

Katedra parazitologie
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

DIZERTAČNÍ PRÁCE

INTERAKCE *PHLEBOTOMUS* – *LEISHMANIA*

MARTINA HAJMOVÁ

**Školitel: prof. RNDr. Petr VOLF, CSc.
Praha 2006**

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří mi v období vzniku této práce byli nablízku a přímo či nepřímo přispěli k jejímu dokončení. V první řadě je mi milou povinností poděkovat Petru Volfovi za to, že mě vůbec přivedl na myšlenku zabývat se studiem tak zajímavého oboru, jakým parazitologie je. Za to, že mě naučil základům vědecké práce, potěšení i odříkání, které obnáší. Za to, že mě přivedl do příjemného kolektivu katedry parazitologie a že mi umožnil zapojit se do jeho výzkumného týmu. Bez jeho rad, vedení a pomoci by tato práce nevznikla. Dále pak moje poděkování patří kolektivu flebotomárek – Soně, Ivě, Evě, Aleně, Věře, Jitce, Aničce, Petře, Lucce Š. i Lucce L. – holky, bez vás by nebyly flebíci :o) a já si nedovedu představit, jak by se pracovalo bez vaší účasti a pomoci. Mileně Svobodové bych ráda poděkovala nejen za pomoc a rady odborné, ale i za lidskou pomoc při řešení nejrůznějších životních situací a za tu nejlepší zpětnou vazbu. Moje díky patří též Honzovi Votýpkovi za obrovskou energii, kterou mi vždy předával, za úsilí, které vynaložil při vzniku společné publikace, a za obrovský entuziasmus, který z něj vždy sálal a kterým mi dobíjel baterky. Dále pak bych chtěla poděkovat Helence Kulíkové, naší dušičce záchranářce, která byla vždy nablízku, když bylo třeba, a svojí radou a dobrým slovem léčila pracovní i soukromé neduhy a Dušanovi Eremiášovi, jenž nikdy neváhal „strčit ruku do ledu“ a pomoci i s „těžkou“ prací. Za nezbytné považuji poděkování celému kolektivu parazitologie, ať již pod vedením pana profesora Kuldy, Petra Horáka či Honzy Tachezyho, za přátelskou atmosféru a tvůrčí prostředí, které mi pro práci vytvořili. Moje díky patří též Davidu Královi z katedry zoologie za přátelské rady a podněty. Janě Nebesářové a kolektivu pracoviště elektronové mikroskopie na akademii věd v Českých Budějovicích děkuji pak za cenné rady, připomínky a praktickou pomoc při experimentech.

Dále musím poděkovat Paulu Pimentovi z Centra de Pesquisas Rene Rachou, Belo Horizonte za umožnění a organizaci méj tříměsíční stáže na jeho pracovišti, Nágile Secundino pak za pomoc a vytvoření přátelského prostředí během mého pobytu v Brazílii. Mattovi Rogersovi patří mé díky za podnětné rady a připomínky a za spolupráci při některých experimentech. Panu profesoru Changovi bych též ráda poděkovala za rady a pomoc při vytváření společné publikace.

V neposlední řadě chci poděkovat též Ivu Lukešovi a potažmo firmě Olympus za sponzorování méj účasti na některých konferencích. Ivovi pak též za přátelské a cenné životní rady.

Moje díky patří též Fílovi za to, že mi ukázal, jak krásný může svět být z vrcholu skály, Georgovi za jeho pochopení a vždy připravenou „helping hand“, Kátě a Igorovi za to, že zůstávají přáteli i v těžké nepohodě a Ondrovi za jeho věčný optimismus a sílu, které šíří kolem sebe. Rodičům pak za to, že mě během mého studia podporovali a za to, že vím, co znamená „doma“. Sestře a švagrovi za ochotu pomoci jakkoli a kdykoli a Luďkovi za trpělivost a toleranci při společném soužití a za duševní podporu a energii, kterou mi dodává.

Úplně na závěr pak děkuji rádiu BEAT a rockové hudbě jako takové za vytváření té správné atmosféry při studiu, práci i relaxaci.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| 1. Členění disertační práce..... | 5 |
| 2. Cíle disertační práce..... | 6 |
| 3. Literární úvod..... | 8 |
| 3.1. Leishmanióza..... | 8 |
| 3.2. Flebotomové..... | 10 |
| 3.3. Leishmanie..... | 12 |
| 3.3.1. Fylogeneze a systematika rodu <i>Leishmania</i> | 12 |
| 3.3.2. Struktura buňky a morfologické formy leishmanií..... | 13 |
| 3.3.3. Enzymy a povrchové molekuly leishmanií..... | 14 |
| 3.3.4. gp63..... | 15 |
| 3.3.5. LPG..... | 16 |
| 3.3.6. sAP..... | 18 |
| 3.3.7. PPG..... | 18 |
| 3.3.8. GIPLs..... | 20 |
| 3.4. Interakce parazit – vektor – hostitel..... | 21 |
| 3.4.1. Životní cyklus leishmanií..... | 21 |
| 3.4.2. Náchylnost parazitů ke střevním enzymům v krevní potravě flebotomů..... | 22 |
| 3.4.3. Únik z endoperitrofického prostoru..... | 23 |
| 3.4.4. Přichycení parazitů ke střevním epitelálním buňkám..... | 24 |
| 3.4.5. Anteriorní migrace leishmanií ve střevě flebotomů..... | 25 |
| 3.4.6. Metacyklogeneze..... | 25 |
| 3.4.7. Přenos leishmaní do hostitele..... | 26 |
| 3.4.8. Iniciační infekce v hostitelské tkáni..... | 26 |
| 4. Výsledky..... | 28 |
| 4.1. Sádlová J., Hajmová M., Volf P. <i>Phlebotomus (Adlerius)</i> <i>halepensis</i> : high susceptibility to <i>Leishmania major</i> and <i>L.</i> <i>tropica</i> infections. | 29 |
| 4.2. Hajmová M., Chang K.P., Kollí B., Volf P. Down regulation of gp63 in <i>Leishmania amazonensis</i> reduces its early development in <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 37 |
| 4.3. Volf P., Hajmová M., Sádlová J., Votýpka J. Blocked and damaged stomodeal valve of the vector: similar mechanism in two Trypanosomatid – Diptera (Nematocera) models | 42 |

| | |
|---|-----------|
| 5. Souhrn výsledků a závěry | 50 |
| 5.1. Náchylnost <i>Phlebotomus (Adlerius) halepensis</i> vůči různým druhům leishmanií..... | 50 |
| 5.2. Nové poznatky o roli metaloproteázy gp63 v přenašeči..... | 51 |
| 5.3. Mechanismus „regurgitační“ teorie - zjištění poškození či blokace stomodeální valvy flebotomů v pozdních stádiích infekce leishmaniemi..... | 52 |
| | |
| 6. Seznam použité literatury..... | 55 |
| | |
| 7. Příloha..... | 71 |
| 7.1. Secundino N. F. C., Nacif-Pimenta R., Hajmova M., Volf P., Pimenta P.F.P. Midgut muscle network in <i>Lutzomyia longipalpis</i> and <i>Phlebotomus duboscqi</i> sand flies: spatial organization and structural modification after blood meal..... | 72 |

1. Členění dizertační práce

Dizertační práce je členěna do čtyř částí, z nichž první popisuje cíle práce (**Cíle dizertační práce**), druhá pak (**Literární úvod**) pojednává obecně o dané problematice. Následuje část třetí (**Výsledky**), která zahrnuje tři samostatně publikované články. Shrnutí dílčích výsledků, vlastní závěry a úvahy jsou naplní kapitoly poslední (**Souhrn výsledků a závěry**). Na závěr práce je v příloze připojena publikace nepřímo související s tématem dizertační práce, která vznikla během stáže v Centro de Pesquisas René Rachou v Belo Horizonte v Brazílii, jež byla absolvována během postgraduálního studia.



2. Cíle dizertační práce

Tématem dizertační práce jsou některé aspekty interakce *Phlebotomus* – *Leishmania*. Leishmanie během svého vývoje prochází několika klíčovými momenty, jejichž překonání je základem pro úspěšné vyvinutí infekce a jejího přenosu na hostitele. Prvním z těchto důležitých momentů je rezistence vůči trávicím enzymům a lektinům vektora, dále pak únik z peritrofické matrix, přichycení leishmanií ke střevním epiteliálním buňkám a následně pak úspěšná anteriorní migrace a průnik do hostitelské tkáně.

V této práci byly sledovány tři hlavní problémy – náchylnost flebotomů vůči různým druhům leishmanií, funkce metaloproteázy gp63 při vývoji leishmanií ve vektoru a mechanismus „regurgitační teorie“.

A. Zjistit náchylnost *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* vůči různým druhům leishmanií a porovnat infekce s prokázanými přirozenými přenašeči.

Jednotlivé druhy flebotomů se vyznačují specifickým a druhově odlišným prostředím trávicího traktu; též adaptace leishmanií na toto prostředí je často druhově specifická. Stále není zcela známo, které druhy flebotomů mohou úspěšně přenášet více druhů leishmanií. Mnoho nejasností je i u podrodu *Adlerius*, jehož zástupci jsou prokázanými přenašeči leishmanií v některých zemích Evropy i Asie. Některé druhy podrodu *Adlerius* jsou vektory viscerální leishmaniózy, jiné pak leishmaniózy kožní. Druhová specifita však není dosud určena, protože podrod *Adlerius* se vyznačuje velmi obtížnou taxonomií (taxonomické znaky odlišující jednotlivé druhy od sebe jsou přítomny pouze u samců). Kolonie podrodu *Adlerius* použitelné pro experimentální infekce jsou navíc ve světových laboratořích velmi vzácné.

Dílčí cíle:

- provést experimentální infekce druhu *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* dvěma druhy leishmanií – *Leishmania major* a *Leishmania tropica*
- porovnat intenzitu a lokalizaci infekcí *L. major* a *L. tropica* v *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* s infekcemi druhů *Lutzomyia longipalpis*, *P. duboscqi* a *P. sergenti*
- pokusit se o experimentální přenos infekce *L. major* z infikovaných flebotomů všech tří výše uvedených druhů
- zjistit hostitelskou preferenci druhu *Phlebotomus (Adlerius) halepensis*

B. Přinést nové poznatky o funkci metaloproteázy gp63 ve vektoru.

Adaptační faktory, které se uplatňují při kolonizaci trávicího traktu flebotomů jednotlivými druhy leishmanií, nejsou zcela známy, proto dalším z témat této práce bylo studium úlohy důležité povrchové molekuly leishmanií – gp63. Funkce této metaloproteázy v obratlovčím hostiteli jsou poměrně známy, její úloha v přenašeči však nikoli. Byly vysloveny hypotézy, že gp63 se účastní degradace hemoglobinu a proteinů v krevní složce potravy či že by mohla mít

ochrannou funkci proti trávicím enzymům vektoru. Některé experimenty (viz literární úvod) naopak dokazují, že gp63 žádnou klíčovou roli v přenašeči nezastává.

Dílčí cíle:

- provést experimentální infekce s použitím mutantů *Leishmania amazonensis* lišících se v expresi gp63
- porovnat intenzitu infekce v raném stádiu (druhý den po sání) a v pozdním stádiu (devátý den po sání)
- pokusit se o reizolaci leishmanií z trávicího traktu flebotomů zpět do selekčního média, abychom prokázali, že během vývoje ve vektoru nedochází k odvržení plasmidu nesoucího gen ovlivňující expresi gp63

C. Objasnit mechanismus „regurgitační“ teorie - zjistit poškození či blokaci stomodeální valvy flebotomů v pozdních stádiích infekce leishmaniemi

Dalším klíčovým momentem životního cyklu leishmanií je jejich anteriorní migrace do oblastí stomodeální valvy a následný přenos do hostitele. Mechanismus přenosu leishmanií do hostitele stále ještě není zcela přesně objasněn a existuje řada hypotéz. Mezi hlavní patří inokulace promastigotů přítomných v proboscis flebotoma v okamžiku sání nebo regurgitace parazitů způsobená různými obtížemi při sání krve. Mezi tyto popisované obtíže se řadí mechanické zablokování stomodeální valvy produkty leishmanií a leishmaniemi samotnými, někteří autoři dokonce popisují i poškození stomodeální valvy a její chitinové výstelky.

