

**Přírodovědecká fakulta
Univerzita Karlova v Praze
Katedra parazitologie**

**Protilátková odpověď hostitele proti
krevsajícím hmyzu**

Michaela Vlková

Bakalářská práce

Praha, 2006
Školitel: Mgr. Iva Rohoušová, Ph.D.

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Ivě Rohoušové, Ph.D. za její trpělivost, ochotu, odborné rady a pomoc nejen při vyhledávání literatury. Dále bych chtěla poděkovat celému týmu katedry parazitologie za vytváření milého a přátelského prostředí.

Obsah:

1. Úvod	4
2. Literární přehled	5
2.1. Systematické zařazení a charakteristika krevsajícího hmyzu	5
2.2. Flebotomové	6
2.2.1. Epidemiologie	7
2.2.2. Sliny flebotomů	7
2.2.3. Protilátková odpověď	9
2.3. Komáři	12
2.3.1. Epidemiologie	12
2.3.2. Sání	12
2.3.3. Sliny komárů	13
2.3.4. Protilátková odpověď	13
2.4. Ostatní krevsající hmyz	15
2.4.1 Muchničky	15
2.4.2. Glossiny	15
2.4.3. Triatomy	17
3. Závěr	19
4. Použitá literatura	21

1. Úvod

Poštipání krevsajícím hmyzem, imunitní odpověď hostitelů a následný vývoj vakcíny proti přenášenému patogenu jsou velice aktuální témata světových parazitologických laboratoří zabývajících se fenoménem interakcí vektor – patogen – hostitel.

Během sání dochází k inokulaci slin, které inhibují obranné mechanismy hostitele, mají tzv. antihemostatický a imunomodulační efekt. Při pobodání naivního hostitele hrají sliny důležitou roli. Protože mají některé komponenty slin imunosupresivní účinky, mohou zvyšovat úspěšnost přenosu patogena. Tento fenomén je v anglické literatuře popisován jako tzv. enhancing effect. Nejvýznamnější lidská onemocnění přenášená krevsajícím hmyzem jsou pak evidována na seznamu Světové zdravotnické organizace (WHO).

Při opakovaném sání na stejném hostiteli se začínají tvořit specifické protilátky, zejména IgG a IgE, které jsou zodpovědné za hypersenzitivní reakce. Tvorba specifických imunoglobulinů ovlivňuje imunomodulační aktivitu slin a částečně ruší enhancing effect. Pre-expozice sání krevsajícimu hmyzu má tedy významnou roli v epidemiologii. Studium složení slin a jejich antigenních složek je klíčem k poznání principů imunitní odpovědi a je krokem vpřed na cestě za vytvořením účinných vakcín proti chorobám, kterým ročně podléhají miliony lidí.

Předkládaná bakalářská práce se zabývá shrnutím poznatků o antigenech ve slinách krevsajícího hmyzu a protilátkové odpovědi pobodaných hostitelů s výhledem na detailnější studium specifických protilátek a jejich dynamiky na modelu myš-flebotomus v rámci budoucí diplomové práce.

2. Literární přehled

2.1. Systematické zařazení a charakteristika krevsajcího hmyzu

Podkmen: Tracheata – INSECTA(hmyz)

Diptera – Nematocera

Psychodidae – Phlebotominae

Culicidae

Simuliidae

Diptera – Brachycera

Glossinidae

Heteroptera

Reduviidae-Triatominae

Tento systém obsahuje pouze čeledi a podčeledi, o kterých pojednává předkládaná bakalářská práce. Vybrané skupiny, na které se v práci zaměřuji, zahrnují krevsajcí hmyz přenášející lidské patogeny a jsou nejlépe prostudovány z hlediska složení slin a protilátkové odpovědi hostitele na sání.

Krevsajcí hmyz lze celkově rozdělit podle strategie sání na dvě skupiny – solenofágy a thelmofágy (Ribeiro, 1989). Solenofágové jsou charakterističtí tím, že sají krev rychleji než vytéká z cévy, tím vzniká v místě sání podtlak, jen málo okolní tkáň je poškozeno a netvoří se hematoma. Do této skupiny patří z výše uvedených - komáři (Culicidae), glossiny (Glossinidae) a ploštice (Triatominae). Thelmofágové poškozují relativně velké množství tkáň kolem místa bodnutí, sají krev pomaleji, než vytéká

z cévy a dochází ke vzniku hematomu. Ze skupin, na které se zaměřujeme, sem patří flebotomové (Phlebotominae) a muchničky (Simuliidae) (Beaty & Marquardt, 1996).

Krevsající hmyz podřizuje sání několika cílům, lokalizovat cévu nebo kapiláru, bezbolestně a rychle se nasát a inhibovat obranné mechanismy hostitele. Ve všech těchto krocích hrají důležitou roli sliny, které mají antihemostatické a imunomodulační účinky (Ribeiro, 1987). Zmíněný proces hemostáze má zpravidla čtyři základní mechanismy: koagulace, agregace a degranulace destiček, vazokonstrikce a indukce zánětlivého procesu. Složení slin je natolik specifické, že dokážou inhibovat všechny zmíněné aktivační dráhy hemostáze (Beaty & Marquardt, 1996).

Opakované sání na stejném hostiteli vyvolává zpravidla kožní hypersenzitivní reakci opožděného typu a působí zvýšenou tvorbu antigeně specifických protilátek, především IgG a IgE (Beaty & Marquardt, 1996). IgM mají v protilátkové odpovědi hostitele jen malý význam, ale jsou první, které se po setkání s antigenem začnou tvořit. IgE jsou většinou zodpovědné za alergické reakce a pomocí IgE receptorů aktivují žírné buňky a basofily. Nejdůležitější třída protilátek jsou IgG, jejichž hlavní funkcí je opsonizace, indukce fagocytózy, aktivace komplementu a pokud se vážou do aktivního místa enzymu, pak také neutralizace (Klein & Hořejší, 1997).

