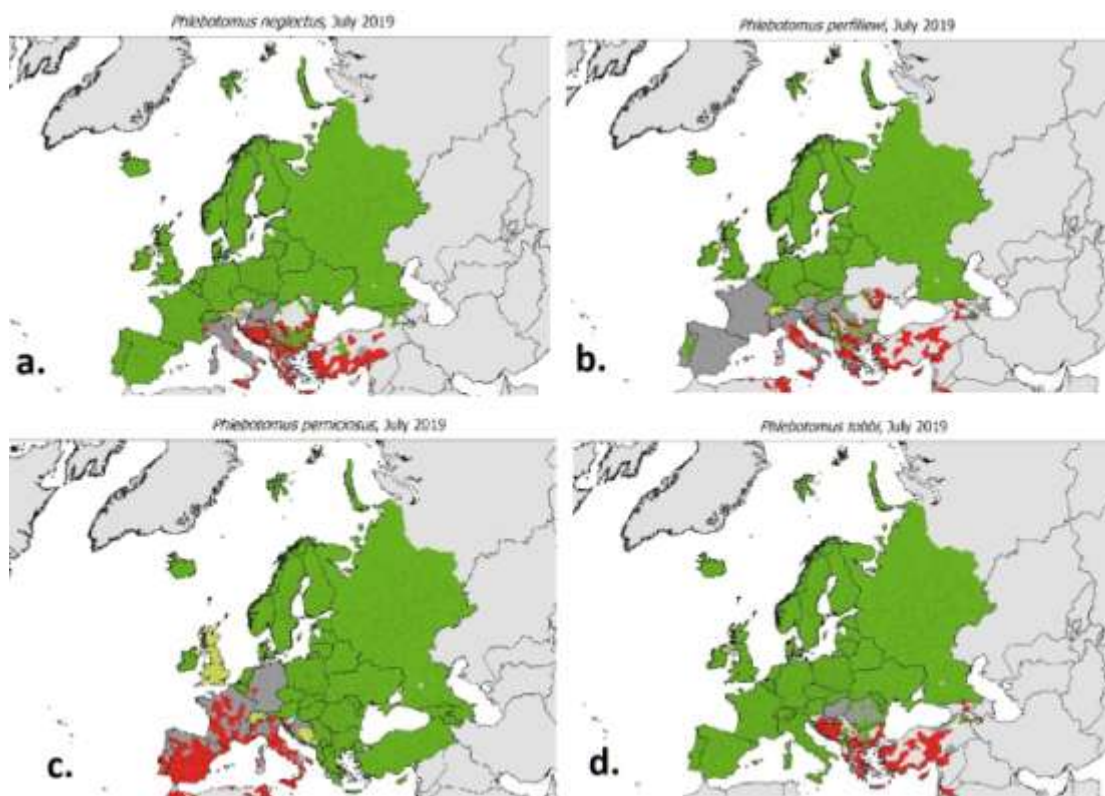
flebotomy v této oblasti je TOSV, jehož infekce u lidí probíhá buď asymptomaticky či jako lehké horečnaté onemocnění, a dalšími příznaky mohou být bolesti hlavy a kloubů, nevolnost či zvracení. U některých lidí však může dojít k zasažení centrální nervové soustavy, díky kterému může u pacientů způsobovat meningitidu či encefalitidu (Charrel et al., 2005; shrnuto v Charrel, 2012; a v Ayhan et al., 2020). Způsob, jakým virus TOSV koluje v přírodě, není momentálně zcela objasněn. V laboratorních podmínkách byl sice potvrzen transovariální či sexuální přenos u flebotomů, nicméně tyto cesty nejsou dostatečně účinné pro udržení koloběhu v přírodě (Tesh & Modi, 1987; Tesh et al., 1992; Maroli et al., 1993). Přestože byl virus izolován z lidí, i z různých zvířat, nelze některého z obratlovců označit za rezervoárového hostitele, a některými autory jsou za rezervoárové hostitele považováni právě flebotomové, nicméně ani pro toto tvrzení neexistují důkazy (Charrel et al., 2005; Charrel, 2012; shrnuto v Moriconi et al., 2017; a v Ayhan et al., 2020). Dále se na Balkánském poloostrově můžeme setkat s dalšími viry rodu *Phlebovirus*, které řadíme do komplexu druhů Salehabad (shrnuto v Ayhan & Charrel, 2018).



Obr. 2: Rozšíření viru rodu *Phlebovirus* na Balkánském poloostrově (dle Ayhan & Charrel, 2018), (podkladová mapa převzata a upravena z www.d-maps.com).

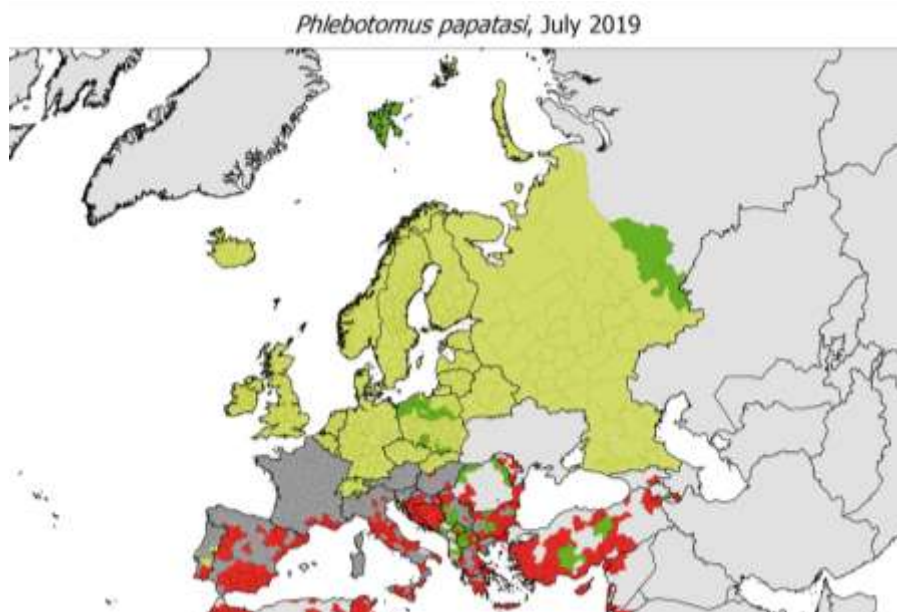
Na Balkánském poloostrově se vyskytují zástupci pěti podrodů, které patří do rodu *Phlebotomus*: *Adlerius*, *Larroussius*, *Paraphlebotomus*, *Phlebotomus*, a *Transphlebotomus*. Výskyt flebotomů je v balkánských státech sezónní, a jedinci se zde vyskytují především od května do přelomu září/října, přičemž největší aktivitu vykazují v červenci a srpnu (Alten et al., 2016).

Podrod *Adlerius* je na Balkánském poloostrově reprezentován druhy *P. balcanicus*, *P. longiductus* a *P. simici*, kteří jsou předpokládanými nebo prokázanými vektory viscerální leishmaniózy (shrnutí v Maroli et al., 2013; a v Mihalca et al., 2019). Hojně je zde zastoupen podrod *Larroussius*. V Balkánských státech se vyskytují nejméně 4 druhy a to; *P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. perniciosus* a *P. tobbi* (Obr. 3), přičemž všichni tito zástupci jsou potvrzenými přenašeči *L. infantum*. *P. perfiliewi* a *P. perniciosus* jsou zároveň potvrzenými přenašeči TOSV (shrnutí v Maroli et al., 2013; a v Ayhan et al., 2020).



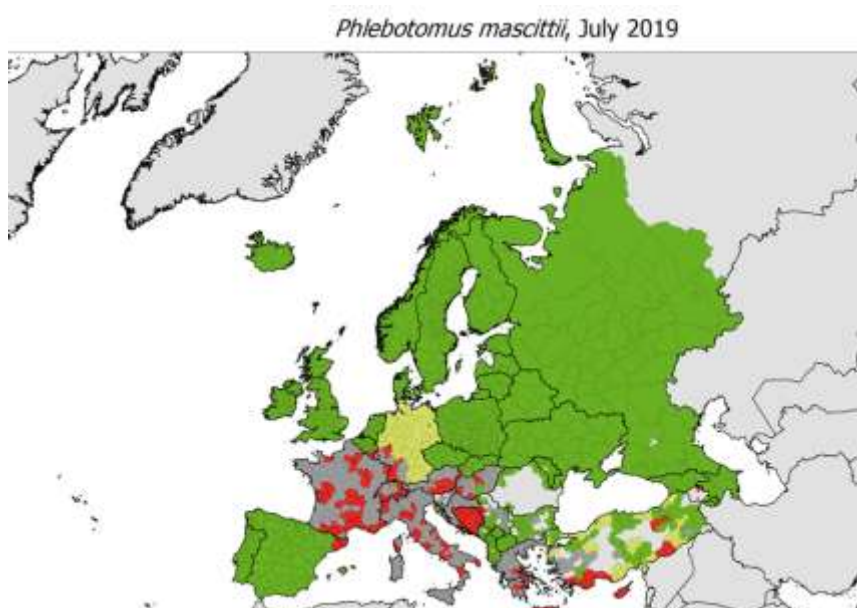
Obr. 3: Rozšíření jednotlivých druhů z podrodu *Larroussius* (vyznačeno červeně) dle projektu VectorNet – a. *P. neglectus*, b. *P. perfiliewi*, c. *P. Perniciosus*, d. *P. tobbi* (stav k lednu 2019, převzato a upraveno z <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data>).

Podrod *Phlebotomus* je na Balkánském poloostrově, ale i v celé Evropě reprezentován pouze jedním druhem a tím je *P. papatasi* (Obr. 4). Tento druh je specifickým přenašečem *L. major*, jež je původcem kutánní formy leishmaniózy, nicméně díky absenci rezervoárových zvířat v Evropě, kterými jsou hlavně hlodavci z podčeledi *Gerbillinae*, zde k přenosu této choroby nedochází (Akhoundi et al., 2013). *P. papatasi* je v balkánských státech důležitý především jako přenašeč SFSV či SFNV (Alkan et al., 2013).



Obr. 4: Rozšíření druhu *P. papatasi* (vyznačeno červeně) dle projektu VectorNet (stav k červnu 2019, převzato a upraveno z <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data>).

Z rodu *Paraphlebotomus* jsou v Evropě popisováni zástupci z druhů *P. sergenti*, *P. similis* a *P. alexandri*, kteří jsou prokázanými nebo předpokládanými přenašeči *L. tropica*, (shrnutí v Antoniou et al., 2013; a v Maroli et al., 2013). Z podrodu *Transphlebotomus* se v Balkánských státech vyskytuje *P. mascitti*, jež je podezřelý z přenosu *L. infantum*. Tento druh je zároveň nejseverněji rozšířeným druhem flebotoma, který byl odchycen i na jihu Slovenska (Obr. 5) (Melaun et al., 2014; Dvořák et al., 2016; Vaselek et al., 2017).



Obr. 5: Rozšíření druhu *P. mascitti* (vyznačeno červeně) dle projektu VectorNet (stav k červnu 2019, převzato a upraveno z <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data>).

2.2 Střevní mikrobiota flebotomů

Termín mikrobiota označuje souhrn všech skupin mikroorganismů v definovaném prostředí. Někdy se také používá pojem mikrobiom, který označuje souhrn všech mikroorganismů a jejich genomů. Dále se můžeme také setkat s pojmem holobiont, jež označuje hostitelský organismus, jeho symbiotické mikroorganismy, a interakce mezi nimi. Tento koncept byl původně použit při studiu korálových ekosystémů, nyní se s ním však můžeme setkat i ve spojení s dalšími organismy, jako je třeba hmyz. Použití těchto termínů není v literatuře momentálně ustáleno, a pojmy jsou mezi sebou často zaměňovány. Pro větší přehlednost v textu je v rámci této diplomové práce použit pouze termín mikrobiota, ve smyslu konkrétních skupin bakterií, hub apod. (Rosenberg et al., 2007; Turnbaugh et al., 2007; Marchesi & Ravel, 2015; Liu, 2016; Guégan et al., 2018).

Tělo hmyzu je kolonizováno různými mikroorganismy, které mohou obsadit nejen střevo, ale i jejich kutikulu, buňky, hemocoel, reprodukční orgány či slinné žlázy. Ne všechny mikroorganismy, se kterými se hmyz setkává, se však stávají součástí jeho mikrobioty, jelikož kromě mechanických bariér, jako je např. kutikula, či kutikulární výstelky trávicího traktu, se mikroorganismy setkávají i s trávicími enzymy či s imunitní odpovědí hmyzu, což jsou faktory, které jim kolonizaci tkání značně znesnadňují. Některé bakterie z prostředí mohou také pouze pasivně procházet střevem spolu s potravou (shrnutí v Dillon & Dillon, 2004; a v Lemaitre & Hoffmann, 2007; Cardoza et al., 2012; shrnutí v Douglas, 2015).

Střevní mikrobiota flebotomů vytváří bohaté společenství, ve kterém dominují především bakterie, ale dále se tu mohou vyskytovat houby, další eukaryota a viry (shrnutí v Telleria et al., 2018). Díky svému vývoji a způsobu života získávají flebotomové svou mikrobiotu jak z prostředí a potravy, tak některé druhy bakterií mohou být přenášeny transstadiálně, transsexuálně či z matky na potomstvo (Volf et al., 2002; Damiani et al., 2008; Guernaoui et al., 2011; Hurwitz et al., 2011; Vivero et al., 2016). Druhovká diverzita a množství střevní mikrobioty se ve střevě flebotomů během života mění (Gouveia et al., 2008; Hillesland et al., 2008; Mukhopadhyay et al., 2012; Vivero et al., 2016; Fraihi et al., 2017; Vivero et al., 2019), například po sání krve dochází u samic ke snížení diverzity střevní mikrobioty, ale zvyšuje se počet bakterií. Pravděpodobným vysvětlením je, že po nasátí krve signifikantně vzrůstají počty bakterií z čeledi Enterobacteriaceae, které mají geneticky danou schopnost vyrovnat se s oxidativním a nitrosativním stresem (Wang et al., 2011). Po defekaci krve se složení a zastoupení jednotlivých skupin mikroorganismů vrací do původního stavu před sáním krve (Volf et al., 2002; Akhoundi et al., 2012; Monteiro et al., 2016; Kelly et al., 2017; Pires et al., 2017).

Identifikace a složení přirozené střevní mikrobioty může být vodítkem pro pochopení interakcí mezi flebotomy a přenášenými patogeny. Ojedinelé studie zabývající se identifikací mikrobioty u flebotomů (*P. papatasi* a *P. tobbi*) se objevují koncem minulého století (Schlein et al., 1985; Dillon et al., 1996), nicméně teprve s rozvojem a dostupností nových metod v poslední době byla identifikace střevní mikrobioty provedena jak u volně žijících, tak u laboratorně chovaných druhů flebotomů (shrnutí v Telleria et al., 2018). S cílem zanalyzovat bohaté zastoupení mikroorganismů sídlících ve střevě flebotomů byla provedena rozšířená metaanalýza střevní mikrobioty dospělců řady druhů flebotomů, pokrývajících jak Nový, tak i

Starý svět. Zastoupení jednotlivých kmenů bakterií nebylo mezi jednotlivými druhy či rody flebotomů signifikantně rozdílné a dominují především bakterie z kmene Firmicutes (např. *Bacillus* sp., *Clostridium* sp.), Proteobacteria (např. *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. a *Acinetobacter* sp.) a v menším zastoupení také bakterie z kmene Bacteroides. Nicméně, druhové zastoupení bakterií se u jednotlivých druhů flebotomů velmi liší, a pouze pár z nich bylo nalezeno u dvou a více druhů flebotomů, což poukazuje na velkou variabilitu ve složení střevní mikrobioty. Kromě bakterií byly u flebotomů také identifikovány některé houbové organismy či kvasinky jako například rody *Mortierella*, *Penicilium*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Candida* či *Saccharomyces* (Schlein et al., 1985; McCarthy et al., 2011; Akhoundi et al., 2012; Fraihi et al., 2017; Karimian et al., 2019; Vivero et al., 2019).

Blízké soužití střevních mikroorganismů s flebotomem je, mimo jiné, udržováno v rovnováze pomocí imunitního systému, protože jinak by došlo k nekontrolovatelnému růstu bakterií a sepsi organismu. Imunitní odpověď ve střevě, která se podílí na udržení střevní homeostázy, se od systémové imunitní odpovědi poněkud liší, a je založena především na produkci antimikrobiálních peptidů (AMPs) a syntéze reaktivních forem kyslíku (ROS). V epitelu střeva jsou intracelulárně či extracelulárně uložené receptory (PGRP – peptidoglycan recognition protein), které rozpoznávají hlavní složku bakteriální buněčné stěny, kterou je peptidoglykan (PGN). Po rozpoznání a navázání tohoto proteinu receptorem, dojde k aktivaci Imd dráhy (immune deficiency pathway), která dává signály ke spuštění exprese AMPs. Poté co je střevo vystaveno bakteriím, dochází také ke spuštění syntézy ROS pomocí membránových proteinů DUOX (dual oxidases), které způsobují oxidativní stres (shrnutí v Engel & Moran, 2013; a v Saraiva et al., 2016).

Mikrobiota ovlivňuje řadu aspektů života flebotomů. Zdá se, že přítomnost mikroorganismů v substrátu je pro samice důležitá při výběru místa pro vykladení snůšky vajec, což bylo v laboratorních podmínkách prokázáno u druhu *L. longipalpis*. V této studii bylo 85,5 % vajec vykladeno na substrát s aktivní bakteriální kulturou a pouze 14,5 % vajec vykladeno do sterilního (klávaného) substrátu (Peterkova-Koci et al., 2012). Přítomnost mikroorganismů v prostředí hraje také důležitou roli během larválního vývoje. U larev *L. longipalpis*, které žily ve sterilním substrátu, se prodloužila délka vývoje, a larvy *P. argentipes* nebyly schopné dokončit svůj vývoj (Hurwitz et al., 2011; Peterkova-Koci et al., 2012). Podobný jev byl pozorován i u komárů, kde axenické larvy nejsou životaschopné a umírají již v prvním larválním instaru, ale přidáním jediného druhu bakterií do jejich potravy dojde ke kolonizaci střeva a dokončení vývoje (Coon et al., 2014). Podle autorů je to dáno nejspíše tím, že bakterie mohou snižovat množství kyslíku ve střevě, čímž vzniká hypoxie, která je důležitým signálem pro růst a vývoj larev (Coon et al., 2016, Coon et al., 2017).

Kromě toho, že bakterie a houby mohou být pro svého hostitele zdrojem živin, tak střevní mikrobiota může ovlivňovat výživu hmyzu i v dalších aspektech. Symbiotické bakterie mohou také syntetizovat látky, jež si hmyz neumí vytvářet sám, jako je například vitamín B u různých krevsajících skupin, esenciální aminokyseliny u mšic či syntéza sterolů u některých brouků. Některé bakterie produkují látky, které se podílejí na zpracování přijaté potravy, takovým příkladem je štěpení a degradace rostlinného materiálu (celulóza) u termitů (Douglas, 1989;

Douglas et al., 2001; shrnuto v Calderón-Cortés et al., 2012; a v Minard et al., 2013a; shrnuto v Douglas, 2015; a v Guégan et al., 2018).

Nicméně, střevní mikrobiota je dalším důležitým faktorem vstupujícím i do interakcí mezi patogenem a vektorem, který jej přenáší. Přítomnost mikrobioty a jejich kolonizace střeva může ovlivňovat vývoj a uchycení patogenů. Jednak přítomnost střevní mikrobioty může stimulovat imunitní systém přenašeče, což může mít i vliv na přenášené patogeny (Xi et al., 2008). Dále může mezi přirozenou mikrobiotou a patogenem docházet ke kompetici o živiny, či o prostor ve kterém žijí, ale také některé bakterie mohou produkovat metabolity, jež patogenům škodí přímo (Stecher & Hardt, 2011; Sant'Anna et al., 2014; Vivero et al., 2019). Na druhou stranu, absence mikrobioty u flebotomů snižuje v pozdějších fázích infekce počty metacyklických stádií, a tudíž se snižuje schopnost vektora přenést onemocnění (Kelly et al., 2017; Louradour et al., 2017). U komárů byl však popsán i fakt, že přítomnost střevní mikrobioty zvyšuje náchylnost vektora k virům (Angleró-Rodríguez et al., 2017; Wu et al., 2019). Tyto různorodé poznatky jen potvrzují komplexitu interakcí mezi vektorem a přenášeným patogenem a ukazují, že je nezbytné se těmito vztahy nadále zabývat.

2.3 Střevní mikrobiota flebotomů a její interakce s *Leishmania* sp.

Flebotomové jsou, mimo některých bakterií a arbovirů, také přenašeči parazitických digenetických trypanosomatid rodu *Leishmania*. Rod *Leishmania* je rozdělen do tří podrodů; *Sauroleishmania*, *Viannia* a *Leishmania*, jež mají rozdílný způsob vývoje. Podrod *Sauroleishmania* se vyvíjí převážně v zadní části střeva (proktodeum) a tento způsob vývoje je označován jako hypopylární. Leishmanie patřící do podrodu *Viannia* mají vývoj peripylární a vyvíjí se jak ve střední části střeva (mesenteron), tak v proktodeu. Podrod *Leishmania* se vyvíjí suprapylárně, což znamená, že celý vývoj probíhá v mesenteronu (shrnuto v Akhoundi et al., 2016).

Flebotom nasaje s krví infikovaného hostitele makrofágy, které obsahují amastigotní stádia leishmanií. Okolo nasáté krve se ve střevě vytvoří peritrofická matrix a v endoperitrofickém prostoru se amastigoti mění na rychle se množící procyklické promastigoty. Při rozpadu peritrofické matrix se z těchto forem stávají dlouhé nektomonády, které z peritrofické matrix unikají a jsou schopné se přichytit na epiteliální buňky mesenteronu. Poté se přemění na krátké leptomonády, a znovu dochází k jejich množení. V pozdní fázi infekce leptomonády migrují do oblasti thorakálního mesenteronu a následně dochází ke kolonizaci stomodeální valvy, kde se vyskytují dvě stádia: metacyklické promastigoti (infekční pro obratlovčího hostitele) a přisedlá stádia zvaná haptomonády (shrnuto v Dostálová & Volf, 2012).

Leishmanie se během vývoje v přenašeči potýkají s různými překážkami, jako jsou peritrofická matrix, trávicí enzymy, defekace krve, imunitní systém flebotomů, a v neposlední řadě také střevní mikrobiota (Boulanger et al., 2004; Volf et al., 2004; Rogers et al., 2008; Secundino et al., 2010; Diaz-Albiter et al., 2012; Telleria et al., 2013; Kelly et al., 2017; Louradour et al., 2017; Sádlová et al., 2018).

Interakce mezi střevní mikrobiotou a patogenem mohou ovlivnit kompetenci vektora a nejínak je tomu i v případě kombinace flebotom – leishmanie, byť informace nejsou zdaleka úplné (Xi et al., 2008; Ramirez et al., 2012, 2014; Carissimo et al., 2015; Kelly et al., 2017; Louradour et al., 2017). Bakterie mohou produkovat ve střevě hmyzu látky, jež mohou mít antimikrobiální, enzymatickou či leishmanicidní aktivitu (shrnutí ve Weiss & Aksoy, 2011; Vivero et al., 2016; Vivero et al., 2019a).

Některé studie prokázaly, že střevní mikrobiota flebotomů je pro vývoj a přenos leishmanií zcela nezbytná (Kelly et al., 2017; Louradour et al., 2017). Samičím *L. longipalpis*, které byly infikovány *L. infantum*, byla pátý den po infekci podávána pravidelně antibiotika, jež výrazně zredukovala populaci bakterií ve střevě. Již po dalších 24 hodinách byl ve střevech samic zaznamenán nižší počet promastigotů v porovnání s kontrolní skupinou bez antibiotik. Nejenže byla u samic ovlivněna intenzita infekce, ale navíc se prokázalo i významně nižší zastoupení infekčních metacyklických stádií v pozdější fázi infekce (Kelly et al., 2017). Podobný experiment byl téhož roku proveden i u samic *P. duboscqi* infikovaných *L. major*. Mezi velikostí bakteriální populace a počtem metacyklických promastigotů byla prokázána pozitivní korelace; eliminace střevní mikrobioty vedla k redukcí metacyklických stádií a snížení vektorové kompetence flebotoma (Louradour et al., 2017).

Mechanismus působení bakterií na vývoj leishmanií ve střevě flebotoma nebyl zatím objasněn, ale existují hypotézy, které se snaží tento mechanismus vysvětlit. Podání antibiotik samičím flebotomů vede nejen k redukcí bakteriální populace, ale také dochází k zásadní změně v jejím druhovém složení. Zatímco u samic kontrolní skupiny převažovaly ve střevě gram-negativní bakterie, u samic, kterým byla podávána antibiotika, dominovala skupina gram-pozitivních bakterií, a to konkrétně rody *Leifsonia* sp. a *Gordonia* sp., což autory vedlo k myšlence, zdali tyto konkrétní druhy bakterií nemají negativní vliv na vývoj leishmanií. Tato teorie však nebyla potvrzena, a naopak u některých antibiotiky léčených samic přidání *Leifsonia* sp. do krve zvýšilo počet metacyklických stádií. Stejně tak rekolonizace střeva bakteriemi, které byly rezistentní vůči antibiotikům, částečně vedla ke zlepšení metacyklogeneze u antibiotiky léčených samic. V tomto případě studie prokázala, že vliv mikrobioty na vývoj patogena není tak závislý na konkrétních bakteriích, jako spíše na přítomnosti bakterií ve střevě obecně (Louradour et al., 2017).

Další teorie se zaměřuje na přítomnost některých látek a živin ve střevě flebotoma, kde změna v jejich koncentraci je signálem pro tvorbu metacyklických stádií (Kelly et al., 2017). Autoři si nezbytnost bakterií ve střevě flebotomů na vývoj leishmanií vysvětlují tím, že bakterie by se mohly podílet na spotřebovávání purinů, čímž by jejich hladina ve střevě poklesla na hranici, jež představuje signál pro zahájení metacyklogeneze. Důležitost adenosinu na metacyklogenezi potvrdili Serafim et al. (2012). Zásadní role adenosinu byla potvrzena jak během *in vitro*, tak i během *in vivo* experimentů, i když přesný mechanismus nebyl zcela objasněn. Během *in vitro* experimentů byly do kultivačního média s *L. amazonensis* přidány puriny, čímž došlo k významnému snížení metacyklogeneze. *In vitro* experimenty byly následně potvrzeny i během *in vivo* experimentů, kdy byla zkoumána role adenosinu na metacyklogenezi *L. infantum chagasi* ve střevě *L. longipalpis*. V případě, kdy byla samičím flebotomů podána směs cukru s adenosinem před tím než měly možnost sáť na infikovaném

hostiteli, došlo u nich po sání k signifikantně nižšímu počtu metacyklických stádií v pozdější fázi infekce, než u samic kontrolní skupiny, kterým byl podáván pouze roztok cukru (Serafim et al., 2012).

Podle Louradour et al. (2017) hraje důležitou roli také sacharóza. Na základě *in vivo* experimentů, kdy byla infikovaným flebotomům po podání antibiotik snížena koncentrace podávaného cukerného roztoku, což u nich částečně vedlo k lepšímu vývoji leishmanií, byly provedeny *in vitro* experimenty. Buňky promastigotů byly promyty a kultivovány v roztoku sacharózy o různých koncentracích, přičemž nejvíce se jim dařilo v izotonickém prostředí, ve kterém začaly za 68 hodin vytvářet metacyklická stadia, která byla poté zcela schopna *in vitro* infikovat makrofágy. Naopak se jim vůbec nedařilo v hypotonickém či hypertonickém prostředí a během několika málo hodin umíraly. Díky těmto výsledkům byla zformulovaná hypotéza, že bakterie se podílí na spotřebovávání sacharózy, což vede ke snížení osmolarity ve střevě na hodnotu, která je už pro leishmanie únosná (Louradour et al., 2017).

Další hypotéza, která se zabývá mechanismy přímé interakce mezi střevní mikrobiotou a leishmaniemi, předpokládá, že bakterie přímo produkují či poskytují živiny důležité pro diferenciaci leishmanií, avšak tato teorie nebyla experimentálně u flebotomů potvrzena (Louradour et al., 2017).

Sant'Anna et al. (2014) se ve své studii zabývali „kolonizační rezistencí“ u flebotomů *L. longipalpis*. Před infekcí *L. mexicana* podávali samicím v cukru bakterie *Asaia* sp., *Ochrobactrum intermedium* nebo kvasinky *Pseudozyma* sp.. V případě obou bakterií došlo k signifikantnímu snížení intenzity infekce v porovnání s kontrolními samicemi. U samic kolonizovaných *O. intermedium* navíc došlo i k redukci počtu samic nakaženými *L. mexicana*, a ke stejnému efektu došlo i v případě podání kombinace *O. intermedium* s *Asaia* sp., a *Pseudozyma* sp. s *Asaia* sp.. Tento jev je autory vysvětlován na základě teorie o ekologii společenstev, jež aplikovali na střevní mikrobiotu flebotomů. Tato teorie praví, že čím je druhové zastoupení střevní mikrobioty bohatší, tím více se mikrobiální společenstvo stává rezistentním vůči dalším patogenům (Case, 1990; Dillon et al., 2005; Sant'Anna et al., 2014). Avšak vysvětlení výsledků autorů Sant'Anna et al. (2014) může být více. Například, díky vysokým dávkám bakterií (10^7) mohlo dojít k aktivaci imunitního systému, což pak mohlo negativně ovlivnit pozdější infekci leishmaniemi (Kelly et al., 2017).

Po pozitivních výsledcích, kdy kolonizace střeva dalším druhem mikroorganismu snížila intenzitu leishmaniové infekce, vyzkoušeli autoři, zdali by tato teorie nemohla být aplikována i opačně, a zdali primární kolonizace střeva promastigoty leishmanií není schopná „záchranit“ flebotomy před entomopatogenní bakterií *Serratia marcescens*. Mortalita u flebotomů, kteří nebyli infikováni *L. mexicana*, ale byla jim denně podávána *S. marcescens*, byla vysoká a šestého dne experimentu se dožilo pouze 11 % z nich. Oproti tomu u samic, které měly střevo primárně kolonizováno leishmaniemi, byla mortalita signifikantně nižší (Sant'Anna et al., 2014). Lze tedy předpokládat, že soužití vektora s leishmaniemi poskytuje výhodu jak populaci parazitů, tak i v ochraně vektora před entomopatogenem (Sant'Anna et al., 2014).