Dílčí cíle:

- provést experimentální infekce různých druhů flebotomů (*Lutzomyia longipalpis* / *Leishmania infantum*, *P. papatasi* / *L. major*, *P. duboscqi* / *L. major*)
- pomocí transmisní elektronové mikroskopie zobrazit eventuální poškození stomodeální valvy flebotomů
- pomocí rastrovací elektronové mikroskopie zdokumentovat způsob parazitární kolonizace trávicího traktu flebotomů
- použitím mutantních kmenů *Leishmania amazonensis* overexprimujících chitinázu provést experimentální infekce v *Lutzomyia longipalpis* a pomocí transmisní elektronové mikroskopie zobrazit změny na kutikulární výstelce stomodeální valvy
- porovnat způsob parazitární kolonizace trávicího traktu, eventuální poškození stomodeální valvy a změny na kutikulární výstelce valvy mezi flebotomy (model *Phlebotomus* / *Leishmania* sp.) a jinými nematocerními dvoukřídlými infikovanými trypanosomami (model *Culex pipiens* / *Trypanosoma corvi*)

3. Literární úvod

3.1. Leishmanióza

Leishmanióza je epidemiologicky i klinicky velmi variabilní onemocnění, které je způsobeno různými druhy prvoků patřících do rodu *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Paraziti jsou přenášeni bodnutím krevsajícím hmyzem, flebotomy (Diptera: Psychodidae). Leishmanie se vyskytují ve dvou hlavních morfologických formách (promastigotní a amastigotní) a prezentují se širokým rozsahem klinických syndromů od samovolně se vyhojující kožní infekce přes destrukční mukokutánní obličejové léze až po fatální formy viscerální.

Leishmanióza je světově rozšířené onemocnění, vyskytující se ve více než 80 zemích na pěti kontinentech - Africe, Asii, Evropě, Severní a Jižní Americe - s prevalencí téměř 12 milionů lidí a s lidmi v ohrožení téměř 350 milionů. Každý rok se objevují 1,5 - 2 milióny nových případů leishmaniózy (860 000 mužů a 1,2 miliónů žen).

Leishmanióza je klasifikována čtyřmi hlavními formami

1. Viscerální leishmanióza (VL) – nejzávažnější forma, která může mít (pokud není léčena) až 100% mortalitu. Je charakterizována nepravidelnými horečnatými záchvaty, podstatnou ztrátou tělesné hmotnosti, zvětšením slinivky a jater a anémií. Epidemiologicky - 90% veškerých případů viscerální leishmaniózy je z Bangladéše, Brazílie, Indie, Nepálu a Súdánu – s 500 000 nových případů zaznamenávaných každý rok. Tuto formu onemocnění způsobují leishmanie druhu *L. donovani* a *L. infantum*.

2. Mukokutánní leishmanióza (MCL) - neboli espundia - byla poprvé klasifikována v Novém světě z infekce způsobené druhem *L. braziliensis*. Průběh nemoci začíná kožními lézemi, které se rozšiřují a způsobují masivní destrukci tkání, zejména nosní a ústní sliznice a hrdelní tkáně. Devadesát procent mukokutánních leishmanióz se vyskytuje v Bolívii, Brazílii a Peru.

3. Kožní leishmanióza (CL) – nejrozšířenější forma, která se projevuje jednou až několika malými kožními lézemi na exponovaných částech těla (tvář, paže, nohy), u nichž dochází ke spontánnímu vyhojení během několika měsíců, které však zanechávají jizvy (např. Baghdad ulcer, Delhi boil nebo Buton d'Orient). Kožní forma leishmaniózy je nejběžnější a reprezentuje 50-75% všech nových případů leishmaniózy. Devadesát procent případů se vyskytuje v Afghánistánu, Brazílii, Iránu, Peru, Saudské Arábii a Sýrii. Celosvětově je ročně evidováno 1-1,5 miliónu nových případů. Tyto kožní formy onemocnění jsou způsobovány zejména druhy *L. major* a *L. tropica*.

4. Difúzní kožní leishmanióza (DCL) produkuje roztroušené a chronické kožní léze, které se nehojí spontánně, jsou velmi obtížně léčitelné a mají tendenci relapsovat; jsou zapříčiněny druhy *L. amazonensis* a *L. aethiopica*.

Epidemiologie leishmaniózy je extrémně rozdílná: 20 druhů rodu *Leishmania* je patogenních pro člověka a z až 700 známých druhů flebotomů pouze okolo 30 bylo pozitivně identifikováno jako prokazatelní vektoři leishmaniózy. Leishmanióza je většinou zoonóza, rezervoárovým hostitelem je živočich a člověk je pouze náhodným hostitelem, existují však případy, kdy leishmanie dosud nebyly nalezeny v žádném rezervoárovém živočichovi a

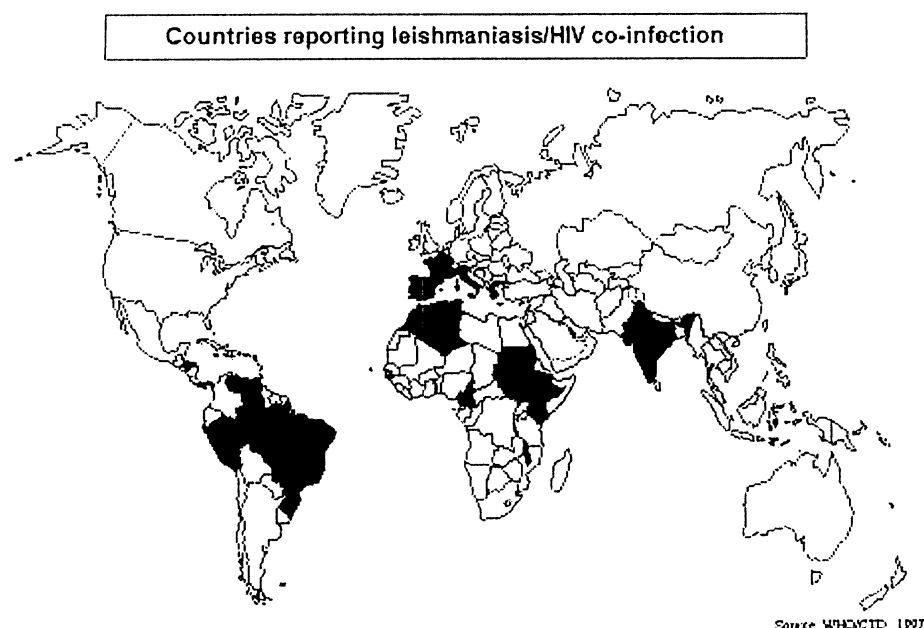
jediným hostitelem je pro ně člověk. Jedná se o druhy *L. tropica* a *L. donovani* a tyto leishmaniózy jsou považovány za antroponotické.

Výskyt leishmaniózy je podporován změnami životního prostředí, jako je odlesňování, stavění přehrad, nová zavlažovací schémata, urbanizace a migrace neimunních lidí do endemických oblastí. Hlavní strategií kontroly leishmaniózy je nález, diagnostika a léčba spolu s kontrolou vektorů a eventuálně s kontrolou zvířecích rezervoárů. Pro viscerální leishmaniózu se pro sérologickou diagnostiku používá přímý aglutinační test (direct agglutination test - DAT), dále test rekombinantního dipsticku pK39 a latexový aglutinační test moče. Parazitologická diagnostika je založena na aspirátech ze sleziny, kostní dřeně nebo lymfatických uzlin. Pro léčbu se používají zejména sloučeniny pětimocného antimonu (Sb5+), dále pak amphotericin B a Ambisome (amphotericin B v liposomech) – ten však kvůli vysoké ceně většinou jen ve vyspělých průmyslových oblastech. V případech kožních forem leishmaniózy je parazitologická diagnostika založena na roztěrech odebraných z kožních lézí a léčebné preparáty jsou postaveny na sloučeninách pětimocného antimonu. Tyto jsou aplikovány lokálně v případě malého počtu malých lézí, v případě velkých nebo i vícečetných lézí je pak nutná systemická léčba. Zdroj <http://www.who.int/tdr>

V posledních letech je velká pozornost věnována též koinfekci *Leishmania*/HIV. Stále více případů se objevuje v různých světových oblastech a tyto případy již nejsou omezeny pouze na endemické oblasti. Do dnešního dne na 33 zemí potvrdilo výskyt koinfekce *Leishmania*/HIV.

Geografický překryv výskytu viscerální leishmaniózy a AIDS se v mnoha rozvojových zemích neustále zvětšuje především kvůli dvěma hlavním faktorům : AIDS se pandemicky šíří jak v příměstských tak i v zemědělských oblastech světa a simultánně s tímto se šíří VL ze zemědělských oblastí do oblastí příměstských.

Oblasti výskytu koinfekce *Leishmania* / HIV



Zdroj <http://www.who.int/tdr>

3.2. Flebotomové

Hmyzí vektoři leishmaniózy, flebotomové rodu *Phlebotomus* a *Lutzomyia*, jsou rozšířeni zejména v tropických oblastech, ale je možno je nalézt i v mírném pásu. Flebotomové se vyskytují v širokém spektru biotopů a jednotlivé druhy mívají často velmi specifické nároky na životní prostředí. Jsou malí (1,5 až 3,5 mm), ochlupení, mají úzká křídla, dlouhé nohy, štíhlá těla a černé oči.

Dospělci jsou aktivní zejména v časných ranních hodinách, k večeru a v noci, mohou však sát krev i během dne, jsou-li vyrušeni. Pokud nejsou aktivní, dospělí flebotomové mají svá místa, kde odpočívají. Místa odpočinku jsou většinou velmi podobná nebo alespoň blízko místa, kde probíhal larvální vývoj a jsou relativně chladná, vlhká a tmavá. Obě pohlaví se živí cukernými šťávami z rostlin (Schlein a Warburg, 1986) nebo medovicí, která je produkována homopterním hmyzem (Killick-Kendrick a Killick-Kendrick, 1987, Moore a kol., 1987), pouze samice potřebují krev pro vývoj vajec. Některé druhy jsou schopny první snůšky bez nasátí krve (autogenní druhy - El Kammah, 1973), jeden druh je dokonce jak autogenní, tak partenogenetický (Oliveira a kol., 1994). Podle chování, při kterém flebotomové spíše poskakují než létají, bylo dříve usuzováno, že se po vylíhnutí z kukly příliš nevzdalují od místa, kde probíhal jejich larvální vývoj. Bylo však prokázáno, že při hledání krevního zdroje (většinou v podvečer či v noci) jsou samice schopny létat až několik stovek metrů od místa vylíhnutí (Quate, 1964, Yuval a kol., 1988, Kamhawi a kol., 1991, Alexander a Young, 1992). Stále však jsou flebotomové považováni za velmi špatné letce – jsou schopni letět maximální rychlostí necelý jeden metr za sekundu (Killick-Kendrick a kol., 1986).

Samice flebotomů sají krev z mnoha druhů obratlovců, zejména ze savců. Některé druhy sají na ptácích, plazech či dokonce obojživelnících. Samice většiny druhů jsou exofágní a exofilní. Ke kopulaci dochází většinou na hostiteli nebo v jeho těsné blízkosti. Některé druhy kopulují před nasátím, jiné při a další po nasátí krve. Samci nejméně dvou druhů flebotomů - *Lu. longipalpis* (Jarvis a Rutledge, 1992) a *P. argentipes* (Lane a kol., 1990) – přilétají na hostitele jako první, kde vytvářejí individuální teritoria a čekají na samice, kterým se pak dvoří (chování nazývané lekking). Bylo prokázáno, že samice rodu *Lutzomyia* rozeznávají své kopulační partnery pomocí feromonů, které samci produkují ve žlázách na zadečku (Ward a Morton, 1991) a byly vysloveny též domněnky, že určitou roli může hrát i zvuk. Žádné podobné feromony však zatím nebyly popsány u rodu *Phlebotomus*, jehož samci, jak se zdá, nemají žádné abdominální žlázy (Ward a kol., 1991b). Je možné, že vibrace křídel samců by mohla být též důležitá k podnícení samic ke kopulaci.

Samice kladou vejce rozptýleně do místa potenciálně vhodného pro larvální vývoj, jako jsou nory určitých hlodavců, kůra starých stromů, rozpadající se budovy, v prasklinách stěn domů a v domovním odpadu – v místech, kde larvy mohou najít organickou hmotu, teplo a vlhkost nezbytné pro jejich další vývoj (Killick - Kendrick, 1987). Vajíčka dozrávají během jednoho až dvou týdnů. Larvy jsou apodní, eucephalní a mají čtyři instary. Palearktické druhy přezimují v diapauzujícím čtvrtém larválním stádiu (Killick-Kendrick a Killick-Kendrick, 1987, Schlein a kol., 1990a), v oblastech teplejších a vlhčích diapauzují některé druhy ve stádiu vajíčka (Lawyer a kol., 1991).

Larvy čtvrtého instaru vytváří kuklu a metamorfuji do dospělce. Vývoj kukly trvá 5-10 dní, začínají se líhnou samci. Dospělci se líhnou z kukel převážně ve tmě. Samotný životní cyklus flebotomů trvá většinou 20-40 dní – podle druhu, rychlosti trávení potravy a okolní teploty. Diapauzující druhy, které mohou pozastavit svůj vývoj, pokud okolní podmínky nejsou dobré pro jejich další vývoj, mohou mít životní cyklus prodloužený o dobu strávenou v diapauze – třeba o několik měsíců.