2.2. Flebotomové (Phlebotominae)

Flebotomové jsou rozšířeni převážně v tropických a subtropických oblastech Starého a Nového světa. Krev sají pouze samice, samci se živí cukernými šťávami (Beaty & Marquardt, 1996). Flebotomové mají velmi krátký, tenký sosák a mohou sát pouze z povrchových kapilár (Ribeiro, 1987). Množství nasáté krve se pohybuje kolem jednoho mikrolitru krve a sání trvá přibližně několik minut (Beaty & Marquardt, 1996).

2.2.1. Epidemiologie

Flebotomové mají velký význam jako přenašeči jednoho z deseti nejrozšířenějších onemocnění na seznamu Světové zdravotnické organizace (WHO) – leishmaniózy. Leishmanióza je způsobena parazitickým prvokem rodu *Leishmania*, který se do hostitele dostává během sání krve. Flebotomus injikuje do místa sání *Leishmanie* ve stádiu metacyklických promastigotů, ti jsou následně pozřeni makrofágy a pomnožují se v nich. V makrofázích dochází ke změně na amastigotní stádia a ta nasaje jiný flebotomus při dalším sání. Ve střevě flebotoma se vyvinou nejprve procykličtí, později metacykličtí promastigoti, kteří jsou regurgitováni během sání do rány, a tím se celý cyklus uzavírá (Sádlová, 1999).

2.2.2. Sliny flebotomů

Ve slinách *Lutzomyia longipalpis* byl popsán nejúčinnější známý vazodilatátor – maxadilan (erythema inducing factor) (Ribeiro et al., 1986). Je to peptid, jehož molekulová velikost je 6,8 - 7 kDa (Lerner et al., 1991, Lerner & Shoemaker, 1992) a tvoří 1-2 % všech proteinů slinných žláz (Lerner et al., 1991). Kromě důležitých vazodilatačních schopností disponuje maxadilan i účinky imunomodulačními (podle Gillespie et al., 2000). Ve slinách rodu *Phlebotomus* přítomnost maxadilanu nebyla zaznamenána (Ribeiro et al., 1986), zato však byl ve slinách *P. papatasi* a *P. argentipes* potvrzen výskyt adenosinu a jeho prekurzoru 5'-AMP (Ribeiro et al., 1999, Ribeiro & Modi, 2001 podle Andrade et al., 2005), které bychom mohli považovat za obdobu maxadilanu, protože mají také vazodilatační a imunomodulační vlastnosti (Collis, 1989, Dionisotti et al., 1992, Lewis et al., 1994 vše podle Andrade et al., 2005).

Mezi další hemostatické regulátory, popsané u většiny studovaného krevsajícího hmyzu, patří apyráza (Ribeiro et al., 1986). Je jedním z majoritních enzymů, které brání agregaci a degranulaci destiček. Tato fosfatáza štěpí ATP a ADP na AMP, čímž

inhibuje oba tyto hemostatické mechanismy závislé na přítomnosti ADP (Ribeiro, 1989). Vzniklý produkt – AMP - má protizánětlivé účinky.

Ve slinách flebotomů byla také objevena hyaluronidázová aktivita (Charlab et al., 1999). Její přítomnost byla prokázána u druhů *L. longipalpis*, *P. papatasi*, *P. duboscqi*, *P. halepensis*, *P. sergenti* a *P. perniciosus* (Černá et al., 2002). Ta by měla dle předpokladů napomáhat difúzi ostatních molekul obsažených ve slinách. V případě přenosu infekce by mohla napomáhat disperzi parazitů v těle rozvolněním extracelulární matrix.

Další složkou slin *L. longipalpis* je 5'-nukleotidasa. Má rovněž vazodilatační efekt a inhibuje agregaci destiček (Charlab et al., 1999).

Experimentálně bylo zjištěno, že sliny flebotomů mají imunomodulační efekt. Popsány byly imunosupresivní účinky, konkrétně inhibice proliferace T buněk, změny v produkci cytokinů a inhibice makrofágů v produkci H₂O₂ a NO₂ (podle Gillespie et al., 2000). Tyto imunomodulační vlastnosti slin flebotomů mají zřejmě rozhodující úlohu v úspěšnosti přenosu leishmanií.

Zjistilo se, že sliny zvyšují virulenci patogena přenášeného na naivního hostitele, mají tzv. enhancing effect. Titus & Ribeiro (1988) porovnávali vývoj leishmaniové infekce u myši, kterým injikovali samotné *Leishmania major* nebo *Le. major* se slinami *L. longipalpis*. V přítomnosti slin byly léze signifikantně větší a obsahovaly větší množství parazitů (Titus & Ribeiro, 1988). V případě, kdy bylo do C57BL/6 myši injikováno jen malé množství (1000) metacyklických stádií *Le. major*, rozhodovala přítomnost slin o tom, zda se patogeni pomnoží a dojde k rozvoji leishmaniové infekce (Belkaid et al., 1998). Model enhancing efektu byl pozorován například i na dvojicích *P. papatasi* – *Le. major* (Theodos et al., 1991 podle Gillespie et al., 2000) nebo *L.*

longipalpis – *Le. braziliensis* (Samuelson et al., 1991, Lima & Titus, 1996 podle Gillespie et al., 2000).