Nejenže interakce mezi střevní mikrobiotou mají vliv na vývoj a růst populace leishmanií, ale mohou působit i na dynamiku bakterií ve střevě. Jak již bylo jednou řečeno, samotné sání krve snižuje bakteriální diverzitu (viz výše). Je ale zajímavé, jak tento jev ovlivní

navíc přítomnost leishmanií. U samic *L. longipalpis* neinfikovaných *L. infantum* byla sledována diverzita bakterií po dobu dvanácti dnů po nasátí krve. Do té doby, než došlo k defekaci krve, se diverzita bakterií u obou skupin snižovala, ale rozdíl se objevil po defekaci. Zatímco se diverzita u neinfikovaných samic vracela do původního stavu před sáním krve, u samic infikovaných leishmaniami samic docházelo přesně k opaku, a ve střevě začala zcela dominovat čeleď Acetobacteraceae, která navíc v počáteční fázi infekce nebyla vůbec ve střevě detekována. Naopak počty zástupců z čeledi Pseudomonadaceae, jež byla ve střevě detekována již na začátku infekce, se snižovaly, a byly zastoupeny pouhými 3 % u samic infikovaných *L. infantum*, oproti 36 % zastoupení u samic bez leishmaniové infekce. Vztah mezi snižováním bakteriální diverzity a zvyšováním počtu leishmanií byl signifikantní (Kelly et al., 2017). Pires et al. (2017) v rámci své studie pozoroval podobný jev u *L. longipalpis* pocházející z neendemické oblasti leishmaniózy v Brazílii; přítomnost leishmanií ovlivnila složení bakteriální mikrobioty i ve střevě flebotomů pocházejících z volné přírody (Pires et al., 2017).

Základní mechanismy, které shrnují výše popsané interakce mezi mikrobiotou a patogenem jsou obecně v anglické literatuře nazývány termínem „colonization resistance“. Tento pojem byl původně zformulovaný na základě experimentů s laboratorními zvířaty, ale dnes se s jeho používáním můžeme setkat i obecně u hmyzu (Van der Waaij et al., 1972; Vollaard & Clasener, 1994; shrnuto v Engel & Moran, 2013).

Střevní mikrobiota přenašeče může dále hrát roli i při infekci savčího hostitele leishmaniami. Dey et al. (2018) poukazuje na její důležitost tím, že část střevní mikrobioty je během sání flebotoma vylučována do hostitele spolu s leishmaniami a přítomnost těchto mikroorganismů působí na inflamazomy (komplex proteinů), které aktivují produkci interleukinů (interleukin-1 β), což vede k infiltraci neutrofilů do rány. Neutrofily poté pohltní a „chrání“ leishmanie před zabitím makrofágy a tím dochází k zesílení průběhu infekce. V případě, že samicím *L. longipalpis* byla před sáním na laboratorní myši podána antibiotika, nebo byla zablokovaná tvorba interleukinů, nedošlo k infiltraci neutrofilů do místa sání flebotoma a *L. donovani* se nerozšířila do dalších tkání (Dey et al., 2018).

Přes to, že jsou interakce mezi patogenem a bohatě druhově zastoupenou střevní mikrobiotou velmi komplexní, byly v rámci této diplomové práce vybrány pro detailnější zkoumání dva konkrétní rody bakterií *Asaia* sp. a *Wolbachia* sp..

2.4 Bakterie rodu *Asaia*

Bakterie rodu *Asaia* jsou obligátně aerobní gram-negativní bakterie, které řadíme do třídy α -proteobacteria a čeledi Acetobacteraceae. Bakterie z této čeledi jsou v české literatuře označovány jako bakterie octového kvašení, neboť společným znakem většiny z nich je oxidace etanolu na kyselinu octovou. I přes příslušnost k této čeledi, bakterie rodu *Asaia* kyselinu octovou z etanolu neprodukují, ale mají schopnost oxidovat acetát a laktát na oxid uhličitý a vodu (Yukphan et al., 2004; Yamada, 2016).

Do dnešní doby bylo popsáno osm druhů (*A. bogorensis*, *A. siamensis*, *A. krungthepensis*, *A. lannensis*, *A. spathodeae*, *A. astilbis*, *A. platycodi* a *A. prunellae*), a všechny byly původně

izolované z tropických rostlin z oblasti Thajska, Indonésie či Japonska. Bakterie *A. bogorensis* a *A. lannensis* byly navíc nalezeny v lidském klinickém materiálu, a proto jsou některými autory označovány jako oportunističtí patogeni člověka, nicméně podrobnější informace o této problematice zatím nejsou dostupné. Rod *Asaia* byl také nalezen u hmyzu např. ve střevě kříška *Scaphoideus titanus* (Hemiptera: Cicadellidae) či ve střevě kříse *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) (Yamada et al., 2000; Snyder et al., 2004; Yukphan et al., 2004; Crotti et al., 2009; Carretto et al., 2016; Yamada, 2016).

Dále byly bakterie rodu *Asaia* detekovány u volně žijících, ale i laboratorně chovaných komárů, a to především u rodů *Anopheles*, *Aedes* (*Ae. aegypti*) a *Culex* (Favia et al., 2007; Chouaia et al., 2010; De Freece et al., 2014). Důležitým znakem těchto bakterií je jejich schopnost kolonizovat různé tkáně komárů, a jejich přítomnost byla detekována jak ve střevě larev i dospělců, tak ve slinných žlázách, divertikulu a pohlavních orgánech samců a samic (Favia et al., 2007). Proto jsou bakterie rodu *Asaia* často považovány za sekundární neboli fakultativní symbionty, avšak jejich přesné postavení vůči komárům není doposud stanoveno. Bylo prokázáno, že přítomnost *Asaia* sp. u larev komárů má pozitivní vliv na jejich vývoj, což může souviset s působením na expresi genů, které se podílejí na formování kutikuly (Chouaia et al., 2012; Mitraka et al., 2013).

Výskyt bakterií rodu *Asaia* v různých tělních tkáních, a především jejich distribuce v pohlavních orgánech, souvisí s různými způsoby přenosu bakterií v populacích komárů. Jedním ze způsobů je přenos horizontální, kdy se komáři mohou nakazit bakteriemi z prostředí, anebo mezi sebou během sání na stejném zdroji cukerné potravy. Další možnou cestou přenosu je přenos sexuální; ten byl u samic *An. stephensi* prokázán po kopulaci s nakaženými samci. U stejného druhu byl prokázán i přenos vertikální z rodičů na potomstvo (Favia et al., 2007; Favia et al., 2008). Problematice vertikálního přenosu se následně věnovali i další autoři, kteří potvrdili, že se u larev a dospělců následující generace nejedná pouze o příjem bakterií spolu s potravou z kontaminovaného prostředí (Damiani et al., 2008; Crotti et al., 2009; Damiani et al., 2010). Bakterie nebyly detekovány v embryu, ale pouze na povrchu vyvíjejících se vajec. Proto byla zformulována hypotéza, že se vylíhnuté larvy nakazí požitím bakterií z povrchu vajec během líhnutí a následně jsou bakterie transstadiálně přenášeny až do stádia dospělců (Favia et al., 2007; Damiani et al., 2010).

Díky snadné kultivaci v laboratorních podmínkách, poměrně častému rozšíření v populaci komárů a distribuci v různých tělních tkáních komárů se bakterie rodu *Asaia* staly kandidáty pro využití v biologickém boji proti malárii pomocí paratransgeneze (Bongio & Lampe, 2015; Shane et al., 2018; Asgari et al., 2020). Principem této strategie je genetická manipulace symbiotických mikroorganismů tak, aby produkovaly molekuly, které by měly negativní dopad na vývoj patogena (Blumberg et al., 2016; Hurwitz et al., 2011). Z *A. bogorensis* byly vyzisolovány geny kodující sekretované proteiny, které byly následně zfúzovány s geny kodující antiplasmodiální efektorové molekuly (scorpin). Takto upravené transgenní bakterie byly komárům *An. stephensi* podávány před nákazou plasmodiem. Výsledkem experimentu bylo nejen potlačení tvorby oocyst *Plasmodium berghei* ve střevě komára, ale také došlo k redukci počtu nakažených samic (Bongio & Lampe, 2015). Podobný experiment byl proveden i o pár let později, ale s jediným rozdílem; bakterie byly transgenně upraveny tak, aby produkovaly

scorpin pouze v momentě, kdy je ve střevě přítomnost plasmodií nejpravděpodobnější, tedy po násátí krve komárem. Takto transgenně modifikované bakterie podané komárům, významně snižovaly počty oocyst *P. berghei* (Shane et al., 2018).

Nicméně, bakterie rodu *Asaia* samy o sobě antiplasmodiální aktivitu nevykazují. Svoji přítomností však mohou aktivovat imunitní systém komárů, a produkce AMPs může mít na vývoj plasmodií ve střevě přenašeče negativní vliv (Cappelli et al., 2019).

U flebotomů byly bakterie rodu *Asaia* detekovány ve střevě *L. longipalpis*, na kutikule samic *P. sergenti* a v homogenátu těl *P. chinensis* (Akhoundi et al., 2012; Sant'Anna et al., 2014; Li et al., 2016), nicméně informace o jejich roli a vlivu na přenášené patogeny zcela chybí.

2.5 Bakterie rodu *Wolbachia*

Bakterie rodu *Wolbachia* jsou intracelulární gram-negativní bakterie patřící do třídy α -proteobacteria a čeledi Anaplasmataceae. Jde o endosymbiotické bakterie, které se vyskytují u řady druhů hmyzu, ale i dalších členovců. Jejich rozsáhlé rozšíření je, mimo jiné, podmíněno způsobem přenosu mezi hostiteli (shrnutí ve Werren et al., 2008).

O těchto bakteriích je známo, že přenos probíhá pomocí vertikálního přenosu po mateřské linii (maternálně). Avšak to, že se wolbachie vyskytují mezi různými druhy hmyzu v přírodě, naznačuje existenci i horizontálního přenosu (Zug et al., 2012). Tuto možnost podporuje i zjištění, že wolbachie jsou schopné přežít i týden extracelulárně v kultivačním médiu a následně infikovat *in vitro* buněčnou linii (Rasgon et al., 2006). Jedním z vysvětlení mechanismu horizontálního přenosu je, že se neinfikovaný jedinec živí potravou ze stejného zdroje spolu s infikovanými zástupci téhož druhu (Huigens et al., 2004). Jedním z takových příkladů horizontálního přenosu wolbachii byl v nedávné studii pozorován u molice *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodida), které se živí rostlinnými šťávami. Samice molice se wolbachii nakazily z floému rostlin, na nichž předtím sály infikované samice, a po otestování následující F1 generace byl prokázán i následný vertikální přenos na potomstvo (Li et al., 2017).

Evoluční úspěch wolbachii je podmíněn jejich schopností manipulovat s reprodukcí hostitele a tím zvýšit přenos do dalších generací. Jednou z reprodukčních modifikací je tzv. feminizace samců. Potomci, kteří jsou geneticky určeni jako jedinci samčího pohlaví, se začínou vyvíjet jako samice. Feminizace samců je známa u stejnonožců (Isopoda), motýlů (Lepidoptera) i ploštic (Hemiptera) (Hiroki et al., 2002; Vandekerckhove et al., 2003; Negri et al., 2006; Werren et al., 2008). Další manipulací je spuštění partenogeneze u haplodiploidních hostitelů, kde samci mají jednu sadu chromozomů (Hymenoptera (blanokřídli), Thysanoptera (trásnokřídli) a Acari (roztoči)). V neoplozeném vajíčku dojde působením wolbachii ke zdvojení sady chromozomů a tím ke vzniku samice. Cílem bakterie je eliminovat samce, kteří wolbachie do další generace nepřenášejí (shrnutí ve Werren et al., 2008). Přítomnost wolbachii také může vyvolat tzv. zabíjení samců. Tento jev byl pozorován u Coleoptera (brouci), Diptera (dvoukřídli), Lepidoptera (motýli) a Pseudoscorpiones (štírci), kdy během embryogeneze dochází k úmrtí samčích embryí, které pak mohou pro ostatní vyhléhlé potomstvo

představovat zdroj potravy, čímž na úkor samců dojde k upřednostnění potomků samičího pohlaví (shrnutí v Charlat et al., 2003; a v Werren et al., 2008). Asi nejznámějším mechanismem ovlivnění hostitelské reprodukce je cytoplazmatická inkompatibilita (CI), jež zabraňuje infikovaným samcům produkovat potomstvo s neinfikovanou samicí, nebo se samicí infikovanou jiným kmenem wolbachii. S tímto jevem se můžeme setkat u některých dvoukřídlých (např. komáři), u zástupců z řádu Isopoda (stejnonožci) či u zástupců ze třídy Arachnida (pavoukovci) (shrnutí v Werren et al., 2008). Přítomnost bakterií rodu *Wolbachia* v těle komárů či flebotomů může vést k úvahám o jejich využití v biologickém boji. I přes to, že *Wolbachia* sp. byla detekována u řady druhů flebotomů, publikace, jež se zabývají vlivem wolbachii na vývoj leishmanií či virů chybí, což je důvodem, proč je tato kapitola primárně dále věnována komárům.

Přirozené infekce wolbachii byly detekovány u volně žijících komárů, jako je například *Ae. albopictus*, *Cx. pipiens* či *An. gambiae* (shrnutí v Ross et al., 2020). Zajímavostí je, že se dlouhou dobu předpokládalo, že bakterie rodu *Wolbachia* se u komárů rodu *Anopheles* nevyskytují (shrnutí v Ricci et al., 2012). Od roku 2014 byly však v západní Africe detekovány wolbachie u *An. gambiae* (Baldini et al., 2014), *An. coluzzii*, a i u dalších druhů např. *An. arabiensis* (Shaw et al., 2016; Gomes et al., 2017; Jeffries et al., 2018a; Ayala et al., 2019). Obdobná situace byla i s *Ae. aegypti* (shrnutí v Ross et al., 2020).

Nicméně, na základě některých experimentů (Bian et al., 2013; Skelton et al., 2016) se zdá, že přirozená infekce wolbachii nemá velký vliv na přenášené patogeny, nejspíše v důsledku vzájemné dlouhodobé koevoluce. Navíc, dopad na přenášené patogeny je závislý jak na druhu wolbachii, tak i na druhu hostitele (shrnutí v Gomes & Barillas-Mury, 2018). Díky tomu jsou nové metody v biologickém boji proti patogenům přenášených komáry založeny spíše na transinfekci komárů wolbachii, což je jev kdy se do daného hostitele zavede wolbachie, která pro něj není přirozená. V důsledku transinfekce může dojít například k aktivaci imunitního systému, který pak negativně ovlivňuje přenášené patogeny (Pan et al., 2018). Díky CI pak může dojít k nahrazení stávající populace transinfikovanými jedinci (shrnutí v Ross et al., 2020). Například typ wMel, izolovaný z *Drosophila melanogaster*, snižuje kompetenci transinfikovaných *Ae. albopictus* v přenosu dengue viru, a díky CI pak může dojít k nahrazení celé *Wolbachia*-negativní (*W*-) populace za *Wolbachia*-pozitivní (*W*+) jedince, kteří nebudou schopni virus přenést (Blagrove et al., 2012). Dalším příkladem jsou transinfikovaní komáři *Ae. aegypti* druhem wolbachii wAlBb, kteří byli vypuštěni v přírodě v 6 endemických oblastech výskytu dengue viru v Malajsii. Nejenže došlo k úspěšnému nahrazení původní populace komárů za populaci s *W*+, kde se wolbachie vyskytovaly s vysokou prevalencí, ale také došlo ke snížení incidence dengue viru u místního obyvatelstva (Nazni et al., 2019).

V biologickém boji proti virům se také pracuje se skutečností, že wolbachie mají schopnost v některých případech vyvolat rezistenci vůči virům prostřednictvím kompetice o látky, jež jsou důležité jak pro patogena, tak pro wolbachie. Jednou z takových látek je například cholesterol, který wolbachie pravděpodobně začleňují do své vnější membrány a čerpají ho z buněk svých hostitelů, jelikož si ho neumí syntetizovat samy (shrnutí v Kamtchum-Tatuene et al., 2016). U *D. melanogaster* bylo experimentálně zjištěno, že zvýšený příjem cholesterolu ve stravě snižuje negativní vliv wolbachii na vývoj patogena (*Drosophila C virus*)

(Caragata et al., 2013). Stejně tak u virů přenášných komáry bylo prokázáno, že cholesterol hostitelů je důležitý pro invazi viru do buňky, jeho replikaci, stavbu virionu a infektivitu, a zdá se, že o něj s wolbachii kompetují (shrnutí v Kamtchum-Tatuene et al., 2016).

Wolbachie u komárů mohou kromě virů ovlivnit i vývoj plasmodií. Na základě experimentů s transinfikovanými komáry bylo prokázáno, že přítomnost wolbachii může mít negativní vliv jak na počet oocyst a frekvenci výskytu patogena v komárech, tak na intenzitu infekce stanovenou celkovým počtem sporozoitů (Moreira et al., 2009; Hughes et al., 2011; Joshi et al., 2017). Avšak různé druhy wolbachii se v interakcích s patogeny mohou lišit, jak bylo například prokázáno u *An. gambiae*, kdy wolbachie typu *wAlbB* zvyšovala počty oocyst *P. berghei* v mesenteronu komára, ale naopak typ *wMelPop* infekci mírně potlačoval, což může být přisuzováno odlišnému původu wolbachii (*wMelPop* pochází z *D. melanogaster*, zatímco *wAlbB* z *Ae. albopictus*), což se pak může odrážet i v rozdílné interakci s imunitním systémem vektora. Je třeba však zmínit, že *P. berghei/An. gambiae* v tomto případě sloužil pouze jako model a v přírodě se nevyskytuje (Hughes et al., 2012). Zatímco druh *wAlbB* zvyšuje intenzitu infekce *P. berghei*, ten samý genotyp v kombinaci *P. falciparum/An. gambiae* vývoj plasmodií potlačuje, což autoři vysvětlují tím, že *P. falciparum* a *P. berghei* spouští rozdílné signalizační dráhy imunitního systému, jak bylo ostatně i experimentálně prokázáno (Garver et al., 2009, Mitri et al., 2009; Hughes et al., 2011).

Důležitým aspektem interakcí *Wolbachia*/patogen/vektor je také vliv vnějšího prostředí, například teplota. Intenzita infekce wolbachii *wAlbB* v těle *An. stephensi* a jejich efekt na průběh infekce *P. yoelli* ve střevě přenašeče byla porovnávána v různých teplotách (20 °C, 22 °C, 24 °C, 26 °C a 28 °C). Obecně platilo, že při vyšších teplotách se bakterie v komárech rychleji množily, největší nárůst wolbachialní populace byl při 26 °C, avšak nárůst populace wolbachii neměl vliv na mortalitu komárů. Dále byly porovnávány počty oocyst, počet sporozoitů na jednu oocystu a intenzita infekce (celkový počet sporozoitů). U *W+* komárů byl signifikantně nejnižší počet oocyst pozorován při 28 °C, naproti tomu u komárů chovaných ve 20 °C se počty oocyst mezi skupinami *W+/W-* nelišily. Co se týče počtu sporozoitů na jednu oocystu, došlo u všech *W+* komárů nezávisle na teplotě k redukci, oproti kontrolním skupinám, avšak tento jev byl nejvíce znatelný v teplotách, které byly pro vývoj parazita neoptimální (20 °C a 28 °C). Na základě stanovení celkového počtu sporozoitů u *W+* komárů byla zhodnocena intenzita infekce, která byla nejvyšší ve 24 °C (Murdock et al., 2015).

Wolbachie mohou ovlivňovat vývoj a množení plasmodií různými způsoby, které však nejsou zatím objasněny. Jedním z možných vysvětlení je, že přítomnost wolbachii aktivuje imunitní systém hostitele a spustí se produkce antiplasmodiálních molekul (Kambris et al., 2010; Joshi et al., 2017). V *in vitro* experimentech bylo prokázáno, že tímto stimulem by mohl být povrchový membránový protein wolbachii (*wsp*), který v buňkách komárů *An. gambiae* a *Ae. albopictus* zvyšuje transkripci imunitních genů, jež se na produkci antiplasmodiálních molekul podílí (Pinto et al., 2012).

Jak už bylo výše zmíněno, studie zabývající se vlivem wolbachii na patogena ve střevě flebotomů chybí. Za účelem využití wolbachii v kontrolních strategiích proti leishmaniím byla u flebotomů *L. longipalpis* vyzkoušena metoda injekce vajíček wolbachii *wMel*. Nicméně u flebotomů nedošlo ke stabilní infekci (Jeffries et al., 2018b). Poněkud úspěšnější byla studie,

provedená autory da Silva Gonçalves, et al. (2019), jejichž cílem bylo infikování embryonální buněčné linie *L. longipalpis* (Lulo a LL-5) wolbachii (wMelPop-CLA a wMel). Na rozdíl od wMel byla infekce wMelPop-CLA v obou buněčných liniích úspěšná. Dalším cílem experimentu bylo zkoumání buněčné imunitní odpovědi proti wolbachii. V buněčné linii Lulo, kde byl vyšší počet wolbachii, došlo k signifikantně nižší expresi imunitních genů oproti kontrolní buněčné linii bez wolbachii. Mezi geny, jež měly díky přítomnosti wolbachii ovlivněnou expresi, patřil gen *Caspar*, který je negativním regulátorem Imd imunitní dráhy (da Silva Gonçalves et al., 2019). V *in vivo* experimentech provedených autory Telleria et al. (2012) snížená exprese *Caspar* zabránila infekci leishmaniemi ve střevě vektora, a tudíž by se dalo předpokládat, že interakce wolbachii s imunitním systémem flebotomů by mohla mít vliv i na vývoj leishmanií. Avšak v *in vitro* experimentech s buněčnými liniemi (Lulo a LL-5) neměla přítomnost wolbachii signifikantní vliv na počet *L. infantum* adherovaných na buňky *L. longipalpis* (da Silva Gonçalves et al., 2019).

3 Materiál a metodika

3.1 Složení použitých roztoků a příprava materiálu

Acetobacter – glukonobacter médium (selekční agarové médium použité při kultivaci bakterií druhu *Asaia krungthepensis*)

2,5 g kvasnicového extraktu, 25 g glukózy, 5 g CaCO₃ (uhličitanu vápenatého), 6,25 g agaru, 250 ml dH₂O (destilované vody); ztuhlé plotny sterilizovány UV světlem po dobu 30 minut

GLY médium (tekuté médium použité při kultivaci bakterií druhu *Asaia krungthepensis*)

5 ml tekutého glycerolu, 2,5 g kvasnicového extraktu, 250 ml dH₂O; pH = 5,5

LB (Luria-Bertani) médium (tekuté médium použité při kultivaci bakterií druhu *Asaia krungthepensis*)

2,5 g tryptonu, 1,25 g kvasnicového extraktu, 2,5 g NaCl (chloridu sodného), dH₂O 250 ml; pH= 7, 5

Médium pro kultivaci leishmanií

M199 (Sigma), 10 % inaktivované fetální kravské sérum (Gibco), 2 % sterilní moč, 1 % BME vitamíny (Sigma), 0,8 % amikin (Bristol-Myers Squibb)

PBS (fosfátový pufr)

80 g NaCl, 2 g KCl (chloridu draselného), 2,4 g KH₂PO₄ (dihydrogen fosforečnanu draselného), 14,4 g Na₂HPO₄ (hydrogen fosforečnanu disodného), 1000 ml dH₂O; pH = 5,5

Ředící roztok (počítání leishmanií v Bürkerově komůrce)

0,85% NaCl (fyziologický roztok) a 1% CH₂O (formaldehyd)

Kuřecí membrány

K přípravě kuřecích membrán bylo potřeba mrtvá cca třídní kuřátka zbavit peří v oblasti zad a za sterilních podmínek ve flowboxu jim z této oblasti byla stažena kůže. Stažená kůžička byla dvakrát po deseti minutách propláchnuta v 70% etanolu a dvakrát ve sterilním fyziologickém roztoku. Takto připravené kuřecí membrány byly skladovány v Petriho miskách v –20 °C.

3.2 Detekce bakterií *Asaia/Wolbachia* sp. u flebotomů z Balkánského poloostrova

Přítomnost bakterií *Asaia* sp. a *Wolbachia* sp. byla testována u flebotomů získaných při terénních odchycích z oblastí Balkánského poloostrova v roce 2015 v rámci mezinárodního projektu VectorNet financovaného agenturami EFSA (European Food Safety Agency) a ECDC (European Centre of Disease Prevention and Control).

Odchyty probíhaly pomocí světelných pastí (CDC Miniature Light Traps, John W. Hock), často v kombinaci se zdrojem oxidu uhličitého, celkem ze 40 oblastí na území pěti států: Bosna a Hercegovina, Bulharsko, Černá hora, Chorvatsko a Makedonie. Seznam lokalit a pastí v jednotlivých zemích, spolu s druhy a počty otestovaných jedinců je uveden v Tab. 1.

U některých flebotomů byla již k dispozici izolovaná DNA, ale u většiny vzorků bylo nutné nejprve získat DNA ze zbylých částí těl flebotomů (hrud' a zadeček), nevyužitých při morfologické determinaci. Tyto vzorky byly původně uskladněny v 70% etanolu v -20°C , a proto byly před samotnou izolací DNA promyty ve sterilní destilované vodě. DNA byla vyizolována kitem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) dle manuálu výrobce a materiál byl eluován do 40 μl elučního pufru.

Tab. 1: Seznam lokalit, pastí a druhů testovaných flebotomů v jednotlivých zemích.

Země	Lokalita	Past	Druh	Počet ♀	Počet ♂	Celkový počet
Bosna a Hercegovina	Capljina-Gorica	Gorica 3	<i>P. tobbi</i>	6	1	7
		Gorica 5	<i>P. neglectus</i>	0	1	1
		Gorica 6	<i>P. tobbi</i>	0	2	2
			<i>P. neglectus</i>	0	3	3
	Čomori	Čomori 4	<i>P. tobbi</i>	1	0	1
			<i>P. neglectus</i>	3	3	6
	Grab	Grab 3	<i>P. neglectus</i>	1	0	1
	Svacici	Svacici 2	<i>P. tobbi</i>	2	3	5
			<i>P. neglectus</i>	1	7	8
		Svacici 5	<i>P. tobbi</i>	1	0	1
		Svacici 6	<i>P. tobbi</i>	1	1	2
		Svacici 7	<i>P. tobbi</i>	1	0	1
		Svacici 10	<i>P. tobbi</i>	3	1	4
	Svitava	Svitava 1	<i>P. tobbi</i>	0	1	1
			<i>P. neglectus</i>	3	0	3
		Svitava 2	<i>P. tobbi</i>	1	2	3
		Svitava 4	<i>P. tobbi</i>	1	1	2
		Svitava 7	<i>P. tobbi</i>	3	3	6
	Žakovo	Žakovo 1	<i>P. tobbi</i>	1	1	2
Celkem		6		29	30	59
Bulharsko	Dalbok Izvor	Dalbok Izvor 3	<i>P. tobbi</i>	0	2	2
		Dalbok Izvor 4	<i>P. tobbi</i>	2	4	6
	Debar	Debar 4	<i>P. perfiliewi</i>	0	1	1
	Harsovo	Harsovo 1	<i>P. neglectus</i>	0	1	1

			<i>P. perfiliewi</i>	6	1	7
			<i>P. tobbi</i>	3	0	3
	Harsovo 2		<i>P. neglectus</i>	0	1	1
			<i>P. perfiliewi</i>	14	1	15
			<i>P. tobbi</i>	3	1	4
	Harsovo 4		<i>P. perfiliewi</i>	1	0	1
	Karnalovo	Karnalovo 3	<i>P. perfiliewi</i>	3	0	3
	Muldava	Muldava 1	<i>P. tobbi</i>	0	1	1
		Muldava 2	<i>P. tobbi</i>	0	1	1
		Muldava 6	<i>P. tobbi</i>	0	1	1
	Pervomay	Pervomay 5	<i>P. neglectus</i>	0	4	4
		Pervomay 5	<i>P. tobbi</i>	1	0	1
	Poroyna	Poroyna 5	<i>P. tobbi</i>	0	2	2
	Razhdak	Razhdak 1	<i>P. tobbi</i>	1	0	1
		Razhdak 5	<i>P. perfiliewi</i>	2	0	2
	Starcevo	Starcevo 4	<i>P. perfiliewi</i>	1	0	1
		Starcevo 5	<i>P. perfiliewi</i>	1	0	1
		Starcevo 6	<i>P. perfiliewi</i>	6	0	6
	Vinograd	Vinograd 1	<i>P. perfiliewi</i>	1	0	1
Celkem		10		45	21	66
Černá Hora	Klicevo	Klicevo 1	<i>P. neglectus</i>	5	0	5
				6	0	6
	Mataguzi	Mataguzi 1	<i>P. neglectus</i>	0	2	2
	Ozrinici	Ozrinici 1	<i>P. neglectus</i>	6	0	6
	Vuljeviči	Vuljeviči 1	<i>P. neglectus</i>	0	1	1
Celkem		4		17	3	20
Chorvatsko	Duba	Duba 1	<i>P. tobbi</i>	0	3	3
		Duba 2	<i>P. neglectus</i>	1	0	1
		Duba 6	<i>P. neglectus</i>	0	1	1
			<i>P. tobbi</i>	0	1	1
	Glušci	Glušci 2	<i>P. tobbi</i>	0	1	1
	Gruda	Gruda 1	<i>P. neglectus</i>	4	4	8
	Jasenice	Jasenice 5	<i>P. neglectus</i>	6	0	6
			<i>P. tobbi</i>	0	2	2
	Kosa	Kosa 1	<i>P. neglectus</i>	1	1	2
			<i>P. tobbi</i>	0	2	2
	Lovornovo	Lovornovo 5	<i>P. tobbi</i>	2	2	4
	Pobrezje	Pobrezje 4	<i>P. tobbi</i>	2	2	4
	Šumet	Šumet 1-3	<i>P. neglectus</i>	4	3	7
	Vidonje	Vidonje 1-4	<i>P. neglectus</i>	1	0	1
			<i>P. tobbi</i>	2	0	2
	Zvekovic	Zvekovic 2	<i>P. neglectus</i>	0	2	2
Celkem		10		23	24	47
Makedonie	Dedeli	Dedeli 2 + 3	<i>P. tobbi</i>	0	1	1
		Dedeli 3	<i>P. tobbi</i>	0	2	2
	Furka	Furka 1	<i>P. tobbi</i>	2	0	2

Gradskobal	Gradskobal 1	<i>P. tobbi</i>	1	0	1
Kalnica	Kalnica 2	<i>P. tobbi</i>	1	0	1
Kežovica	Kežovica 1	<i>P. perfiliewi</i>	1	0	1
	Kežovica 3	<i>P. perfiliewi</i>	1	0	1
		<i>P. tobbi</i>	2	0	2
	Kežovica 4	<i>P. perfiliewi</i>	3	3	6
Kukliš	Kukliš 1+3	<i>P. neglectus</i>	1	0	1
		<i>P. tobbi</i>	2	0	2
Kurtamzali	Kurtamzali 3	<i>P. perfiliewi</i>	1	0	1
		<i>P. tobbi</i>	1	0	1
Mokrievio	Mokrievio 1	<i>P. neglectus</i>	4	0	4
	Mokrievio 2-3	<i>P. neglectus</i>	2	0	2
	Mokrievio 4-6	<i>P. neglectus</i>	1	0	1
	Mokrievio 7	<i>P. neglectus</i>	1	1	2
	Mokrievio 7-9	<i>P. neglectus</i>	2	1	3
Mokrina	Mokrina 1	<i>P. neglectus</i>	1	6	7
		<i>P. tobbi</i>	1	0	1
Selce	Selce 1	<i>P. tobbi</i>	3	0	3
Celkem	10		31	14	45
Celkem	40		145	92	237

3.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR) a elektroforéza

Vyizolovaná DNA flebotomů posloužila jako templát pro amplifikaci požadovaných genů pomocí PCR. V případě wolbachii byl amplifikován gen kódující jejich povrchový protein wsp (wolbachia surface protein). Použité primery amplifikují DNA fragmenty o velikosti v rozmezí 590 – 632 bp, v závislosti na tom, o jaký druh wolbachii se jedná (Zhou et al., 1998). Pro detekci *Asaia* sp. byl amplifikován 181 bp dlouhý úsek genu kódující podjednotku 16S rRNA těchto bakterií (Favia et al., 2007). Přehled použitých primerů je uveden v Tab. 2. Celkový objem reakční směsi byl 25 µl a složení je uvedeno v Tab. 3. PCR proběhlo v následujícím cyklu; 94 °C – 2 min, 30× (94 °C 30 s, 50,7 °C – 1 min, 72 °C –1 min), 72 °C – 4 min.