Ačkoli jsou flebotomové rozšířeni zejména v teplejších oblastech světa (včetně jižní Evropy, Asie, Afriky, Austrálie a střední a jižní Ameriky), jejich výskyt sahá až k 50° severní šířky v jihovýchodní Kanadě (Young a Perkins, 1984) a těsně pod tuto hranici v severní Francii a Mongolsku (Lewis, 1982), směrem k jihu pak až ke 40° jižní šířky – nevyskytují se však na Novém Zélandu a ostrovech Tichého oceánu (Lane, 1993). Výšková distribuce sahá až do nadmořských výšek 3300 metrů nad mořem (Afghanistan - *P. rupester*) (Artemiev, 1980). Celkem je známo okolo 700 druhů flebotomů, z nichž o 70 se předpokládá, že přenášejí nemoci na lidi, 30 z nich jsou pak potvrzenými vektory leishmaniózy.

Kontrola vektorů v případech přenosu leishmaniózy v blízkosti sídel nebo uvnitř sídel je prováděna postřikem domů residuálními insekticidy (obvykle pyrethroidy). Flebotomové jsou na insekticidy stále velmi citliví. Tato metoda je však bohužel zcela neúčinná na ty druhy flebotomů, které sají mimo budovy – například druhy flebotomů v jihoamerických lesích. Postřiky reziduálními insekticidy jsou používány též proti komárům rodu *Anopheles* a jsou tedy efektivní nejen proti leishmanióze, ale i proti malárii. Zvířecí rezervoáry viscerální leishmaniózy (*L. infantum*) jsou kontrolovány eliminací toulavých séropozitivních psů, rezervoáry kožní leishmaniózy pak používáním jedovatých návnad pro hlodavce či kontrolou životního prostředí těchto hlodavců – skládky apod. (např. použití rodenticidů proti *Rhombomys opimus* ve střední Asii). Kochraně domácích psů jsou často používány obojky s repelenty.

Ochrana lidí před vlastním bodnutím flebotomy je též poměrně složitá. Flebotomové jsou schopni proniknout pod běžné moskytiéry, proti nim je nutno používat moskytiéry speciální s velmi jemnou strukturou. Tyto jsou však méně prodyšné a ve vlhkých tropických oblastech velmi nepohodlné. Chemické repelenty (DEET, DMP) jsou účinné při aplikování na oděvy či moskytiéry, avšak při přímé aplikaci na kůži ztrácejí kvůli perspiraci velmi brzy účinnost. Insekticidní postřiky líhnišť jsou též potenciální strategií boje proti flebotomům, velmi málo je však o líhništích známo.

Zdroj:

<http://www.museums.org.za/bio/insects/flies/psychodidae/phlebotominae.htm>

Flebotomové přenášejí na člověka kromě leishmanióz i řadu virových i bakteriálních onemocnění. Mezi nejznámější patří Sandfly Fever Virus – virus patřící do skupiny flebovirů, který způsobuje horečku papataci (nebo též sandfly fever). Je přenášen flebotomy (zejména druhem *P. papatasi* (Lewis, 1973, Lane, 1993, Service, 1996) v mediteránu a na středním východě. Mezi další fleboviry Starého světa patří Toscana virus vyskytující se v severní a západní části mediteránu přenášený druhem *P. perniciosus*. V Novém světě jsou pak medicínsky významné Chagres a Punta Toro viry přenášené druhy *Lu. trapidoi* a *Lu. ylephiletor*. Mezi nejvýznamější bakteriální onemocnění patří

Bartonella bacilliformis, bakteriální původce nemoci zvané bartonellosis (nebo též Oroya fever, Carrion's disease, Verruca peruana) v severozápadní jižní Americe (v Peru, v Kolumbii a Ekvádoru). Je přenášen (a to zřejmě mechanicky) druhem *Lutzomyia verrucarum*.

Flebotomové patří do podřádu *Nematocera*, řádu *Diptera*. Další klasifikace není jednotná a není univerzálně přijímána (Lane, 1993), ale zpravidla jsou řazeni do čeledi *Psychodidae*, podčeledi *Phlebotominae*. Lane (1993) rozeznává šest rodů (viz níže), z nichž pouze dva rody mají medicínský význam, jmenovitě *Phlebotomus* ve Starém světě, který je dále rozdělován do 12 podrodů a *Lutzomyia* v Novém světě, který je dále rozdělován do 25 podrodů a skupin druhů. Všichni potvrzení vektorů leishmaniózy patří do těchto dvou rodů.

Flebotomové Nového světa

- Rod: *Brumptomyia* Franca et Parrot
- Rod: *Lutzomyia* Franca – jediný rod flebotomů, který saje krev na lidech v Novém světě, vyskytuje se zejména v zalesněných oblastech tropů.
- Rod: *Warileya* Hertig
Flebotomové Starého světa
- Rod: *Phlebotomus* Rondani - vyskytuje se zejména v semiaridních oblastech a v savanách. Jediný rod flebotomů, který přenáší choroby na lidi v těchto oblastech.
- Rod: *Sergentomyia* Franca et Parrot – saje zejména na plazech, občas přenáší protozoální parazity rodu *Sauroleishmania*. Vzácně saje na lidech, ale dosud nebyl potvrzen přenos nějaké choroby na lidi.
- Rod: *Chinius* Leng

3.3. Leishmanie

3.3.1. Fylogeneze a systematika rodu *Leishmania*

Leishmania je monofyletický taxon z čeledi Trypanosomatidae, řádu Kinetoplastida. O původu digenetických trypanosomatidů existují dvě základní hypotézy. První zastává teorii, že se vyvinuli z monogenetických parazitů bezobratlých živočichů. Toto tvrzení by mohl podporovat častější výskyt monogenetických bičíkovců v různých bezobratlých hostitelích, vývoj v zadní části střevního traktu a kontaminativní přenos spolu s pohlavním rozmnožováním v hmyzím přenašeči. Druhou hypotézou je teorie, že původ digenetických trypanosomatidů je v obratlovcích a že přenos do krevsajících bezobratlých byl pouze náhodný. Toto tvrzení může být podpořeno častějším výskytem monogenetických bičíkovců v těch čeledích bezobratlých, které se živí sáním krve (review Lainson a Shaw, 1987, Sádlová, 1999). Původ rodu *Leishmania* z monogenetických bičíkovců je obecně více přijímán.

Rod *Leishmania* se dělí na dva hlavní podrody *Leishmania* a *Viannia*, které byly od sebe odděleny zhruba před 90 milióny lety, v době, kdy se oddělil africký a jihoamerický kontinent. Oddělení a následná nezávislá evoluce těchto dvou podrodů je potvrzena kladogramem Thomaz-Soccol a kol. (1993a). Podrod *Sauroleishmania* (plazí parazit) se oddělil od podrodu *Leishmania* až poté, co byla tato skupina oddělena od podrodu *Viannia* (Noyes a kol. 1998). Dnešní klasifikace je založena na diferenciaci druhů rodu *Leishmania* z různých geografických oblastí. Moderní imunologické, biochemické a genetické metody jsou používány při charakterizaci různých geografických izolátů. Podle Shawa (1994) v současné době existuje 30 pojmenovaných druhů rodu *Leishmania* izolovaných ze savců, 10 ve starém světě a 20 v novém světě. Klasifikace a základní charakteristiky pojmenovaných druhů leishmanií jsou v review Sádlové (1999).

Během vývoje ve vektoru leishmanie procházejí složitým vývojovým cyklem. Existují tři hlavní modely vývoje a diverzifikace leishmanií ve vektoru – Peripylaria (podrod *Viannia*), Suprapylaria (podrod *Leishmania*) a Hypopylaria (pouze plazí parazit, rod *Sauroleishmania*). Peripylaria mají svůj vývoj lokalizován do zadní části trávicího traktu (hindgut), následuje anteriorní migrace promastigotů do thorakálního střeva (thoracic midgut) a předního střeva (foregut). Při opětovném sání krve dochází k přenosu leishmanií do hostitele. Suprapylaria mají svůj vývoj limitován do oblasti přední části trávicího traktu (midgut a foregut) – parazité jsou přenašeni též při bodnutí při sání krve. Hypopylaria mají svůj vývoj limitován do zadní části trávicího traktu (hindgut) a přenos je kontaminativní. Tyto modely – Peripylaria, Suprapylaria, Hypopylaria - však nemají žádný taxonomický status.

3.3.2. Struktura buňky a morfologické formy leishmanií

Základní buněčná ultrastruktura leishmanií je stejná jako u ostatních eukaryotických buněk. Leishmanie mají speciální subpelikulární korset pod plasmatickou membránou, který je tvořen sítí mikrotubulární cytoskeletu a probíhá ve spirálních drahách podél longitudinální osy celé buňky. Mitochondriální DNA obsahuje až 20% veškeré buněčné DNA a je kondenzována v pravidelně uspořádaných fibrózních sítích ve zvláštní části mitochondrie zvané kinetoplast. Ten je zpravidla situován nad jádrem a pod bazálním tělískem bičíku. Velikost kinetoplastu a minikroužků je stálou a charakteristickou vlastností jednotlivých druhů trypanosomatidů (Lukeš a kol, 2002, Lukeš a Votýpka, 2000). Bičík je přítomen pouze v promastigotním stádiu leishmanií (viz dále). Rotační pohyb bičíku zajišťuje pohyb buňky vpřed. Leishmanie jsou digenetičtí bičíkovci a vyskytují se (podle mikrohabitatu v hostiteli nebo v přenašeči) ve dvou hlavních morfologických formách – promastigotní a amastigotní. Během vývojového cyklu v přenašeči procházejí několika transformacemi – některé modifikace obou základních forem byly popsány a pojmenovány (Killick-Kendrick, 1979, Walters, 1993, Schlein, 1993).

Promastigotní stádium – dlouhá, bičíkatá forma vyskytující se extracelulárně v trávicím traktu flebotomů.

procyklické promastigotní stádium – je první formou promastigotního stádia vyvíjející se z amastigotů nasátých společně s krví z obratlovčího hostitele. Transformace amastigotních stádií do promastigotních je vždy provázena určitou mortalitou (Pimenta a kol., 1997), proto hlavní úlohou procyklických promastigotů je množení se v energeticky bohatém prostředí a iniciace infekce.

nektomonádní promastigotní stádium – nalézáme většinou v abdominální části střeva. Byly zaznamenány dva typy nektomonád – dlouhé (s délkou více než $12\mu\text{m}$) a krátké (s délkou $6,5 - 11,5\mu\text{m}$ a s bičíkem vždy delším než tělo). Jedná se o stádium pomalu se pohybující, elektrondensní, délka bičíku je velmi variabilní. Nektomonády se pohybují anteriorně směrem ke stomodeální valvě, do oblasti zvané cardia.

haptomonádní promastigotní stádium – je nepohyblivé, tělo má kratší a širší, elektronlucidní, bez bičíku je délka těla menší než $12\mu\text{m}$. Bičík je schopen se přichytávat k chitinu pomocí spojů podobných hemidesmosomálním.

paramastigotní stádium – je nejběžnějším morfologickou formou v přední (foregut) a zadní (hindgut) části trávicí trubice flebotomů. Od promastigotních stádií se liší zejména kinetoplastem ležícím vedle či lehce posteriorně od jádra. Tyto formy se přichytávají na kutikulární výstelku stomodeální valvy a k mikrovilům thorakálního střeva flebotomů

metacyklické promastigotní stádium – malé (méně než $8\mu\text{m}$ dlouhé), velmi pohyblivé, nedělící se, bičíkaté infekční formy přenášené do obratlovčího hostitele.

Amastigotní stádium – malé, oválné či kulaté formy, bez bičíku, které jsou lokalizovány intracelulárně v makrofázích obratlovčího hostitele. Residuum bičíku je omezeno na přítomnost v bičíkovém reservoáru.

Další informace o transformaci a významu jednotlivých forem jsou uvedeny v kapitole o vývoji leishmanií ve flebotomech.

3.3.3. Enzymy a povrchové molekuly leishmanií

Velká pozornost je věnována enzymům a molekulám leishmanií, které se zdají být důležité či dokonce nezbytné pro invazi a přežívání v hostiteli či přenašeči. Superoxid dismutáza (SOD) bakteriálního typu je přítomna v leishmaniích, katalázová aktivita je velmi nízká nebo dokonce nulová. Namísto glutathionu obsahují leishmanie glutathionyl-spermidinový konjugát trypanothion. Trypanothion a SOD společně s trypanothion peroxidázou vytváří hlavní linii obranných mechanismů proti oxidativním metabolitům hostitele. (Chang, 1997)

Na povrchu promastigotů leishmanií byly identifikovány dvě hlavní skupiny glykokonjugátů ukotvených GPI kotvou k membráně. První skupinu tvoří GPI ukotvené glykolipidy (hlavní povrchová molekula leishmanií - lipofosfoglykan (LPG) a příbuzné molekuly glykosylinositolfosfolipidy (GIPLs) (Mc Conville, 1991, McConville a Homans, 1992). Druhou skupinu pak tvoří

GPI ukotvené glykoproteiny. Z nich je nejvíce zastoupena gp63, dále pak promastigotní povrchový antigen 2 - promastigote surface antigen-2 (PSA-2) (objeven v *L. major* Murrayem a kol., 1989) nebo gp46 (z *L. mexicana* (Kahl a McMahon, 1987) - review Moody, 1993. Další důležité glykokonjugáty jako je fosfoglykan (phosphoglycan - PG - Handman a kol., 1984)) nebo proteofosfoglykan (proteophosphoglycan - PPG) jsou exkretovány, posledně jmenovaný - PPG – může být též vázán GPI kotvou. Výše uvedené povrchové molekuly jsou velmi důležité pro přežívání parazitů ve vektoru i v hostiteli, proto je jim věnována značná pozornost i v této práci – s důrazem na vývoj leishmanií ve vektoru – hlavnímu tématu práce.