2.2.3. Protilátková odpověď

Opakované sání flebotomů na savčím hostiteli vyvolává tvorbu specifických protilátek (Ghosh & Mukhopadhyay, 1998, Barral et al., 2000, Volf & Rohoušová, 2001, Gomes et al., 2002, Rohoušová et al., 2005, Silva et al., 2005). Pomocí těchto protilátek byla studována druhová specifita antigenů ve slinách různých druhů flebotomů. Proteinový profil slin jednotlivých druhů se liší (Volf et al., 2000) a druhově specifické jsou i antigeny (Volf & Rohoušová, 2001, Rohoušová et al., 2005). Séra myši experimentálně pobodaných druhů *Phlebotomus sergenti* nebo *Phlebotomus papatasi* nereagovala s lyzátem slinných žláz *Lutzomyia longipalpis*, pouze protilátky obsažené v sérech myši vystavených sání *L. longipalpis* rozeznávaly antigeny slin *L. longipalpis* (Rohoušová et al., 2005). V rámci rodu *Phlebotomus* se vyskytly případy zkřížených reakcí, a to mezi zástupci podrodů Larrousius a Adlerius (Volf & Rohoušová, 2001). Zatímco nebyla pozorována žádná zkřížená reakce *P. papatasi* s ostatními testovanými druhy, mezi *P. halepensis* a *P. perniciosus* už částečně patrná byla (Volf & Rohoušová, 2001). Zdá se, že k výskytu zkřížených reakcí dochází i mezi flebotomy a komáry. Jako modelové organismy vystupovaly *Phlebotomus papatasi* a *Culex pipiens* a porovnáván byl počet nasátých komárů. Na křečcích vystavených opakovanému sání *P. papatasi* se nasálo signifikantně menší množství komárů než na kontrolních křečcích neimunizovaných sáním *P. papatasi* (Wahba et al., 2005).

Výskyt protilátek proti slinám flebotomů byl prokázán i u lidí v oblastech s výskytem leishmaniózy (Barral et al., 2000, Gomes et al., 2002, Rohoušová et al., 2005). Gomes et al. (2002) sledovali děti z endemických oblastí viscerální leishmaniózy v Brazílii. Rozdělili děti na dvě skupiny dle změny reakce na antigeny *Leishmania*

chagasi v průběhu 6 měsíců: první, u kterých došlo k serokonverzi z negativní na pozitivní, a druhou, u kterých se změnila opožděná hypersenzitivní reakce (DTH) z negativní na pozitivní. Pouze u druhé skupiny dětí byl zaznamenán nárůst specifických IgG, IgG1 a IgE proti slinám *Lutzomyia longipalpis* a tato séra reagovala s antigeny slin *L. longipalpis* o molekulové velikosti 45-, 44-, 43-, 35-, 27-, a 16 kDa, zatímco séra dětí z první skupiny nerozeznala antigeny žádné (Gomes et al., 2002). Zvyšování hladiny IgE je signálem pro vytváření časné hypersenzitivní reakce, která by mohla při dlouhodobé expozici slinám vektora přejít v desenzitizaci (Gomes et al., 2002).

Porovnáním lidských a zvířecích (myších) sér se zjistily prokazatelné rozdíly v intenzitě reakce a v množství rozeznávaných antigenů. Séra lidí z endemické oblasti *Leishmania tropica* (Sanliurfa, Turecko) i séra myší experimentálně pobodaných flebotomy reagovala s homologním antigenem, tzn. s homogenátem slinných žláz *Phlebotomus sergenti* a *Phlebotomus papatasi*. Obě skupiny sér rozeznaly hlavní antigeny slin *P. sergenti*, myší séra však vykazovala reaktivitu s větším počtem antigenů. V případě anti- *Phlebotomus papatasi* protilátek byl u myší nejsilnějším antigenem 42 kDa protein, u lidí pak 30 kDa protein (Rohoušová et al., 2005). V BALB/c myších vyvolalo opakované pobodání *Lutzomyia longipalpis* zvýšenou tvorbu IgG, zejména IgG1 (Silva et al., 2005). Tyto protilátky reagovaly převážně s proteiny slin *L. longipalpis* o molekulové velikosti 16, 44 a 45 kDa (Silva et al., 2005). Stejně antigeny byly rozpoznávány i protilátkami z lidských sér. Protilátky lidí opakovaně pobodaných *L. longipalpis* však rozeznávají ve slinách *L. longipalpis* více antigenů než protilátky z experimentálně imunizovaných myší (Gomes et al., 2002, Silva et al., 2005).

Z toho je patrné, že protilátkovou odpověď vyvolávají pouze některé proteiny slin. Oliveira et al. (2006) vložili sekvence kódující jednotlivé proteiny slin *P. ariasi* do plazmidového vektora, který byl následně použit k imunizaci C57BL/6 myši. Nejsilnější protilátkovou odpověď proti homogenátu slinných žláz *P. ariasi* vyvolávala u myši imunizace plazmidem *ParSP25* nebo *ParSP23*. Imunizace různými plazmidy vyvolávala tvorbu rozdílných typů protilátek. U myši imunizovaných plazmidem *ParSP25* byla prokázána vysoká produkce IgG1. Oproti tomu imunizace plazmidem *ParSP03* vyvolávala produkci IgG2a (Oliveira et al., 2006).

Protilátky z opakovaně pobodaných hostitelů byly schopné neutralizovat imunomodulační efekt slin vektorů (Belkaid et al., 1998, Costa et al., 2004). Po inkubaci se specifickými protilátkami ztrácely slinné žlázy *Lutzomyia longipalpis* schopnost ovlivnit produkci cytokinů a expresi kostimulačních molekul u lidských monocytů, (Costa et al., 2004). Na modelu myš – *Phlebotomus papatasi* bylo pozorováno, že specifické protilátky v sérech myši pobodaných *P. papatasi* inhibovaly enhancing efekt slin vektora (Belkaid et al., 1998).

Tvorba protilátek proti antigenům slin flebotomů (např. uváděný maxadilan) může také negativně ovlivnit sání a s tím spojenou plodnost. Milleron et al. (2004) popisují, že opakované sání mělo vliv na množství nasáté krve. Zatímco na naivní myši nasály samice *L. longipalpis* v průměru asi 0,251 μL krve, na myších senzitivovaných sáním pouze 0,206 μL . Šlo tedy přibližně o 18 % pokles, což vedlo k prokazatelnému zmenšení snůšky. Množství vajec na jednu snůšku se po sání na imunizovaných myších zmenšilo přibližně na polovinu (Milleron et al., 2004).