Tab. 2: Primery použité při detekci bakterií.

Amplifikovaný gen	Název	Určení	Sekvence (5' → 3')
<i>wsp</i>	691R	Reverse	AAAAATTAAACGCTACTCCA
	81F	Forward	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC
16S rDNA	Asarev	Reverse	AGCGTCAGTAATGAGCCAGGTT
	Asafor	Forward	GCGCGTAGGCGGTTTACAC

Tab. 3: Složení reakčních směsí.

Detekce <i>Asaia</i> sp./ <i>Wolbachia</i> sp.	
Složka	Množství
Master Mix (Emerald green)	12,5 µl
Asafor/81F	1 µl
Asarev/691R	1 µl
PCR H ₂ O	8,5 µl
DNA	2 µl

K vyhodnocení získaného PCR produktu byla využita horizontální gelová elektroforéza za použití 1% agarózového gelu. Gel byl připraven smícháním práškové agarózy (BioReagent, Sigma) a pufru (50x TAE Electrophoresis Buffer, Thermo Scientific) a pro vizualizaci DNA bylo nakonec do směsi přidáno barvivo SYBR safe (ThermoFisher Scientific) a k určení velikosti produktů byl použit GeneRuler100bp DNA Ladder (Thermo Scientific). V závislosti na velikosti gelu byla elektroforéza spuštěna při napětí 90 – 115 V, po dobu 25 – 45 minut. v závislosti na velikosti gelu. Výsledek byl následně vizualizován pod UV světlem pomocí UV transluminátoru (East Port).

3.2.2 Příprava vzorků na sekvenační analýzu

U pozitivních vzorků byl zbylý PCR produkt přečištěn pomocí purifikačního kitu High Pure PCR Product Purification Kit (Roche), dle návodu výrobce, a byl eluován do PCR vody (Top-Bio, s.r.o) o celkovém objemu 30 – 50 µl. Čistota a koncentrace vzorku byla měřena pomocí spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Na základě naměřených hodnot byla namíchána sekvenační reakce tak, aby výsledná koncentrace odpovídala ± 5 ng DNA na 100 pb.

Výsledky získané ze sekvenační laboratoře PřF UK byly následně zobrazeny pomocí programu BioLign a poté porovnány pomocí algoritmu BLAST s databází GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

3.3 Detekce bakterií *Wolbachia* sp. u laboratorně chovaných samic flebotomů

Na přítomnost bakterie *Wolbachia* sp. byly testovány i laboratorní kolonie flebotomů chované v insektáriu na katedře parazitologie PřF UK.

Kolonie flebotomů jsou drženy za standartních podmínek ($26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60 – 70% vlhkost, fotoperioda 14 : 10, 50% cukerný roztok, detailnější popis Volf & Volfová (2011). Z každého druhu (viz Tab. 4) bylo, krátce po vylíhnutí (2 – 5 dnů), odebráno 15 samic, které byly rozděleny do tří vzorků po pěti, ze kterých byla následně vyizolována DNA pomocí High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), dle pokynů výrobce. Získaná DNA byla eluována

do 40 µl elučního pufru. Izolovaná DNA byla následně využita k detekci bakterií pomocí PCR reakce, gelové elektroforézy a sekvenční analýzy (viz kapitoly 3.2.1 a 3.2.2).

Tab. 4: Seznam testovaných laboratorně chovaných druhů flebotomů.

Druh	Rok založení	Země původu
<i>Phlebotomus arabicus</i>	2001	Izrael
<i>P. argentipes</i>	2008	Indie
<i>P. duboscqi</i>	2008	Senegal
<i>P. orientalis</i>	2010	Etiopie
<i>P. papatasi</i>	2005	Turecko
<i>P. perniciosus</i>	1994	Španělsko
<i>P. sergenti</i>	2005	Turecko
<i>P. tobbi</i>	2008	Turecko
<i>Sergentomyia schwetzi</i> A*	2010	Etiopie
<i>S. schwetzi</i> B*	2010	Etiopie
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	1991	Brazílie
<i>L. migonei</i>	2014	Brazílie

* kolonie A a B se liší sáním na různém hostiteli

3.3.1 Frekvence výskytu bakterií rodu *Wolbachia* u *Phlebotomus perniciosus*

V rámci screeningu všech laboratorně chovaných druhů flebotomů bylo zjištěno, že kolonie *P. perniciosus* je *Wolbachia* pozitivní (*W*+), a proto bylo provedeno detailnější sledování infekce; každých 14 dní byli testováni 1 – 2 dny starí jedinci (individuálně 15 samců a 15 samic) po dobu 8 týdnů, s cílem zjistit frekvenci výskytu wolbachii v dané populaci.

DNA izolovaná pomocí kitu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), byla eluována do 40 µl elučního pufru. Poté byla provedena PCR amplifikace wolbachialního genu *wsp* a výsledky byly vyhodnoceny pomocí elektroforézy (viz kapitola 3.2.1).

3.3.2 Tkáňová specifita bakterií rodu *Wolbachia* u *P. perniciosus*

K tomuto experimentu bylo použito 12 samic a 12 samců z laboratorně chované kolonie *P. perniciosus*. Flebotomové byli pitváni v kapce fyziologického roztoku pod binokulární lupou, za pomoci pitvacích nástrojů (entomologická minucie upevněná ve špejli) a pinzety. Z každého jedince byly získány 4 vzorky: hlava se slinnými žlázami, střevo s malpighickými trubicemi, hrud' s křídly a zadeček (u samic s ováriemi).

Během pitvy byla prováděna důkladná desinfekce pitvacích nástrojů a pinzety, aby bylo zabráněno kontaminaci mezi jednotlivými tkáněmi. Všechny nástroje byly ponořeny do destilované vody, poté opláchnuty vodou se saponátem, následně dvakrát omyty destilovanou vodou, a nakonec ponořeny do 70% ethanolu a opět opláchnuty destilovanou

vodou. Také každý vypitvaný orgán byl nejdříve promyt v kapce čistého fyziologického roztoku a následně uložen do 200 µl lyzačního pufru a homogenizován.

Z takto připravených vzorků byla následně vyizolována DNA pomocí kitu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Vzorky byly eluovány do 40 µl elučního pufru. DNA byla následně využita na detekci bakterií, ke které byla použita metoda PCR a gelová elektroforéza (viz kapitola 3.2.1).

3.4 Experimentální eliminace bakterií rodu *Wolbachia* z populace

P. perniciosus

Cílem experimentu bylo získat kolonii *P. perniciosus* zbavenou wolbachii (*W*⁻), kterou by bylo možno porovnat s mateřskou kolonií s wolbachii (*W*⁺). K eliminaci endosymbiotických bakterií rodu *Wolbachia* sp. bylo použito širokospektrální tetracyklinové antibiotikum (Tetracyklin hydrochlorid, Sigma-Aldrich), které bylo v minulosti úspěšně využito proti těmto bakteriím u laboratorně chovaných komárů, ale i u dalších skupin členovců (shrnuje Li et al., 2014). Antibiotikum bylo podáváno dospělým flebotomům v krvi či v roztoku cukru.

K experimentům byly použity antibiotika v práškové formě. Za sterilních podmínek bylo 50 mg antibiotik rozpuštěno ve 4 ml injekční vody (Braun), roztok byl přefiltrován pomocí membránového filtru (0,22 µm) Millex®GP a byly z něj připraveny alikvoty s 1 mg rozpuštěného tetracyklinu o objemu 80 µl, a uloženy do -20 °C.

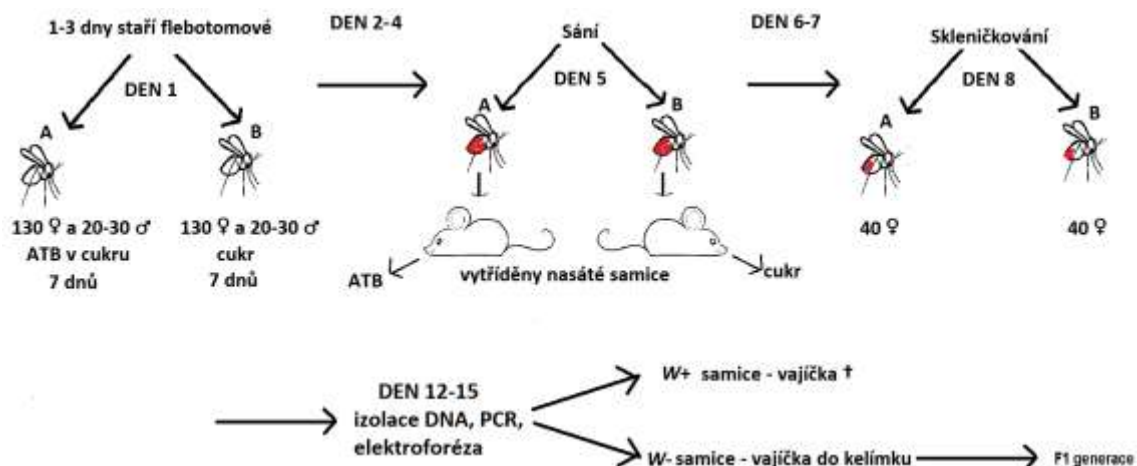
3.4.1 F0 generace flebotomů: podávání antibiotik v roztoku cukru

Během experimentu byla antibiotika o koncentraci 1 mg/ml přidávána do 50% cukerného roztoku, běžně používaného v chovech flebotomů (Volf & Volfová, 2011) (Tab. 5).

Tab. 5: Složení roztoku cukru a antibiotik používaného při experimentech.

Skupina A		Skupina B (kontrolní)	
Složka	Množství	Složka	Množství
ATB	16 µl	H ₂ O	16 µl
roztok cukru	200 µl	roztok cukru	200 µl

Jeden až tři dny staří flebotomové byli rozděleni do dvou skupin (A - pokusná a B - kontrolní), každá čítala 130 samic a 20 – 30 samců. Flebotomům skupiny A byla po dobu 4 dnů podávána antibiotika v kapce cukru a každých 24 hodin byla obměňována, u kontrolní skupiny byl podáván pouze roztok cukru s příslušným objemem injekční vody místo ATB. Pátý den experimentu samice sály na laboratorní myši kmene SKH, nasáté samice byly odděleny do malé sítě, kde měla skupina A k dispozici cukr s antibiotiky, a skupina B cukr bez ATB, který jim byl každých 24 hodin obměňován až do sedmého dne experimentu (Obr. 6). Flebotomové byli po celou dobu experimentu umístěni v chovných místnostech při teplotě 26 °C.



Obr. 6: Schéma experimentu eliminace wolbachii u flebotomů F0 generace (skupině A podávána antibiotika a skupině B cukr bez antibiotik).

Osmý den experimentu bylo 40 nasátých samic z každé skupiny jednotlivě separováno pomocí exhaustoru do připravených skleniček. Ve skleničkách byl umístěn složený čtverec filtračního papíru o rozměrech 5×5 cm, který byl navlhčen destilovanou vodou, čímž udržoval ve skleničce stálou vlhkost. Ústí skleniček bylo přetaženo pruhem monofilu s otvorem vyplněným vatou a upevněn plastovým víčkem (viz Obr. 7).

Takto připravené a popsané skleničky se samicemi byly umístěny do větších uzavíratelných dóz, na jejichž dně byl navlhčený filtrační papír, a dózy byly umístěny do 26 °C. Zbylé nasáté samice byly „zakelímkovány“ do plastového kelímku vylitého navlhčenou sádrou a uzavřeného plastovým víčkem s pruhem monofilu. Tento kelímek byl umístěn do větší bedny s navlhčeným sterilním pískem 26 °C a larvy byly chovány až do vylíhnutí dospělců F1 generace.



Obr. 7: Skleničky použité pro separaci samic (Kristina Sovová).

Samice umístěné ve skleničkách byly odebrány po vykladení snůšky vajíček (cca za dalších 6 dnů) a byla z nich vyizolována DNA (viz výše).

Vajíčka každé samice byla ve skleničkách následně spočítána a celá snůška přenesena do další zkumavky s lyzačním pufrům. Pro izolaci DNA bylo nutné vajíčka nejdříve homogenizovat, ale vzhledem k pevnosti vaječných obalů byly vyzkoušeny tři způsoby homogenizace:

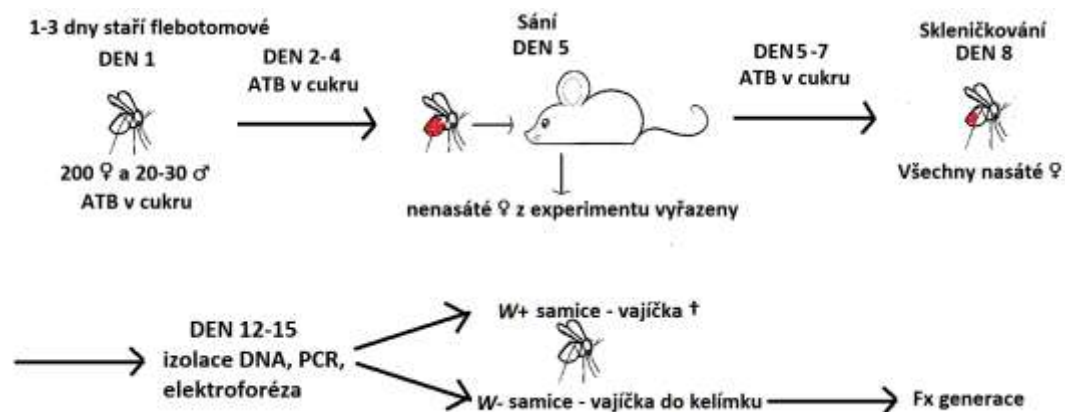
- mechanická homogenizace pomocí elektrického homogenizátoru v malém objemu lyzačního pufru (50 μ l)
- vajíčka v 50 μ l lyzačního pufru nejprve zmrazeny v -80°C po dobu 24 hodin, a poté rozmrazeny a nakonec homogenizovány pomocí homogenizátoru
- zmrazení vajíček tekutým dusíkem, které byly v uzavřených plastových zkumavkách s 50 μ l lyzačního pufru 3 $\times$ ponořeny na 10 s do tekutého dusíku a následně rozmrazeny ponořením do teplé vody a poté homogenizovány pomocí homogenizátoru.

Objem lyzačního pufru ve vzorcích byl doplněn do celkového objemu 200 μ l a poté bylo přidáno 40 μ l proteinázy K (součást izolačního kitu) a takto připravené homogenáty byly inkubovány po dobu 2 hodin, při 54°C . Poté byla izolována DNA kitem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), při které byl dodržován postup uváděný výrobcem. DNA bylo nakonec eluováno do 15 – 40 μ l elučního pufru. Kontrolou úspěšné izolace DNA ze snůšky vajíček byla PCR amplifikace 739 bp velkého úseku mitochondriálního genu pro podjednotku I cytochrom c oxidázy, jež je univerzálním markerem pro skupiny bezobratlých živočichů, za použití univerzálních primerů; LCO (forward) o sekvenci (5' – GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG – 3') a HCO (reverse) o sekvenci (5' – TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA – 3') (Folmer et al., 1994). Průběh PCR cyklu byl následující; 94°C – 2:30 min, 5 $\times$ (94°C – 30 s, 45°C – 1 min, 72°C – 1 min), 35 $\times$ (94°C – 30 s, 51°C – 30 s, 72°C – 1 min), 72°C – 5 min.

Samice a jejich snůšky vajíček byly následně podrobeny testování na přítomnost bakterií pomocí PCR a výsledky byly zobrazeny pomocí gelové elektroforézy na 1% agarózovém gelu (kapitola 3.2.1).

3.4.2 F1 generace flebotomů: podávání antibiotik v roztoku cukru

V léčbě s antibiotiky se pokračovalo u 200 samic F1 generace, které vylétly během jednoho týdne, a s 20 – 30 samci. Experiment byl modifikován následovně (viz Obr. 8). Antibiotikum bylo podáváno v cukru před nasátím krve (den 1 - 4), ale i po sání (den 5-7).



Obr. 8: Schéma experimentu u F1/F2 generace flebotomů.

Osmý den experimentu byly všechny nasáté samice opět „zaskleničkovány“. Ze samic, které vykladly snůšku vajíček, byla izolována DNA, a snůšky vajíček *W+* samic (zjištěno pomocí PCR viz 3.2.1) byly zlikvidovány. Vajíčka, jejichž samice byly *W-*, byla poté pomocí štětečku přesunuta do připravených umělohmotných kelímků vylitých sádrou. Tyto kelímky byly poté umístěny do beden s navlhčeným pískem a dány do chovných místností do 26 °C a drženy až do dospělců F2 generace dle Volf & Volfová (2011), se kterými bylo stejné schéma experimentu (viz Obr. 8.) zopakováno.

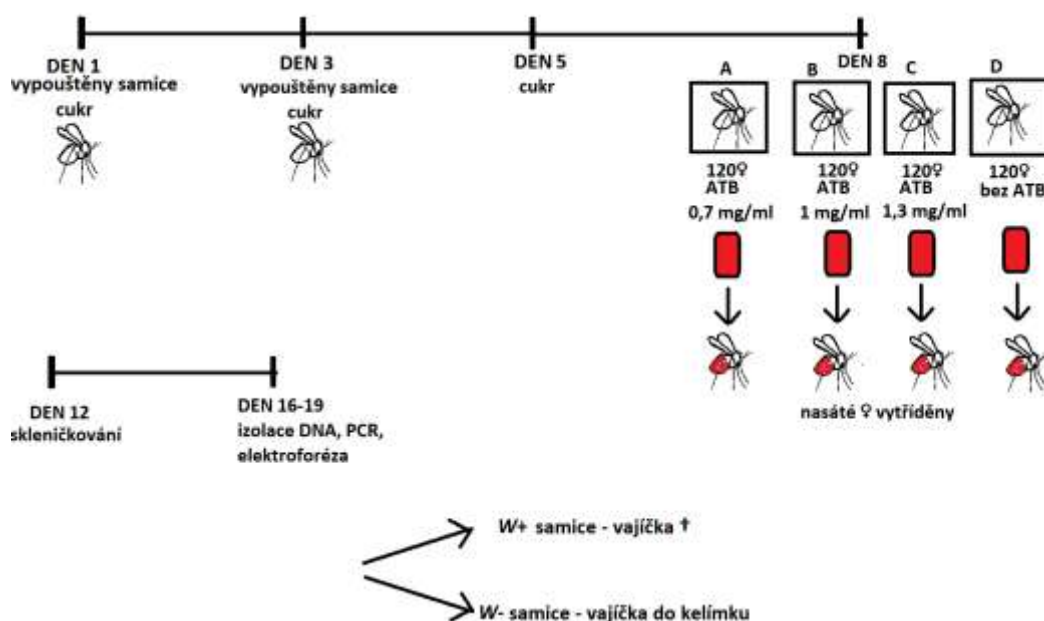
3.4.3 F0 generace flebotomů: podávání antibiotik do krve

Během experimentu byly vyzkoušeny tři různé koncentrace (0,7, 1 a 1,3 mg/ml) antibiotik přidávaných do krve. Složení roztoku krve s antibiotiky pro všechny studované koncentrace je zapsáno v Tab. 6.

Tab. 6: Složení roztoku krve a antibiotik používaného při experimentech.

Skupina A 0,7 mg/ml		Skupina B 1 mg/ml		Skupina C 1,3 mg/ml		Skupina D (kontrolní) bez ATB	
Složka	Množství	Složka	Množství	Složka	Množství	Složka	Množství
ATB	159 µl	ATB	222 µl	ATB	283 µl	—	—
0,85% NaCl	124 µl	0,85% NaCl	61 µl	0,85% NaCl	—	0,85% NaCl	283 µl
Krev	2717 µl	Krev	2717 µl	Krev	2717 µl	Krev	2717 µl

Tři až šest dnů staré samice flebotomů druhu *P. perniciosus* byly vypuštěny do jedné společné sítě a umístěny do chovné místnosti do 26 °C. Těmto jedincům byl během pěti dnů třikrát vyměněn roztok cukru, a pravidelně jim byla kontrolována vlhkost. Osmý den experimentu, byly samice odděleny do 4 malých sítěk (A, B, C, D) po 120 samicích. Skupina A – C byla pokusná (byla podána antibiotika do krve o koncentracích 0,7, 1 a 1,3 mg/ml) a skupina D kontrolní (Tab. 6). Schéma experimentu je zobrazeno na Obr. 9.



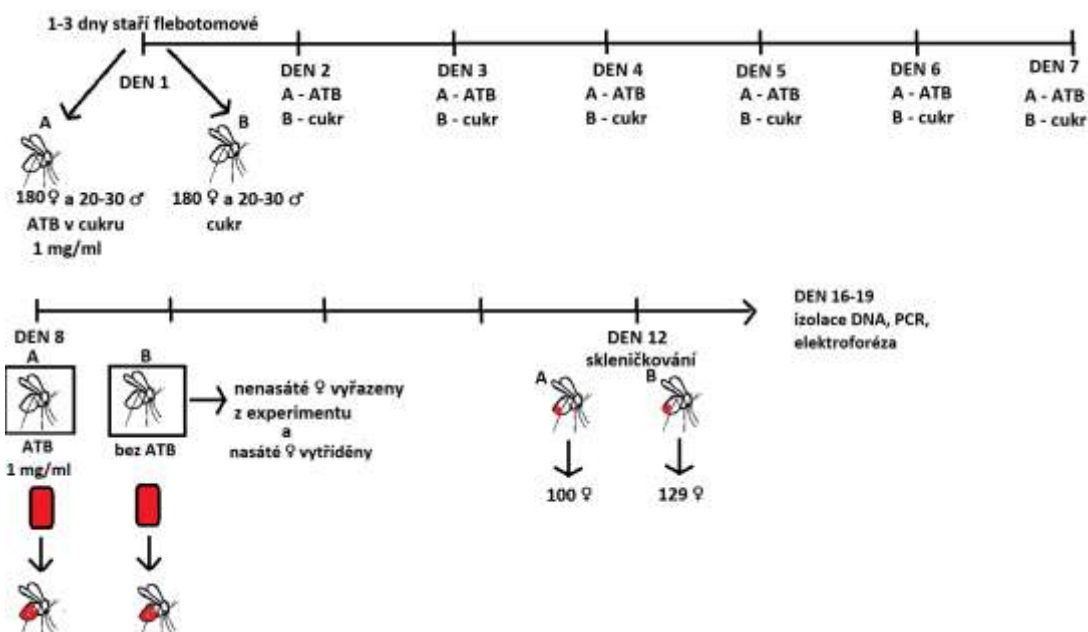
Obr. 9: Schéma experimentu přidání ATB do krve.

Inaktivovaná beraní krev s antibiotiky byla naplněna do skleněných krmítek, potažených kuřecí membránou. Krmítka byla napojena na vodní lázeň s vnější cirkulací (37 °C). Samice sály v šeru po dobu 1,5 hodiny. Nasaté samice byly odděleny do sítěk do termostatu (26 °C), kam jim byl dán cukr bez antibiotik, a kontrolována vlhkost.

Dvanáctý den experimentu byly samice pokusných skupin jednotlivě „zaskleníčkovány“ bez dalšího přístupu k cukernému zdroji. Po uplynutí cca 4 – 7 dnů byly vykladené samice odebrány na izolaci DNA a detekci přítomnosti genu *wsp* pomocí PCR amplifikace (kapitola 3.2.1). Na základě výsledků z elektroforézy byly všechny snůšky *Wolbachia*-negativních samic zakelímkovány do společného kelímku.

3.4.4 F0 generace flebotomů: podávání antibiotik v cukru a krvi

Na základě neuspokojivých výsledků předešlých experimentů, byla u *W+* populace vyzkoušena kombinace antibiotik v cukru a krvi. Koncentrace tetracyklinu byla v obou případech 1 mg/ml. Použité schéma pokusů vzniklo kombinací dvou předešlých schémat experimentů (Obr. 10), podrobněji popsanych v kapitole 3.4.2 a 3.4.3.



Obr. 10: Podání antibiotik v krvi a cukru.

Pokusné skupině byl po dobu 7 dnů podáván tetracyklin (1 mg/ml) v roztoku cukru, zatímco kontrolní skupině pouze cukr. Osmý den experimentu byly obě skupiny nasáty na krmítkách potažených kuřecí kůžičkou, ve kterých bylo pro pokusnou skupinu do krve o celkovém objemu 3 ml přimícháno antibiotikum o koncentraci 1 mg/ml (222 μ l ATB, 61 μ l fyziologického roztoku, 2717 krve), a skupina kontrolní se mohla nasát na roztoku krve s fyziologickým roztokem (283 μ l fyziologického roztoku a 2717 μ l krve). Nenasáté samice byly z experimentu vyřazeny.

Dvanáctý den experimentu bylo 100 přeživších samic pokusné skupiny, a 129 samic ze skupiny kontrolní zaskleničkováno. Po vykladení vajíček do skleniček byla ze samic vyizolována DNA a provedena PCR amplifikace genu *wsp* (viz kapitola 3.2.1).

3.5 Detekce bakterií *Asaia* sp. u laboratorně chovaných samic flebotomů

Všechny laboratorně chované kolonie flebotomů (Tab. 4, str. 24) byly podrobeny i testování na přítomnost bakterií rodu *Asaia* sp.

Z každé kolonie byly testovány čerstvě vylíhlé samice (15 samic rozdělených do tří vzorků po pěti), ze kterých byla vyizolována DNA pomocí kitu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Eluovaná DNA byla poté využita k PCR amplifikaci části genu kódující podjednotku 16S rRNA a výsledky byly zobrazeny pomocí elektroforézy (viz kapitola 3.2.1).

3.6 Experimentální infekce flebotomů bakterií *Asaia krungthepensis*

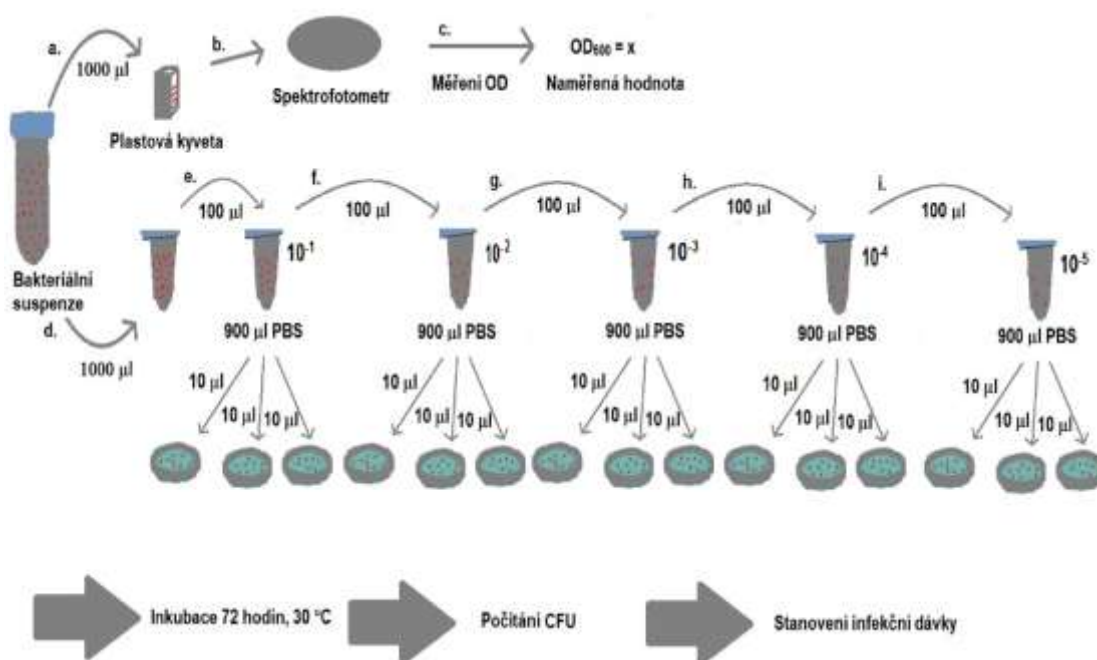
Vzhledem k tomu, že z laboratorně chovaných kolonií flebotomů nebyla ani jedna pozitivní na přítomnost *Asaia* sp., byla provedena experimentální infekce flebotomů touto bakterií. K tomuto experimentu byla vybrána kolonie *Phlebotomus duboscqi* a k infekcím byl použit druh bakterií

Asaia krungthepensis, původně vyizolovaný z tropické rostliny *Heliconia* sp. v Thajsku (Yukphan et al., 2004). Použitý izolát (7333^T) pochází z České sbírky mikroorganismů (CCM) v Brně. Bakterie byly v laboratoři rozočkovány na několik dalších ploten se selekčním médiem (Acetobacter – glukonobacter médium) a po dobu 72 hodin inkubovány v termostatu při 30 °C. Takto narostlé kultury byly uchovávány v chladničce po dobu maximálně 5 týdnů před dalším očkováním.

3.6.1 Stanovení infekční dávky bakterií

Nejdříve bylo nutné standardizovat metodu stanovení množství bakterií v 1 ml média pomocí měření optické denzity. Pro určení infekční dávky byly nezbytné následující kroky:

- kultivace bakterií v tekutém médiu
- stanovení koncentrace buněk v bakteriální suspenzi měřením optické denzity (OD_{600}) spektrofotometrem
- ředění kultury a inokulace bakterií na plotny
- počítání životaschopných bakterií, tzv. colony forming units (CFU) v 1 ml bakteriální suspenze.



Obr. 11: Schéma stanovení infekční dávky bakterií.

Kultura bakterií z tuhého média byla přeočkována do 50 ml centrifugační zkumavky „falkony“ se 40 ml LB nebo GLY tekutého média s cílem zjistit, které z nich je pro kultivaci vhodnější. Roztok byl inkubován na třepačce (200 rpm, 30 °C) s pootevřeným víčkem (kvůli

přístupu kyslíku) a 6, 24, 30, 48, 50, 54 a 72 hodin od zahájení inkubace byla měřena optická densita (Obr. 11, a. – c.).

V každém časovém intervalu byla ve sterilním boxu z buněk připravena ředící řada od 10^{-1} do 10^{-5} v 900 μ l sterilního PBS (Obr. 11, e. – i.). Deset μ l této směsi bylo nanášeno na plotny a rozetřeno sterilní bakteriologickou hokejkou tak, aby jednotlivé kolonie narostly odděleně, a bylo jednoduché je počítat.