3.3.4. GP63

GP63 je hlavní proteinem povrchu leishmanií a je exprimována v množství odpovídajícímu zhruba 1% celkového objemu buněčných proteinů (Bahr a kol., 1993). U *L. major* bylo dokázáno, že geny kódující gp63 jsou exprimovány různě – geny 1-5 jsou exprimovány ve vyšších hladinách pouze u promastigotů, zatímco gen 6 je exprimován pouze v nižší hladině, ale jak u promastigotů, tak i u amastigotů (Voth a kol., 1998).

Gp63 je endopeptidáza známá pod názvem leishmanolysin nebo též pod pojmenováním promastigotní povrchová proteáza (promastigote surface protease - PSP), která má velmi širokou substrátovou specifitu (Chaudhuri a Chang, 1988, Bouvier a kol., 1989, Ip a kol., 1990, Bouvier a kol., 1990). Je to metaloenzym s dvojmocným zinkem v aktivním místě (Colomer-Goud a kol., 1985, Etges a kol., 1985, 1986a, 1986b, 1989, Bouvier a kol., 1987, 1989, Chaudhuri a kol., 1989, Bouvier a kol., 1995). Má podle substrátu závislé pH optimum (Chaudhuri a Chang, 1988, Ip a kol. 1990, Tzinia a Soteriadou, 1991), optimální aktivitu vykazuje v kyselém prostředí (Ilg a kol., 1993). Gp63 hydrolyzuje širokou řadu substrátů včetně kaseinu, azokaseinu, želatiny, albuminu, hemoglobinu a fibrinogenu (Chaudhuri a kol., 1989, Bouvier a kol., 1989, 1990, Ip a kol., 1990, Tzinia a Soteriadou, 1991).

Gp63 je zastoupena zejména v promastigotních stádiích leishmanií a to na celém povrchu buňky včetně bičíku (Fong a Chan, 1982, Russel a Wilhelm, 1986, Kweider a kol., 1987, Bouvier a kol., 1987, Etges, 1992). Byla objevena také u amastigotních stádií, avšak v menší míře a jinak lokalizována. V amastigotech je lokalizována zejména ve flagelární kapse. Amastigoti *L. mexicana* mají proteázu gp63 lokalizovanou do velkých lysosomů nazývaných megasomy (Bahr a kol., 1993, Ilg a kol., 1993).

Bylo prokázáno, že gp63 je velmi důležitou molekulou s více úlohami při infekci v obratlovčím hostiteli. Pokrytí lysosomů nativní gp63 s plnou enzymatickou aktivitou je nutné pro jejich ochranu proti fagolysosomální degradaci v makrofázích (Chaudhuri a kol., 1989). Podle těchto studií je tento enzym zodpovědný za rezistenci leishmanií vůči cytolýze indikované komplementem (Brittingham a kol., 1995) a za vazbu k makrofágům (Wilson a Pearson, 1986, Russell, 1987). Interakce s makrofágy zahrnuje jak přímou vazbu ligandů k hostitelským receptorům (Blackwell a kol., 1985, Handman a Goding, 1985, Russell a Wright, 1988, Rizvi a kol., 1988, Mosser a kol., 1987),

tak vazbu opsoninů (komplementu a fibronektinu) k jejich příslušným receptorům (Mosser a Edelson, 1985, Wyler a kol., 1985, Mosser a kol., 1992). Další pravděpodobnou úlohou gp63 je absorpce promastigotů makrofágy (Liu a Chang, 1992), ochrana proti intracelulární degradaci ve fagolysosomech (Chaudhuri a kol., 1989, McGwire a Chang, 1994) a inhibice chemotaxe monocytů a neutrofilů (Sorensen a kol., 1994). Je též zapojena do procesu patogeneze – degraduje extracelulární matrix a vytváří léze v hostitelích (McMaster a kol., 1994), zejména relevantní je toto tvrzení pro volnou formu gp63 (McGwire a kol., 2002, 2003).

Úloha gp63 pro leishmanie ve vektoru je méně probádána. Byla vyslovena domněnka, že gp63 by mohla degradovat hemoglobin a další proteiny v krvi nasáté spolu s parazity do vektora a tím získávat živiny potřebné pro růst promastigotů (Schlein, 1993). Tato a možné další funkce mohou být dále podpořeny nálezem podobných ektopeptáz v dalších trypanosomatidech včetně monoxenních druhů jako *Crithidia* a *Herpetomonas* (např. Etges, 1992, Inverso a kol., 1993). Fakt, že přítomnost gp63 byla detekována na povrchu promastigotů ve střevě experimentálně infikovaných flebotomů (Grimm a kol., 1987, Davies a kol., 1990), a obtíže při demonstraci přítomnosti této proteázy v amastigotech též nasvědčují hypotéze, že úloha gp63 je v trávicím traktu hmyzího vektora (Etges a kol., 1992).

Konkrétní úloha metaloproteinázy gp63 v životním cyklu leishmanií však stále ještě není zcela známa. Cílená náhrada či knockautování genů je nástrojem pro určení funkce specifických genů. Použitím této techniky byly modifikovány kmeny *L. major*, které měly zablokovánou produkci gp63 (delece genů 1-6 gp63) a byl sledován jejich vývoj ve vektoru (Joshi a kol., 1998, 2002). Podle těchto studií gp63 hraje zanedbatelnou či dokonce nehraje žádnou úlohu ve vektoru, protože mutanti s knockautovanými geny pro gp63 se vyvíjeli a přežívali srovnatelně s kmeny kontrolními (Joshi a kol., 1998, 2002).

3.3.5. LPG

LPG je hlavním glykokonjugátem na povrchu promastigotů leishmanií. Je exprimován po celém povrchu promastigotů a vytváří silný plášť s těsně nahloučenými molekulami, které účinně maskují další molekuly jako třeba gp63 (Pimenta a kol., 1991).

LPG je tvořeno čtyřmi strukturálními doménami. Sestává se z páteřní několikrát opakované fosfodisacharidové jednotky $-6\text{Gal}\beta 1,4\text{Man}\alpha 1\text{-PO}_4-$, která je buď nesubstituována nebo substituována různými postranními polysacharidovými řetězci. Fosfoglykanové řetězce jsou přes hexasacharidové glykanové jádro připojeny k 1-O-alkyl-2-lyso-fosfatidylinositollipidu, který je kotví k plasmatické membráně. Řetězec je ukončen neutrální nefosforylovanou oligosacharidovou čepičkou (review McConville a Blackwell, 1991, Turco a Descoteaux, 1992). Přítomnost fosforylovaných hexóz, neacetylovaného glukosaminu a lysoalkylglycerolových složek je zcela výjimečnou vlastností LPG. Různé druhy leishmanií mají heterogenní LPG, stejně tak se LPG strukturálně liší u různých vývojových stádií. Páteřní opakující se

disacharidová jednotka může být v C-3 místě Gal zbytku nesubstituována (súdánský kmen *L. donovani*), nebo částečně substituována glukózovými postraními řetězci (indický kmen *L. donovani*, *L. mexicana* a *L. chagasi*) nebo kompletně substituována sacharidovými řetězci. Tyto pak mohou být primárně zakončeny galaktózou (*L. major*) nebo glukózou a arabinózou (*L. tropica*) (McConville a kol., 1995, Thomas a kol., 1992, Turco a Descoteaux, 1992). Molekulární variabilita LPG je rozhodující pro přežití parazitů, jejich náchylnost a životaschopnost a pro formu onemocnění, které způsobují.

Při studiu LPG v hostiteli bylo prokázáno, že LPG se účastní inhibice chemotaxe monocytů a neutrofilů (Lo a kol., 1998, Frankenburg a kol., 1990, 1992). LPG se přímo váže na CR3 receptor, manózo-fukózový receptor a fibrinogenní receptor (Talamas-Rohana a kol., 1990, Kelleher a kol., 1995, Wilson a Pearson, 1986), LPG tvoří bariéru bránící inserci MAC (membrane attack complexes) (Puentes a kol., 1990), chrání leishmanie před intracelulární degradací ve fagolysosomech (McNeely a kol., 1989, McNeely a Turco, 1990, Proudfoot a kol., 1995, 1996), potlačuje expresi cytokinů v monocytech (Frankenburg a kol., 1990, Hatzigeorgiou a kol., 1996) a inhibuje fagolysosomální fúzi (Desjardins a Descoteaux, 1997)

O funkci LPG ve vektoru existovaly dvě hlavní hypotézy. První byla, že LPG podporuje přežívání promastigotů ve střevě inhibicí uvolňovaných střevních proteáz (Schlein a kol. 1990b) a ochraňuje povrch parazitů před proteolýzou (Pimenta a kol., 1997). Proti tomuto tvrzení se však postavily výsledky Saraivy a kol. (1995), kteří zaznamenali zpoždění exprese LPG na povrchu *L. major* v *P. papatasi* do objevení se nektomonád (třetí den po sání), zatímco vrchol proteázové aktivity v tomto druhu flebotoma byl zaznamenán 24 – 34 hodin po sání (Dillon a Lane, 1993a).

Účinným nástrojem pro definování funkce některých molekul zodpovědných za komplikovanou strukturu LPG se ukázalo použití specifických mutantů deficientních v biosyntéze těchto molekul. Gen *lpg1* je zodpovědný za připojování galaktofuranózy ke glykanovému jádru LPG (Huang a Turco, 1993, Ryan a kol., 1993) - to znamená, že mutanti defektní v *lpg1* stále vytvářejí a sekretují další proteinové fosfoglykany (Spath a kol., 2000), nikoli však LPG. *lpg2* kóduje transportér pro přenos GDP-Man do Golgiho aparátu. To znamená, že mutanti bez *lpg2*- jsou deficientní v syntéze všech fosfoglykanů (Descoteaux a kol., 1995, Ma a kol., 1997). U mutantů defektních v *lpg1* (R2D2 – *L. donovani*, *L. major lpg1*-) byl zaznamenán pouze slabý pokles nárůstu promastigotů v rané fázi infekce ve střevech flebotomů (Sacks a kol., 2000). Naproti tomu, mutanti postrádající gen *lpg2* (C3PO – *L. donovani*, *L. major lpg2*-) byli zničeni během prvních 24 hodin po nasátí do střeva. Z toho vyplývá, že další uvolňované molekuly obsahující fosfoglykanové struktury (např. sAP nebo PPG) hrají důležitou úlohu v ochraně parazitů před trávicími enzymy ve střevě flebotomů v raném stádiu infekce. Tato zjištění zároveň vyvracejí první hypotézu o funkci LPG ve střevě flebotomů – proteolytická aktivita k ochraně před hmyzími proteázami není primárně zajišťována LPG.

Expese LPG koreluje s dobou úniku promastigotů z intraperitrofického prostoru, což by podporovalo více druhou teorii o funkci LPG ve vektoru a to přichycení promastigotů ke střevní stěně (Pimenta a kol., 1992, Sacks a kol., 1994). Úloha LPG v přichycování ke střevní stěně je založena zejména na faktech, že purifikovaný LPG se váže ke střevní stěně *in vitro* (Pimenta a kol.

1992) a že LPG inhibuje vazbu promastigotů ke střevu *in vitro* (Pimenta a kol., 1992, Sacks a kol., 1995). Dále pak je známo, že druhově specifický polymorfismus ve struktuře LPG předurčuje druhovou diferenciaci - schopnost jednotlivých druhů leishmanií persistovat ve střevě po defekaci je různá u různých druhů flebotomů (Pimenta a kol., 1994).

Stále se však vedou spory o receptorech, na které se LPG váže. Několik studií předpovědělo, že by za tuto vazbu mohly být zodpovědné střevní lektiny flebotomů (Wallbanks a kol., 1986, Svobodova a kol., 1996, Volf a kol., 1998, 2002.). Recentní studie Kamhawi a kol. (2004) tato zjištění potvrdila. Bylo prokázáno, že LPG *L. major* se váže na galektiny střeva *P. papatasi* (Kamhawi a kol., 2004).