V pokusech o nalezení proteinu, který by v rekombinantní podobě mohl být použitelný jako součást vakcíny proti leishmanióze, byl popsán protein ze slin *Phlebotomus papatasi* o molekulové velikosti 15 kDa (pojmenován PpSP15), který byl

schopen chránit vakcinovanou myš před infekcí *Le. major*, a to i v případě, že paraziti byli inokulováni s lyzátem slinných žlaz *P. papatasi* (Valenzuela et al., 2001). Ochrana přetrvávala nejméně po dobu třech měsíců. Vakcína působila jak humorální, tak DTH reakci. I myši deficientní v B-buňkách s inokulovaným SP-15 plazmidem bezpečně kontrolovaly nákazu leishmanií se slinami. Z toho lze usoudit, že DTH odpověď zajišťovala většinu nebo všechny obranné efekty této vakcíny (Valenzuela et al., 2001).

2.3. Komáři (Culicidae)

2.3.1. Epidemiologie

Komáři jsou další zástupci nematocerních Dipter. Z hlediska humánní medicíny jsou pro nás komáři (zejména rody *Anopheles*, *Aedes* a *Culex*) velice významní, a to proto, že vystupují jako vektorů nebezpečných onemocnění. Vzhledem k velkému výčtu přenášených agens zmíním pouze některé z nich. *Aedes aegypti* přenáší flaviviry, které způsobují žlutou zimnici či horečku Dengue, druhy z komplexu *Anopheles maculipennis* nebo *Anopheles gambiae* pak šíří prvoky rodu *Plasmodium*, kteří způsobují horečnaté onemocnění – malárii. I tyto choroby jsou evidovány na seznamu deseti nejrozšířenějších onemocnění (WHO).

2.3.2. Sání

Komáři jsou stejně jako flebotomové typičtí dočasní parazité a doba jejich sání se pohybuje řádově v minutách. Krev sají pouze samice, které ji potřebují k dokončení vývoje vaječnicků, samci se živí pouze cukernými šťávami. Komáři jsou schopni nasát mikrolitry až desítky mikrolitrů krve, a to nejen z povrchových, ale i hlubších vrstev malých cév (Beaty & Marquardt, 1996).

2.3.3. Sliny komárů

Sliny komárů mají antihemostatické a imunomodulační aktivity. Slouží mimo jiné i k lokalizaci cév (Ribeiro & Rossignol, 1984 podle Ribeiro, 1987). Ve slinách komárů byla popsána přítomnost apyrázy (Ribeiro & Sarkis, 1984 podle Ribeiro, 1987). Množství apyrázy ve slinách samic je druhově specifické a předpokládá se, že souvisí s rozdílnou délkou sání jednotlivých druhů (Ribeiro, 1987). Mezi další komponenty slin patří například antikoagulanty (Ribeiro, 1987), u *Aedes aegypti* pak byl popsán inhibitor faktoru Xa (Stark & James, 1998) nebo sialokinin s vazodilatačními účinky (Champagne & Ribeiro, 1994).

2.3.4. Protilátková odpověď

Na první sání komárů reagují hostitelé kožní hypersenzitivní reakcí. Přesto, že je pobodání spojeno s nepříjemnostmi například v podobě svědění, otékání místa kontaktu nebo alergiemi, zpravidla nedochází k extrémním reakcím – anafylaktickým šokům (Peng et al., 2004), jako je tomu někdy u muchniček (Cupp & Cupp, 1997).

V sérech opakovaně pobodaných lidí byl zaznamenán nárůst specifických IgG (konkrétně IgG1 a IgG4) a IgE (Brummer-Korvenkontio et al., 1994, Peng et al., 2004). Pozitivní korelace byla prokázána mezi množstvím IgE a velikostí otoku pobodaného jedince (Brummer-Korvenkontio et al. 1997b). Peng et al. (2004) pozorovali změny hladiny protilátek u dětí ve věku od 1 měsíce do 18 let. Byla prokázána nepřímá korelace mezi věkem jedinců a množstvím protilátek (IgG, IgE) v séru testovaných osob. Pro IgG bylo maximální hladiny dosaženo u dětí ve věku od 1 do 6 měsíců a pro IgE u dětí od 6 měsíců do jednoho roku života (Peng et al., 2004). Od pátého roku života postupně klesala hladina specifických protilátek. Ve věku 16 let se protilátky ustálily na hladině, která byla srovnatelná s hladinou protilátek dospělých pobodaných

lidí. V sérech pobodaných chlapců byla naměřena prokazatelně vyšší hladina IgG než u dívek (Peng et al., 2004).

Peng & Simons (1998) se pokusili o navození desenzitizace u lidí. Každé dva týdny vystavili pokusné osoby sání 100 komárů *Culex quinquefasciatus* po dobu 50 týdnů. Hladina IgG i IgE dosáhla svého vrcholu během pátého týdne stejně tak jako opožděná a časná kožní reakce. Hladina IgE se vrátila do výchozí hodnoty po 26 týdnech a hladina IgG po 39 týdnech. Společně s poklesem protilátek se oslabovala i kožní reakce, což vyústilo po 48 týdnech v desenzitizaci (Peng & Simons, 1998).