Při očkování ploten se pracovalo se vzorky v tripletech. Agarové plotny s takto naočkovanými bakteriemi byly následně kultivovány ve 30 °C a po 72 hodinách spočítány kolonie (CFU). Pro vyhodnocení byly vždy zvoleny tři plotny z jednoho (popřípadě ze dvou) vhodných ředění (plotny s 20 – 200 koloniemi). Počty kolonií ze tří misek konkrétního ředění byly vždy sečteny, zprůměrovány, a celkový počet CFU v 1 ml tekutého média byl dopočítáván podle následujícího vzorce;

$\text{CFU / ml} = \text{počet kolonií} \times \text{hodnota ředění (s kladným exponentem)} \times 10^2 \text{ (očkováno 10 } \mu\text{l)}$

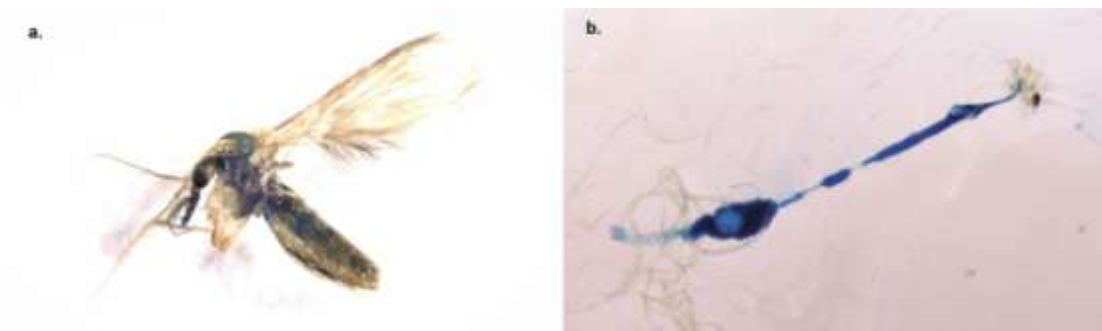
Tyto experimenty byly provedeny v třech nezávislých opakováních a na základě jejich výsledků byla zvolena infekční dávka bakterií $1,7 - 4 \times 10^8$ CFU / ml, což odpovídalo $\text{OD}_{600} = 0,5$.

3.6.2 Příprava infekčního roztoku cukru s bakteriemi

Pro infekci flebotomů byl následně připraven 20% roztok cukru obarvený modrým potravinářským barvivem (AROMA a.s.) a přefiltrovaný membránovým filtrem (0,22 μ m) Millex® GP (Sigma-Aldrich). Modré potravinářské barvivo lze vidět přes kutikulu flebotomů, tudíž později posloužilo jako indikátor nasátých/nenasátých samic na cukru (viz Obr. 12).

Před každou experimentální infekcí byly bakterie kultivovány v tekutém médiu na třepačce (200 rpm, 30 °C) po dobu 50 hodin, což po předešlém měření optické density odpovídalo hodnotě roztoku $\text{OD}_{600} = 0,5$ a tudíž i stanovené infekční dávce.

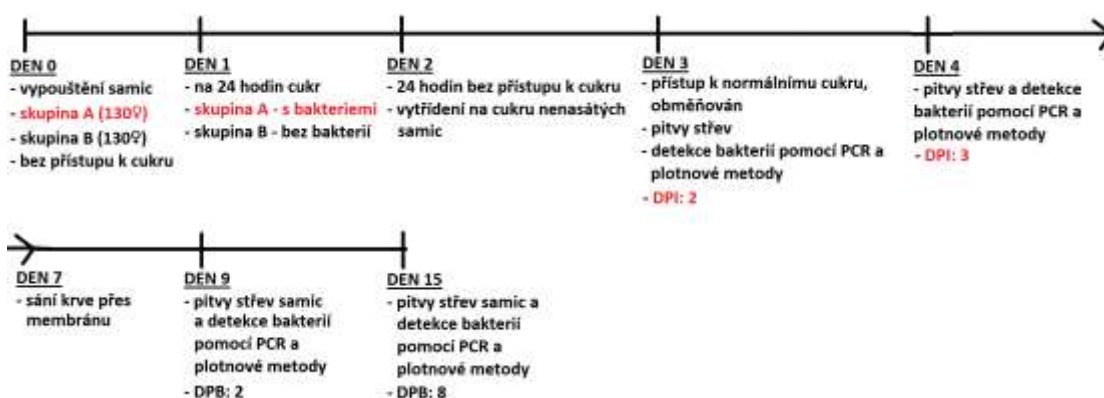
Z takto narostlé bakteriální suspenze byl odebrán 1 ml a buňky byly poté centrifugovány po dobu 5 minut při rychlosti 6 500 rpm. Následně byl odebrán supernatant, vzniklý pelet resuspendován v 1 ml PBS, a tímto způsobem byly buňky dvakrát promyty. Celý objem resuspendovaných bakterií v PBS byl smíchán s připraveným obarveným roztokem cukru a byl flebotomům podáván na smotku vaty. Cukr, který byl podáván skupině samic sloužících jako negativní kontrola, byl ve stejném poměru, smíchán s čistým PBS bez bakterií.



Obr. 12: Obarvený cukerný roztok po nasátí flebotomem – **a.** modré barvivo prosvítající přes kutikulu flebotomů; **b.** vypitvané střevo (Kristina Sovová).

3.6.3 Experimentální infekce a přežívání *A. krungthepensis* ve flebotomech

Nejdříve bylo nutné otestovat, zda *A. krungthepensis* po infekci ve flebotomech přežívá, a proto byl proveden následující experiment (Obr. 13).



Obr. 13: Časové schéma experimentální infekce flebotomů bakteriemi a sání na krmítku (skupině A byl podáván infekční cukr s bakteriemi a skupině B byl podáván obarvený cukr bez bakterií).

Vysvětlivky: DPI – počet dnů po podání infekčního cukru, DPB – počet dnů po nasátí krve

Jeden až tři dny staré samice flebotomů byly vypuštěny a rozděleny do dvou sítěk po 150 jedincích. Den 1, tedy 24 hodin po vypuštění, byl jedné skupině podán obarvený cukr s bakteriemi (skupina A) a druhé skupině (skupina B) cukr bez bakterií.

Flebotomové měli přístup k infekčnímu cukru pouze jednou a to na dobu 24 hodin. Následně byl ze sítěky cukr odebrán a nenasáté samice byly odstraněny. Den 2 experimentu byly samice bez přístupu k cukernému zdroji, a den 3 byl samicím dán v chovech běžně používaný (neobarvený) cukr, který byl jednou denně obměňován. 48 a 72 hodin po podání infekčního cukru (DPI: 2 a DPI: 3) bylo odebráno 10 samic, které byly testovány na přítomnost a přežívání *A. krungthepensis* (viz následující kapitola 3.6.4).

Šestý den po podání infekčního cukru byly zbývající samice nasáty na krmítku s inaktivovanou beraní krví, aby bylo zjištěno, zda bakterie přežívají i sání a následnou defekaci krve. Beraní krev byla nejdříve inaktivována ve vodní lázni po dobu 35 minut při 56 °C a

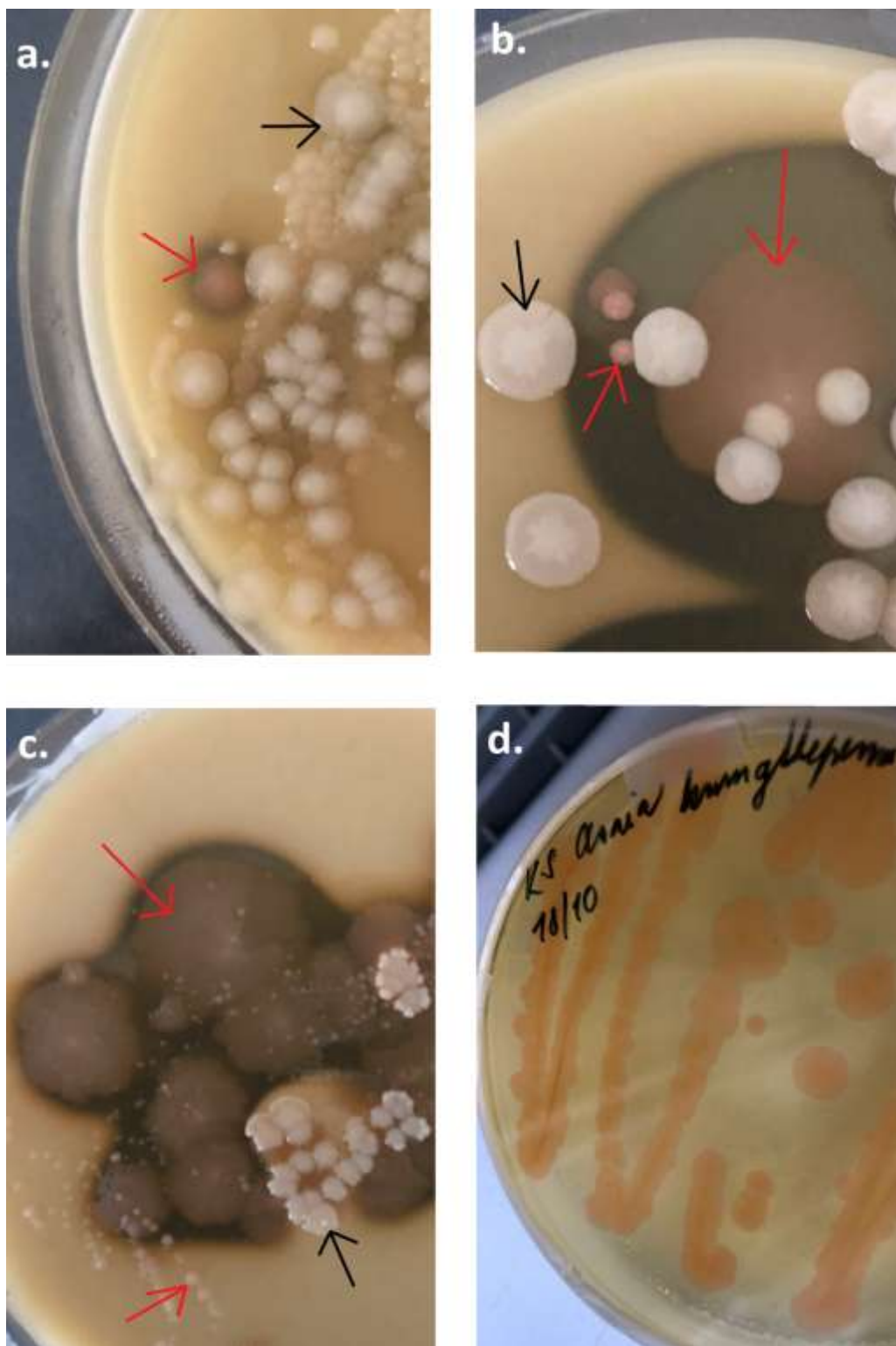
smíchána s fyziologickým roztokem v poměru 1 : 9 (300 µl fyziologického roztoku, 2700 µl krve). Následně proběhlo experimentální sání, jak už bylo popsáno výše (kapitola 3.4.3), a po sání byli flebotomové drženi standardně ve 26 °C s neomezeným přístupem k cukernému zdroji. Druhý a osmý den po sání krve (DPB: 2 a 8) bylo taktéž ze sítěk odebráno 10 samic, s cílem zjistit přítomnost a životaschopnost bakterií (viz následující kapitola 3.6.4).

3.6.4 Detekce bakterií ve střevě samic *P. duboscqi* pomocí PCR a plotnové metody

Samice (odebrané druhý a třetí den po infekci bakteriemi nebo druhý a osmý den po sání (viz výše) byly jednotlivě opláchnuty v destilované vodě se saponátem, následně dvakrát omyty čistou destilovanou vodou a na 15 vteřin ponořeny do 70% roztoku etanolu, aby bylo během pitev zabráněno kontaminaci bakteriemi z povrchu těla flebotomů. Po desinfekci v etanolu byly znovu opláchnuty sterilním fyziologickým roztokem a přeneseny na podložní sklíčko. V kapce fyziologického roztoku byly nejprve pod binokulární lupou pomocí pitvacích nástrojů zbaveny hlavy a poté jim bylo vypitváno střevo, které bylo přeneseno do 100 µl fyziologického roztoku a zhomogenizováno.

Deset µl tohoto homogenátu bylo naočkováno na agarové plotny, které byly kultivovány v termostatu při 30 °C po dobu 72 hodin s cílem zjistit, zda jsou bakterie z vypitvaných střev životaschopné (Obr. 14).

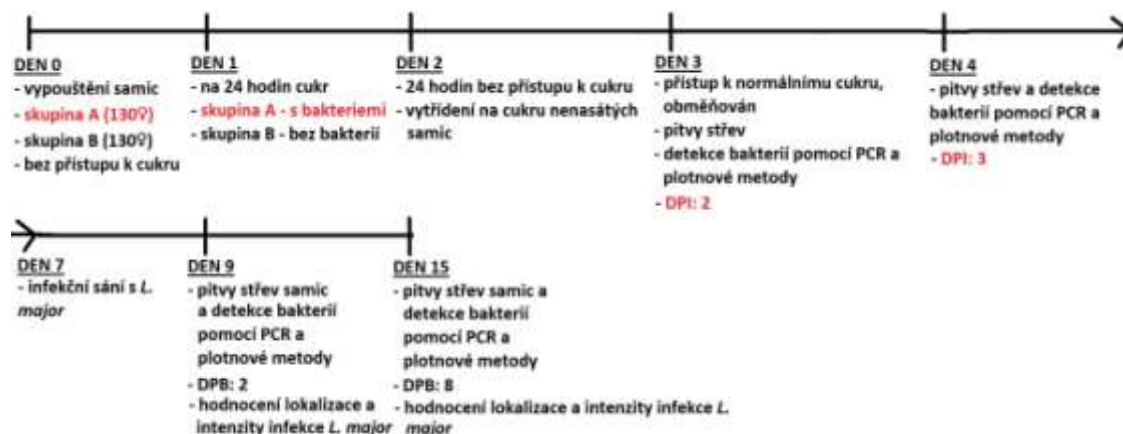
Ke zbylým 90 µl homogenátu bylo přidáno 110 µl lyzačního pufru a z takto připravených vzorků byla následně vyizolovaná DNA pomocí izolačního kitu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Během izolace bylo postupováno dle pokynů výrobce. Izolovaná DNA střev byla nakonec eluována do 40 µl elučního pufru. Vyizolovaná DNA byla poté využita k detekci bakterií *Asaia* sp. pomocí PCR již popsané v kapitole 3.2.1.



Obr. 14: *A. krunghthepensis* na selekčním tuhém médiu, **a. - c.** naočkovaná agarová plotna homogenátem ze střeva samic, **d.** – čistá kultura (skladovaná v 8 °C). Bakterie *A. krunghthepensis* vytváří na agarových plotnách typicky světle růžové až nebarevné kolonie (červené šipky). Ve střevě flebotomů můžeme detekovat i další bakterie z čeledi Acetobacteraceae (černé šipky). Tmavé kruhové útvary (foceno proti tmavému podkladu) okolo kolonií *A. krunghthepensis* jsou v anglické literatuře označovány jako tzv. „haloes“ a vznikají díky solubilizaci uhličitanu, obsaženého v médiu (Favia et al., 2007). V případě skladování kultury v chladničce (8 °C) se barvy kolonií změní na sytější odstíny oranžovo-červené. (Kristina Sovová).

3.7 Flebotomové s bakterií *A. krungthepensis* a jejich experimentální superinfekce s *Leishmania major*

Cílem tohoto experimentu bylo otestovat, zda mají bakterie vliv na vývoj leishmanií ve střevě přenašeče. V první části experimentu bylo nutné nakazit skupinu pokusných samic flebotomů (skupina A) bakteriemi *A. krungthepensis* a samicím kontrolní skupiny byl podáván pouze obarvený cukr bez bakterií (viz kapitola 3.6.3). V druhé části experimentu byla provedena infekce obou skupin leishmaniemi *L. major* (Obr. 15).



Obr. 15: Časové schéma experimentální superinfekce flebotomů bakteriemi *A. krungthepensis* a leishmaniemi *L. major* (skupině A byl podáván infekční cukr s bakteriemi a skupině B byl podáván obarvený cukr bez bakterií, s oběma skupinami bylo provedeno infekční sání).

Vysvětlivky: DPI – počet dnů po podání infekčního cukru s bakteriemi, DPB – počet dnů po infekčním sání

3.7.1 Kultivace leishmanií

Pro infekční sání flebotomů byl použit druh leishmanií *L. major* (MHOM/IL/81/Friedlin/FVI). Minimálně týden před provedením infekčního sání byla kultura leishmanií vymrazena a přeočkována do tekutého média (M199), ve kterém byla následně 3 – 5 dnů kultivována v termostatu v 23 °C.

3.7.2 Infekční sání

Kultura promastigotů stará 3 – 5 dnů byla dvakrát promyta sterilním fyziologickým roztokem. Z promyté kultury bylo odebráno 10 µl a přidáno do 990 µl ředícího roztoku s 1% formaldehydem. Tímto krokem byly leishmanie usmrceny a kultura byla zároveň 100× naředěna. Leishmanie byly spočítány v Bürkerově komůrce (P – lab), mezitím byla ve vodní lázni inaktivována beraní krev při 56 °C po dobu 35 minut. Krev s leishmaniemi byla smíchána v poměru 9: 1 tak, aby byla zajištěna infekční dávka leishmanií 5×10^5 buněk / ml krve.

Poté bylo provedeno infekční sání (experimentální sání viz 3.4.3) samic kontrolní (bez bakterie *A. krungthepensis*) i pokusné skupiny (s bakterií *A. krungthepensis*). Po sání byly

odstraněny nenasáté samice a sítky byly uloženy do termostatu do 26 °C, cukr byl samicím pravidelně obměňován.

3.7.3 Pitvy střev samic

Pitvy střev samic kontrolní a pokusné skupiny probíhaly druhý a osmý den po sání. Samice byly nejprve imobilizovány na ledu, následně byly zbaveny končetin a poté přeneseny do kapky fyziologického roztoku na podložním sklíčku. Pod binokulární lupou bylo vypitváno střevo, přeneseno do nové kapky fyziologického roztoku a překryto krycím sklíčkem. Takto připravený preparát byl prohlédnut pod světelným mikroskopem, a byla hodnocena jak lokalizace leishmanií v rámci střeva, tak intenzita infekce. Intenzita infekce byla rozdělena do čtyř kategorií; bez infekce, slabá infekce (1 – 100 buněk/střevo), střední infekce (100 – 1000 buněk/střevo) a silná infekce (>1000 buněk/střevo) (Myšková et al., 2008).

Zároveň ve stejných intervalech (druhý a osmý den po sání spolu s druhým a třetím dnem po infekci bakteriemi) probíhaly pitvy střev pro detekci na přítomnost bakterií pomocí PCR a plotnové metody (kapitola 3.6.4).

Mimo detekci bakterií ve střevech, a hodnocení intenzity a lokalizace infekce, byly z některých prohlížených preparátů udělány roztěrové preparáty, na kterých byly následně měřeny a porovnávány morfologické formy leishmanií.

3.7.4 Měření morfologickým forem leishmanií

Měření morfologických forem leishmanií proběhlo u obou skupin samic s cílem porovnat možné rozdíly.

Osmý den po infekci byla střeva flebotomů vypitvána a prohlédnuta pod mikroskopem. Střeva, která byla pozitivní na leishmaniovou infekci, byla poté rozmáčknuta a rozetřena na podložním skle pomocí krycího sklíčka. Po zaschnutí (v pokojové teplotě) byla střeva fixována metanolem po dobu 5 minut a pak nabarvena roztokem Giemsa (ředění v poměru 1 : 19 s destilovanou vodou) po dobu 20 minut (Sigma-Aldrich).

Nabarvené preparáty byly prohlíženy pod světelným mikroskopem (Olympus BX51) se zabudovanou kamerou (DP-70) za použití imerzního oleje při 1000× zvětšení. Jednotlivé leishmanie byly poté foceny v programu QuickPHOTO MICRO 2.2 (Olympus). Měření morfologických forem bylo provedeno v počítačovém programu ImageJ (Java), kdy byly vždy zaznamenávány tři následující rozměry; délka bičíku a délka a šířka buňky. Tímto způsobem došlo k měření 150 leishmanií ze tří náhodně vybraných flebotomů, ze skupiny *Asaia* pozitivních (*Asaia*+) a *Asaia* negativních (*Asaia*-) samic. Naměřená data byla nakonec statisticky vyhodnocena a konkrétní morfologické formy byly stanoveny na základě kritérií popsanych ve studii Sádlová et al. (2010).

3.8 Společná kultivace bakterií a leishmanií *in vitro*

Před začátkem společné kultivace bakterií a leishmanií byly nejprve obě kultury kultivovány zvlášť. Kultura bakterií ve 30 °C na třepačce při rychlosti 200 rpm a kultura leishmanií v termostatu při teplotě 23 °C.

Kultura promastigotů stará 2 – 5 dnů a 50 hodin stará kultura bakterií byly následně dvakrát promyty sterilním fyziologickým roztokem. Takto zvlášť připravené buňky bakterií a leishmanií byly společně kultivovány (200 rpm, 26 °C) v tekutém médiu, které bylo připraveno smícháním GLY média a kultivačního média pro leishmanie bez antibiotik, v poměru 1 : 1 o celkovém objemu 1,5 ml. Jako kontrola byla použita kultura leishmanií bez bakterií. Infekční dávky bakterií a leishmanií byly shodné s infekčními dávkami použitých v experimentálních superinfekcích; $1,7 - 4 \times 10^8$ buněk / ml (pro bakterie) a 5×10^5 buněk / ml (pro leishmanie).

Po dobu 6 dnů bylo každých 24 hodin odebráno 10 µl roztoku, $10\times - 100\times$ naředěno a poté byla pomocí počítání promastigotů v Bürkerově komůrce zjištěna koncentrace leishmanií v kontrolní i pokusné kultuře.

3.9 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno za použití programů R software (<http://cran.r-project.org/>) a Statistical Product and Service Solutions (SPSS (Java)). Rozdíl mezi skupinami flebotomů nenakaženými a nakaženými bakteriemi *A. krungthepensis* v lokalizaci a intenzitě infekce *L. major* byl otestován pomocí Fisherova exaktního testu (R software), a rozdíl mezi naměřenými morfologickými formami *L. major* u obou skupin byl analyzován pomocí χ^2 testu (SPSS). Rozdíly v mortalitě a počty vykladených samic byly analyzovány pomocí proporcionálního testu. Za signifikantní byly považovány výsledky s $p < 0,05$.

4 Výsledky

4.1 Prevalence výskytu bakterií *Asaia/Wolbachia* sp. u flebotomů z Balkánského poloostrova

Pomocí PCR bylo otestováno 237 volně žijících flebotomů (145 samic a 92 samců) z oblasti Balkánského poloostrova. Flebotomové pocházeli z pěti vybraných zemí (Bosna a Hercegovina, Bulharsko, Černá Hora, Chorvatsko a Makedonie), celkem ze 40 oblastí a 67 odchytových pastí. Všichni testovaní jedinci patřili do podrodu *Larrousius*, který byl zastoupen třemi druhy: *Phlebotomus neglectus* 38 % (90), *P. perfiliewi* 22,3 % (53) a *P. tobbi* 39,7 % (94).

Bakterie rodu *Wolbachia* sp. byly pomocí PCR detekovány u dvaceti (8,4 %) testovaných flebotomů. Nejvíce pozitivních vzorků (17) pocházelo z Chorvatska, ze šesti různých oblastí, kde všichni pozitivní flebotomové patřili do druhu *P. neglectus* (5 samců a 12 samic). Dále byly pozitivní dvě samice pocházející ze dvou odchytových oblastí Bosny a Hercegoviny (*P. neglectus* a *P. tobbi*), a jeden pozitivní samec *P. perfiliewi*, který byl odchycen v Bulharsku (Tab. 7). U vzorků pocházejících z Černé Hory a Makedonie, nebyly bakterie tohoto rodu detekovány.

Všechny amplifikované vzorky byly sekvenovány a na základě porovnávání sekvencí s databází GeneBank byly detekované bakterie rodu *Wolbachia* rozděleny do dvou skupin. U první skupiny, která byla detekována u všech pozitivních vzorků z Chorvatska (*P. neglectus*) a Bulharska (*P. perfiliewi*), byla nalezena homologie se sekvencí z wolbachie izolované z motýlů druhu *Libythea celtis* (Tagami & Miura, 2004). Druhou skupinou byly wolbachie pocházející z odchytů z Bosny a Hercegoviny (*P. neglectus* a *P. tobbi*), jejichž sekvence byly shodné s druhem wolbachie pojmenované wPrn, a izolované z *P. perniciosus* (Ono et al., 2001).

Bakterie rodu *Asaia* sp. byly pomocí PCR detekovány u šesti (2,5 %) testovaných flebotomů. Čtyři pozitivní samice *P. perfiliewi* pocházely ze dvou různých oblastí v Bulharsku. Dvě pozitivní samice *P. neglectus* byly odchyceny z jedné pasti v Chorvatsku, přičemž u jedné z nich byla zároveň detekována bakterie rodu *Wolbachia* sp. (Tab. 7). *Asaia* sp. nebyla detekována u žádného flebotoma pocházejícího z Bosny a Hercegoviny, Černé Hory či Makedonie.

Sekvenčně se všechny pozitivních vzorky z Bulharska a jeden z Chorvatska (CU10) shodovaly s blíže neidentifikovanou bakterií *Asaia* sp. izolovanou z komára *Anopheles stephensi* (Asgari et al., 2020). U získané sekvence z *P. neglectus* v Chorvatsku (CU2) nebyla nalezena žádná shoda se sekvencemi v databázi GeneBank.

Tab. 7: Seznam terénních vzorků pozitivních na přítomnost bakterií rodu *Wolbachia* sp. (W+) a *Asaia* sp. (A+) pomocí PCR.

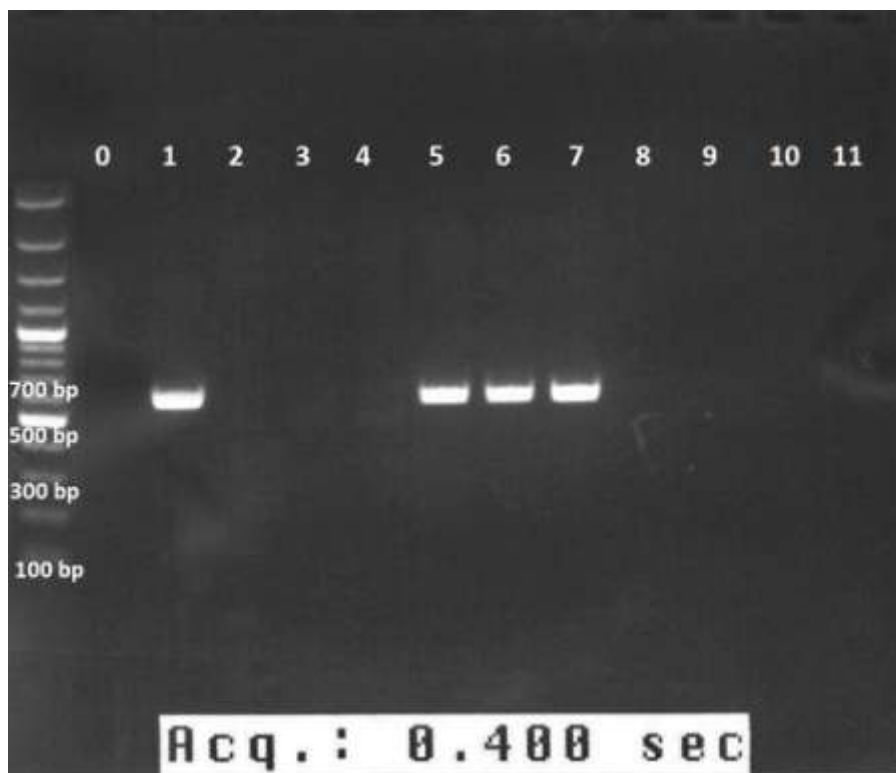
Země	Vzorek	Lokalita	Past	Druh	Pohlaví	A+	W+
Bosna a Hercegovina	BC15	Svacici	Svacici 2	<i>P. neglectus</i>	♀	Neg	poz
	BS46	Svitava	Svitava 7	<i>P. tobbi</i>	♀	Neg	poz
Celkem testováno		59	Celkem pozitivních		0	2	
Bulharsko	BHA15	Harsovo	Harsovo 1	<i>P. perfiliewi</i>	♀	poz.	neg.

	BHA58	Harsovo	Harsovo 2	<i>P. perfiliewi</i>	♂	neg.	poz.
	BRA1	Razhdak	Razhdak 1	<i>P. perfiliewi</i>	♀	poz.	neg.
	BRA2	Razhdak	Razhdak 5	<i>P. perfiliewi</i>	♀	poz.	neg.
	BRA3	Razhdak	Razhdak 5	<i>P. perfiliewi</i>	♀	poz.	neg.
Celkem testováno		66	Celkem pozitivních		4	1	
Černá Hora							
Celkem testováno		20	Celkem pozitivních		0	0	
Chorvatsko	CE10	Vidonje	Vidonje 1-4	<i>P. neglectus</i>	♀	neg.	poz.
	CJ2	Jasenice	Jasenice 5	<i>P. neglectus</i>	♀	neg.	poz.
	CJ3	Jasenice	Jasenice 5	<i>P. neglectus</i>	♀	neg.	poz.
	CJ4	Jasenice	Jasenice 5	<i>P. neglectus</i>	♀	neg.	poz.
	CJ7	Jasenice	Jasenice 5	<i>P. neglectus</i>	♀	neg.	poz.
	CK19	Kosa	Kosa 1	<i>P. neglectus</i>	♀	neg.	poz.
	CT25	Šumet	Šumet 1-3	<i>P. neglectus</i>	♀	neg.	poz.
	CT26	Šumet	Šumet 1-3	<i>P. neglectus</i>	♀	neg.	poz.
	CT27	Šumet	Šumet 1-3	<i>P. neglectus</i>	♂	neg.	poz.
	CT30	Šumet	Šumet 1-3	<i>P. neglectus</i>	♀	neg.	poz.
	CT31	Šumet	Šumet 1-3	<i>P. neglectus</i>	♀	neg.	poz.
	CU2	Gruda	Gruda 1	<i>P. neglectus</i>	♀	poz.	poz.
	CU5	Gruda	Gruda 1	<i>P. neglectus</i>	♂	neg.	poz.
	CU8	Gruda	Gruda 1	<i>P. neglectus</i>	♂	neg.	poz.
	CU9	Gruda	Gruda 1	<i>P. neglectus</i>	♀	neg.	poz.
	CU10	Gruda	Gruda 1	<i>P. neglectus</i>	♀	poz.	neg.
	CZ24	Zvekovic	Zvekovic 2	<i>P. neglectus</i>	♂	neg.	poz.
	CZ25	Zvekovic	Zvekovic 2	<i>P. neglectus</i>	♂	neg.	poz.
Celkem testováno		47	Celkem pozitivních		2	17	
Makedonie							
Celkem testováno		45	Celkem pozitivních		0	0	
Celkem otestováno		237	Celkem pozitivních		6	20	

4.2 Detekce bakterií *Wolbachia* sp. u laboratorně chovaných samic flebotomů

Z každé kolonie bylo odebráno 15 samic, které byly po 5 jedincích rozděleny do tří vzorků. Celkem tak bylo testováno 36 vzorků. Bakterie *Wolbachia* sp. byly detekovány pomocí PCR a výsledný PCR produkt byl vyhodnocen pomocí elektroforézy a zobrazen pod UV světlem (Obr. 16).