Schopnost přichycení leishmanií je též vývojově regulována modifikací LPG, kterou s sebou přináší transformace promastigotů z procyklických do metacyklických forem. U *L. major* se jedná o částečnou substituci terminálně exponované galaktózy arabinózou (Pimenta a kol., 1992). Infekční metacykličti promastigoti tak ztrácejí schopnost se vázat ke střevnímu epitelu.

3.3.6. sAP - secreted acid phosphatase – sekretovaná kyselá fosfatáza

Promastigoti leishmanií syntetizují sAP a uvolňují ji z flagelární kapsy (Bates a kol., 1989) ve formě monomérů či dimérů (Doyle a Dwyer, 1993, Shakarian a Dwyer, 2000b). Sekretovaná kyselá fosfatáza je bohatá na serin a threonin, mnoho z reziduí je modifikováno fosfoglykany (Stierhof, 1998). Kyselá fosfatázy jsou skupinou hydrolytických enzymů, které zřejmě podporují rezistenci parazitů proti destrukci hostitelem a jeho patogenitě a dále pak mají určitou úlohu nutriční (Lovelace a kol., 1986) – to kvůli jejich široké substrátové specifitě (Gottlieb a Dwyer, 1982). Pokusy s mutanty defektními v *lpg2* – viz výše – podporují tvrzení, že sAP se podílí na defosforylaci a tím inhibici aktivity trávicích enzymů flebotomů.

3.3.7. PPG – proteofosfoglykany

Filamentární proteofosfoglykan (fPPG) se skládá zejména z fosfoglykanů (96% w/w) a malého množství aminokyselin (4% w/w) - ser, ala, pro, které jsou bohatě glykosylovány (review Ilg, 2000). Svými vlastnostmi (vysoký obsah karbohydrátů, vysoký obsah glykosylovaných aminokyselin, enormní množství molekul, vysoký negativní náboj, filamentární struktura, přítomnost za sebou se opakujících glykosylovaných domén, formace síťových struktur, viskozita a vytváření gelu ze středně koncentrovaných roztoků) připomínají savčí muciny (review Ilg, 2000).

Promastigoti leishmanií mají tendenci k tvorbě agregátů, které drží při sobě gelózní látkou. Pomocí elektronové mikroskopie byl tento gel klasifikován jako

sít' fibrózních filament, které jsou jako produkty sekrece vylučovány ve flagelární kapse (Stierhof a kol., 1994). Filamentární molekula, která vytváří sít' a zdá se být asociována s buněčnou agregací je fPPG (Ilg a kol., 1996). Leishmanie vytvářejí pevnou hmotu parazitů zabudovaných ve filamentární gelovité matrix v oblasti cardie a stomodeální valvy (Walters a kol., 1989, Lawyer a kol., 1990) a to velmi pravděpodobně způsobuje těžkosti, které mají infikovaní flebotomové při opětovném sání krve na hostiteli (Killick-Kendrick, 1979, Beach a kol., 1985). Bylo též prokázáno, že při sání flebotomové uvolňují do hostitele spolu s parazity a slinami i malé množství gelovité hmoty, která je recentně popisována jako PSG (promastigote secretory gel) a jejíž hlavní složkou je právě fPPG (Rogers a kol., 2002, 2004). Tento gel byl až do současnosti pozorován u všech studovaných modelů *Phlebotomus - Leishmania*. Experimenty s mutanty selektivně deficientními v PPG, LPG, sAP (Rogers a kol., 2004) byla potvrzena i předpokládaná funkce fPPG (Ilg a kol., 1999) – zvýšení pravděpodobnosti úspěšného přenosu parazitů do hostitele (Rogers a kol., 2004).

Membránově vázaný fosfoglykan (mPPG) je připojen k membráně přes GPI kotvu na C terminální doméně a může být až několik stovek nanometrů dlouhý (Ilg a kol., 1999). N-terminální doména ukazuje určitou homologii s povrchovým proteinem leishmanií – komplexu PSA/gp46 (Ilg a kol., 1999). mPPG je exprimován na povrchu promastigotů *L. major* a je přítomen i u amastigotů avšak v menším množství (Piani a kol., 1999). Podobné molekuly byly též detekovány u druhů *L. mexicana* a *L. donovani* (Piani a kol., 1999). Úloha mPPG není ještě zcela přesně známa, délka molekuly mPPG však napovídá, že mPPG by mohl být potenciálním ligandem pro makrofágy a receptory ve střevě flebotomů by mohly též být komplementárním akceptorem – tyto funkce byly připisovány zejména LPG (review Ilg, 2000).

Amastigoti druhu *Leishmania mexicana* nesyntetizují LPG (Bahr a kol., 1993) ani fosfoglykosylované sAP (Ilg a kol., 1991, 1994), ale sekretují amastigotní PPG (neboli aPPG) do parasitoforní vakuoly hostitelských makrofágů (Ilg a kol., 1995). aPPG obsahuje všechny glykany, které byly identifikovány v *L. mexicana* promastigotním fosfoglykanovým antigenem LPG (Ilg a kol., 1992) a sAP (Ilg a kol., 1994), většina glykanů je však specifická pro amastigoty či jsou to zcela nové struktury (Ilg, 2000). aPPG – je jediným sekretovaným produktem amastigotů, který byl identifikován v infikované hostitelské tkáni (Ilg a kol., 1998). Je obecně přijímáno, že sekretované a na povrchu exponované antigeny intracelulárních patogenů jsou primárním terčem pro detekci hostitelským imunitním systémem (Overath a Aebischer, 1999). Komplexní glykosylace aPPG, jak se zdá, zabraňuje produkci antigenů a tím inhibuje prezentaci této abundantní molekuly hostitelskému imunitnímu systému (Aebischer a kol., 1999, Overath a Aebischer, 1999). Dále je známo, že nízká koncentrace polyanioických komponent vede k vakuolizaci – akumulaci v sekundárních lysosomech (Ilg a kol., 1995). aPPG je polyanickým polysacharidem, který zřejmě indukuje tvorbu lysozomálních vakuol v makrofázích (Peters a kol., 1997).

Promastigoti *Leishmania mexicana* sekretují promastigotní PPG2 (pPPG2) a tento pPPG je morfologicky odlišný od sAP i fPPG / mPPG (Ilg, 2000) Biochemické a imunologické nálezy však ukazují, že pPPG2 má stejný polypeptidový řetězec jako aPPG (Klein a kol., 1999). Existují však velké rozdíly mezi aPPG a pPPG2 v jejich molekulové hmotnosti, ultrastruktuře,

proteinázové senzitivě, které jsou zřejmě důsledkem glykosylace specifické pro vývojová stádia.

3.3.8. GIPLs - glykoinositolfosfolipidy

Nízkomolekulární glykoinositolfosfolipidy jsou hlavní skupinou GPI - ukotvených glykolipidů, které byly charakterizovány v *L. major* (McConville a Bacic, 1989, McConville a Bacic, 1990, McConville a kol., 1990a, McConville a Homans, 1992) a v *L. donovani* (McConville a Blackwell, 1991). GIPLs jsou exprimovány v ustáleném množství v obou vývojových stádiích – amastigotním i promastigotním (McConville a Blackwell, 1991, Schneider a kol., 1993). Existují druhově, kmenově i podle vývojového stádia specifické strukturální rozdíly řetězců v populaci GIPLs (review McConville, 1991, McConville a Homans, 1992). V hostiteli GIPLs pravděpodobně vytváří ochranu před lysosomálními hydrolázami (Opat a kol., 1996) a jsou důležité zejména u amastigotů, kteří nejsou chráněni LPG. Zufferey a kol. (2003) na základě pokusů s mutanty defektními ve tvorbě GIPLs vyslovil hypotézu, že GIPLs jsou nezbytné pro přežití amastigotů v obratlovčím hostiteli a že lyso-alkyl nebo alkylacyl-GPI kotvy mohou inhibovat aktivaci makrofágů.

3.4. Interakce parazit - vektor – hostitel

3.4.1. Životní cyklus leishmanií

Leishmanie jsou parazité vyskytující se ve dvou hlavních morfologických formách – jako promastigoti ve vektoru, kde se vyvíjejí extracelulárně v trávicím traktu a jako amastigoti v hostiteli, kde přežívají a množí se intracelulárně – ve fagolysosomálních vakuolách hostitelských makrofágů. Životní cyklus leishmanií začíná v okamžiku, kdy infikovaná samice flebotomy inokuluje metacyklické promastigoty při sání do obratlovčího hostitele (1). V krevním řečišti jsou parazité fagocytováni makrofágy (2), ve kterých se vyvíjejí do amastigotních forem (malých, kulatých, bezbičkatých stadií) (3) a množí se. Ve fagolysosomech se dále pomnožují až do zániku hostitelské buňky (4), kdy se amastigoti uvolňují a infikují další fagocytické buňky a pokračují v cyklu. Amastigoti jsou nasávány flebotomy společně s krevní potravou (5). Infikované buňky krevního řečiště nebo podkožních tkání jsou pohlceny vektory (6), amastigoti procházejí několika transformacemi (7) a množí se do promastigotních forem (8). Při opětovném sání krve se metacyklické promastigoti (vysoce pohyblivé, infekční formy) dostávají do hostitelské tkáně (1) a cyklus se uzavírá.

Life Cycle:

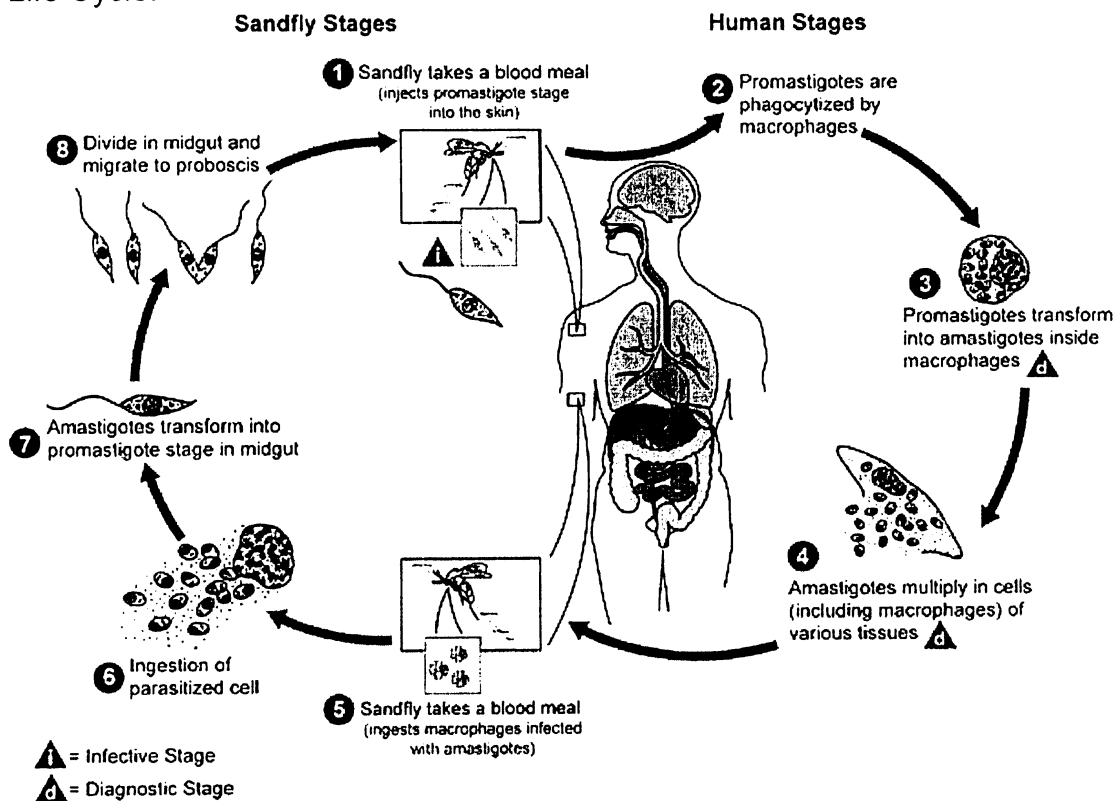


Schéma převzato z <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>

Leishmanie se během svého životního cyklu ve vektoru musí vyrovnat s několika hlavními překážkami, jejichž překonání je nutné k dokončení vývoje a úspěšnému přenosu do hostitele.

Mezi tyto bariéry patří zejména trávicí enzymy ve střevě flebotomů, peritrofická matrix, exkrece s nestrávenými zbytky krve, úspěšná anteriorní migrace, metacyklogeneze a inokulace infekčních metacyklů do hostitelské tkáně. Pro zjednodušení problematiky se v objasňování výše uvedených témat omezují pouze na suprapylární druhy, které byly předmětem studia dizertační práce.