Pomocí protilátek z opakovaně sátých hostitelů byly stanoveny hlavní antigeny slin *Aedes communis*, *Aedes aegypti* a *Anopheles stephensi* (Brummer-Korvenkontio et al., 1990, Brummer-Korvenkontio et al., 1997a). U *Ae. communis* to byly antigeny o molekulové velikosti 22-, 30-, 36- kDa, u *Ae. aegypti* 31-, 36-, 46- a 64 – 66 kDa antigeny a u *An. stephensi* 46- kDa peptid. Ve slinách samců žádné antigeny zaznamenány nebyly (Brummer-Korvenkontio et al., 1997a). Séra myši pobodaných *Ae. communis* nereagovala s antigeny slin *Ae. aegypti* ani *An. stephensi*. Byla detekována slabá zkřížená reakce anti-*Ae. aegypti* protilátek s antigeny *Ae. communis* a *An. stephensi*. Protilátky proti *An. stephensi* pak slabě reagovaly s antigeny *Ae. communis* i s *Ae. aegypti* (Brummer-Korvenkontio et al., 1997a).

Testy ukázaly, že lidské IgG4 a IgE se vážou ke všem hlavním antigenům slin *Ae. aegypti* i *Ae. communis* (Brummer-Korvenkontio et al., 1994, Brummer-Korvenkontio et al., 1997a). IgE z lidských sér se nejsilněji vážaly na 36-, 46-, a 68-kDa protein slin *An. stephensi*. Nejsilnější reakce ale byla zaznamenaná v případě 46-kDa proteinu, který by mohl být zodpovědný za alergické reakce lidí (Brummer-Korvenkontio et al., 1997a). Lidské IgG4 a IgE ze sér pobodaných dětí se vážaly ke stejným antigenům jako protilátky experimentálně imunizovaných myši (Brummer-Korvenkontio et al., 1997a).

2.4. Ostatní krevsající hmyz

2.4.1. Muchničky (Simuliidae)

Muchničky patří mezi nematocerní Diptera. Jedná se o přenašeče lidského patogena *Onchocerca volvulus*, původce říční slepoty. Muchničky mají silně antigenní a alergenní sliny a mohou způsobit velice intenzivní hypersenzitivní odpověď hostitele, od edémů či puchýřů, přes krvácení do vnitřních orgánů, až po ochrnutí dýchacích svalů s následkem smrti (Cupp & Cupp, 1997). Ve slinách muchniček byly detekovány silné vazodilatátory, konkrétně EIF (erythema inducing factor), inhibitory koagulačního faktoru Xa, hyaluronidáza (Ribeiro et al., 2000), histamin (amin s vazodilatačním efektem) a apyráza (inhibice agregace destiček) (Cross et al., 1993).

V sérech myši intraperitoneálně imunizovaných i opakovaně pobodaných *Simulium vittatum* byla zaznamenána zvýšená hladina IgG, IgE a IgM (Cross et al., 1993). Protilátky proti slinám *S. vittatum* byly použity k identifikaci společných imunogenů a alergenů ve slinách ostatních testovaných druhů. Byl pozorován velký stupeň podobnosti proteinových profilů slin *S. vittatum* a *S. argus*. Četné zkřížené reakce se vyskytovaly mezi *S. vittatum* a *S. argus*, slabé s *S. ochraceum* a žádné s antigeny *S. metallicum* (Cross et al., 1993). IgE ze sér imunizovaných myši rozeznávaly 37 kDa protein slin *S. vittatum*, *S. ochraceum* a *S. argus*. Na tuto molekulu se vázaly i anti-*S. vittatum* IgG a IgM, ale pouze u *S. vittatum* a *S. argus* (Cross et al., 1993).

2.4.2. Glossiny (Glossinidae)

Glossiny patří mezi brachycerní Diptera. Mezi jejich hostitele patří zejména antilopy a dobytek. Mají masivní sosák, což souvisí se zvýšenou bolestivostí pobodání. Od předešlých zástupců se liší tím, že krev sají obě pohlaví. Glossiny napadají své savčí

hostitele i několikrát denně, sají přibližně několik minut a úbytek krve se pohybuje řádově v mikrolitrech až desítkách mikrolitrů (Beaty & Marquardt, 1996). Z hlediska humánní medicíny jsou glossiny významné především jako vektoři *Trypanosoma gambiense* a *Trypanosoma rhodensiense*, které způsobují u lidí africkou spavou nemoc.

Ve slinách *Glossina morsitans* byla prokázána antitrombinová aktivita (Parker & Mant, 1979), která způsobuje inaktivaci thrombinem indukované dráhy agregace destiček. Mezi další látky, které byly identifikovány ve slinách glossin, patří například apyráza (Parker & Mant, 1979).

Sání *Glossiny morsitans centralis* na laboratorních králících vyvolávalo hypersenzitivní reakce časného i opožděného typu (Ellis et al., 1986). Po prvním sání se objevily v místě sání neutrofilů a eosinofylů a navenek se sání projevovalo pouze malými hemoragiemi. Na druhé sání (5 minut po přerušení druhého sání) zareagovala většina hostitelů časnou hypersenzitivní odpovědí v podobě dvojnásobného zduření místa sání, hyperemií a erythemii. Zánětlivá reakce se vyznačovala především zvýšenou akumulací eosinofilů a mastocytů v místě sání. Po 24 hodinách tato zánětlivá reakce odeznívala. U zbylých třech králíků se časná hypersenzitivní odpověď objevila až po šestém sání. Králíkům, kteří byli sání vystaveni 3x týdně po dobu jednoho roku, se objevovaly bezprostředně po sání malé hemoragie. Přibližně 2 hodiny po sání se pobodání projevilo mírně zvýšenou kumulací granulocytů, především eosinofilů. Po 24 hodinách se charakter reakce změnil a vyznačoval se zvýšenou kumulací lymfocytů, makrofágů a plazmatických buněk (Ellis et al., 1986) Právě plazmatické buňky jsou zodpovědné za zvyšování hladiny protilátek. V séru těchto zvířat byla experimentálně prokázána přítomnost IgG a IgE. U IgE byla zaznamenána korelace s výskytem alergických reakcí (Ellis et al., 1986). Mat'ha & Weiser (1988) neprokázali vliv protilátek proti slinám glossin na délku života dospělců. Pozorována nebyla ani korelace

mezi zvyšováním hladiny protilátek a aktivitou „killing“ faktoru v krvi hostitele, který způsobuje smrt nasátých glossin. V sérech pobodaných králíků ale „killing“ faktor popsán byl a lze jim pasivně imunizovat naivního hostitele (Mařha et al., 1989).