Ze všech otestovaných laboratorně chovaných druhů flebotomů (Tab. 4, str. 24), byla pozitivní pouze kolonie *P. perniciosus*. Na základě porovnávání získaných sekvencí s databází GeneBank, byla nalezena shoda sekvencí s wolbachii izolovanou z *P. perniciosus* (wPrn) (Ono et al., 2001).



Obr. 16: Detekce PCR produktu u tří laboratorně chovaných kolonií, **0** – negativní kontrola, **1** – pozitivní kontrola (DNA z pozitivního *Culex pipiens*), **2 – 4** - *P. arabicus*, **5 – 7** - *P. perniciosus*, **8 – 11** – *P. argentipes*.

4.2.1 Prevalence a tkáňová specifita bakterií rodu *Wolbachia* u *P. perniciosus*

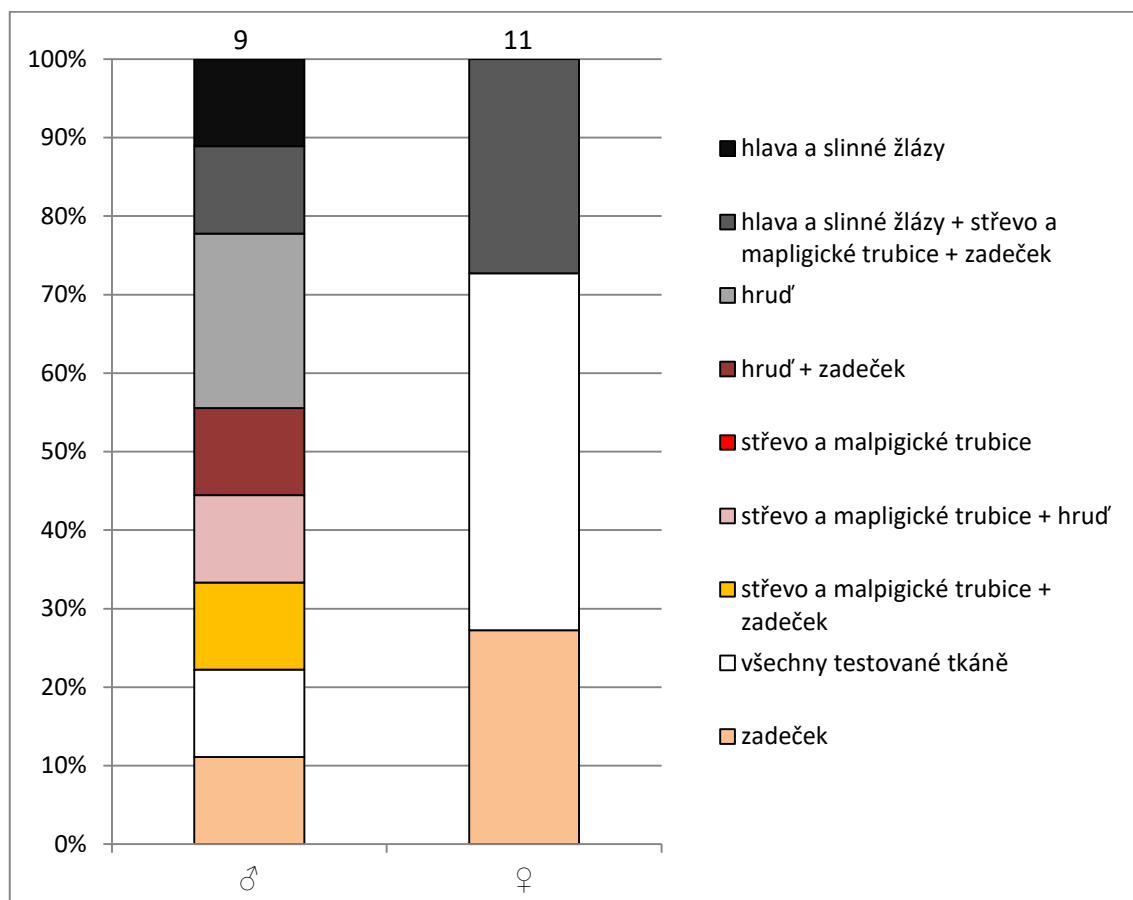
Na základě výsledků předešlého experimentu byla kolonie *P. perniciosus* podrobena detailnějšímu zkoumání. Pro zjištění prevalence wolbachii bylo celkově otestováno 150 jedinců (75 samic a 75 samců). Ze všech 150 testovaných jedinců bylo 88,6 % (133) pozitivních (*W*+), kdy zastoupení pozitivních samic (67 ze 75) bylo jen o 1 % vyšší než zastoupení nakažených samců (66 ze 75).

Pro zjištění tkáňové specifity wolbachii bylo celkem otestováno 24 jedinců (12 samic a 12 samců), jejichž těla flebotomů byla rozdělena na 4 vzorky - hlava a slinné žlázy, střevo a malpigické trubice, hrud' s křídly, a zadeček (u samic i ovaria). Celkem bylo tedy otestováno 96 vzorků. Výsledky jsou shrnuty v grafu (Obr. 17). Dva samci a jedna samice byli *W*- a proto nebyli do hodnocení dat zařazeni.

U pozitivních samců byly wolbachie 2× detekovány pouze z hrudi, 1× pouze ze slinných žláz a hlavy a 1× ze zadečku, ale nikdy nebyly detekovány pouze ze střeva a malpigických trubic. Zbytek detekovaných wolbachii pocházel z různých tělních tkání najednou v různých kombinacích.

U pozitivních samic byly wolbachie, na rozdíl od samců, nejčastěji detekovány ve všech testovaných tkáních, a to u 45,4 % (5 z 11). U tří samic (27,3 %) se wolbachie nacházely ve všech tkáních kromě hrudi, u tří (27,3 %) byly lokalizovány pouze v zadečku a ovariích. U

žádné ze samic nebyly wolbachie detekovány pouze ze slinných žláz a hlavy, hrudi, či ze střeva s malpigickými trubicemi.



Obr. 17: Tkáňová lokalizace wolbachii u samic (♀) a samců (♂) *P. perniciosus*. Čísla nad sloupci značí počet *W*+ jedinců, *W*- jedinci nebyli do hodnocení dat zařazeni.

4.3 Experimentální eliminace bakterií rodu *Wolbachia* z populace *P. perniciosus*

4.3.1 Podávání antibiotik v roztoku cukru

Antibiotika o koncentraci 1 mg/ml byla podána 130 samicím F0 generace flebotomů. Během experimentu byly zaznamenávány počty mrtvých samic a porovnávány s počty mrtvých kontrolní skupiny. U samic obou skupin byla mortalita 7,7 % (10 ze 130), tudíž podání antibiotik u F0 generace vylétujících jedinců nemělo žádný vliv na jejich mortalitu během experimentu v porovnání s kontrolní skupinou, a proto dále nebyly počty mrtvolek u F1 a F2 generace zaznamenávány ($p = 1$).

Přítomnost/nepřítomnost bakterií byla testována pouze u samic, které vykládly snůšku vajíček. V experimentu bylo u obou skupin nasátých samic „zaskleničkováno“ 40. Z nasátých samic pokusné skupiny vykladlo vajíčka 52,5 % (21 ze 40) ze skupiny kontrolní pouze 37,5 % (15 ze 40). Rozdíl v počtu vykladených samic nebyl signifikantní ($p = 0,26$) (Tab. 8).

Tab. 8: Zaznamenaná data u samic pokusné (ATB v cukru) a kontrolní (cukr bez ATB) skupiny.

	F0 pokusná skupina	F0 kontrolní skupina
celkem ♀	130	130
počet mrtvých ♀	10	10
zaskleníčkováno ♀	40	40
vykladeno ♀	21	15

→ mortalita 7,7 %

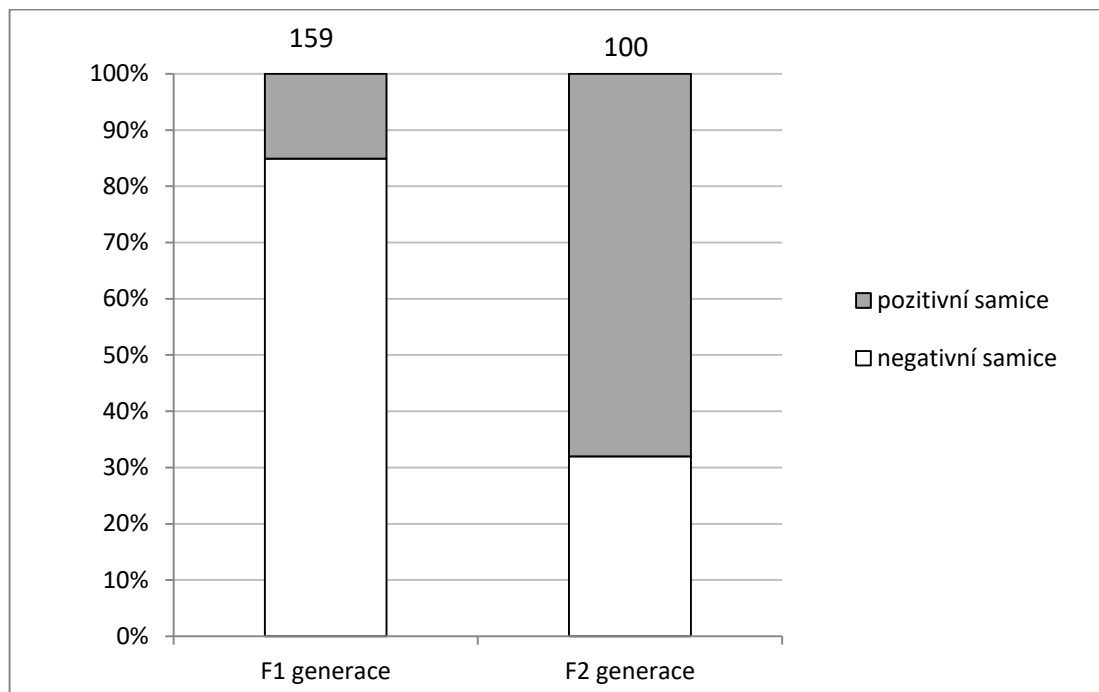
Vykladené samice a jejich snůška vajíček byly rozděleny do tří skupin o stejném počtu (pokusná skupina po 7 a kontrolní po 5), a u každé z nich byl vyzkoušen jiný postup homogenizace vajíček. DNA se podařila izolovat pouze u vajíček, které byly nejdříve zmrazeny tekutým dusíkem a po rozmrazení mechanicky homogenizovány. Nicméně, i přes úspěšnou izolaci DNA (potvrzeno díky amplifikaci úseku mitochondriálního genu pro podjednotku I cytochrom c oxidázy) se gen *wsp* wolbachii u vajíček nepodařilo detekovat ani u skupiny kontrolní. Nebylo tedy možné zjistit, zda byla eliminace wolbachii antibiotiky úspěšná, a proto bylo s podáváním antibiotiky pokračováno i u F1 a F2 generace.

U F1 a F2 generace bylo antibiotikum podáváno v cukru 200 samicím. Z 200 samic F1 generace se nasálo 180 samic a z nasátých samic se vykladlo 85,9 % (159 ze 180). U F2 generace léčených flebotomů, se z nasátých samic vykladlo pouze 62,5 % z nich (100 ze 160) (Tab. 9).

Tab. 9: Počty samic v experimentu podání antibiotik v cukru u F1 a F2 generace flebotomů.

	F1 generace	F2 generace
celkem ♀	200	200
nasáté ♀	180	160
nasáté vykladené ♀	159	100
vykladené W+ ♀	24	68
vykladené W- ♀	135	32

Testovány na přítomnost/nepřítomnost bakterií *Wolbachia* sp. byly pouze samice, které vykládly svoji snůšku vajíček. Nevykladené a nenasáté samice nebyly do hodnocení dat zařazeny. Z otestovaných samic F1 generace bylo 84,9 % (135 ze 159) *W*-, a u F2 generace bylo 32 % (32 ze 100) *W*- (Obr. 18).



Obr. 18: Výsledky eliminace *Wolbachia* sp. u samic podáním antibiotik o koncentraci 1 mg/ml v cukru. Čísla nad sloupce značí celkový počet otestovaných samic na přítomnost/nepřítomnost bakterií.

U následující (F3) generace došlo k úmrtí většiny larev třetího instaru, a proto muselo být užití antibiotiky v cukru ukončeno.

4.3.2 Podávání antibiotik v krvi

Antibiotika o třech různých koncentracích (0,7, 1 a 1,3 mg/ml) byla podávána třem skupinám flebotomů v krvi, sáním přes membránu (A, B, a C). Čtvrtá skupina (D) sloužila jako kontrola (sání na krvi bez antibiotik).

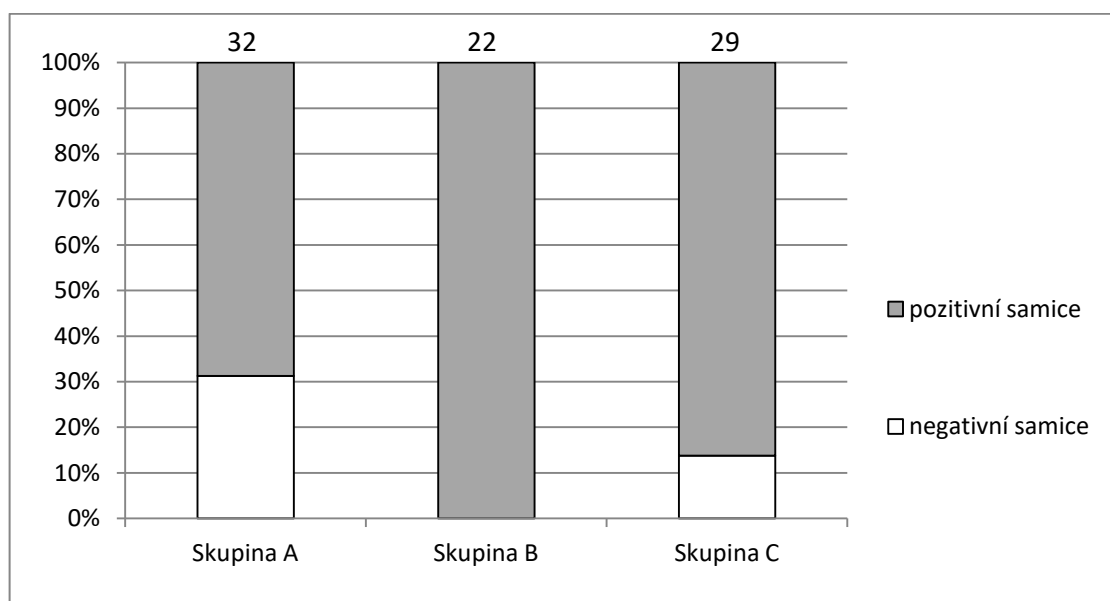
Po sání krve s antibiotiky byly po dobu 4 dnů zaznamenávány počty mrtvých jedinců (skupiny A, B a C) a porovnávány s počty mrtvých jedinců kontrolní skupiny D, která sála krev bez antibiotik (Tab. 10). U samic, kterým byla antibiotika podávána, nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl v mortalitě oproti samicím kontrolní skupiny ($p = 0,83$). Kontrolní skupina nasátých samic (skupina D) nebyla dále v tomto experimentu testována.

Tab. 10: Mortalita samic během 1. – 4. dnu po sání krve s antibiotiky (skupina A, B a C) a bez antibiotik (skupina D), počty vykladených *W*⁺ a *W*⁻ samic.

	počet nasátých ♀	počet nasátých mrtvých ♀	% mortalita ♀	z nasátých vykladeno ♀	vykladené <i>W</i> ⁺	vykladené <i>W</i> ⁻
skupina A	95	15	15,79%	32	22	10
skupina B	105	20	19,05%	22	22	0
skupina C	109	19	17,43%	29	25	4
skupina D	104	19	18,27%	-	-	-

Nasáté samice pokusných skupin byly „zaskleničkovány“. U skupiny A se z nasátých samic vykladlo do skleniček 40 % (32 z 80). U skupiny B se z nasátých samic vykladlo pouze 25,8 % (22 z 85), a u skupiny C z nasátých vykladlo svoji snůšku vajíček 32,2 % (29 z 90) samic. Mezi skupinami nebyl prokázán signifikantní rozdíl v počtu vykladených samic ($p = 0,15$).

Na přítomnost/nepřítomnost bakterií byly otestovány pouze nasáté samice, které vykladly svoji snůšku vajíček. Ve skupině A bylo negativních 31,3 % (10 ze 32) samic, u skupiny B nebylo použití antibiotik úspěšné u žádné z testovaných samic, a ve skupině C bylo negativních pouze 13,8 % (4 z 29) samic (Obr. 19).



Obr. 19: Výsledky eliminace bakterií *Wolbachia* sp. u vykladených samic flebotomů podáním antibiotik v krvi o koncentraci v skupině A – 0,7 mg/ml, B – 1 mg/ml a C – 1,3 mg/ml. Čísla nad sloupce značí počet otestovaných samic v experimentu.

Vzhledem k nízkým počtům *W*⁻ jedinců v pokusných skupinách, nebylo možné s pokusy u F1 generace dále pokračovat.

4.3.3 Kombinace podávání antibiotik v cukru a krvi

Byla využita kombinace podání antibiotik do cukru a krve o koncentraci 1 mg/ml. Během experimentu byly porovnávány počty mrtvých jedinců v pokusné a kontrolní skupině. Během

příjmu antibiotik v cukru (den 1 – 7), nebyl prokázán efekt podávaných antibiotik na mortalitu dospělých samic ($p = 1$). Po sání krve (den 8 – 12) však došlo u pokusné skupiny ke zvýšení mortality: proto pouze 66,6 % (100 ze 150) samic bylo zaskleníčkováno a z nich svoji snůšku vykladlo 43 % (43 ze 100). Pouze dvě samice z pokusné skupiny byly *W-*. Oproti tomu u kontrolní skupiny bylo zaskleníčkováno 86 % samic (129 ze 150), a snůšku vykladlo 48 % (62 ze 129) z nich (Tab. 11). Mezi oběma skupinami nebyl však prokázán signifikantní rozdíl v mortalitě ($p = 0,22$), ani v počtu vykladených samic ($p = 0,89$).

Kvůli nízké úspěšnosti léčby, a vysoké mortalitě samic po sání krve, byl experiment ukončen jako neúspěšný.

Tab. 11: Počty samic během experimentu podávání antibiotik do krve a cukru.

	F0 pokusná skupina	F0 kontrolní skupina
celkem ♀	180	180
mrtvé ♀ (den 1 -7)	5	5
nasáté ♀	150	150
mrtvé ♀ (den 8-12)	50	21
nasáté vykladené ♀	43	62
vykladené <i>W-</i>	2	0
vykladené <i>W+</i>	41	62

4.4 Detekce bakterií *Asaia* sp. u laboratorně chovaných samic flebotomů

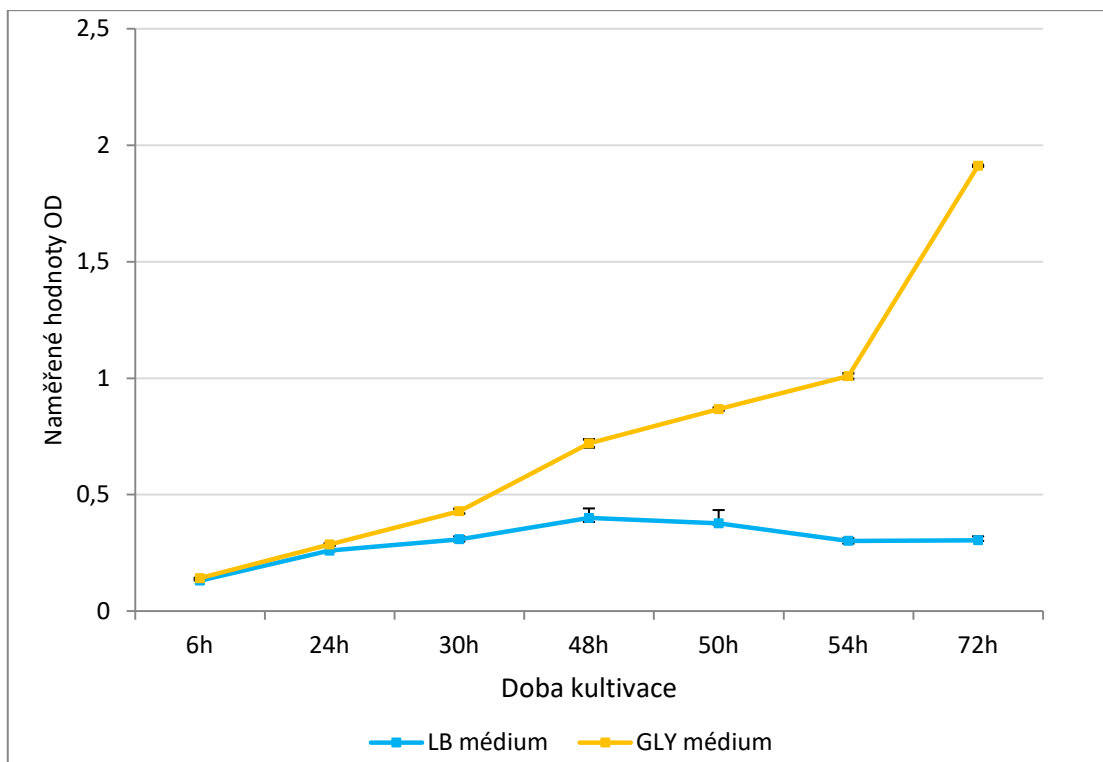
Pro detekci bakterií rodu *Asaia* sp. u laboratorně chovaných flebotomů, byly využity stejné vzorky jako u detekce bakterií rodu *Wolbachia* sp. (viz kapitola 4.2). Z každého druhu laboratorně chovaných flebotomů bylo odebráno 15 samic, které byly po 5 jedincích rozděleny do tří vzorků. Celkem tak bylo testováno 36 vzorků. Ani u jednoho z druhů nebyla tato bakterie pomocí PCR detekována.

4.5 Experimentální infekce flebotomů bakterií *A. krungthepensis* u samic *P. duboscqi*

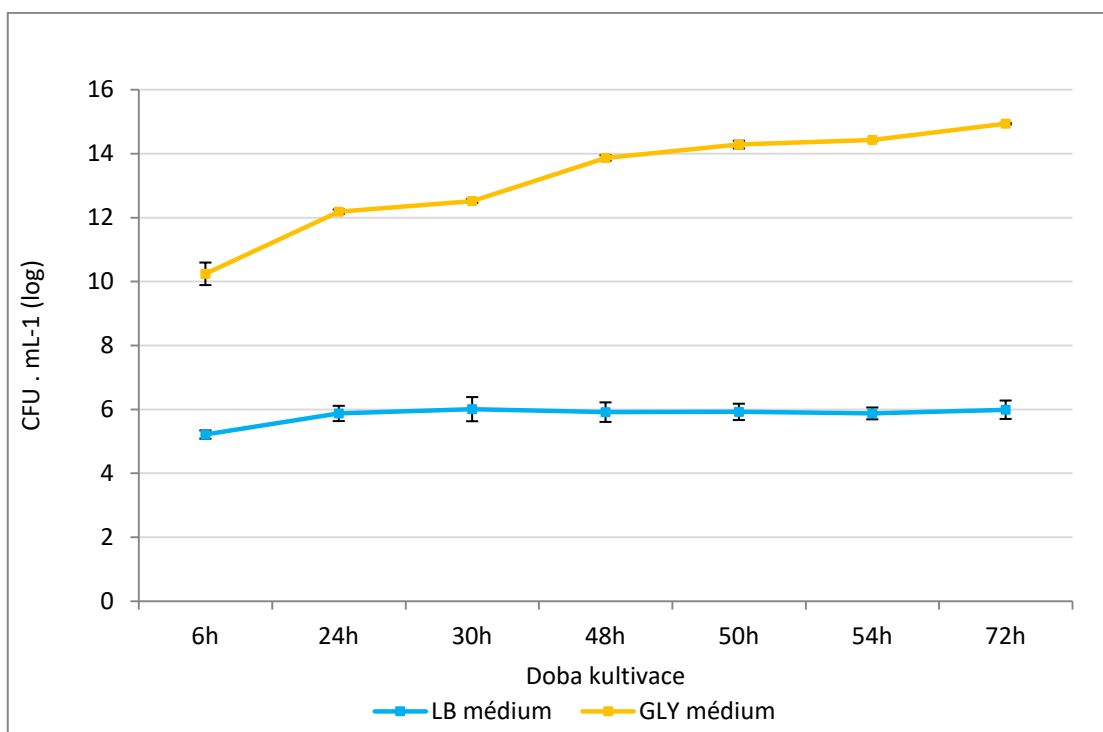
Cílem experimentu bylo experimentálně nakazit kolonii *P. duboscqi* bakterií *A. krungthepensis*.

4.5.1 Stanovení infekční dávky bakterií

Během experimentu byla vyzkoušena dvě tekutá kultivační média (LB a GLY médium), ve kterých bylo stanoveno množství bakterií, a měřeny a zaznamenávány hodnoty OD₆₀₀ po 6, 24, 30, 48, 50, 54 a 72 hodinách inkubace. Experimenty proběhly třikrát nezávisle na sobě a naměřená data byla sloučena a zprůměrována (Obr. 20 a Obr. 21).



Obr. 20: Zprůměrované hodnoty OD₆₀₀ naměřené v GLY a LB médiu při kultivaci bakterií *A. krungthepensis* ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky v grafu zobrazují standardní chybu.



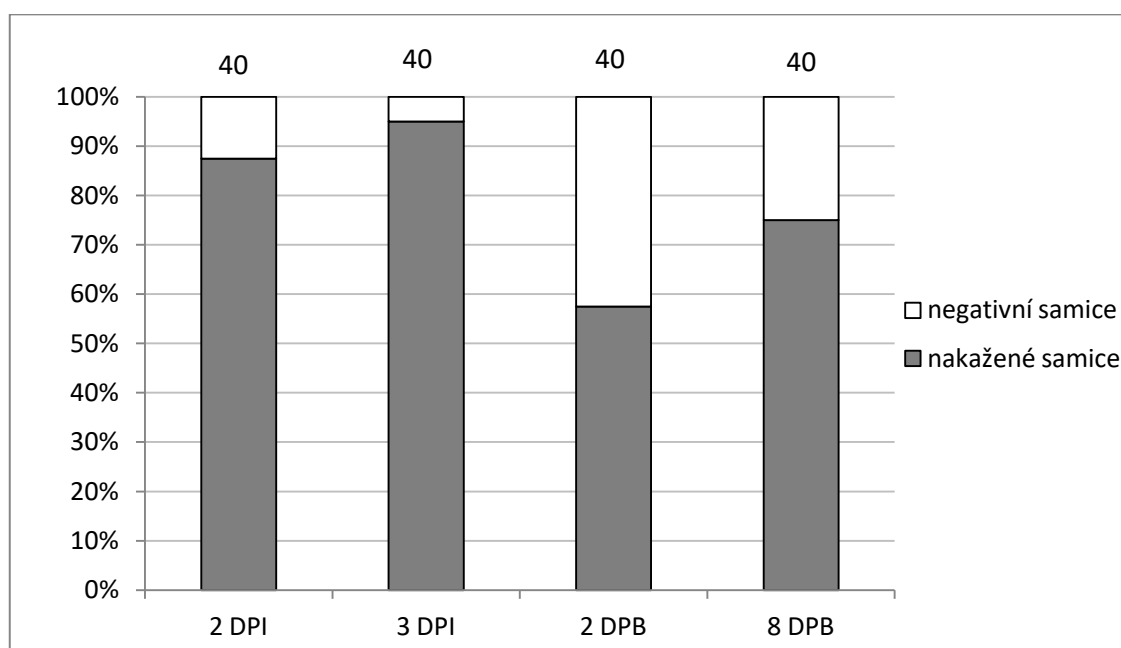
Obr. 21: Růstová křivka bakterií *A. krungthepensis* v LB a GLY médiu (po dobu 72 hodin) sestavená na základě zprůměrovaných hodnot ze tří opakování experimentu. Chybové úsečky zobrazují standardní chybu.

Na základě výsledků těchto experimentů bylo dále používáno pouze médium GLY. Požadovaná infekční dávka bakterií byla standardizována na hodnotu $1,7 - 4 \times 10^8$ CFU / ml, což odpovídalo naměřené hodnotě roztoku $OD_{600} = 0,5$ po 50 hodinách kultivace.

4.5.2 Experimentální infekce a přežívání *A. krungthepensis* ve flebotomech

K ověření infekce a přežívání bakterií u flebotomů byly prováděny pitvy střev. Pitvy 10 samic probíhaly vždy druhý a třetí den po podání infekčního cukru (DPI: 2 a 3), a druhý a osmý den po sání krve (DPB: 2 a 8). Z vypitvaných střev byly detekovány bakterie pomocí PCR a plotnové metody. Experimenty byly provedeny 4×, a celkově bylo otestováno 160 samic.

Druhý a třetí den po podání infekčního cukru bylo nakaženo 87,5 % (35 ze 40) a 95 % (38 ze 40) samic. Oproti tomu dva dny po nasátí krve počty nakažených klesly a pozitivních samic bylo pouze 57,5 % (23 ze 40) samic, osm dnů po nasátí krve bylo nakažených 75 % (30 ze 40) samic (Obr. 22). Výsledky získané vyhodnocením PCR produktů na gelové elektroforéze byly vždy potvrzeny plotnovou metodou (Obr. 14, str. 35), což prokázalo přežívání bakterií ve střevě samic před a po sání krve.



Obr. 22: Detekce bakterií *A. krungthepensis* ve střevě experimentálně nakažených samic *P. duboscqi* pomocí PCR a plotnové metody. Čísla nad sloupci značí počet celkově otestovaných samic.