3.4.2. Náchylnost parazitů ke střevním enzymům v krevní potravě flebotomů

Nasátí krve do střeva flebotomů indukuje syntézu a sekreci trávicích enzymů jako je trypsin, chymotrypsin, některé aminopeptidázy, karboxypeptidázy a alfa-glukosidázy do lumen střeva. Tyto enzymy jsou uvolňovány do ektoperitrofického prostoru. Signifikantní hladina proteáz je produkována již cca 10 hodin po sání, vrcholů produkce proteáz je dosaženo někdy mezi 18-48 hodinami, podle druhu flebotoma a původu krve (Borovsky a Schlein, 1987, Daba a kol., 1997a, Dillon a Lane, 1993a). Domněnku, že vývoj leishmanií ve vektoru by mohl být ovlivněn hladinou proteáz, potvrzují pokusy Schleina a Jacobsona (1998). V jejich experimentech úspěšnější přežití parazitů *L. donovani* v *P. papatasi* korelovalo s časovým posunem a nižší hladinou vrcholů proteázové aktivity. V dalších případech, kdy byla proteolytická aktivita trávicích enzymů snížena přidáním sojového inhibitoru trypsinu, bylo též podpořeno přežívání *L. donovani* v *P. papatasi* v raných fázích infekce (Borovsky a Schlein, 1987, Pimenta a kol., 1997). Vystává otázka, zda parazité jsou schopni přežít díky své rezistenci vůči trávicím enzymům vektoru, nebo díky své schopnosti potlačovat expresi enzymů, kterým jsou vystaveni. Experimentálně bylo potvrzeno, že parazité mají inhibiční efekt na trávení krve ve vektorech. Schlein a Romano (1986) a Borovsky a Schlein (1987) zjistili, že proteolytické enzymy, které produkoval *P. papatasi* během trávení, byly při infekci promastigoty *L. major* (přirozený model vektor – parazit) inhibovány, nebo alespoň byla opožděna jejich produkce. Tyto enzymy však nebyly nikterak ovlivněny infekcí *L. donovani* (nepřirozený model vektor – parazit). Podobně Dillon a Lane (1993b) prokázali, že přidání amastigotů *L. major* do lidské krve opoždilo a snížilo vrcholy proteázové aktivity ve střevě *P. papatasi*. V druhu *P. langeroni* přidání *L. infantum* vyústilo v pokles enzymatické aktivity a zpomalilo trávení krevních proteinů, přidání *L. major* (nepřirozeného parazita) nikoli (Daba a kol., 1997a, 1997b). Bohužel však existuje velmi málo studií, které by ukazovaly, zda jsou paraziti skutečně ničení či přímo zabíjeni, jsou-li vystaveni účinku těchto enzymů (Pimenta a kol., 1997). To znamená, že fakt, zda přežívání parazitů přímo závisí na modulaci proteolytické aktivity trávicích enzymů vektorů, zůstává stále jen hypotézou.

Výsledky experimentů popsaných výše indikují, že prostředí čerstvě nasátého střeva by mohlo být pro vyvíjející se parazity potenciálně letální a že produkce určitých molekul (druhově i vývojově specifických) pomáhá parazitům přežít a růst během proteolýzy nasáté krve. Použitím mutantů postrádajících gen pro *lpg2-* (Descoteaux a kol., 1995, Ma a kol., 1997) bylo

prokázáno, že fosfoglykany (PPG, sAP) hrají určitou roli při rané fázi infekce, zřejmě právě inhibicí aktivity trávicích enzymů flebotomů.

Jednou z dalších parazitických molekul, o které se též předpokládá, že hraje určitou roli v přežívání parazitů ve střevě vektora je gp63. Její funkcí by mohla být ochrana leishmanií proti proteolytickým enzymům flebotomů. Přítomnost gp63 u monoxenních trypanosomatidů (Etges, 1992) by tuto domněnku podporovala, naproti tomu Joshi a kol. (1998, 2002) při experimentálních infekcích gp63 mutanty nenašli žádné rozdíly v růstu a vývoji parazitů ve vektoru.

3.4.3. Únik z endoperitofického prostoru

V krevsajících nematocerních dvoukřídlech je peritrofická matrix (PM) sekretována střevním epitelem a vytváří cylindrický obal, který úplně obklopuje potravu v abdominálním střevě (Blackburn a kol., 1988, Gemetchu 1974, Walters a kol., 1993a). Je složena ze sítě chitinu v matrix vytvořené z proteinů a proteoglykanů. Funkcí PM je vytvoření permeabilní bariéry propustné pro trávicí enzymy. Podle Pimenty a kol. (1997) tím zároveň dochází k ochraně parazitů proti vlivu těchto trávicích enzymů v době, kdy se amastigoti transformují a jsou vůči nim extrémně citliví. Přidání exogenní chitinázy do sítě krve *P. papatasi*, která úplně zablokovala formaci PM, způsobilo masivní destrukci parazitů několik hodin po sání infekční krve.

V pozdější fázi infekce se PM může stát fyzikální bariérou infekce. Ztráta infekce kvůli neúspěšné penetraci přes PM byla popsána na modelu *L. panamensis* / *P. papatasi* (Walters a kol., 1992) – parazité uvěznění uvnitř endoperitrofického prostoru byly ze střeva exkretovány. Stejně tak se nejlépe vyvíjely kmeny *L. major* v *P. papatasi*, které unikly z endoperitrofického prostoru nejdříve (Cihakova a Volf, 1997). Fakt, že PM je bariérou, jejíž překonání je nezbytně nutné pro další vývoj parazitů v přenašečích, byl potvrzen i na jiných modelech (například microfilarie *Onchocerca volvulus* v muchničkách *Simulium damnosum*, ookinety rodu *Plasmodium* v komárech rodu *Anopheles*) (Billingsley a Rudin, 1992, Shahabuddin a kol., 1993).

Na rozdíl od neinfikovaných flebotomů, kde k porušení PM dochází nejprve na posteriorním konci, u infikovaných flebotomů je PM degradována nejprve na konci anteriorním, kde se nachází většina parazitů (Walters, 1989a, 1989b). Tato zjištění vedla – po identifikaci chitinolytických enzymů v leishmaniích – k domněnce, že degradace PM je způsobována chitinázou parazita (Schlein a kol., 1991). V době cca 72 hodin po sání krve však dosahuje maxima i chitináza produkovaná flebotomy (Ramalho-Ortigao a Traub-Cseko, 2003); ta se účastní procesu degradace PM též. V současnosti je naklonován a osekvenován gen pro chitinázu leishmanií (Shakarian a Dwyer, 1998) a bylo zjištěno, že chitináza leishmanií vykazuje jak exo- tak endochitinázovou aktivitu a že je antigenně i enzymaticky konzervována u různých druhů leishmanií (Shakarian a Dwyer, 1998, 2000a). Konstrukcí a použitím mutantů overexprimujících chitinázu bylo zjištěno, že chitináza je produkována nejen promastigotními, ale i amastigotními formami leishmanií a že hraje určitou úlohu i v obratlovčím hostiteli (Joshi a kol., 2005).

3.4.4. Přichycení parazitů ke střevním epitelijním buňkám

Většina studií mapujících vývoj různých druhů leishmanií v nepřirozených vektorech nepotvrdila inhibici růstu a přežívání parazitů v raných fázích infekcí. Ke ztrátě infekce docházelo později a tato ztráta byla spojena s exkrecí nestrávených zbytků krve. Studie byly prováděny především s vektorem *P. papatasi* (*L. donovani* - Heyneman (1963) a Pimenta a kol. (1994), *L. tropica* - Kamhawi a kol. (2000a), Killick-Kendrick (1985), a Pimenta a kol. (1994) a *L. panamensis* - Walters a kol. (1992).

Killick-Kendrick a kol. (1974) jako první pozoroval v elektronovém mikroskopu ukotvení promastigotů *L. amazonensis* k epitelijní výstelce střeva *Lu. longipalpis* – leishmanie vkládaly bičiky mezi mikrovili. Takovéto přichycení promastigotů bylo pozorováno na mnoha modelech *Leishmania* - *Phlebotomus* (Kaddu a M, 1981, Lawyer a kol., 1990, Molyneux a Killick-Kendrick, 1987, Walters a kol., 1987, 1989b, Warburg a kol., 1986). Tato vazba ochraňuje parazity před peristaltickými pohyby střeva. Hlavní role v této vazbě bývá připisována LPG. Několik studií potvrzuje tuto funkci LPG - in vitro pozorována vazba promastigotů *L. major* ke střevu *P. papatasi* byla inhibována použitím LPG (Pimenta a kol., 1992), LPG zprostředkovaná vazba *L. donovani* ke střevu *P. argentipes* nebo *L. tropica* ke střevu *P. sergenti* (Sacks a kol., 1995, Kamhawi a kol., 2000a). V experimentech in vivo bylo prokázáno, že schopnost parazitů persistovat ve střevě po defekaci byla kompletně ztracena při infekcích LPG deficientními mutanty (Sacks a kol. 2000).

Některé druhy flebotomů jsou náchylné pouze na jeden druh leishmanie, v některých se naopak mohou vyvinout infekce několika druhů. *Phlebotomus papatasi* je náchylný pouze na *L. major*, což prokázaly pokusy např. Pimenty a kol. (1994.), kteří inkubovali promastigoty *L. major*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. amazonensis* se střevem *P. papatasi* – pouze promastigoti *L. major* zůstali přichyceni po oplachu střeva. Stejně tak *P. sergenti* vykazoval vazbu pouze k promastigotům *L. tropica* (Kamhawi a kol., 2000a). Naproti tomu, střeva jak druhu *P. argentipes*, tak *Lu. longipalpis* vázala promastigoty většiny testovaných druhů leishmanií. Tato zjištění korelují s tvrzením, že *P. argentipes* a *Lu. longipalpis* narozdíl od *P. papatasi* a *P. sergenti*, jsou permissivní pro infekce mnoha druhů leishmanií (Molyneux a Killick-Kendrick, 1987, Pimenta a kol., 1994, Walters a kol., 1989a, 1993b).

Mezidruhově i vnitrodruhově specifický polymorfismus fosfoglykanových domén LPG by mohl naznačovat, že druhově i kmenově omezená vazba leishmanií ke střevním buňkám predeterminuje druhově a kmenově specifickou kompetenci jednotlivých druhů flebotomů k jednotlivým druhům leishmanií. Na základě laboratorních experimentů lze vyslovit dva základní názory. Přirozený vektor těch druhů leishmanií, které mají velmi větvené, druhově omezené LPG struktury, se vyznačuje velmi specifickou kompetencí; a přirozený vektor těch druhů leishmanií, které mají nesubstituovaný (nebo velmi málo) LPG, je naopak velmi permissivní pro více druhů leishmanií (review Sacks a Kamhawi, 2001).

Do současnosti není zcela známo, jaké molekuly ve střevech flebotomů se účastní vazby k parazitárnímu LPG. Recentně byly popsány galektiny ve střevech *P. papatasi*, u kterých bylo potvrzeno, že jsou specifickými receptory pro *L. major* LPG (Kamhawi a kol., 2004). Bylo též potvrzeno, že exprese PpGalec (specifického receptoru procyklického LPG *L. major*) je omezena

pouze na dva druhy flebotomů – *P. papatasi* a *P. duboscqi* – přirozené vektory *L. major* (Kamhawi a kol., 2004).

3.4.5. Anteriorní migrace leishmanií ve střevě flebotomů

Po opuštění endoperitrofického prostoru a po přežití defekace leishmanie migrují do přední části trávicího traktu. Tato migrace promastigotů do thorakálního střeva a do oblasti stomodeální valvy je obecně připisována pohybu leishmanií podle koncentračního gradientu cukrů – cukry se postupně rozlévají z oblasti cropu do anteriorní části střeva. Tento chemotaktický pohyb promastigotů v přítomnosti cukrů byl prokázán in vitro (Bray, 1983, Oliveira a kol. 2000), naproti tomu však anteriorní migrace byla pozorována též v případech, kdy flebotomové neměli k cukerné potravě přístup (Warburg a Schlein, 1986). Co indikuje anteriorní migraci leishmanií tedy stále není zcela známo.

3.4.6. Metacyklogeneze

Ve finální fázi životního cyklu leishmanií ve flebotomech dochází k procesu zvanému metacyklogeneze – k diferenciaci procyklických promastigotů v metacyklické. Co přesně indikuje tento proces zůstává stále neobjasněno – jde zřejmě o celou řadu faktorů, jak endogenních, tak exogenních. Je známo, že promastigoti acidifikují medium, ve kterém jsou pěstováni, a že při nízkém pH v kultuře dochází k nárůstu počtu metacyklů (Bates a Tetley, 1993, Zakai a kol., 1998). Pokud vezmeme v úvahu tento fakt, pak by se určitá úloha v iniciaci metacyklogeneze mohla připisovat i kyselému fPPG, který je jednou z hlavních molekul gelu sekretovaného promastigoty (Stierhof a kol., 1999, Ilg a kol., 1996, Rogers a kol., 2002). Dále pak bylo prokázáno, že metacyklogeneze je indikována též anaerobiózními podmínkami in vitro (Mendez a kol., 1999) a gelovitá struktura promastigoty sekretovaného gelu (PSG) (Rogers a kol., 2002) společně s vysokou hustotou parazitů by mohla zapříčinit lokální nedostatek kyslíku v anteriorní oblasti střeva. Dalším možným faktorem, který by mohl ovlivňovat genezi metacyklů, jsou sliny flebotomů. Bylo prokázáno, že množení *L. amazonensis* bylo zastaveno přidáním homogenátu slinných žláz *Lu. longipalpis* (Charlab a kol., 1995). Též se zdá, že hemin (produkt trávení krve) naopak inhibuje vliv slin tím, že udržuje promastigoty neustále se dělicí (Charlab a kol., 1995). Z toho vyplývá, že účinek slin spolu s odstraňováním strávené krve by mohl sloužit jako exogenní faktor pro diferenciaci dělicích se procyklických promastigotů na nedělicí se metacyklické promastigoty.