2.4.3. Triatomy (Reduviidae – Triatominae)

Zákeřnice patří mezi Heteroptera. Na svém hostiteli sají triatomy řádově desítky minut a množství nasáté krve může přesahovat jeden mililitr. Patří sem přenašeči *Trypanosoma cruzi*, která u lidí způsobuje Chagasovu chorobu.

Sliny usnadňují krevsajícím zákeřnicím lokalizaci kapiláry (Ribeiro, 1987) a mají antihemostatický efekt (Ribeiro & Garcia, 1981). Slinami triatom jsou inhibovány dráhy agregace a degranulace destiček i koagulace. Ribeiro & Garcia (1980) popsali ve slinách přítomnost apyrázy, která štěpí ATP a ADP na AMP. Sliny *Rhodnius prolixus* mají antithromboxanovou (Ribeiro & Garcia, 1981), antiserotoninovou a antihistaminovou aktivitu (Ribeiro, 1982) a inhibují agregaci destiček zprostředkovanou thrombinem i kolagenem (Ribeiro & Garcia, 1981). Ve slinách *R. prolixus* byl zaznamenán výskyt nitrophenolu, který je významnou vazodilatační molekulou (Ribeiro et al., 1995).

V sérech lidí pobodaných triatomami byla pozorována zvýšená hladina IgE (Marshall et al., 1986). Bylo prokázáno, že protilátková i alergická odpověď lidí na pobodání krevsajícími zákeřnicemi je druhově specifická. U lidí alergických na pobodání *Triatoma protracta* nebo *T. rubida* se při kožním testu objevila reakce pouze se slinami příslušných druhů. Vazba IgE na antigeny slin *T. protracta* nebyla inhibována slinami *T. rubida*, *T. cavernicola*, *T. rubrofasciata* ani *Rhodnius prolixus* (Marshall et al., 1986). Opakované sání *Triatoma infestans* vyvolávalo u myši zvýšenou tvorbu specifických IgE protilátek (Volf et al., 1993). Vývoj antigenně-specifické

protilátkové odpovědi byl rychlejší u myši vystavených sání nymf, ale vyšší hladina protilátek byla zaznamenána u myši pobodaných dospělci (Volf et al., 1993).

Proteiny slinných žláz *T. infestans* mohou vyvolávat u lidí lokální a systémové hypersenzitivní reakce (Nascimento et al., 2001). IgG1 a IgG4 byly popsány jako hlavní protilátky reagující se slinami *T. infestans* (Nascimento et al., 2001). IgG1 byly detekovány v sérech pacientů postižených Chagasovou chorobou a v sérech lidí žijících v oblastech s běžným výskytem *T. infestans*. Vyšší hladina IgG1 byla pozorována u pacientů s Chagasovo chorobou v porovnání se zdravými jedinci z oblastí s triatomami i bez nich. Zdraví jedinci ze zamořených oblastí vykazovaly vyšší hladiny IgG1 než lidé z oblastí bez triatom. Zvýšená hladina IgG4 reagující se slinami *T. infestans* byla popsána u lidí trpících Chagasovou chorobou, ale i u ostatních jedinců byly IgG4 v malém množství zaznamenány (Nascimento et al., 2001). Séra lidí z oblastí s běžným výskytem krevsajících zákeřnic (bez rozdílu jsou-li zdraví či trpí Chagasovo chorobou) rozeznávala větší množství antigenů ve slinách triatom než lidé z nezamořených oblastí (Nascimento et al., 2001).

3. Závěr

Tato bakalářská práce shrnuje poznatky o problematice protilátkové odpovědi na poštípání krevsajícím hmyzem. U skupin hmyzu, na které jsem se v této práci zaměřila vyvolává opakované sání u hostitele tvorbu specifických IgG a IgE, ojediněle byly pozorovány zvýšené hladiny IgM. IgM jsou první protilátky, které se po styku s antigenem začínají tvořit. Jsou méně specifické, ale jsou schopné dobře aktivovat komplement. Mírně zvýšená hladina IgM byla pozorována pouze u hostitelů opakovaně vystavovaných antigenům muchniček (Cross et al., 1993). Z IgG rodiny byly nejčastěji zastoupeny IgG1 a IgG4. IgG1, které velmi dobře aktivují komplement a vážou se na receptory fagocytů, byly ve zvýšené míře pozorovány u hostitelů pobodaných flebotomy (Gomes et al., 2002, Silva et al., 2005), komáry (Brummer-Korvenkontio et al., 1994, Peng et al., 2004) nebo triatomami (Nascimento et al., 2001). Výskyt IgG4, které neaktivují komplement a které se na receptory fagocytů vážou s menší afinitou, byl zaznamenán v sérech lidí vystavených sání komárů (Brummer-Korvenkontio et al., 1994, Brummer-Korvenkontio et al., 1997a, Peng et al., 2004), ale především triatom (Nascimento et al., 2001). Zvýšená hladina IgG protilátek proti slinám krevsajícího hmyzu u lidí dobře koreluje s výskytem přenášeného onemocnění (Barral et al., 2000, Nascimento et al., 2001, Gomes et al., 2002, Rohoušová et al., 2005). IgE jsou v případě krevsajícího hmyzu zodpovědné především za alergické reakce (hypersenzitivní reakce typu I). Vazbou IgE na receptory žírných buněk a bazofilů dochází k jejich degranulaci a současně uvolnění biologicky aktivních mediátorů. Tyto protilátky byly pozorovány v sérech hostitelů pobodaných všemi zmiňovanými skupinami. U komárů byla prokázána pozitivní korelace mezi hladinou IgE a velikostí otoku pobodaného jedince (Brummer-Korvenkontio et al., 1997).