Vysvětlivky zkratk: DPI – počet dnů po podání infekčního cukru s bakteriemi, DPB – počet dnů po sání krve

4.6 Vliv infekce bakterií *A. krungthepensis* na vývoj *L. major* u samic *P. duboscqi*

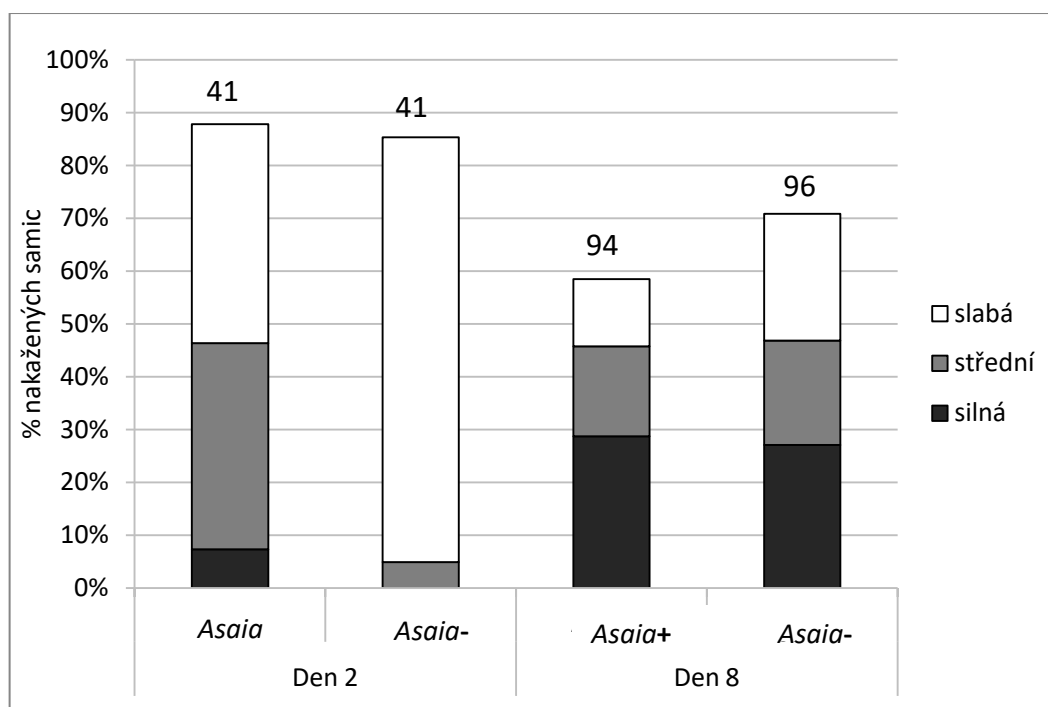
Pitvy samic byly prováděny 2. a 8. den po sání krve s leishmaniami (infekční dávka 5×10^5 promastigotů/ ml) a byla mikroskopicky stanovena intenzita a lokalizace

infekcí. Experimenty byly prováděny ve 4 nezávislých opakováních a všechny výsledky byly sloučeny a vyhodnoceny hromadně (Fisherův exaktní test).

Den 2 po sání krve byla intenzita infekce signifikantně vyšší u *Asaia+* než u *Asaia-* ($p < 0,001$). Oproti tomu 8. den po sání nebyl mezi skupinami prokázán žádný signifikantní rozdíl v intenzitách infekce ($p = 0,945$) (Tab. 12 a Obr. 23).

Tab. 12: Shrnutí intenzity infekce *L. major* u *P. duboscqi* infikovanými (*Asaia+*) a neinfikovanými (*Asaia-*) bakterií *Asaia krungthepensis* a to 2. a 8. den po sání.

Intenzita infekce		Silná	Střední	Slabá	bez infekce	celkem samic
Den 2	<i>Asaia+</i>	3	16	17	5	41
	<i>Asaia-</i>	0	2	33	6	41
Den 8	<i>Asaia+</i>	27	16	12	39	94
	<i>Asaia-</i>	26	19	23	28	96



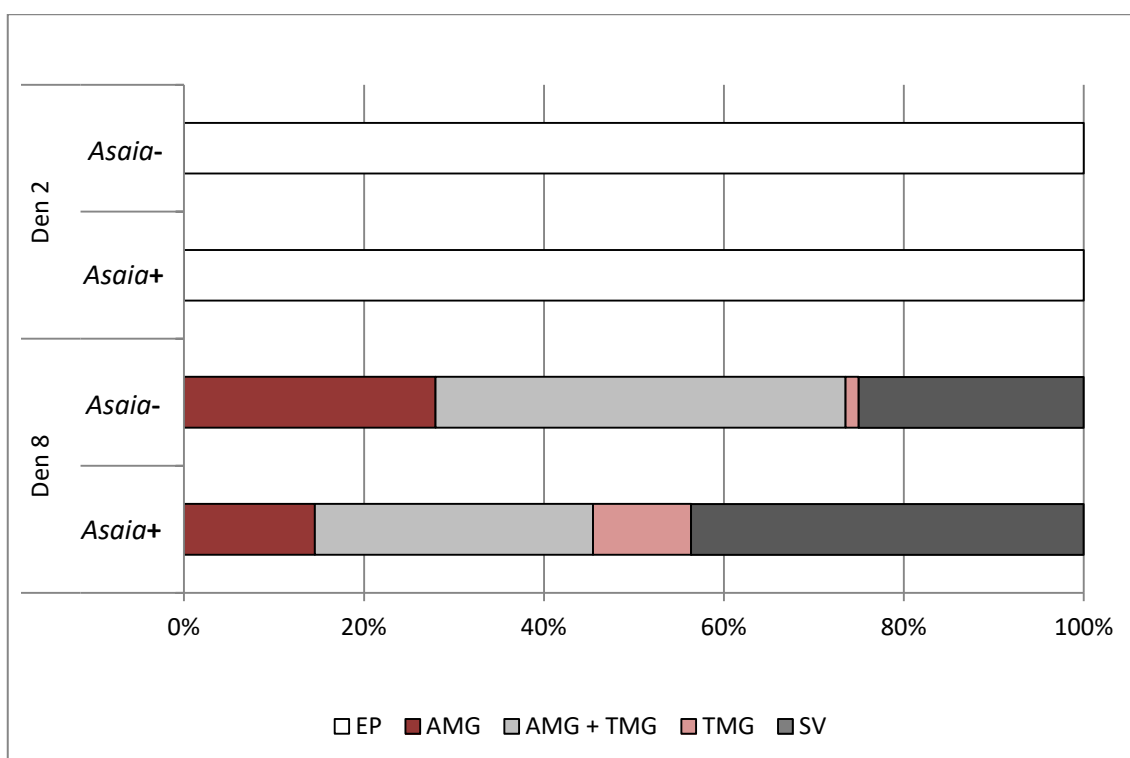
Obr. 23: Intenzita infekce *L. major* u *P. duboscqi* infikovanými (*Asaia+*) a neinfikovanými (*Asaia-*) bakterií *A. krungthepensis* ve dvou intervalech po sání krve s leishmaniemi (2. a 8. den po sání). Čísla nad sloupce značí počet vypitvaných samic.

Dále byla také hodnocena lokalizace promastigotů *L. major* u *Asaia+* a *Asaia-* jedinců. Druhý den po sání se u obou skupin leishmanie nacházely v endoperitrofickém prostoru ($p = 1$). Osmý den po sání byl prokázán signifikantní rozdíl v lokalizaci infekce ($p = 0,0066$); u *Asaia+* jedinců se leishmanie častěji vyskytovaly v thorakálním mesenteronu a kolonizovaly stomodeální valvu, zatímco u *Asaia-* samic se promastigoti nacházeli převážně v abdominálním mesenteronu (Tab. 13 a Obr. 24).

Tab. 13: Shrnutí lokalizace infekce *L. major* u *P. duboscqi* infikovanými (*Asaia*+) a neinfikovanými (*Asaia*-) bakterií *Asaia krungthepensis* a to 2. a 8. den po sání.

Vysvětlivky zkratk: EP – endoperitrofický prostor, AMG – abdominální mesenteron, TMG – thorakální mesenteron, SV – stomodeální valva

Lokalizace infekce		EP	AMG	AMG + TMG	TMG	SV
Den 2	<i>Asaia</i> +	35	0	0	0	0
	<i>Asaia</i> -	35	0	0	0	0
Den 8	<i>Asaia</i> +	0	19	31	1	17
	<i>Asaia</i> -	0	4	7	3	1



Obr. 24: Graf znázorňuje lokalizaci infekce *L. major* u *P. duboscqi* infikovanými (*Asaia*+) a neinfikovanými (*Asaia*-) bakterií *A. krungthepensis* a to 2. a 8. den po sání.

Vysvětlivky zkratk: EP – endoperitrofický prostor, AMG – abdominální mesenteron, TMG – thorakální mesenteron, SV – stomodeální valva

4.6.1 Morfologické formy leishmanií

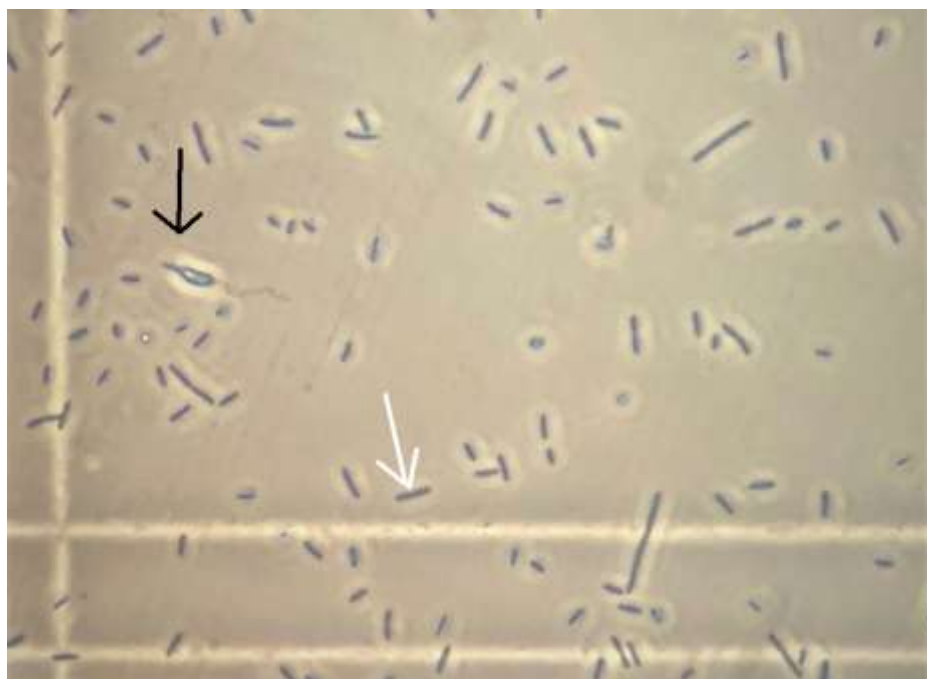
Osmý den po sání bylo studováno zastoupení morfologických forem leishmanií *L. major*. Bylo naměřeno 150 leishmanií z každé skupiny (*Asaia*++ a *Asaia*-) ze tří náhodně vybraných roztěrů střev flebotomů. Mezi skupinami nebyl prokázán žádný signifikantní rozdíl v zastoupení naměřených morfologických forem ($\chi^2 = 0,086$, $df = 2$, $p = 0,958$) (Tab. 14).

Tab. 14: Zastoupení jednotlivých morfologických forem druhu *L. major* u neinfikovaných (*Asaia*-) a infikovaných (*Asaia*+) flebotomů *P. duboscqi*.

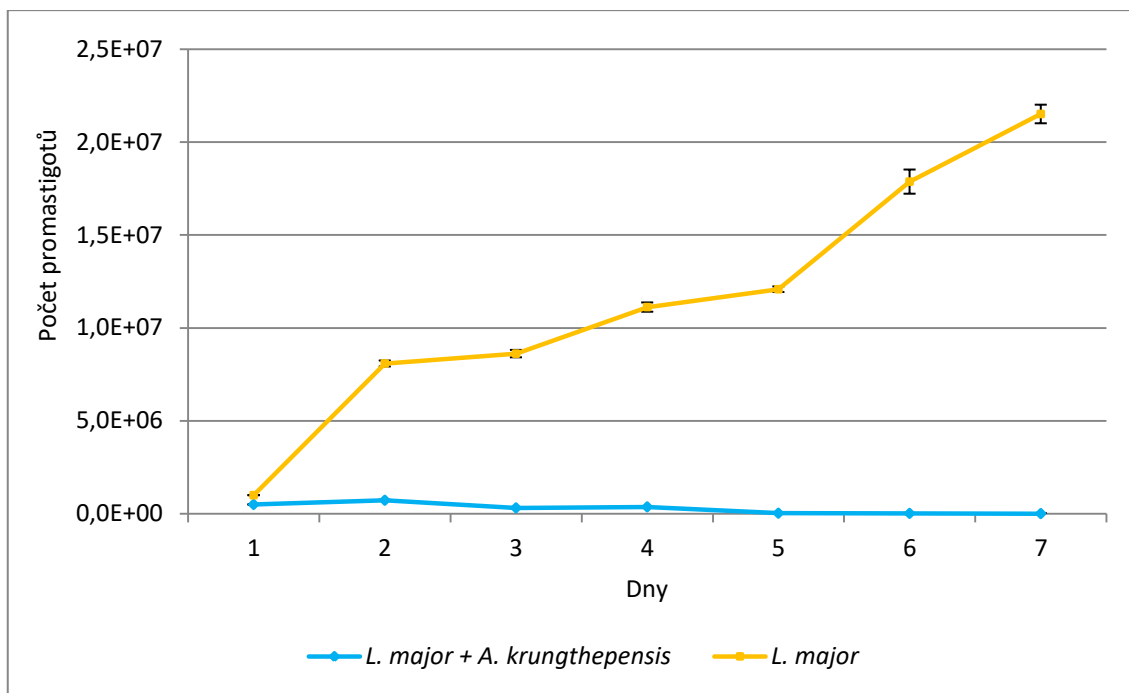
Naměřené morfologické formy	Den 8	
	<i>Asaia</i> -	<i>Asaia</i> +
Nektomonády	91 (60,6 %)	91 (60,6 %)
metacykličtí promastigoti	6 (4%)	7 (4,6%)
krátkí promastigoti - leptomonády	53 (35,4 %)	52 (34,6 %)
Celkem	150	150

4.7 Vliv bakterií na růst leishmanií *in vitro*

Pro otestování zda *A. krungthepensis* ovlivňuje *L. major* přímo, byly provedeny *in vitro* experimenty, ve kterých byly použity stejné infekční dávky, jako v *in vivo* experimentech s flebotomy (*A. krungthepensis* $1,7 - 4 \times 10^8$ CFU / ml, *L. major* 5×10^5 buněk / ml). Byla porovnána pokusná skupina, kde se vyskytovaly leishmanie i bakterie s kontrolní skupinou, v níž byly pouze leishmanie. Promastigoti byli počítáni po dobu 6 dnů v intervalech 24 hodin (Obr. 25). Pokusy byly provedeny 2×, data byla sloučena a zprůměrována, výsledkem byly růstové křivky leishmanií v kontrolní a pokusné skupině (Obr. 26). Zatímco v kontrolní kultuře se leishmanie množily až do koncentrace $2,1 \times 10^7$, v kultuře s bakteriemi se leishmanie množily pouze první den, a následně se počty promastigotů neustále snižovaly.



Obr. 25: *L. major* (černá šipka) a *A. krungthepensis* (bílá šipka) v Bürkerově komůrce (světelný mikroskop 400× zvětšení) (Kristina Sovová).



Obr. 26: Růstová křivka leishmanií *L. major* v čisté kultuře a v kultuře s bakteriemi *A. krungthepensis*. Výsledky dvou experimentů byly zprůměrovány, a chybové úsečky zobrazují standardní chybu.

5 Diskuze

V současné době představuje téma střevní mikrobioty neodmyslitelnou součást studia hmyzích vektorů, neboť její přítomnost má vliv jak na vývoj přenašeče (Mitraka et al., 2013; Coon et al., 2014), tak na interakci patogen/vektor (shrnuto v Weiss & Aksoy, 2011), a nejenak je tomu i u flebotomů (Peterkova-Koci et al., 2012; Kelly et al., 2017).

Bakterie rodu *Asaia* a *Wolbachia* ze skupiny α -proteobakterií jsou studovány především u komárů, což je dáno častým a hojným výskytem v jejich populaci. Bakterie rodu *Wolbachia* jsou na rozdíl od rodu *Asaia* často detekovány i u flebotomů, nicméně informací o jejich vlivu na vývoj a množení leishmanií či dalších patogenů je u obou zmíněných rodů bakterií nedostatek, a proto jsme se jimi v předložené diplomové práci zabývali.

Prvním krokem byla detekce *Asaia* sp. a *Wolbachia* sp. u flebotomů z terénních odchytů z vybraných zemí Balkánského poloostrova. Oblast Balkánského poloostrova jsme si vybrali záměrně, jelikož výskyt *Asaia* sp. a *Wolbachia* sp. u flebotomů z této oblasti nebyl doposud publikován, a zároveň jsou balkánské státy považovány za ohniska výskytu viscerální leishmaniózy či virových onemocnění přenášených flebotomy. Testování byli flebotomové z podrodu *Larroussius*, konkrétně druhy *P. neglectus*, *P. perfiliewi* a *P. tobbi*, a při výběru byl zohledněn jak jejich medicínský význam, tak jejich hojné zastoupení v pěti vybraných zemích (Bosna a Hercegovina, Bulharsko, Černá Hora, Chorvatsko a Makedonie).

Bakterie rodu *Asaia* byly poprvé izolovány z rostlin v Indonésii autory Yamada et al. (2000). Jsou to bakterie tyčinkovitého tvaru s peritrichálními bičíky a tropické rostliny jsou přirozeným místem jejich výskytu (Yamada et al., 2000). Do populace komárů se dostávají během sání rostlinných šťáv či nektaru a význam rostlin v přenosu *Asaia* sp. byl potvrzen nedávno provedenou studií Bassene et al. (2020). V populaci komárů se následně bakterie šíří díky velmi efektivnímu horizontálnímu a vertikálnímu přenosu (Favia et al., 2007; Damiani et al., 2010). Nicméně, data o výskytu bakterií rodu *Asaia*, ať už u hmyzu či rostlin, na námi studovaném území neexistují.

Bakterie rodu *Asaia* jsou schopné kolonizovat různé druhy hmyzu (Crotti et al., 2009), ale podle dostupných dat byly u flebotomů detekovány pouze třikrát, a to z kutikuly *P. sergenti* (Akhoundi et al., 2012), ze střeva *L. longipalpis* (Sant'Anna et al., 2014) a z homogenátu *P. chinensis* (Li et al., 2016). V rámci této práce jsme u flebotomů pomocí PCR detekovali *Asaia* sp. s prevalencí 2,5 % (6 z 237).

Srovnáme-li výsledky například se studií provedenou u volně žijících komárů *An. gambiae* a *An. funestus* z jedné oblasti v Senegal, byla prevalence výskytu 14,6 % (52 ze 362) a 1,6 % (6 ze 375), zatímco u *An. gambiae* z jiné oblasti byla *Asaia* sp. detekována s prevalencí 0,45 % (2 ze 447) (Bassene et al., 2019), a u madagaskarské populace *Ae. albopictus* byly bakterie rodu *Asaia* detekovány u 46 % (117 ze 252) testovaných jedinců (Minard et al., 2013b). I přes prokázanou vysokou efektivitu horizontálního a vertikálního přenosu u laboratorních populací je výskyt *Asaia* sp. u komárů ve volné přírodě zpravidla nižší, a stejně tomu bylo i v našem případě. Prozatím jedinou výjimkou je studie Damiani et al. (2010), ve které byly bakterie rodu *Asaia* detekovány ve všech otestovaných *An. gambiae* z Burkina Faso. Pravděpodobně zde hrají roli faktory vnějšího prostředí, které prevalenci výskytu ovlivňují. Jedním z takových faktorů by mohlo být odlišné druhové

zastoupení rostlin, ve kterých jsou bakterie rodu *Asaia* přítomny, a každý druh rostliny by tak v přenosu bakterií mohl být jinak efektivní (Bassene et al., 2019), avšak na toto téma by bylo nutné provést další studie.

Je zajímavé, že u jednoho ze vzorků (*P. neglectus*) jsme zároveň detekovali i bakterie rodu *Wolbachia*, a jedná se tak o první záznam koinfekce těchto dvou rodů bakterií. Možným vysvětlením, proč nebyla doposud koinfekce *Wolbachia* sp. a *Asaia* sp. detekována u komárů ve volné přírodě, i přes studie zaměřené na tento typ screeningu (Raharimalala et al., 2016; Jeffries et al., 2018a), se opírá o studii provedenou autory Rossi et al. (2015). Autoři postulují, že bakterie rodu *Asaia* a *Wolbachia* si navzájem konkurují v ovariích a/nebo si navzájem brání v možnosti vertikálního přenosu. Tato hypotéza vychází z experimentů, jež se zaměřily na lokalizaci *Asaia* sp. ve tkáních laboratorně chovaných kolonií *W+* a *W-* komárů. Na základě výsledků získaných pomocí klasické a kvantitativní PCR bylo zjištěno, že u *W+* komárů kolonizují bakterie rodu *Asaia* především střevo a v malém množství samčí gonády, nikoliv však ovaria. Díky tomu se *Asaia* sp. nedostane ani na povrch vajec, což je jedna z podmínek vertikálního přenosu (Damiani et al., 2010), takže je pravděpodobné, že u *W+* komárů se *Asaia* sp. takto přenášet nebude. Naopak u *W-* komárů *Asaia* sp. intenzivně kolonizuje právě ovaria a zbylé tkáně (Rossi et al., 2015).

Bakterie rodu *Wolbachia* byly detekovány u 8,4 % (20 z 237) testovaných flebotomů. Abychom plošně zjistili výskyt bakterií na celém území jednotlivých zemí, vybírali jsme si flebotomy ze všech států, kde probíhaly terénní odchyty, avšak z každé lokality bylo otestováno maximálně šest jedinců, což by mohlo být důvodem, proč je námi detekovaná prevalence takto nízká. Dalším z důvodů by mohlo být, že v různých populacích flebotomů se bakterie vyskytují různě často (Parvizi et al., 2013a). Porovnáme-li prevalenci výskytu bakterií u volně žijících flebotomů ze Starého světa, tak nejpodobnější procentuální zastoupení *W+* jedinců (8,6 %) bylo zjištěno u flebotomů *P. chinensis* v Číně (Li et al., 2016). Tato studie testovala wolbachie u 1061 jedinců flebotomů, a tak se zároveň jedná o doposud nejrozsáhlejší provedenou studii. Studie Karatepe et al. (2018), která se zaměřila na výskyt wolbachii a *Spiroplasma* sp., u blíže neurčených druhů rodu *Phlebotomus* pocházejícího z provincie Antalya v Turecku, detekovala *Wolbachia* sp. u 70 % (28 ze 40) testovaných flebotomů.

Nejvíce studií, které se zabývaly detekcí wolbachii u flebotomů Starého světa z terénních odchytů, bylo však provedeno z různých oblastí Íránu. Velmi často, 78,6 % (136 ze 173), byly wolbachie nacházeny u *P. papatasi* z provincií Isfahán, Hamadán a Teherán (Parvizi et al., 2003). V oblasti severovýchodního Íránu (Turkmen Sahra) byly wolbachie detekovány u 36,5 % odchycených flebotomů druhu *P. mongolensis* a *P. causicus* (Parvizi et al., 2013a), a ten samý rok autoři v jiné publikaci detekovali wolbachie u *P. perfiliewi* a *P. kandelakii* z íránské provincie Ázerbajdžán a Ardabil (Parvizi et al., 2013b). Další studie byla provedena autory Bordbar et al. (2014), ve které bylo z různých oblastí Íránu otestováno 638 flebotomů a 37,7 % z nich bylo *W+*. Mezi *W+* jedinci byly zastoupeny druhy *P. sergenti*, *P. mongolensis*, *P. causicus*, *P. alexandri* či *P. perfiliewi* (Bordbar et al., 2014). Flebotomům z Íránu se také věnovala studie Karimian et al., (2018), která detekovala wolbachie u 83 % *P. papatasi* a 76 % *P. sergenti*.

Taxonomické zařazení a fylogenetický původ wolbachii jsou poměrně komplikované a momentálně neustálené, a proto zde budou zmíněny pouze okrajově. Momentálně jsou jednotlivé kmeny wolbachii brány jako konkrétní druhy, které jsou rozděleny do minimálně 16 tzv. superskupin (A-Q), jež představují jednotlivé evoluční linie, které se od sebe liší svou biologií a hostitelskou specifitou (Zhou et al., 1998; Pascari & Chandler, 2018). V rámci předložené diplomové práce byly detekované wolbachie rozděleny do dvou skupin. První skupina wolbachii byla detekována u flebotomů (*P. neglectus* a *P. perfiliewi*) z Bulharska a Chorvatska. Tyto wolbachie měly 98 % homologii se sekvencemi wolbachii, jež byly původně izolovány z motýla *Libythea celtis* (cípatec jižní), a které byly pojmenovány jako wCel (Tagami & Miura, 2004). Na základě fylogenetického původu patří do superskupiny B, která spolu se superskupinou A představuje monofyletické skupiny wolbachii infikující pouze členovce (Gerth et al., 2014; Pascari & Chandler, 2018). Do superskupiny B patří i další námi detekované wolbachie wPrn u flebotomů (samice *P. neglectus* a *P. tobbi*) z Bosny a Hercegoviny. Tyto bakterie byly sice původně izolovány z *P. perniciosus* (Ono et al., 2001), avšak kromě *P. perniciosus* (Benlarbi & Ready, 2003; Matsumoto et al., 2008) byly detekovány i u *P. perfiliewi* v Íránu (Bordbar et al., 2014) a u *Phlebotomus* sp. ve Francii (Matsumoto et al., 2008).

Na základě pozitivních výsledků získaných z terénních odchytů jsme se rozhodli otestovat přítomnost bakterií rodu *Asaia* a *Wolbachia* i u laboratorních kolonií flebotomů chovaných na naší katedře. *Asaia* sp. nebyla detekována ani u jedné z kolonií, a jedinou W+ kolonií byla populace *P. perniciosus*. Pomocí sekvenování jsme u kolonie *P. perniciosus* identifikovali kmen wPrn, který byl původně izolován z tohoto samého druhu flebotoma (Ono et al., 2001). Wolbachie se v laboratorní kolonii vyskytovaly s prevalencí 88,6 % a zastoupení W+ samců a samic bylo vyrovnané. Vysoká míra prevalence u laboratorně chovaných flebotomů je pravděpodobně dána způsobem chovu, který poskytuje rodu *Wolbachia* ideální podmínky k přenosu a šíření v populaci.

Je známo, že vzhledem k maternálnímu způsobu přenosu wolbachie kolonizují buňky zárodečné linie, avšak během posledních let se začalo více autorů věnovat lokalizaci wolbachii i v somatických buňkách různých tkání. Bylo zjištěno, že wolbachie se mohou vyskytovat např. v mozgovém gangliu, svaích, mesenteronu, slinných žlázách, malpighických trubicích, tukovém tělese, křídlech, hemolymfě, varlat či ovarii (shrnuto v Pietri et al., 2016). Dobson et al. (1999) provedli rozsáhlou studii zaměřenou na tkáňovou specifitu různých druhů wolbachii u různých zástupců hmyzu (komáři, drozofily či glossiny), a prokázali, že lokalizace se liší v závislosti na konkrétní testované kombinaci wolbachie/hostitel. Například u komárů *Ae. albopictus* z Mauricia a Koh Samui (wAlbA) a glossin *G. morsitans* (wMor) byly wolbachie detekovány pouze v gonádách, zatímco *Ae. albopictus* se superinfekcí (wAlbA a wAlbB) či *Cx. pipiens* (wPip) byly lokalizovány v somatických buňkách různých tkání (Dobson et al., 1999). Ve studii Benlarbi & Ready, (2003) autoři uvádí, že infekce wolbachii byly u flebotomů *P. perniciosus* a *P. papatasi* čteně nacházeny v hrudi a zadečku.

Vzhledem k nedostatku informací o distribuci wolbachii v tkáních flebotomů jsme se rozhodli zjistit tkáňovou specifitu wolbachii druhu wPrn u laboratorně chované populace *P. perniciosus*. Ke zjištění lokalizace wolbachii se dají použít různé metody, jako je klasická PCR, kvantitativní PCR či fluorescenční *in-situ* hybridizace (Zouache et al., 2009), avšak pro

naše účely, kdy nám šlo pouze o kvalitativní posouzení, tedy zda se wolbachie v dané tkáni vyskytují/nevyskytují, nám postačila metoda klasické PCR. Těla flebotomů jsme rozdělili na čtyři části: hlavu se slinnými žlázami, střevo s malpighickými tubicemi, hrud' s křídly a zadeček. I přes snahu blíže specifikovat lokalizaci wolbachii jsme na základě našich výsledků dospěli k závěru, že wolbachie wPrn nevykazují u *P. perniciosus* specifitu ke konkrétním tělním tkáním a vyskytují se v každé ze čtyř testovaných typů tkání.

Na základě výše zmíněných získaných informací jsme se rozhodli wolbachie z části populace *P. perniciosus* eliminovat a vytvořit tak dvě skupiny *W+* a *W-* jedinců. U skupin bychom následně provedli experimentální infekci *Leishmania* sp. a porovnali vliv přítomnosti/nepřítomnosti wolbachii na průběh infekce. Bohužel, naše experimentální eliminace byla neúspěšná.

K eliminaci *Wolbachia* sp. jsme se rozhodli využít širokospektrální antibiotikum tetracyklin-hydrochlorid, které bylo nejhojněji využívaným a účinným antibiotikem při eliminaci wolbachii u různých členovců (roztoči, brouci, komáři, glossiny, drozofily) (shrnuto v Li et al., 2014). Kassem et al. (2003), ve své studii zabývající se cytoplasmatickou inkompatibilitou u flebotomů, podávali tetracyklin do potravy larev, ze kterých se vylíhli dospělci bez wolbachii. Tato studie je však zároveň jedinou, ve které bylo použito antibiotikum s cílem eliminovat wolbachie z populace flebotomů. Avšak vzhledem ke způsobu života larev je podání antibiotik problematické. Nejenže nelze mít kontrolu nad dávkou přijatých antibiotik larvami, ale také zda larvy antibiotikum opravdu zkonzumují. Navíc larvální stádia jsou, na rozdíl od dospělců, citlivější k manipulaci, která může vést k jejich úhynu. V kombinaci s těmito faktory, a na základě nedostatku informací o eliminaci wolbachii z dospělých flebotomů, jsme se rozhodli vyzkoušet eliminaci wolbachii u dospělců. Stejný postup byl úspěšně proveden i u komárů (Dutton & Sinkins, 2005; Brelsfoard & Dobson, 2011; Baton et al., 2013). Navíc „léčba“ larválních stádií byla u komárů méně úspěšná než u dospělců, což bylo prokázáno u *Ae. albopictus* (Dobson & Rattanadechakul, 2001) či *Cx. pipiens* (shrnuto v Li et al., 2014). Dalším důvodem podání antibiotik dospělcům v potravě byla možnost experimenty různě modifikovat.

V prvním z experimentů jsme jedincům podávali antibiotikum o koncentraci 1mg/ml v kapce cukru a po celou dobu podávání ATB (7 dnů) jsme nepozorovali žádný vliv tetracyklinu na mortalitu jedinců. Následně jsme, s cílem detekovat wolbachialní DNA ve vajíčkách „léčených“ samic, vyzkoušeli tři způsoby homogenizace. I přesto, že byla homogenizace úspěšná, přítomnost/nepřítomnost wolbachii jsme nebyli schopni detekovat. Dle našeho názoru je ve vajíčkách obsaženo tak malé množství wolbachialní DNA, že je pod hranici detekčního limitu. S podáváním antibiotik jsme nadále pokračovali u F1 a F2 generace. U F1 generace byly po podání antibiotik wolbachie eliminovány u 85 % samic, ale u F2 generace oproti předešlé, vzrostl počet *W+* samic a *W-* bylo pouze 32 %. Bohužel, během experimentů s F3 generací došlo u třetích larválních instarů k vysoké mortalitě a experimenty byly ukončeny. K mortalitě larev mohlo nejspíše dojít v důsledku dlouhodobého podávání antibiotik, což způsobilo eliminaci střevní mikrobioty, která je pro vývoj larev důležitá. Po eliminaci wolbachii antibiotiky v provedených experimentech u komárů, vždy autoři s provedením dalších experimentů 1-2 generace vyčkávali, neboť ztráta celkové mikrobioty by mohla ovlivnit průběh

následujících experimentů, či fitness jedince. Naše výsledky jsou opakem provedených studií s *Ae. fluviatilis* a *Ae. polynesiensis*, kdy podání antibiotik bylo účinné nejen o stejné koncentraci tetracyklinu, ale i o 10x nižší koncentraci podané *Ae. pseudoscutellaris*. Počty *W+* jedinců klesaly a po podání antibiotik 3. - 4. generaci byla eliminace wolbachii z populace zcela úspěšná (Dutton & Sinkins, 2005; Brelsfoard & Dobson, 2011; Baton et al., 2013). Na základě našich výsledků se zdá, že flebotomové jsou na rozdíl od komárů citlivější, ať už vzhledem k podání tetracyklinu a/nebo ztrátě celkové mikrobioty.