Při transformaci procyklických promastigotů *L. major* v metacyklické dochází téměř ke zdvojení počtu opakujících se disacharidových jednotek LPG a k jejich zakončení arabinózou, což efektivně maskuje galaktózové struktury sloužící k vazbě *L. major* na střevní epitel flebotomů (McConville a kol., 1992, Sacks a kol., 1990). U *L. tropica* a *L. amazonensis* dochází zřejmě k podobným modifikacím – bylo prokázáno, že monoklonální protilátky, které

rozeznávají procyklický LPG se na metacyklický nejsou schopny navázat (Courret a kol., 1999, Lira a kol., 1998). Výše popsané modifikace LPG dokazují, že během metacyklogeneze dochází ke ztrátě terminálních cukrů, které jsou zapojeny do vazby ke střevním buňkám – metacykliční promastigoté se na střevní stěnu nevážou.

3.4.7. Přenos leishmanií do hostitele

O mechanismu přenosu existuje v současnosti několik teorií, nejstarší z nich předpokládá, že leishmanie jsou do kůže hostitele pouze mechanicky deponovány v sósáku. Sádlová a Volf (1999) naznačili i možnost kontaminativního přenosu: během sání na hostiteli dochází k prediurezi (vylučování moči), která u nakažených flebotomů obsahuje živé leishmanie.

Nejčastěji přijímaná teorie přenosu je však založena na fyziologických změnách, ke kterým dochází ve střevě infikovaných samic flebotomů. Prvním předpokladem pro úspěšný přenos infekce je přítomnost parazitů v anteriorní části mesenteronu. Parazit zde vytváří jakousi zátku, která omezuje sání krve (Beach a kol., 1985, Killick-Kendrick a kol., 1977, Killick-Kendrick a Molyneux, 1981). To, jak se zdá, podporuje regurgitaci infekčních promastigotů z oblasti stomodeální valvy, kteří jsou vypuzováni do hostitele během sání. Jednou ze složek této „zátky“ jsou zcela jistě promastigoti samotní, kteří jsou buď přichyceni ke stomodeální valvě nebo uvězněni za valvou v gelovitém materiálu, který omezuje jejich pohyblivost a způsobuje zduření valvy (Lawyer a kol., 1990, Warburg a kol., 1986, Warburg a Schlein, 1986). Stierhof a kol. (1999) pomocí imunologického značení a elektronové mikroskopie na dvou modelech *Leishmania - Phlebotomus* prokázali, že gelovitá hmota, která je vytvářena v oblasti stomodeální valvy, je morfologicky a imunologicky identická s filamentárním PPG, který parazité produkují in vitro.

Těž byla pozorována destrukce výstelky stomodeální valvy, zřejmě působením parazitické chitinázy. To způsobí permanentní otevření stomodeální valvy a tím následnou regurgitaci a vyplavení metacyklických promastigotů ze sající samice do hostitele (Schlein a kol., 1992). Zabránění příjmu cukerné složky potravy nhibuje přenos infekce, zřejmě proto, že produkce parazitické chitinázy je blokována hemoglobinem (Schlein a Jacobson, 1994).

3.4.8. Iniciace infekce v hostitelské tkáni

Interakce mezi vektorem a přenosem infekce nekončí pouhou inokulací leishmanií do hostitelské tkáně. Infikované samice spolu s parazity inokulují též malé množství slin, které též ovlivňují výsledek infekce. Flebotomové patří mezi thelmofágy, což znamená, že sají krev z ranky, kterou vytvoří, nikoli přímo z krevních kapilár, a do této vypouští malé množství slin (review Ribeiro, 1987 a Ribeiro, 1995). Proteiny slin indukují vasodilataci a zabraňují koagulaci krve, dále mají vlastnosti imunosupresivní a imunogenní, které modifikují imunitní reakci hostitele.

Experimentální injekce parazitů společně s homogenátem slinných žláz způsobuje podstatné zvětšení lézí ve srovnání s injekcí samotných parazitů (Belkaid a kol., 1998, Donnelly a kol., 1998, Mbow a kol., 1998, Lima a Titus, 1996, Samuelson a kol., 1991, Theodos a kol., 1991, Titus a Ribeiro, 1988). Imunomodulační aktivity slin mohou způsobovat inhibici některých funkcí makrofágů, jako je prezentace antigenů, IFN- γ indukovaná genová exprese iNOS a produkce NO, indukce proliferace T-buněk (Hall a Titus, 1995, Katz a kol., 2000, Theodos a Titus, 1993).

Maxadilan, který byl prokázán ve slinách *Lu. longipalpis* (Lerner a kol., 1991), je též znám svými imunomodulačními účinky. Inhibuje T aktivaci, TNF α a indukuje tvorbu IL-6, IL10 a prostaglandinů E2 v makrofázích (Bozza a kol., 1998, Lanzaro a kol., 1999, Soares a kol., 1998). Namísto maxadilanu *P. papatasi* disponuje farmakologicky významnou hladinou vasodilatačního adenosinu a 5'AMP (Ribeiro a kol., 1999). Adenosin je molekula s protizánětlivými účinky, u které bylo prokázáno, že inhibuje produkci IFN- γ , IL12, TNF α a NO a zvyšuje produkci IL10 (Hasko a kol., 1996).

Dalšími molekulami slin flebotomů, o kterých je známo, že mají imunomodulační účinky, jsou hyaluronidáza a adenosindeamináza. Hyaluronidáza byla nejprve identifikována druhů u *L. longipalpis* a *P. papatasi* (Charlab a kol. 1999, Ribeiro a kol. 2000). Později bylo potvrzeno, že se vyskytuje ve slinných žlázách nejméně šesti druhů flebotomů – s určitými rozdíly ve struktuře a vlastnostech (Černá a kol., 2002). Hyaluronanové fragmenty vzniklé štěpením extracelulární matrix omezují produkci IFN- γ a indukují expresi genů pro chemokiny a iNOS v makrofázích (Horton a kol., 1998, McKee a kol., 1997). Adenosindeamináza, identifikována v *L. longipalpis*, (nikoli však v *P. papatasi*), zabraňuje apoptóze T buněk zapříčiněné akumulací adenosinu (Charlab a kol., 2000). Inosin, vedlejší produkt degradace adenosinu adenosindeaminázou, inhibuje produkci zánětlivých cytokinů – IL12 a IFN- γ (Hasko a kol., 2000). Tyto studie ukazují, že různé molekuly slin flebotomů mají imunomodulační efekt na hostitele.

Sliny obsahují též imunogenní molekuly, které vyvolávají protilátkovou i buněčnou odpověď hostitele. Přenos leishmanií do hostitele, který byl předtím účinkům slin vystaven (např. opakovaným bodnutím neinfekčními samicemi), vyvolává imunitní odpověď v místě vpichu. Tato imunitní odpověď pak ovlivňuje celkový vývoj infekce (Belkaid a kol., 1998, Kamhawi a kol., 2000b). Ochrana proti leishmaniové infekci u hostitelů preexponovaných poštipání flebotomy by mohla vysvětlit fakt, že v endemických oblastech kožní leishmaniózy je domorodé obyvatelstvo podstatně odolnější vůči infekci než nově příchozí. Valenzuela a kol. (2001) potvrdili, že lze vyvolat protektivní imunitu vakcinací hostitelů rekombinantními proteiny ze slin flebotomů. Antigeny ze slin se tak stávají potencionálními kandidáty na vakcínu blokujiící přenos leishmanií.

4. Výsledky

- 4.1. **Sadlova, J., Hajmova, M., Volf, P.** 2002. *Phlebotomus halepensis*: susceptibility to *Leishmania major* and *L. tropica* infections and host feeding preferences. *Med. Vet. Entomol.*: 17: 244-250.
- 4.2. **Hajmová, M., Chang, K.P., Kolli, B., Volf, P.** 2004. Down regulation of gp63 in *Leishmania amazonensis* reduces its early development in *Lutzomyia longipalpis*. *Microbes and Infection* 6: 646-649.
- 4.3. **Volf, P., Hajmová, M., Sádlová, J., Votýpka, J.** 2004. Blocked and damaged stomodeal valve of the vector: similar mechanism in two Trypanosomatid – Diptera (Nematocera) models. *Int. J. Parasitol.* 34: 1221-1227.

- 4.1. Sadlova, J., Hajmova, M., Volf, P. 2002. *Phlebotomus halepensis*: susceptibility to *Leishmania major* and *L. tropica* infections and host feeding preferences. Med. Vet. Entomol.: 17: 244-250.

Phlebotomus (*Adlerius*) *halepensis* vector competence for *Leishmania major* and *Le. tropica*

J. SÁDLOVÁ, M. HAJMOVÁ and P. VOLF

Department of Parasitology, Charles University, Prague, Czech Republic

Abstract. In Eurasia, phlebotomine sandflies of the subgenus *Adlerius* (Diptera: Psychodidae) comprise about 20 known species. Some are suspected vectors of visceral leishmaniasis (VL) and at least one species has been implicated as a vector of cutaneous leishmaniasis (CL). We tested *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* Theodor (Jordan strain) for CL vector competence, compared with three standard vectors: *Phlebotomus (Phlebotomus) duboscqi* N-L. from Senegal, *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* Parrot from Turkey and the Neotropical *Lutzomyia longipalpis* (L. & N) (Jacobina strain). Sandfly females were membrane-fed on amastigote suspensions of *Leishmania major* Y. & S. and *Le. tropica* (Wright) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and examined for parasite development 3, 6 and 10 days post-infection.

Phlebotomus halepensis showed high susceptibility to both leishmaniasis, supporting typical suprapylarian parasite development similar to the other vectors. *Phlebotomus halepensis* infection rates were ~90% for *Le. major* and ~80% for *Le. tropica*, with high parasite densities. Development of infections was relatively fast, colonizing the thoracic midgut by 6 days post-bloodmeal in every case and reaching the stomodeal valve in >80% of flies. In late-stage infections, 10 days post-bloodmeal, nearly all *P. halepensis* females had cardia and stomodeal valve filled with very high numbers of parasites and some *Le. tropica*-infected females had promastigotes in the pharynx and proboscis.

Host choice experiments in the laboratory showed that *P. halepensis* females fed readily on rat or rabbit and preferred the human forearm. In view of its vector competence and partial anthropophily, we infer that *P. halepensis* is a potential vector of cutaneous as well as visceral leishmaniasis.

Key words. *Adlerius*, *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Lutzomyia longipalpis*, *Phlebotomus duboscqi*, *Phlebotomus halepensis*, *Phlebotomus sergenti*, host preference, sandfly, vector competence.

Introduction

Phlebotomine sandflies of the subgenus *Adlerius* apparently transmit *Leishmania* parasites in various Eurasian countries, but the species involved have seldom been identified because, despite the taxonomic efforts of Artemiev (1980) and others, about 20 *Adlerius* species are generally

recognized on the basis of male morphology. Laboratory colonies of *Adlerius* are seldom available for experimental studies of their female vector competence and bio-systematics.

Among suspected vectors of visceral leishmaniasis (VL), *Phlebotomus (Adlerius) turanicus* Artemiev is regarded as the vector of *Leishmania infantum* Nicolle in Turkmenistan (Lesnikova & Sabitov, 1995), whereas *P. (A.) chinensis* Newstead apparently transmits this parasite in China (Killick-Kendrick, 1999). Parasites of the *Le. donovani* (Laveran & Mesnil) complex developed well in *P. chinensis* and were transmitted to Chinese hamsters by bites of females

Correspondence: Dr Petr Volf, Department of Parasitology, Faculty of Sciences, Charles University, Vinicna 7, 128 44 Prague 2, Czech Republic. E-mail: volf@cesnet.cz

experimentally infected from dogs (Feng & Chung, 1941) as well as naturally infected females of *P. chinensis* (Chung *et al.*, 1951). Similarly, Strelkova & Dergacheva (1986) succeeded with experimental transmission of *Le. infantum* by bites of *P. (A.) longiductus* Parrot and concluded that this species is a vector of VL in Kazakhstan, as indicated by field observations (Dergacheva *et al.*, 1981; Dergacheva & Strelkova, 1985). Experimentally, *P. simici* Nitzulescu was infected with Indian *Le. donovani* (Adler & Theodor, 1957) and *Leishmania* DNA was amplified from this species in a VL focus near Greece (Aransay *et al.*, 2000). According to Lewis & Ward (1987), *P. simici* 'evidently transmits *Le. infantum* in eastern Mediterranean' and at least two more *Adlerius* species are suspected vectors of *Le. infantum*: *P. brevis* in Kazakhstan and *P. kyreniae* in Cyprus.