Studium tvorby protilátek a jejich dynamiky je velice významné z hlediska epidemiologie. Sliny vektorů, které jsou inokulovány do hostitelů během sání, mají rozhodující roli v přenosu patogenů, zvyšují jejich virulenci a tím i úspěšnost přenosu. Zvýšené hladiny protilátek mohou sloužit jako důkaz pobodání krevsajícím hmyzem a mohou pomoci odhadnout riziko přenosu nákazy v endemických oblastech.

4. Použitá literatura

- Andrade, B.B., Texeira, C.R., Barral, A., and Barral-Netto, M. (2005). Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 77, 665-693.
- Barral, A., Honda, E., Caldas, A., Costa, J., Vinhas, V., Rowton, E.D., Valenzuela, J.G., Charlab, R., Barral-Netto, M., and Ribeiro, J.M.C. (2000). Human immune response to sand fly salivary gland antigens: A useful epidemiological marker? *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 62, 740-745.
- Beaty, B.J. and Marquardt, W.C. (1996). The biology of disease vectors. *University Press of Colorado*.
- Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Ribeiro, J., and Sacks, D.L. (1998). Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: Powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *Journal Of Experimental Medicine* 188, 1941-1953.
- Brummer-Korvenkontio, H., Lappalainen, P., Reunala, T., and Palosuo, T. (1990). Immunization of rabbits with mosquito bites: immunoblot analysis of IgG antimosquito antibodies in rabbit and man. *International Archives of Allergy and Immunology* 93, 14-18.
- Brummer-Korvenkontio, H., Lappalainen, P., Reunala, T., and Palosuo, T. (1994). Clinical aspects of allergic disease. Detection of mosquito saliva-specific IgE and IgG4 antibodies by immunoblotting. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 93, 551-555.
- Brummer-Korvenkontio, H., Palosuo, T., Francois, G., and Reunala, T. (1997a). Characterization of *Aedes communis*, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* mosquito saliva antigens by immunoblotting. *International Archives of Allergy and Immunology* 112, 169-174.
- Brummer-Korvenkontio, H., Palosuo, K., Palosuo, T., Brummer-Korvenkontio, M., Leinikki, P., and Reunala, T. (1997b). Detection of mosquito saliva-specific IgE antibodies by capture ELISA. *Allergy* 52, 342-345.
- Cerna, P., Mikes, L., and Volf, P. (2002). Salivary gland hyaluronidase in various species of phlebotomine sand flies (Diptera : Psychodidae). *Insect Biochemistry And Molecular Biology* 32, 1691-1697.
- Charlab, R., Valenzuela, J.G., Rowton, E.D., and Ribeiro, J.M.C. (1999). Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 15155-15160.
- Collis M.G. (1989). The vasodilator role of adenosin. *Pharmacology and Therapeutics* 41, 143-162.

- Costa, D.J., Favali, C., Clarencio, J., Afonso, L., Conceicao, V., Miranda, J.C., Titus, R.G., Valenzuela, J., Barral-Netto, M., Barral, A., and Brodskyn, C.I. (2004). *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infection And Immunity* 72, 1298-1305.
- Cross, M.L., Cupp, M.S., Cupp, E.W., Ramberg, F.B., and Enriquez, F.J. (1993). Antibody-responses of BALB/c mice to salivary antigens of hematophagous black flies (Diptera: Simuliidae). *Journal Of Medical Entomology* 30, 725-734.
- Cupp, E.W. and Cupp, M.S. (1997). Black fly (Diptera: Simuliidae) salivary secretions: Importance in vector competence and disease. *Journal Of Medical Entomology* 34, 87-94.
- Dionisotti S., Zocchi C., Varani K., Borea P.A. and Ongini E. (1992). Effects of adenosine derivates on human and rabbit platelet. Correlation of adenosin receptor affinities and anti-aggregatory activity. *Naunyn Schmiedebergs Archiv of Pharmacology* 346, 673-676.
- Ellis J.A., Shapiro S.Z., Moi-Yoi O.O., and Moloo S.K. (1986). Lesions and saliva-specific antibody responses in rabbits with immediate and delayed hypersensitivity reactions to the bites of *Glossina morsitans centralis*. *Veterinary Pathology* 23, 661-667.
- Ghosh, K.N. and Mukhopadhyay, A. (1998). The effect of anti-sandfly saliva antibodies on *Phlebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. *The Internacional Journal of Parasitology* 28, 275-281.
- Gillespie, R.D., Mbow, M.L., and Titus, R.G. (2000). The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunology* 22, 319-331.
- Gomes, R.B., Brodskyn, U., de Oliveira, C.I., Costa, J., Miranda, J.C., Caldas, A., Valenzuela, J.G., Barral-Netto, M., and Barral, A. (2002). Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *Journal Of Infectious Diseases* 186, 1530-1534.
- Kamhawi, S. (2000). The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes And Infection* 2, 1765-1773.
- Klein J. and Hořejší V. (1997). Immunology. *Blackwell Science*.
- Lerner, E.A., Ribeiro, J.M.C., Nelson, R.J., and Lerner, M.R. (1991). Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *The journal of biological chemistry* 266, 11234-11236.
- Lerner, E.A. and Shoemaker, C.B. (1992). Maxadilan cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. *The journal of biological chemistry* 267, 1062-1066.