Na základě nezdařilých výsledků s podáním antibiotik do cukru jsme se rozhodli antibiotika přidat samicím flebotomům do krve; zvolili jsme si tři různé koncentrace 0,7, 1 a 1,3 mg/ml. Největší procentuální zastoupení *W-* jedinců bylo získáno při využití nejnižší koncentrace, naopak nejhůře dopadla koncentrace 1 mg/ml, kde z testované skupiny byli všichni jedinci *W+*. Vzhledem k tomu, že byly počty *W-* jedinců ve všech třech skupinách velmi nízké, nemělo smysl s eliminací wolbachii u následujících generací pokračovat.

Posledním z pokusů eliminace wolbachii z populace *P. perniciosus* bylo podání antibiotik jak do cukru, tak krve o jednotné koncentraci 1mg/ml. Během experimentů jsme nepozorovali žádný vliv podávaných antibiotik v cukru na mortalitu dospělých jedinců, zvýšení mortality u samic po sání krve s antibiotiky bylo nesignifikantní. Wolbachie se však opět nepodařilo eliminovat. Lze tedy shrnout, že podání antibiotik různými způsoby nebo jejich kombinacemi bylo neúčinné. Pro značnou časovou náročnost byly proto experimenty po téměř roce ukončeny jako neúspěšné. I přes úspěšné využití tetracyklinu při eliminaci wolbachii u různých skupin hmyzu nelze vyloučit, že náš neúspěch mohl být dán možnou rezistencí *wPrn* wolbachii vůči tetracyklinu či detoxifikací antibiotik hostitelem ještě dříve, než na *Wolbachia* sp. začne působit.

V poslední části diplomové práce jsme se zabývali bakteriemi rodu *Asaia* a jejich vlivem na vývoj leishmanií. Vzhledem k tomu, že *Asaia* sp. nebyly detekovány ani u jedné laboratorně chované populace, rozhodli jsme se kolonii *P. duboscqi* experimentálně infikovat a získat dvě experimentální skupiny *Asaia+* (infikované *A. krungthepensis*) a *Asaia-* (neinfikované *A. krungthepensis*).

Dodnes bylo popsáno 8 druhů bakterií patřící do rodu *Asaia*, přičemž nejčastěji jsou u komárů detekovány druhy *A. bogorensis* a *A. krungthepensis* (Chouaia et al., 2010). *A. bogorensis* je některými autory označován jako oportunní patogen člověka, což jsme během našeho výběru zohlednili a pro naše experimenty jsme raději zvolili druh *A. krungthepensis* (Yukphan et al., 2004), jehož izolát byl navíc dostupný v České sbírce mikroorganismů v Brně. Bakterie byly relativně snadno kultivovatelné a kultura dobře rostla na selekčním médiu při 30 °C minimálně 72 hodin, kde jednotlivé bakterie vytvářely lesklé, narůžovělé a kruhové kolonie, které jsou svoji morfologií téměř nezaměnitelné. Okolo kolonií se zároveň vytvářely typické kruhové útvary, jež vznikají solubilizací uhličitanu, který je jednou ze složek selekčního média (Favia et al., 2007).

Abychom byli schopni stanovit infekční dávku bakterií, museli jsme nejprve standardizovat metodu stanovení množství bakterií v 1 ml média pomocí měření optické denzity. Během kultivace *A. krungthepensis* jsme porovnali dvě tekutá kultivační média (LB a GLY). Naměřená optická denzita roztoku LB média s bakteriální kulturou však nedosáhla

hodnoty vyšší než $OD_{600} = 0,5$, a proto jsme LB médium z dalších experimentů vyřadili, a dále používali pouze GLY médium doporučené autory Sant'Anna et al. (2014). Infekční dávku bakterií ($1,7 - 4 \times 10^8$ CFU / ml) jsme flebotomům podávali v modře obarveném roztoku cukru. Modré barvivo bylo vybráno záměrně, jelikož dobře prosvítá přes kutikulu flebotomů, a je tak možné pod binokulární lupou poznat, které samice na infekčním cukru s bakteriemi sály a které nikoliv. Abychom zjistili, zda jsou bakterie ve střevě flebotomů živé a schopné kolonizovat střevo, část homogenátu střev jsme vyšetřili (kromě PCR) i kultivací na agarových plotnách se selekčním médiem. *Asaia* sp. jsme poté rozlišili na základě morfologických znaků kolonií. Kultivaci bakterií jsme prováděli vždy druhý a třetí den od podání infekčního cukru (DPI: 2, DPI: 3) a druhý a osmý den po sání krve flebotomů (DPB: 2, DPB: 8) abychom zjistili, zdali *A. krungthepensis* přežívá ve střevě během trávení krve i po defekaci zbytků krve. Navíc tyto intervaly (DPB: 2 a DPB: 8) byly pro nás zároveň důležité i pro hodnocení průběhu leishmaniové infekce.

Dva nebo tři dny po sání infekčního cukru (DPI: 2 a DPI: 3) byly bakterie detekovány ve většině testovaných samic (87,5 % a 95 %). Po sání krve počty *Asaia*+ jedinců byly zprvu relativně nízké (57,5 % v DPB: 2), ale po defekaci krve (DPB: 8) se jejich zastoupení opět zvýšilo (75 % samic). Výsledky získané pomocí PCR byly ve všech případech shodné s výsledky získanými kultivací, která navíc potvrdila, že bakterie rodu *Asaia* byly ve střevech flebotomů životaschopné. Nižší výskyt *A. krungthepensis* po sání infekční krve souvisí nejspíš s faktem, že spolu s nasátou krví se střevo mění z prostředí bohatého na cukry, na prostředí bohaté na proteiny, čímž v něm dochází k metabolickým změnám. Zároveň v důsledku trávení nasáté krve dochází k uvolňování ROS a všechny tyto změny se odráží i v druhovém složení střevní mikrobioty flebotomů po sání (Volf et al., 2002; Akhoundi et al., 2012; Monteiro et al., 2016; Kelly et al., 2017; Pires et al., 2017), což může být důvodem, proč byly *Asaia* sp. detekovány u méně samic, než před sáním. Domníváme se, že díky těmto změnám došlo k úplnému či částečnému snížení populace *A. krungthepensis*, u některých samic až na takovou hodnotu, která byla pod detekčním limitem. Po defekaci krve se však zastoupení bakterií vrací do původního stavu před sáním krve, stejně jako tomu bylo i v dalších studiích (Kelly et al., 2017), což může vysvětlit opětovný nárůst *Asaia*+ samic. Studie Tchioffo et al. (2016), která zkoumala dynamiku bakteriálního společenství u komárů rodu *Anopheles* v různých tkáních, zmiňuje, že osmý den po sání krve mají bakterie rodu *Asaia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* aj. ve střevě relativně největší zastoupení. Abychom však mohli s jistotou říct, zda početní zastoupení *Asaia* sp. ve střevě opravdu kolísá a nejedná se pouze o neúspěšnou infekci, bylo by nutné provést kvantitativní PCR.

Abychom zjistili, zda má *A. krungthepensis* vliv na průběh infekce *L. major*, provedli jsme u *P. duboscqi* experimentální superinfekci *L. major* a porovnali intenzitu a lokalizaci infekce *L. major* u *Asaia*- a *Asaia*+ jedinců. Během plánování experimentů jsme vycházeli z teorie, že podání bakterií by mohlo aktivovat imunitní systém flebotomů, což by mohlo negativně ovlivnit průběh leishmaniové infekce (Kelly et al., 2017). Bakterie by též mohly působit na leishmanie (například svými toxickými metabolity), nebo by s nimi mohly kompetitovat při přichycení na epitel mesenteronu. U rodu *Asaia* bylo v komárech pozorováno, že během kolonizace epitelů (střevo, slinné žlázy či ovaria) okolo sebe bakterie tvoří

extracelulární matrix (Crotti et al., 2009; Favia et al., 2007), která je, podobně jako u ostatních bakterií octového kvašení, polysacharidového původu, a tím vytváří pevné spojení s epitelální buňkou neboli „biofilm“. Pokud by tato extracelulární matrix byla vylučována i bakteriemi ve střevě flebotoma, pak by mohla bránit přichycení promastigotů na epitel abdominálního mesenteronu.

In vivo pokusy jsme zjistili, že druhý den po sání byla intenzita infekce vyšší u *Asaia*+ flebotomů, avšak osmý den po sání, jsme nepozorovali v intenzitě infekce žádný signifikantní rozdíl. Naše výsledky jsou v rozporu se studií Sant'Anna et al., (2014), kdy před infekcí *L. mexicana* byly samicím *Lutzomyia longipalpis* podávány v cukru bakterie *Asaia* sp., které snížily intenzitu leishmaniové infekce. Autoři však hodnotili intenzitu infekce pouze 72 hodin od začátku infekce a tudíž nemůžeme studii porovnat s našimi výsledky v pozdějších fázích infekce.

Porovnání lokalizace infekcí ukázalo, že dva dny po sání krve se u obou skupin vyskytovali promastigoti v endoperitrofickém prostoru, avšak 8 dní po sání měli *Asaia*+ jedinci signifikantně častěji kolonizovanou stomodeální valvu a promastigoti se vyskytovali v thorakálním mesenteronu, což je nezbytný krok pro přenos leishmaniové infekce. Naproti tomu u *Asaia*- jedinců se leishmanie vyskytovaly často pouze v abdominálním mesenteronu, či zároveň v jeho thorakální části. Domníváme se, že bakterie rodu *Asaia* vytváří v mesenteronu méně hostinné prostředí pro leishmanie a způsobují tak rychlejší migraci promastigotů do oblasti thorakálního mesenteronu a stomodeální valvy. To by v důsledku mohlo mít pozitivní vliv na průběh infekce *L. major* a zvýšit pravděpodobnost přenosu do obratlovčího hostitele.

Abychom zjistili, zda bakterie působí přímo negativně na leishmanie, rozhodli jsme se provést *in vitro* experimenty během kterých, jsme společně kultivovali bakterie rodu *Asaia* a *L. major*. Po dobu 6 dnů jsme pak porovnávali růst populace *L. major* u pokusné (kultivace *L. major* s *A. krungthepensis*) a kontrolní skupiny (kultivace jen *L. major*). Vzhledem k tomu, že populace bakterií rodu *Asaia* nebyla schopna růst v kultivačním médiu pro leishmanie a to samé platilo i naopak, vyzkoušeli jsme smíchat obě kultivační média (GLY a M199 bez antibiotik) v poměru 1:1, a nejprve v nich vyzkoušeli kultivovat leishmanie a bakterie zvlášť. Výsledky z těchto „předpokusů“ potvrdily schopnost obou kultur růst v takto připraveném médiu a vyloučily možný negativní vliv média na chování kultury leishmanií.

Pro společnou kultivaci jsme použili stejnou infekční dávku bakterií i leishmanií, jako byla použita v *in vivo* experimentech (5×10^5 buněk / ml pro leishmanie a $1,7 - 4 \times 10^8$ CFU / ml pro bakterie). Pokusná a kontrolní skupina se lišily. Zatímco v kontrolní skupině docházelo k množení promastigotů a jejich počet neustále vzrůstal, u pokusné skupiny došlo k mírnému růstu promastigotů pouze první dva dny a následně se počty promastigotů snižovaly až do 6. dne. Naopak, přítomnost leishmanií neměla na růst bakterií žádný viditelný vliv. Úbytek promastigotů v kultuře s *A. krungthepensis* svědčí o tom, že bakterie mohou ovlivňovat leishmanie přímo a že ve střevě flebotoma mohou (například svými metabolity) vytvářet prostředí nevhodné pro vývoj leishmanií. Podobný mechanismus byl popsán například u bakterie *Chromobacterium violaceum*, jejíž metabolit violacein vykazuje v *in vitro* experimentech leishmanicidní aktivitu (Leon, 2001).

Díky signifikantně rozdílné lokalizaci promastigotů u *Asaia*- a *Asaia*+ flebotomů jsme předpokládali i rozdílné zastoupení morfologických forem. Proto jsme ze střev, které byly pozitivní na leishmaniovou infekci, udělali preparáty barvené roztokem Giemsa a následně měřili morfologické formy promastigotů. Na preparátech jsme detekovali tři typy morfologických forem: dlouhé promastigoty (nektomonády), krátké promastigoty (leptomonády) a metacyklické promastigoty. Zastoupení všech tří morfologických forem bylo u obou skupin flebotomů podobné. Je tedy zřejmé, že bakterie rodu *Asaia* nemají vliv na morfologickou diferenciaci *L. major* ve střevě *P. duboscqi*.

6 Závěr

- U 237 testovaných flebotomů z podrodu *Larroussius*, odchycených v pěti zemích na Balkánském poloostrově, byly bakterie rodu *Asaia* a *Wolbachia* detekovány pomocí PCR s prevalencí 2,5 %, respektive 8,4 %. Pomocí sekvenace jsme prokázali, že všechny detekované bakterie rodu *Wolbachia* patřily do dvou kmenů wPrn a wCel, které řadíme do superskupiny B. Bakterie rodu *Asaia* se nepodařilo určit do druhu.
- Bakterie rodu *Asaia* nebyly detekovány ani v jedné z 12 testovaných laboratorních kolonií flebotomů. Bakterie rodu *Wolbachia* byly detekovány pouze u kolonie *Phlebotomus perniciosus*, a to s prevalencí výskytu 88,6 %. Jedná se o wolbachie wPrn, které nevykazují u infikovaných jedinců tkáňovou specifitu a vyskytují se ve všech testovaných tkání (hlava a slinné žlázy, hrud' s křídly, střevo s malpighickými trubicemi, zadeček).
- Experimentální eliminace bakterií rodu *Wolbachia* z populace *P. perniciosus* pomocí širokospektrálního antibiotika tetracyklin-hydrochlorid selhala.
- Úspěšně byla provedena experimentální superinfekce *Asaia krungthepensis* a *Leishmania major* u flebotomů *Phlebotomus duboscqi*. *A. krungthepensis* nemá vliv na intenzitu infekce *L. major*, ani na zastoupení morfologických forem leishmanií ve střevě flebotomů. Osmý den po infekci *L. major* však dochází u *Asaia*+ jedinců k signifikantně častější lokalizaci promastigotů v oblasti thorakálního mesenteronu a stomodeální valvy. U *Asaia*- jedinců jsou promastigoti lokalizováni spíše v abdominálním mesenteronu.
- Během *in vitro* experimentů bylo prokázáno, že *A. krungthepensis* ovlivňuje růst promastigotů *L. major*.

7 Seznam použité literatury

- Akhoundi, M., Bakhtiari, R., Guillard, T., Baghaei, A., Tolouei, R., Sereno, D., Toubas, D., Depaquit, J., Abyaneh, M. R. (2012). Diversity of the bacterial and fungal microflora from the midgut and cuticle of phlebotomine sand flies collected in North-western Iran. *PLoS ONE*, 7(11), e50259.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., Sereno, D. (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of leishmania parasites and sand flies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), e0004349.
- Akhoundi, M., Mohebbi, M., Asadi, M., Mahmodi, M. R., Amraei, K., Mirzaei, A. (2013). Molecular characterization of *Leishmania* spp. in reservoir hosts in endemic foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Folia Parasitologica*, 60(3), 218–224.
- Alkan, C., Bichaud, L., de Lamballerie, X., Alten, B., Gould, E. A., Charrel, R. N. (2013). Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: Epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral Research*, 100(1), 54–74.
- Alten, B., Maia, C., Afonso, M. O., Campino, L., Jiménez, M., González, E., Molina, R., Bañuls, A. L., Prudhomme, J., Vergnes, B., Toty, C., Cassan, C., Rahola, N., Thierry, M., Sereno, D., Bongiorno, G., Bianchi, R., Khoury, C., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., Antoniou, M., Christodoulou, V., Mazeris, A., Karakus, M., Ozbel, Y., Arserim, S. K., Erisoz Kasap, O., Gunay, F., Oguz, G., Kaynas, S., Tsertsivadze, N., Tskhvaradze L., Giorgobiani, E., Gramiccia, M., Volf, P., Gradoni, L., (2016). Seasonal dynamics of phlebotomine sand fly species proven vectors of mediterranean leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(2), e0004458.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., Boer, M. den, WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, 7(5), e35671.
- Angleró-Rodríguez, Y. I., Talyuli, O. A., Blumberg, B. J., Kang, S., Demby, C., Shields, A., Carlson, J., Jupatanakul, N., Dimopoulos, G. (2017). An *Aedes aegypti*-associated fungus increases susceptibility to dengue virus by modulating gut trypsin activity. *eLife*, 6, e28844.

- Antoniou, M., Ntais, P., Poupalos, G., Christodoulou, V., Sifaki-Pistola, D., Pratlong, F., Messaritakis, I. (2013).** Leishmaniasis in Greece. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(5), 906–915.
- Asgari, M., Ilbeigikhamsehnejad, M., Rismani, E., Dinparast Djadid, N., Raz, A. (2020).** Molecular characterization of RNase III protein of *Asaia* sp. for developing a robust RNAi-based paratransgenesis tool to affect the sexual life-cycle of *Plasmodium* or *Anopheles* fitness. *Parasites & Vectors*, 13(1), 42.
- Ayala, D., Akone-Ella, O., Rahola, N., Kengne, P., Ngangue, M. F., Mezeme, F., Makanga, B. K., Nigg, M., Costantini, C., Simard, F., Prugnolle, F., Roche, B., Duron, O., Paupy, C. (2019).** Natural *Wolbachia* infections are common in the major malaria vectors in Central Africa. *Evolutionary Applications*, 12(8), 1583–1594.
- Ayhan, N., & Charrel, R. N. (2018).** Emergent sand fly-borne phleboviruses in the Balkan region. *Emerging Infectious Diseases*, 24(12), 2324–2330.
- Ayhan, N., Prudhomme, J., Laroche, L., Bañuls, A. L., Charrel, R. N. (2020).** Broader geographical distribution of Toscana virus in the mediterranean region suggests the existence of larger varieties of sand fly vectors. *Microorganisms*, 8(1), 114.
- Baldini, F., Segata, N., Pompon, J., Marcenac, P., Shaw, W. R., Dabiré, R. K., Diabaté, A., Levashina, E. A., Catteruccia, F. (2014).** Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae*. *Nature Communications*, 5(1), 3985.
- Bassene, H., Fenollar, F., Doucoure, S., Samb, B., Faye, O., Raoult, D., Sokhna, C., Mediannikov, O. (2019).** A pilot study on isolation of *Asaia* and detecting its co-presence with *Plasmodium falciparum* in two major malaria vectors in Senegal. *Journal of Parasitology and Vector Biology*, 11(1), 1–9.
- Bassene, H., Niang, E. H. A., Fenollar, F., Doucoure, S., Faye, O., Raoult, D., Sokhna, C., Mediannikov, O. (2020).** Role of plants in the transmission of *Asaia* sp., which potentially inhibit the *Plasmodium* sporogenic cycle in *Anopheles* mosquitoes. *Scientific Reports*, 10(1), 7144.
- Baton, L. A., Pacidônio, E. C., Gonçalves, D. da S., Moreira, L. A. (2013).** wFlu: characterization and evaluation of a native *Wolbachia* from the mosquito *Aedes fluviatilis* as a potential vector control agent. *PLoS ONE*, 8(3), e59619.

- Beck, A., Beck, R., Kusak, J., Gudan, A., Martinković, F., Artuković, B., Hohšteter, M., Huber, Đ., Marinculić, A., Grabarević, Ž. (2008).** A case of visceral leishmaniosis in a gray wolf (*Canis lupus*) from Croatia. *Journal of Wildlife Diseases*, 44(2), 451–456.
- Benlarbi, M., & Ready, P. D. (2003).** Host-specific *Wolbachia* strains in widespread populations of *Phlebotomus perniciosus* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae), and prospects for driving genes into these vectors of *Leishmania*. *Bulletin of Entomological Research*, 93(5), 383–391.
- Bian, G., Zhou, G., Lu, P., Xi, Z. (2013).** Replacing a native *Wolbachia* with a novel strain results in an increase in endosymbiont load and resistance to dengue virus in a mosquito vector. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(6), e2250.
- Blagrove, M. S. C., Arias-Goeta, C., Failloux, A. B., Sinkins, S. P. (2012).** *Wolbachia* strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(1), 255–260.
- Blumberg, B. J., Short, S. M., Dimopoulos, G. (2016).** Employing the mosquito microflora for disease control. In *Genetic Control of Malaria and Dengue*, Elsevier Inc., (335–362), ISBN: 978-0-12-800246-9
- Bongio, N. J., & Lampe, D. J. (2015).** Inhibition of *Plasmodium berghei* development in mosquitoes by effector proteins secreted from *Asaia* sp. bacteria using a novel native secretion signal. *PLoS ONE*, 10(12), e0143541.
- Bordbar, A., Soleimani, S., Fardid, F., Zolfaghari, M. R., Parvizi, P. (2014).** Three strains of *Wolbachia pipientis* and high rates of infection in Iranian sand fly species. *Bulletin of Entomological Research*, 104(2), 195–202.
- Bosilkovski, M., Dimzova, M., Cvetkova, M., Poposki, K., Spasovska, K., Vidinic, I. (2019).** The changing pattern of fever of unknown origin in the Republic of North Macedonia. *Romanian Journal of Internal Medicine*, 57(3), 248–253.
- Boulanger, N., Lowenberger, C., Volf, P., Ursic, R., Sigutova, L., Sabatier, L., Svobodová, M., Beverley, S. M., Spath, G., Brun, R., Pesson, B., Bulet, P. (2004).** Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, 72(12), 7140–7146.

- Brelsfoard, C. L., & Dobson, S. L. (2011).** *Wolbachia* effects on host fitness and the influence of male aging on cytoplasmic incompatibility in *Aedes polynesiensis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 48(5), 1008–1015.
- Calderón-Cortés, N., Quesada, M., Watanabe, H., Cano-Camacho, H., Oyama, K. (2012).** Endogenous plant cell wall digestion: a key mechanism in insect evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(1), 45–71.
- Cappelli, A., Damiani, C., Mancini, M. V., Valzano, M., Rossi, P., Serrao, A., Ricci, I., Favia, G. (2019).** *Asaia* activates immune genes in mosquito eliciting an anti-plasmodium response: implications in malaria control. *Frontiers in Genetics*, 10, 836.
- Caragata, E. P., Rancès, E., Hedges, L. M., Goffon, A. W., Johnson, K. N., O'Neill, S. L., McGraw, E. A. (2013).** Dietary cholesterol modulates pathogen blocking by *Wolbachia*. *PLoS Pathogens*, 9(6), e1003459.
- Cardoza, Y. J., Hofstetter, R. W., Vega, F. E. (2012).** Insect-associated microorganisms and their possible role in outbreaks. In *Insect Outbreaks Revisited*, Blackwell Publishing Ltd., (155–174), ISBN: 978-1-118-29520-5
- Carissimo, G., Pondeville, E., McFarlane, M., Dietrich, I., Mitri, C., Bischoff, E., Antoniewski, C., Bourgouin, C., Failloux, A. B., Kohl, A., Vernick, K. D. (2015).** Antiviral immunity of *Anopheles gambiae* is highly compartmentalized, with distinct roles for RNA interference and gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(2), 176–185.
- Carretto, E., Visiello, R., Bardaro, M., Schivazappa, S., Vailati, F., Farina, C., Barbarini, D. (2016).** *Asaia lannensis* bacteremia in a ‘needle freak’ patient. *Future Microbiology*, 11(1), 23–29.
- Case, T. J. (1990).** Invasion resistance arises in strongly interacting species-rich model competition communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(24), 9610–9614.
- Cazan, C. D., Păstrav, I. R., Ionică, A. M., Oguz, G., Erisoz Kasap, O., Dvořák, V., Halada, P., Dumitrache, M. O., Volf, P., Alten, B., Mihalca, A. D. (2019).** Updates on the distribution and diversity of sand flies (Diptera: Psychodidae) in Romania. *Parasites & Vectors*, 12(1), 247.
- Ćirović, D., Chochlakakis, D., Tomanović, S., Sukara, R., Penezić, A., Tselentis, Y., Psaroulaki, A. (2014).** Presence of *Leishmania* and *Brucella* species in the golden jackal *Canis aureus* in Serbia. *BioMed Research International*, 2014, 1–6.

- Coon, K. L., Brown, M. R., Strand, M. R. (2016).** Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. *Molecular Ecology*, 25(22), 5806–5826.
- Coon, K. L., Valzania, L., McKinney, D. A., Vogel, K. J., Brown, M. R., Strand, M. R. (2017).** Bacteria-mediated hypoxia functions as a signal for mosquito development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(27), 5362–5369.
- Coon, K. L., Vogel, K. J., Brown, M. R., Strand, M. R. (2014).** Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Molecular ecology*, 23(11), 2727–2739.
- Crotti, E., Damiani, C., Pajoro, M., Gonella, E., Rizzi, A., Ricci, I., Negri, I., Scuppa, P., Rossi, P., Ballarini, P., Raddadi, N., Marzorati, M., Sacchi, L., Clementi, E., Genchi, M., Mandrioli, M., Bandi, C., Favia, G., Alma, A., Daffonchio, D. (2009).** *Asaia*, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insects of phylogenetically distant genera and orders. *Environmental Microbiology*, 11(12), 3252–3264.
- da Silva Gonçalves, D., Iturbe-Ormaetxe, I., Martins-da-Silva, A., Telleria, E. L., Rocha, M. N., Traub-Csekö, Y. M., O'Neill, S. L., Sant'Anna, M. R. V., Moreira, L. A. (2019).** *Wolbachia* introduction into *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) cell lines and its effects on immune-related gene expression and interaction with *Leishmania infantum*. *Parasites & Vectors*, 12(1), 33.
- Damiani, C., Ricci, I., Crotti, E., Rossi, P., Rizzi, A., Scuppa, P., Capone, A., Ulissi, U., Epis, S., Genchi, M., Sagnon, N., Faye, I., Kang, A., Chouaia, B., Whitehorn, C., Moussa, G. W., Mandrioli, M., Esposito, F., Sacchi, L., Bandi, C., Daffonchio, D., Favia, G. (2010).** Mosquito-bacteria symbiosis: the case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*. *Microbial Ecology*, 60(3), 644–654.
- Damiani, C., Ricci, I., Crotti, E., Rossi, P., Rizzi, A., Scuppa, P., Esposito, F., Bandi, C., Daffonchio, D., Favia, G. (2008).** Paternal transmission of symbiotic bacteria in malaria vectors. *Current Biology*, 18(23), 1087–1088.
- De Freece, C., Damiani, C., Valzano, M., D'Amelio, S., Cappelli, A., Ricci, I., Favia, G. (2014).** Detection and isolation of the α -proteobacterium *Asaia* in *Culex* mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology*, 28(4), 438–442.

- Depaquit, J., Grandadam, M., Fouque, F., Andry, P. E., Peyrefitte, C. (2010).** Arthropod-borne viruses transmitted by phlebotomine sand flies in Europe: a review. *Eurosurveillance*, 15(10), 40–47.
- Dey, R., Joshi, A. B., Oliveira, F., Pereira, L., Guimarães-Costa, A. B., Serafim, T. D., de Castro, W., Coutinho-Abreu, I. V., Bhattacharya, P., Townsend, S., Aslan, H., Perkins, A., Karmakar, S., Ismail, N., Karetnick, M., Meneses, C., Duncan, R., Nakhasi, H. L., Valenzuela, J. G., Kamhawi, S. (2018).** Gut microbes egested during bites of infected sand flies augment severity of leishmaniasis via inflammasome-derived IL-1 β . *Cell Host & Microbe*, 23(1), 134–143.
- Diaz-Albiter, H., Sant’Anna, M. R. V., Genta, F. A., Dillon, R. J. (2012).** Reactive oxygen species-mediated immunity against *Leishmania mexicana* and *Serratia marcescens* in the phlebotomine sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(28), 23995–24003.
- Dillon, R. J., & Dillon, V. M. (2004).** The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology*, 49(1), 71–92.
- Dillon, R. J., Kordy, E. E., Shehata, M., Lane, R. P. (1996).** The prevalence of a microbiota in the digestive tract of *Phlebotomus papatasi*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 90(6), 669–673.
- Dillon, R. J., Vennard, C. T., Buckling, A., Charnley, A. K. (2005).** Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecology Letters*, 8(12), 1291–1298.
- Dobson, S. L., Bourtzis, K., Braig, H. R., Jones, B. F., Zhou, W., Rousset, F., O’Neill, S. L. (1999).** *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(2), 153–160.
- Dobson, S. L., & Rattanadechakul, W. (2001).** A novel technique for removing *Wolbachia* infections from *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 38(6), 844–849.
- Dostálová, A., & Volf, P. (2012).** *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors*, 5(1), 276.
- Douglas, A. E. (1989).** Mycetocyte symbiosis in insect. *Biological Reviews*, 64(4), 409–434.

- Douglas, A. E., Minto, L. B., Wilkinson, T. L. (2001).** Quantifying nutrient production by the microbial symbionts in an aphid. *The Journal of Experimental Biology*, 204(Pt 2), 349–358.
- Douglas, A. E. (2015).** Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 17–34.
- Dutton, T. J., & Sinkins, S. P. (2005).** Filarial susceptibility and effects of *Wolbachia* in *Aedes pseudoscutellaris* mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology*, 19(1), 60–65.
- Dvořák, V., Hlaváčková, K., Kočíšová, A., Volf, P. (2016).** First record of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* in Slovakia. *Parasite*, 23, 48.
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013).** The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699–735.
- Favia, G., Ricci, I., Damiani, C., Raddadi, N., Crotti, E., Marzorati, M., Rizzi, A., Urso, R., Brusetti, L., Borin, S., Mora, D., Scuppa, P., Pasqualini, L., Clementi, E., Genchi, M., Corona, S., Negri, I., Grandi, G., Alma, A., Kramer, L., Esposito, F., Bandi, C., Sacchi, L., Daffonchio, D. (2007).** Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an asian malarial mosquito vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21), 9047–9051.
- Favia, G., Ricci, I., Marzorati, M., Negri, I., Alma, A., Sacchi, L., Bandi, C., Daffonchio, D. (2008).** Bacteria of the genus *Asaia*: a potential paratransgenic weapon against malaria. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 627, 49–59.
- Fňukal, M. (2008).** Neklidný Balkán. *Geografické rozhledy*, 17(3), 2–3.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994).** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299.
- Fraih, W., Fares, W., Perrin, P., Dorkeld, F., Sereno, D., Barhoumi, W., Sbissi, I., Cherni, S., Chelbi, I., Durvasula, R., Ramalho-Ortigao, M., Gtari, M., Zhioua, E. (2017).** An integrated overview of the midgut bacterial flora composition of *Phlebotomus perniciosus*, a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in the Western Mediterranean Basin. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(3).