- Lewis C.D., Hourani S.M., Long C.J. and Collis M.G. (1994). Charakterization of adenosin receptors in the rat isolated aorta. *Genetic Pharmacology* 25, 1381-1387.
- Lima, H.C. and Titus, R.G. (1996). Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infection and Immunity* 64, 5442-5445.
- Marshall, N.A., Chapman, M.D., and Saxon, A. (1986). Species-specific allergens from the salivary glands of Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 78, p. 430-435.
- Matha, V. and Weiser, J. (1988). Detection of antigens common to salivary-glands and other tissues of tsetse-fly, *Glossina-palpalis-palpalis* (Diptera, Glossinidae). *Folia Parasitologica* 35, 285-287.
- Matha, V., Weiser, J., Soldan, T., and Weyda, F. (1989). Tissue common epitopes of *Glossina palpalis*, their potential role in fly biology. Review and prospects. Tonner, M., *Regulation of Insect reproduction*, IV., Academia.
- Milleron, R.S., Ribeiro, J.M.C., Elnaime, D., Soong, L., and Lanzaro, G.C. (2004). Negative effect of antibodies against maxadilan on the fitness of the sand fly vector of American visceral leishmaniasis. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 70, 278-285.
- Nascimento, R.J., Santana, J.M., Lozzi, S.P., Araujo, C.N., and Teixeira, A.R.L. (2001). Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae) salivary gland proteins. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 65, 219-226.
- Oliveira, F., Kamhawi, S., Seitz, A.E., Pham, V.M., Guigal, P.M., Fischer, L., Ward, J., and Valenzuela, J.G. (2006). From transcriptome to immunome: Identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine* 24, 374-390.
- Parker K.R., and Mant M.J. (1979). Effects of tsetse (*Glossina morsitans* Westw.) (Diptera: Glossinidae) salivary gland homogenate on coagulation and fibrinolysis. *Thrombosis and Haemostasis* 42, 743.
- Peng, Z. and Simons, F.E.R. (1998). A prospective study of naturally acquired sensitization and subsequent desensitization to mosquito bites and concurrent antibody responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 101, 284-287.
- Peng, Z., Man K.H., Caihe L., and Simons F.E.R. (2004). Evidence for natural desensitization to mosquito salivary allergens: mosquito saliva specific IgE and IgG levels in children. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 93, 553-556.
- Ribeiro, J.M.C. and Garcia, E.S. (1980). The salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology* 26, 303-307.

- Ribeiro, J.M.C. and Garcia, E.S., (1981). Platelet antiaggregating activity in the salivary secretion of the blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Experientia* 37, 384-386.
- Ribeiro, J.M.C. (1982). The antiserotonin and antihistamine activities of salivary secretion of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology* 28, 69-75.
- Ribeiro, J.M.C., Rossignol, P.A., and Spielman, A. (1986). Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 83A, 683-686.
- Ribeiro, J.M.C. (1987). Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annual Review of Entomology* 32, 463-478.
- Ribeiro, J.M.C., Schneider, M., and Guimaraes, J.A. (1995). Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochemical Journal* 308, 243-249.
- Ribeiro, J.M.C., Katz, O., Pannell, L.K., Waitumbi, J., and Warburg, A. (1999). Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *Journal Of Experimental Biology* 202, 1551-1559.
- Ribeiro, J.M.C., Charlab, R., Rowton, E.D., and Cupp, E.W. (2000). *Simulium vittatum* (Diptera : Simuliidae) and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera : Psychodidae) salivary gland hyaluronidase activity. *Journal Of Medical Entomology*, 37, 743-747.
- Ribeiro, J.M.C. and Modi, G. (2001). The salivary adenosine/AMP content of *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti, the main vector of human kala-azar. *Journal Of Parasitology* 87, 915-917.
- Ribeiro, J.M.C. (1989). Vector saliva and its role in parasite transmission. *Experimental Parasitology* 69, 104-106.
- Rohousova, I., Ozensoy, S., Ozbel, Y., and Volf, P. (2005). Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* 130, 493-499.
- Sacks, D. and Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology* 2, 845-858.
- Sadlova, J. (1999). The life history of *Leishmania* (kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae* 63, 331-366.
- Samuelson, J., Lerner, E., Tesh, R., and Titus, R. (1991). A mouse model of *Leishmania-braziliensis-braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *Journal Of Experimental Medicine* 173, 49-54.
- Silva, F., Gomes, R., Prates, D., Miranda, J.C., Andrade, B., Barral-Netto, M., and Barral, A. (2005). Inflammatory cell infiltration and high antibody production

in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 72, 94-98.

- Stark, K.R. and James, A.A. (1998). Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *The journal of biological chemistry* 273, 20802-20809.
- Theodos, C.M., Ribeiro, J.M.C., and Titus, R.G. (1991). Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on Leishmania infection in mice. *Infection and Immunity* 59, 1592-1598.
- Titus, R.G. and Ribeiro, J.M.C. (1988). Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance Leishmania infectivity. *Science* 239, 1306-1308.
- Valenzuela, J.G., Belkaid, Y., Garfield, M.K., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E.D., Sacks, D.L., and Ribeiro, J.M.C. (2001). Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: Characterization of a protective salivary protein. *Journal Of Experimental Medicine* 194, 331-342.
- Volf, P., Grubhoffer, L., and Hosek, P. (1993). Characterisation of salivary gland antigens of *Triatoma infestans* and antigen-specific serum antibody response in mice exposed to bites of *T. infestans*. *Veterinary Parasitology* 47, 327-337.
- Volf, P. and Rohousova, I. (2000). Sandfly salivary antigens and antibody response in bitten animals. *Proceedings of the 13th European SOVE Meeting* 17-20.
- Volf, P. and Rohousova, I. (2001). Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology* 122, 37-41.
- Wahba M., Riera C., Abdel-Hamid Y.M. and Kamal H. (2005). Immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role on vertebrate host. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 35, 1135-1147.
- WHO - URL: < [http:// www.who.int/tdr/diseases/](http://www.who.int/tdr/diseases/)>, [cit. 2006-04-28]