- *Garver, L. S., Dong, Y., Dimopoulos, G. (2009).** Caspar controls resistance to *Plasmodium falciparum* in diverse *Anopheline* Species. *PLoS Pathogens*, 5(3).
- *Gerth, M., Gansauge, M.T., Weigert, A., Bleidorn, C. (2014).** Phylogenomic analyses uncover origin and spread of the *Wolbachia* pandemic. *Nature Communications*, 5(1), 5117.
- Gomes, F. M., & Barillas-Mury, C. (2018).** Infection of anopheline mosquitoes with *Wolbachia*: implications for malaria control. *PLoS Pathogens*, 14(11), e1007333.
- Gomes, F. M., Hixson, B. L., Tyner, M. D. W., Ramirez, J. L., Canepa, G. E., Alves e Silva, T. L., Molina-Cruz, A., Keita, M., Kane, F., Traoré, B., Sogoba, N., Barillas-Mury, C. (2017).** Effect of naturally occurring *Wolbachia* in *Anopheles gambiae* s.l. mosquitoes from Mali on *Plasmodium falciparum* malaria transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(47), 12566–12571.
- Gouveia, C., Asensi, M. D., Zahner, V., Rangel, E. F., Oliveira, S. M. P. de. (2008).** Study on the bacterial midgut microbiota associated to different Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Neotropical Entomology*, 37(5), 597–601.
- Guégan, M., Zouache, K., Démichel, C., Minard, G., Tran Van, V., Potier, P., Mavingui, P., Valiente Moro, C. (2018).** The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome*, 6(1), 49.
- Guernaoui, S., Garcia, D., Gazanion, E., Ouhdouch, Y., Boumezzough, A., Pesson, B., Fontenille, D., Sereno, D. (2011).** Bacterial flora as indicated by PCR-temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) of 16S rDNA gene fragments from isolated guts of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Vector Ecology*, 36, 144–147.
- Hillesland, H., Read, A., Subhadra, B., Hurwitz, I., McKelvey, R., Ghosh, K., Das, P., Durvasula, R. (2008).** Identification of aerobic gut bacteria from the kala azar vector, *Phlebotomus argentipes*: a platform for potential paratransgenic manipulation of sand flies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(6), 881–886.
- *Hiroki, M., Kato, Y., Kamito, T., Miura, K. (2002).** Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly, *Eurema hecabe* (Lepidoptera: Pieridae). *Naturwissenschaften*, 89(4), 167–170.

- Hughes, G. L., Koga, R., Xue, P., Fukatsu, T., Rasgon, J. L. (2011).** *Wolbachia* infections are virulent and inhibit the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathogens*, 7(5).
- Hughes, G. L., Vega-Rodriguez, J., Xue, P., Rasgon, J. L. (2012).** *Wolbachia* strain wAlbB enhances infection by the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5), 1491–1495.
- Huigens, M. E., de Almeida, R. P., Boons, P. A. H., Luck, R. F., Stouthamer, R. (2004).** Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271(1538), 509–515.
- Hurwitz, I., Hillesland, H., Fieck, A., Das, P., Durvasula, R. (2011).** The paratransgenic sand fly: a platform for control of *Leishmania* transmission. *Parasites & Vectors*, 4(1), 82.
- Charlat, S., Hurst, G. D. D., Merçot, H. (2003).** Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends in Genetics*, 19(4), 217–223.
- Charrel, R. N. (2012).** Emergence of Toscana virus in the mediterranean area. *World Journal of Virology*, 1(5), 135.
- Charrel, R. N., Gallian, P., Navarro-Mari, J.-M., Nicoletti, L., Papa, A., Sánchez-Seco, M. P., Tenorio, A., de Lamballerie, X. (2005).** Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), 1657–1663.
- Chouaia, B., Rossi, P., Montagna, M., Ricci, I., Crotti, E., Damiani, C., Epis, S., Faye, I., Sagnon, N., Alma, A., Favia, G., Daffonchio, D., Bandi, C. (2010).** Molecular evidence for multiple infections as revealed by typing of *Asaia* bacterial symbionts of four mosquito species. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(22), 7444–7450.
- Chouaia, B., Rossi, P., Epis, S., Mosca, M., Ricci, I., Damiani, C., Ulissi, U., Crotti, E., Daffonchio, D., Bandi, C., Favia, G. (2012).** Delayed larval development in *Anopheles* mosquitoes deprived of *Asaia* bacterial symbionts. *BMC Microbiology*, 12(Suppl 1), S2.
- Jeffries, C. L., Lawrence, G. G., Golovko, G., Kristan, M., Orsborne, J., Spence, K., Hurn, E., Bandibabone, J., Tantely, L. M., Raharimalala, F. N., Keita, K., Camara, D., Barry, Y., Wat'senga, F., Manzambi, E. Z., Afrane, Y. A., Mohammed, A. R., Abeku, T. A., Hedge, S., Khanipov, K., Pimenova, M.,**

- Fofanov, Y., Boyer, S., Irish, S. R., Hughes, G. L., Walker, T. (2018a).** Novel *Wolbachia* strains in *Anopheles* malaria vectors from sub-Saharan Africa. *Wellcome Open Research*, 3, 113.
- Jeffries, C. L., Rogers, M. E., Walker, T. (2018b).** Establishment of a method for *Lutzomyia longipalpis* sand fly egg microinjection: the first step towards potential novel control strategies for leishmaniasis. *Wellcome Open Research*, 3, 55.
- Joshi, D., Pan, X., McFadden, M. J., Bevins, D., Liang, X., Lu, P., Thiem, S., Xi, Z. (2017).** The maternally inheritable *Wolbachia* wAlbB induces refractoriness to *Plasmodium berghei* in *Anopheles stephensi*. *Frontiers in Microbiology*, 8(366).
- Kambris, Z., Blagborough, A. M., Pinto, S. B., Blagrove, M. S. C., Godfray, H. C. J., Sinden, R. E., Sinkins, S. P. (2010).** *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits *Plasmodium* development in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathogens*, 6(10), e1001143.
- Kamtchum-Tatuene, J., Makepeace, B. L., Benjamin, L., Baylis, M., Solomon, T. (2016).** The potential role of *Wolbachia* in controlling the transmission of emerging human arboviral infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 30(1), 108–116.
- Karatepe, B., Aksoy, S., Karatepe, M. (2018).** Investigation of *Wolbachia* spp. and *Spiroplasma* spp. in *Phlebotomus* species by molecular methods. *Scientific Reports*, 8(1), 10616.
- Karayiannis, S., Ntais, P., Messaritakis, I., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., Antoniou, M. (2015).** Detection of *Leishmania Infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in central Greece. *Parasitology*, 142(13), 1574–1578.
- Karimian, F., Vatandoost, H., Rassi, Y., Maleki-Ravasan, N., Choubdar, N., Koosha, M., Arzamani, K., Moradi-Asl, E., Veysi, A., Alipour, H., Shirani, M., Oshaghi, M. A. (2018).** Wsp-based analysis of *Wolbachia* strains associated with *Phlebotomus papatasi* and *P. sergenti* (Diptera: Psychodidae) main cutaneous leishmaniasis vectors, introduction of a new subgroup wSerg. *Pathogens and Global Health*, 112(3), 152–160.
- Karimian, F., Vatandoost, H., Rassi, Y., Maleki-Ravasan, N., Mohebbi, M., Shirazi, M. H., Koosha, M., Choubdar, N., Oshaghi, M. A. (2019).** Aerobic midgut microbiota of sand fly vectors of zoonotic visceral leishmaniasis from northern Iran, a step toward finding potential paratransgenic candidates. *Parasites & Vectors*, 12(1), 10.

- Kassem, H. A., Hassan, A. N., Abdel-Hamid, I., Osman, G., El Khalab, E. M., Madkour, M. A. (2003).** *Wolbachia* infection and the expression of cytoplasmic incompatibility in sandflies (Diptera: Psychodidae) from Egypt. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 97(6), 639–644.
- Kelly, P. H., Bahr, S. M., Serafim, T. D., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., Meneses, C., Kirby, J. R., Valenzuela, J. G., Kamhawi, S., Wilson, M. E. (2017).** The gut microbiome of the vector *Lutzomyia longipalpis* is essential for survival of *Leishmania infantum*. *mBio*, 8(1), e01121-16.
- Killick-Kendrick, R. (1999).** The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17(3), 279–289.
- Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007).** The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25(1), 697–743.
- Leon, L. L. (2001).** Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(3), 449–450.
- Li, K., Chen, H., Jiang, J., Li, X., Xu, J., Ma, Y. (2016).** Diversity of bacteriome associated with *Phlebotomus chinensis* (Diptera: Psychodidae) sand flies in two wild populations from China. *Scientific Reports*, 6(1), 36406.
- Li, S. J., Ahmed, M. Z., Lv, N., Shi, P. Q., Wang, X. M., Huang, J. L., Qiu, B. L. (2017).** Plantmediated horizontal transmission of *Wolbachia* between whiteflies. *The ISME Journal*, 11(4), 1019–1028.
- Li, Y. Y., Floate, K. D., Fields, P. G., Pang, B.-P. (2014).** Review of treatment methods to remove *Wolbachia* bacteria from arthropods. *Symbiosis*, 62(1), 1–15.
- Liu, X. (2016).** Microbiome. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 89(3), 275–276.
- Louradour, I., Monteiro, C. C., Inbar, E., Ghosh, K., Merkhofer, R., Lawyer, P., Paun, A., Smelkinson, M., Secundino, N., Lewis, M., Erram, D., Zurek, L., Sacks, D. (2017).** The midgut microbiota plays an essential role in sand fly vector competence for *Leishmania major*. *Cellular Microbiology*, 19(10), e12755.
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015).** The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3(1), 31.

- Maroli, M., Ciufolini, M. G., Verani, P. (1993).** Vertical transmission of Toscana virus in the sand fly, *Phlebotomus perniciosus*, via the second gonotrophic cycle. *Medical and Veterinary Entomology*, 7(3), 283–286.
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., Gradoni, L. (2013).** Phlebotomine sand flies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), 123–147.
- Matsumoto, K., Izri, A., Dumon, H., Raoult, D., Parola, P. (2008).** First detection of *Wolbachia* spp., including a new genotype, in sand flies collected in Marseille, France. *Journal of Medical Entomology*, 45(3), 466–469.
- McCarthy, C. B., Diambra, L. A., Rivera Pomar, R. V. (2011).** Metagenomic analysis of taxa associated with *Lutzomyia longipalpis*, vector of visceral leishmaniasis, using an unbiased high-throughput approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(9), e1304.
- Medlock, J. M., Hansford, K. M., Van Bortel, W., Zeller, H., Alten, B. (2014).** A summary of the evidence for the change in European distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of public health importance. *Journal of Vector Ecology*, 39(1), 72–77.
- Melaun, C., Krüger, A., Werblow, A., Klimpel, S. (2014).** New record of the suspected leishmaniasis vector *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) — the northernmost phlebotomine sand fly occurrence in the Palearctic region. *Parasitology Research*, 113(6), 2295–2301.
- Mihalca, A. D., Cazan, C. D., Sulesco, T., Dumitrache, M. O. (2019).** A historical review on vector distribution and epidemiology of human and animal leishmanioses in eastern Europe. *Research in Veterinary Science*, 123, 185–191.
- Minard, G., Mavingui, P., Moro, C. (2013a).** Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites & Vectors*, 6(1), 146.
- Minard, G., Tran, F. H., Raharimalala, F. N., Hellard, E., Ravelonandro, P., Mavingui, P., Valiente Moro, C. (2013b).** Prevalence, genomic and metabolic profiles of *Acinetobacter* and *Asaia* associated with field-caught *Aedes albopictus* from Madagascar. *FEMS Microbiology Ecology*, 83(1), 63–73.
- Mitraka, E., Stathopoulos, S., Siden-Kiamos, I., Christophides, G. K., Louis, C. (2013).** *Asaia* accelerates larval development of *Anopheles gambiae*. *Pathogens and Global Health*, 107(6), 305–311.

- *Mitri, C., Jacques, J. C., Thiery, I., Riehle, M. M., Xu, J., Bischoff, E., Morlais, I., Nsango, S. E., Vernick, K. D., Bourgouin, C. (2009).** Fine pathogen discrimination within the APL1 gene family protects *Anopheles gambiae* against human and rodent malaria species. *PLoS Pathogens*, 5(9), e1000576.
- Monteiro, C. C., Villegas, L. E. M., Campolina, T. B., Pires, A. C. M. A., Miranda, J. C., Pimenta, P. F. P., Secundino, N. F. C. (2016).** Bacterial diversity of the american sand fly *Lutzomyia intermedia* using high-throughput metagenomic sequencing. *Parasites & Vectors*, 9(1), 480.
- Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J. A., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., Rocha, B. C., Hall-Mendelin, S., Day, A., Riegler, M., Hugo, L. E., Johnson, K. N., Kay, B. H., McGraw, E. A., van den Hurk, A. F., Ryan, P. A., O'Neill, S. L. (2009).** A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell*, 139(7), 1268–1278.
- Moriconi, M., Rugna, G., Calzolari, M., Bellini, R., Albieri, A., Angelini, P., Cagarelli, R., Landini, M. P., Charrel, R. N., Varani, S. (2017).** Phlebotomine sand fly-borne pathogens in the Mediterranean Basin: human leishmaniasis and phlebovirus infections. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(8), e0005660.
- Mukhopadhyay, J., Braig, H. R., Rowton, E. D., & Ghosh, K. (2012).** Naturally occurring culturable aerobic gut flora of adult *Phlebotomus papatasi*, vector of *Leishmania major* in the Old World. *PLoS ONE*, 7(5), e35748.
- Murdock, C. C., Blanford, S., Hughes, G. L., Rasgon, J. L., Thomas, M. B. (2015).** Temperature alters *Plasmodium* blocking by *Wolbachia*. *Scientific Reports*, 4(1), 3932.
- Myšková, J., Votýpka, J., Volf, P. (2008).** *Leishmania* in sand flies: comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. *Journal of Medical Entomology*, 45(1), 133–138.
- Nazni, W. A., Hoffmann, A. A., NoorAfizah, A., Cheong, Y. L., Mancini, M. V., Golding, N., Kamarul, G. M. R., Arif, M. A. K., Thohir, H., NurSyamimi, H., ZatilAqmar, M. Z., NurRuqqayah, M., NorSyazwani, A., Faiz, A., Irfan, F. R. M. N., Rubaaini, S., Nuradila, N., Nizam, N. M. N., Irwan, S. M., Endersby-Harshman, N., White, V. L., Ant, T. H., Herd, Ch. S., Hasnor, A. H., Abubakar, R., Hapsah, D. M., Khadijah, K., Kamilan, D., Lee, S. Ch., Paid, Y. M., Fadzilah, K., Topek, O., Gill, B. S., Lee, H. L., Sinkins, S. P. (2019).** Establishment of *Wolbachia* strain wAlbB in Malaysian populations of *Aedes aegypti* for dengue control. *Current Biology*, 29(24), 4241-4248.e5.

- *Negri, I., Pellecchia, M., Mazzoglio, P. J., Patetta, A., Alma, A. (2006).** Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/X0 sex-determination system. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1599), 2409–2416.
- Ono, M., Braig, H. R., Munstermann, L. E., Ferro, C., O’Neil, S. L. (2001).** *Wolbachia* Infections of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 38(2), 237–241.
- Pace, D. (2014).** Leishmaniasis. *Journal of Infection*, 69, 10–18.
- Palatnik-de-Sousa, C. B., & Day, M. J. (2011).** One health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 4(1), 197.
- Pan, X., Pike, A., Joshi, D., Bian, G., McFadden, M. J., Lu, P., Liang, X., Zhang, F., Raikhel, A. S., Xi, Z. (2018).** The bacterium *Wolbachia* exploits host innate immunity to establish a symbiotic relationship with the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. *The ISME Journal*, 12(1), 277–288.
- Parvizi, P., Benlarbi, M., Ready, P. D. (2003).** Mitochondrial and *Wolbachia* markers for the sand fly *Phlebotomus papatasi*: little population differentiation between peridomestic sites and gerbil burrows in Isfahan province, Iran. *Medical and Veterinary Entomology*, 17(4), 351–362.
- Parvizi, P., Bordbar, A., Najafzadeh, N. (2013a).** Detection of *Wolbachia pipientis*, including a new strain containing the wsp gene, in two sister species of *Paraphlebotomus* sand flies, potential vectors of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(4), 414–420.
- Parvizi, P., Fardid, F., Soleimani, S. (2013b).** Detection of a new strain of *Wolbachia pipientis* in *Phlebotomus perfiliewi transcaucasicus*, a potential vector of visceral leishmaniasis in North-west of Iran, by targeting the major surface protein gene. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 7(1), 46–55.
- Pascar, J., & Chandler, C. H. (2018).** A bioinformatics approach to identifying *Wolbachia* infections in arthropods. *PeerJ*, 6, e5486.
- Peterkova-Koci, K., Robles-Murguia, M., Ramalho-Ortigao, M., Zurek, L. (2012).** Significance of bacteria in oviposition and larval development of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasites & Vectors*, 5(1), 145.

- Petrela, R., Foto, E., Kuli, G., Hoxha, H., Zavalani, F., Neza, B. (2016).** The epidemiologic considerations about visceral leishmaniasis in Albania 2010-2014. *International Journal of Infectious Diseases*, 45, 375.
- Pietri, J. E., DeBruhl, H., Sullivan, W. (2016).** The rich somatic life of *Wolbachia*. *MicrobiologyOpen*, 5(6), 923–936.
- Pinto, S. B., Mariconti, M., Bazzocchi, C., Bandi, C., Sinkins, S. P. (2012).** *Wolbachia* surface protein induces innate immune responses in mosquito cells. *BMC Microbiology*, 12(Suppl 1), S11.
- Pires, A. C. A. M., Villegas, L. E. M., Campolina, T. B., Orfanó, A. S., Pimenta, P. F. P., Secundino, N. F. C. (2017).** Bacterial diversity of wild-caught *Lutzomyia longipalpis* (a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in Brazil) under distinct physiological conditions by metagenomics analysis. *Parasites & Vectors*, 10(1), 627.
- Raharimalala, F. N., Boukraa, S., Bawin, T., Boyer, S., Francis, F. (2016).** Molecular detection of six (endo-) symbiotic bacteria in Belgian mosquitoes: first step towards the selection of appropriate paratransgenesis candidates. *Parasitology Research*, 115(4), 1391–1399.
- Ramirez, J. L., Short, S. M., Bahia, A. C., Saraiva, R. G., Dong, Y., Kang, S., Tripathi, A., Mlambo, G., Dimopoulos, G. (2014).** *Chromobacterium* Csp_P reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and *in vitro* anti-pathogen activities. *PLoS Pathogens*, 10(10), e1004398.
- Ramirez, J. L., Souza-Neto, J., Torres Cosme, R., Rovira, J., Ortiz, A., Pascale, J. M., Dimopoulos, G. (2012).** Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(3), e1561.
- Rasgon, J. L., Gamston, C. E., Ren, X. (2006).** Survival of *Wolbachia pipientis* in cell-free medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 6934–6937.
- Ricci, I., Damiani, C., Capone, A., DeFreece, C., Rossi, P., Favia, G. (2012).** Mosquito/microbiota interactions: from complex relationships to biotechnological perspectives. *Current Opinion in Microbiology*, 15(3), 278–284.
- Rogers, M. E., Hajmová, M., Joshi, M. B., Sádlová, J., Dwyer, D. M., Volf, P., Bates, P. A. (2008).** *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly

- vectors and enhances transmission to mice. *Cellular Microbiology*, 10(6), 1363–1372.
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., Zilber-Rosenberg, I. (2007).** The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), 355–362.
- Rosenberg, M. (2020).** The Balkans. <https://www.thoughtco.com/where-are-the-balkan-states-4070249>
- Ross, P. A., Callahan, A. G., Yang, Q., Jasper, M., Arif, M. A. K., Afizah, A. N., Nazni, W. A., Hoffmann, A. A. (2020).** An elusive endosymbiont: does *Wolbachia* occur naturally in *Aedes aegypti*? *Ecology and Evolution*, 10(3), 1581–1591.
- Rossi, P., Ricci, I., Cappelli, A., Damiani, C., Ulissi, U., Mancini, M. V., Valzano, M., Capone, A., Epis, S., Crotti, E., Chouaia, B., Scuppa, P., Joshi, D., Xi, Z., Mandrioli, M., Sacchi, L., O'Neill, S. L., Favia, G. (2015).** Mutual exclusion of *Asaia* and *Wolbachia* in the reproductive organs of mosquito vectors. *Parasites & Vectors*, 8(1), 278.
- Sádlová, J., Homola, M., Myšková, J., Jančařová, M., Volf, P. (2018).** Refractoriness of *Sergentomyia schwetzi* to *Leishmania* spp. is mediated by the peritrophic matrix. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(4), e0006382.
- Sádlová, J., Price, H. P., Smith, B. A., Votýpka, J., Volf, P., Smith, D. F. (2010).** The stage-regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*. *Cellular Microbiology*, 12(12), 1765–1779.
- Sant'Anna, M. R., Diaz-Albiter, H., Aguiar-Martins, K., Al Salem, W. S., Cavalcante, R. R., Dillon, V. M., Bates, P. A., Genta, F. A., Dillon, R. J. (2014).** Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. *Parasites & Vectors*, 7, 329.
- Saraiva, R. G., Kang, S., Simões, M. L., Angleró-Rodríguez, Y. I., Dimopoulos, G. (2016).** Mosquito gut antiparasitic and antiviral immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 64, 53–64.
- Secundino, N., Kimblin, N., Peters, N. C., Lawyer, P., Capul, A. A., Beverley, S. M., Turco, S. J., Sacks, D. (2010).** Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in

- vector sand flies: Proteophosphoglycan protects *L. major*. *Cellular Microbiology*, 12(7), 906–918.
- Serafim, T. D., Figueiredo, A. B., Costa, P. A. C., Marques-da-Silva, E. A., Gonçalves, R., de Moura, S. A. L., Gontijo, N. F., da Silva, M., Michalick, M. S. M., Meyer-Fernandes, J. R., de Carvalho, R. P., Uliana, S. R. B., Fietto, J. L. R., Afonso, L. C. C. (2012).** *Leishmania* metacyclogenesis is promoted in the absence of purines. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(9), e1833.
- Shane, J. L., Grogan, C. L., Cwalina, C., Lampe, D. J. (2018).** Blood meal-induced inhibition of vector-borne disease by transgenic microbiota. *Nature Communications*, 9(1), 4127.
- Shaw, W. R., Marcenac, P., Childs, L. M., Buckee, C. O., Baldini, F., Sawadogo, S. P., Dabiré, R. K., Diabaté, A., Catteruccia, F. (2016).** *Wolbachia* infections in natural *Anopheles* populations affect egg laying and negatively correlate with *Plasmodium* development. *Nature Communications*, 7(1), 11772.
- Schlein, Y., Polacheck, I., Yuval, B. (1985).** Mycoses, bacterial infections and antibacterial activity in sand flies (Psychodidae) and their possible role in the transmission of leishmaniasis. *Parasitology*, 90(1), 57–66.
- Skelton, E., Rancès, E., Frentiu, F. D., Kusmintarsih, E. S., Iturbe-Ormaetxe, I., Caragata, E. P., Woolfit, M., O'Neill, S. L. (2016).** A Native *Wolbachia* endosymbiont does not limit dengue virus infection in the Mosquito *Aedes notoscriptus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 53(2), 401–408.
- Snyder, R. W., Ruhe, J., Kobrin, S., Wasserstein, A., Doline, C., Nachamkin, I., Lipschutz, J. H. (2004).** *Asaia bogorensis* peritonitis identified by 16S ribosomal RNA sequence analysis in a patient receiving peritoneal dialysis. *American Journal of Kidney Diseases*, 44(2), 15–17.
- Stecher, B., & Hardt, W.D. (2011).** Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Current Opinion in Microbiology*, 14(1), 82–91.
- Tagami, Y., & Miura, K. (2004).** Distribution and prevalence of *Wolbachia* in Japanese populations of Lepidoptera. *Insect Molecular Biology*, 13(4), 359–364.
- Telleria, E.,L., Sant'Anna, M. R. V., Alkurbi, M. O., Pitaluga, A. N., Dillon, R. J., Traub-Csekö, Y. M. (2013).** Bacterial feeding, *Leishmania* infection and distinct infection routes induce differential defensin expression in *Lutzomyia longipalpis*. *Parasites & Vectors*, 6(1), 12.

- Telleria, E., L., Sant'Anna, M. R. V., Ortigão-Farias, J. R., Pitaluga, A. N., Dillon, V. M., Bates, P. A., Traub-Csekö, Y. M., Dillon, R. J. (2012).** Caspar-like gene depletion reduces *Leishmania* infection in sand fly host *Lutzomyia longipalpis*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(16), 12985–12993.
- Telleria, E., L., Martins-da-Silva, A., Tempone, A. J., Traub-Csekö, Y. M. (2018).** *Leishmania*, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology*, 145(10), 1336–1353.
- Tesh, R. B., Lubroth, J., Guzman, H. (1992).** Simulation of arbovirus overwintering: survival of Toscana virus (Bunyaviridae: *Phlebovirus*) in its natural sand fly vector *Phlebotomus perniciosus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 47(5), 574–581.
- Tesh, R. B., & Modi, G. B. (1987).** Maintenance of Toscana virus in *Phlebotomus Perniciosus* by vertical transmission. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 36(1), 189–193.
- Tchioffo, M. T., Boissière, A., Abate, L., Nsango, S. E., Bayibéki, A. N., Awono-Ambéné, P. H., Christen, R., Gimonneau, G., Morlais, I. (2016).** Dynamics of bacterial community composition in the malaria mosquito's epithelia. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1500.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., Gordon, J. I. (2007).** The human microbiome project. *Nature*, 449(7164), 804–810.
- Van der Waaij, D., Berghuis-de Vries, J. M., Lekkerkerk-Van der Wees, J. E. C. (1972).** Colonization resistance of the digestive tract and the spread of bacteria to the lymphatic organs in mice. *Epidemiology & Infection*, 70(2), 335–342.
- *Vandekerckhove, T. T. M., Watteyne, S., Bonne, W., Vanacker, D., Devaere, S., Rumes, B., Maelfait, J. P., Gillis, M., Swings, J. G., Braig, H. R., Mertens, J. (2003).** Evolutionary trends in feminization and intersexuality in woodlice (Crustacea, Isopoda) infected with *Wolbachia pipientis* (alpha-proteobacteria). *Belgian Journal of Zoology*, 133(1), 61–69.
- Vaselek, S., Ayhan, N., Oguz, G., Erisoz Kasap, O., Savić, S., Di Muccio, T., Gradoni, L., Ozbek, Y., Alten, B., Petrić, D. (2017).** Sand fly and *Leishmania* spp. survey in Vojvodina (Serbia): first detection of *Leishmania infantum* DNA in sand flies and the first record of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908. *Parasites & Vectors*, 10(1), 444.

- Vivero, G. R. J., Cadavid Restrepo, G. E., Moreno Herrera, C. X., Ospina, V., Uribe, S. I., Robledo, S. M. (2016).** Antagonistic effect of bacteria isolated from the digestive tract of *Lutzomyia evansi* against promastigotes of *Leishmania infantum*, antimicrobial activities and susceptibility to antibiotics. *Advances in Microbiology*, 06(10), 760–775.
- Vivero, R. J., Mesa, G. B., Robledo, S. M., Herrera, C. X. M., Cadavid-Restrepo, G. (2019a).** Enzymatic, antimicrobial, and leishmanicidal bioactivity of gram-negative bacteria strains from the midgut of *Lutzomyia evansi*, an insect vector of leishmaniasis in Colombia. *Biotechnology Reports*, 24, e00379._
- Vivero, R. J., Villegas-Plazas, M., Cadavid-Restrepo, G. E., Herrera, C. X. M., Uribe, S. I., Junca, H. (2019b).** Wild specimens of sand fly phlebotomine *Lutzomyia evansi*, vector of leishmaniasis, show high abundance of *Methylobacterium* and natural carriage of *Wolbachia* and *Cardinium* types in the midgut microbiome. *Scientific Reports*, 9(1), 17746.
- Vivero, R. J., Jaramillo, N. G., Cadavid-Restrepo, G., Soto, S. I. U., Herrera, C. X. M. (2016).** Structural differences in gut bacteria communities in developmental stages of natural populations of *Lutzomyia evansi* from Colombia's Caribbean coast. *Parasites & Vectors*, 9(1), 496.
- Volf, P., Hajmová, M., Sádlová, J., Votýpka, J. (2004).** Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International Journal for Parasitology*, 34(11), 1221–1227.
- Volf, P., & Volfová, V. (2011).** Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology*, 36, 1–9.
- Volf, P., Kiewegová, A., Němec, A. (2002).** Bacterial colonisation in the gut of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae): transtadial passage and the role of female diet. *Folia Parasitologica*, 49(1), 73–77.
- Vollaard, E. J., & Clasener, H. A. (1994).** Colonization resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(3), 409–414.
- Wang, Y., Gilbreath, T. M., Kukutla, P., Yan, G., Xu, J. (2011).** Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PLoS ONE*, 6(9), 2972–2985.
- Weiss, B., & Aksoy, S. (2011).** Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends in Parasitology*, 27(11), 514–522.

- Werren, J. H., Baldo, L., Clark, M. E. (2008).** *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 741–751.
- Wilke, A. B. B., & Marrelli, M. T. (2015).** Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. *Parasites & Vectors*, 8(1), 342.
- WHO, World Health Organisation (2020b).** <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (18.4. 2020).
- WHO, World Health Organisation. (2020a).** <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases> (18.4. 2020).
- Wu, P., Sun, P., Nie, K., Zhu, Y., Shi, M., Xiao, C., Liu, H., Liu, Q., Zhao, T., Chen, X., Zhou, H., Wang, P., Cheng, G. (2019).** A gut commensal bacterium promotes mosquito permissiveness to arboviruses. *Cell Host & Microbe*, 25(1), 101–112.
- Xi, Z., Ramirez, J. L., Dimopoulos, G. (2008).** The *Aedes aegypti* Toll pathway controls Dengue virus infection. *PLoS Pathogens*, 4(7), e1000098.
- Yamada, Y, Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Uchimura, T., Komagata, K. (2000).** *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the alpha-proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2), 823–829.
- Yamada, Y. (2016).** Systematics of acetic acid bacteria. In *Acetic Acid Bacteria*, Springer, (1-50), ISBN: 978-4-431-55931-3.
- Yukphan, P., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M., Yamada, Y. (2004).** *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the alpha-proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 2), 313–316.
- Zhou, W., Rousset, F., O'Neill, S. (1998).** Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1395), 509–515.
- Zouache, K., Voronin, D., Tran-Van, V., Mousson, L., Failloux, A.-B., Mavingui, P. (2009).** Persistent *Wolbachia* and cultivable bacteria infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*. *PLoS ONE*, 4(7), e6388.

Zug, R., Koehncke, A., Hammerstein, P. (2012). Epidemiology in evolutionary time: the case of *Wolbachia* horizontal transmission between arthropod host species. *Journal of Evolutionary Biology*, 25(11), 2149–2160.

***Sekundární citace**