Regarding the vector role of *Adlerius* for cutaneous leishmaniasis (CL), Jacobson *et al.* (2003) isolated two genotypes of *Le. tropica* from *P. (A.) arabicus* Theodor in northern Israel where 5.2% (5/97) of these sandflies were infected with *Le. tropica* identical to those in humans and hyraxes nearby. To assess the CL vector competence of another *Adlerius* species, we used *P. halepensis* for infection experiments with *Le. major* and *Le. tropica*, the two most important parasites causing CL in the Old World. Criteria for implication of leishmaniasis vector status include demonstration that the suspected sandfly species is anthropophilic and commonly feeds on the reservoir hosts (Killick-Kendrick, 1990). Females of our *P. halepensis* colony readily bite humans or rabbits but blood-feed less avidly on golden hamsters and mice. To assess the relative anthropophily of *P. halepensis*, we compared their propensity to feed on different hosts under laboratory conditions.

Phlebotomus halepensis has widespread occurrence from Turkey to Israel and Jordan, across Transcaucasia (Azerbaijan, Armenia, Georgia) to Iran and southern Turkmenistan. Theodor (1958) first described *P. halepensis* as a subspecies of *P. chinensis* and it was elevated to species rank by Artemiev (1980). The vector status of *P. halepensis* remains unclear. Its distribution coincides with both visceral (*Le. infantum*) and cutaneous (*Le. major*, *Le. tropica*) leishmaniasis. Lewis & Ward (1987) suggested that *P. halepensis* probably transmits visceral leishmaniasis in southern states of the former USSR, whereas Killick-Kendrick (1990) accepted the interpretation by Russian investigators (*vide supra*) that *P. longiductus* is the vector involved in Kazakhstan. However, in the former Nakhichevan ASSR (transcaucasian part of southern Azerbaijan, near the Iran border), *P. halepensis* is one of the predominant sandfly species in the VL focus at Ordubad (38°54' N, 46°02' E), so there it is a suspected vector of *Le. infantum* (Tagi-zade *et al.*, 1989).

Methods

Sandflies

The *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* colony, established from flies collected in Jordan, was obtained from Professor

R. Killick-Kendrick (Imperial College at Silwood Park, Ascot, U.K). Standard colonies of *Lutzomyia longipalpis* (from Jacobina, Brazil), *Phlebotomus (Phlebotomus) duboscqi* (Senegal origin) and *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* (Turkish origin) were used for comparison.

Sandfly larvae were fed on composted and powdered mixture of rabbit faeces and rabbit food pellets with addition of dried *Daphnia* powder. Adults were maintained at >70% relative humidity (RH) and 25–26°C in 14:10 h light:dark photoperiod. Both sexes had access to dietary choice of 50% sucrose and 50% honey plus small slices of apple. Once or twice a week, females were allowed to feed on hamster, rabbit or human volunteer.

Leishmania infection of sandflies and rodents

The parasite strains *Leishmania major* LV561 (MHOM/IL/67/LRC-L137 Jericho II) and *Le. tropica* (MHOM/TR/99/Vedha) were maintained alternatively in SNB-9 blood agar and BALB/c mice (*Le. major*) or hamster (*Le. tropica*). Animals were inoculated after two *in vitro* passages with 10⁷ promastigotes into the footpad. The lesions were dissected and homogenized in Schneider's *Drosophila* medium with gentamycin.

Sandfly females were infected by feeding through a chick-skin membrane on suspension of amastigotes mixed 1:1 with rabbit blood (final concentration 10⁶ amastigotes/ml). After batches of each sandfly species had fed in parallel on the same infective blood-source, engorged females were separated, maintained in the same conditions as the colonies and dissected 3, 6 or 10 days after the infective feed. The location of any infections with *Leishmania* in the sandfly (proboscis, pharynx, stomodeal valve, thoracic or abdominal midgut, within peritrophic sac or in the ectoperitrophic space) was determined by dissection and examination under a light microscope. The infection intensity was estimated, as described previously (Ciháková & Volf, 1997), by scoring the proportions of sandflies with light (<100 parasites/gut), moderate (100–500 parasites/gut), heavy (500–1000 parasites/gut) or very heavy (>1000 parasites/gut) infections in the gut lumen. To test whether female sandflies infected with *Le. major* could transmit the parasite, they were allowed to feed on anaesthetized hamsters 6–15 days post-infection. Females were dissected immediately after feeding and the gut checked for presence of remaining parasites. Hamsters were examined for leishmanial lesions weekly for up to 6 months. When no lesions appeared, attempts were made to isolate parasites from the skin of the site bitten and by draining lymphatic nodes, spleen and liver.

Sandfly host preference

A row of three connected cages (each 40 cm cubic) was employed to investigate sandfly host preference, starting with 250 females of *P. halepensis* placed into the central cage and left for habituation for 1 h. Assessment of host

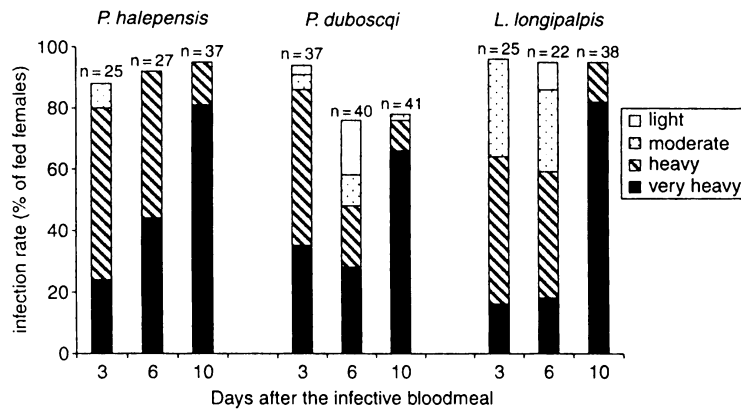


Fig. 1. *Leishmania major* infection rates in *Phlebotomus halepensis*, *P. duboscqi* and *Lutzomyia longipalpis* examined 3–10 days after the infective bloodmeal. Intensity of infection categorized as: light, <100; moderate, 100–500; heavy, 500–1000; very heavy, >1000 parasites/sandfly gut.

preference involved pair-wise comparisons between three types of host: anaesthetized rat (*Rattus rattus*), ears of a restrained rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) or the forearm of a human volunteer. Examples of two host types (rat vs. rabbit, rat vs. human, rabbit vs. human) were placed in each of the lateral cages and partitions with the central cage were opened. After 40 min, the cages were separated and closed, host animals removed and the numbers of blood-fed sandflies in each host cage were counted. Each pair of different hosts was tested twice, with the hosts alternated between lateral cages. Experiments were conducted in darkness at 59–61% RH and 26–27°C. Mortality of fed female sandflies was recorded for 7 days post-feeding, then they were allowed to oviposit in a breeding pot and the number of laid eggs was recorded.

Statistical analysis

Leishmania infection rates in the different vector species were compared first by log-linear analysis, then non-parametric Kruskal–Wallis tests compared the rates for each experimental day. In the host preference experiment, differences between (i) the numbers of females fed on each host, (ii) their mortality rates and (iii) the numbers of eggs laid eggs were compared by Pearson chi-square test. All statistical treatments were performed using the programme Statgraphics version 5.0 (Manugistics Inc., Rockville, MD, U.S.A.: www.statgraphics.com).

Results

Sandfly infection with *Leishmania major*

Rates of sandfly infection with *Le. major* differed between vector species ($\chi^2 = 29.25$, d.f. = 8, $P = 0.0003$)

and depended on the development period before examination ($\chi^2 = 89.47$, d.f. = 8, $P < 0.0001$). When flies were dissected and examined 3 days after the infective feed, midgut infection rates were high (~90%) with a majority of heavy or very heavy infections (Fig. 1): differences between the three species tested were insignificant ($H = 4.4528$, $P = 0.1079$). By this time, parasites started escaping from the peritrophic sac into the ectoperitrophic space of the abdominal midgut and even the thoracic midgut of some females (Table 1); escape from the peritrophic sac was slowest in *P. duboscqi*. In *P. halepensis* long nectomonads (free-swimming forms) predominated and the presence of parasites in the residual bloodmeal within the peritrophic sac was sporadic.

On days 6–10 post-infection, infection rates were high (>90%) in *P. halepensis* and *Lu. longipalpis* but slightly lower in *P. duboscqi* (75–78%). In all three species, the bloodmeal was digested and the remnants defaecated by day 6 and the parasites had migrated anteriorly to colonize the thoracic midgut or even the stomodeal valve (Table 1). In *P. halepensis* all infections were heavy or very heavy, whereas significantly weaker infections occurred in both *Lu. longipalpis* and *P. duboscqi* ($H = 9.7550$, $P = 0.0076$). By day 6, among the positive females, the stomodeal valve was colonized in 88% of *P. halepensis* and 67% of *P. duboscqi* but only 28% of *Lu. longipalpis*, with the majority of infected *Lu. longipalpis* harbouring the parasites in the abdominal (72%) and/or thoracic (48%) midgut (Table 1).

By day 10, heavy infections predominated (Fig. 1), with no significant difference between the three species tested ($H = 4.6030$, $P = 0.1001$) with respect to infection rate and location: colonization of the thoracic midgut and stomodeal valve occurred in most females (Table 1). In addition, pharyngeal infections were observed in *P. duboscqi* and *Lu. longipalpis* (one female of each) and two promastigotes were observed in the proboscis of another *Lu. longipalpis* female.

Table 1. Location of *Leishmania major* in guts of three species of sandfly examined 3–10 days after the infective bloodmeal. PS, peritrophic sac; AMG, abdominal midgut; TMG, thoracic midgut; SV, stomodeal valve; PHAR, pharynx; PROB, proboscis.

| Species | Days post-infection | No. (%) infected/dissected | Percentage of positive flies with infection reaching: | | | | | |
|------------------------|---------------------|----------------------------|---|-----|-----|----|------|------|
| | | | PS | AMG | TMG | SV | PHAR | PROB |
| <i>P. halepensis</i> | 3 | 22/25 (88) | 18 | 68 | 14 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 25/27 (93) | 0 | 0 | 12 | 88 | 0 | 0 |
| | 10 | 35/37 (95) | 0 | 0 | 3 | 97 | 0 | 0 |
| <i>P. duboscqi</i> | 3 | 35/37 (95) | 63 | 28 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 30/40 (75) | 0 | 0 | 33 | 67 | 0 | 0 |
| | 10 | 32/41 (78) | 0 | 0 | 3 | 94 | 3 | 0 |
| <i>Lu. longipalpis</i> | 3 | 24/25 (96) | 42 | 37 | 21 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 21/22 (96) | 0 | 24 | 48 | 28 | 0 | 0 |
| | 10 | 36/38 (95) | 0 | 0 | 14 | 80 | 3 | 3 |

In transmission attempts, nine golden hamsters were bitten by a total of 137 females of three sandfly species with late-stage infections of *Le. major*, comprising 13 *P. halepensis* in five hamsters (1–5/hamster), 28 *P. duboscqi* (3 and 25/hamster) and 96 *Lu. longipalpis* (19 and 77/hamster). Although a small pit developed temporarily at sites bitten by *P. halepensis* on two hamsters and slight transient edema of the footpad occurred in three other animals, all cultivation attempts were negative.

Sandfly infection with *Leishmania tropica*

In *P. halepensis* the infection rate of *Le. tropica* was 75–76% during the whole period of observation (days 3–10 after the infective feed), not significantly different from infection rates of 72–86% in *P. sergenti* (Table 2). Slight contrasts between the intensity of infection (Fig. 2) were not significantly different between *P. halepensis* and *P. sergenti*. However, a pronounced contrast was observed between vector species with respect to the timing of promastigotes escaping from the peritrophic sac into the ectoperitrophic space (Table 2). This process occurred sooner in *P. halepensis*: on day 3 only 47% of infections remained within the peritrophic sac, vs. 70% in *P. sergenti*. By day 6, all infections had reached the anterior midgut (SV + TMG in Table 2) and had reached the stomodeal valve in 83% of *P. halepensis* and 75% of *P. sergenti*. By day 10, massive infections of the stomodeal valve predominated in both sandfly species, the foregut (mainly pharynx)

was colonized in some females (15% and 18% of the positive *P. halepensis* and *P. sergenti*, respectively) and free-swimming promastigotes were observed in the proboscis of one *P. halepensis* and two *P. sergenti* females.

Host feeding experiment

In the reciprocal host choice experiments, without compensating for differential host size, *P. halepensis* females clearly preferred man over rabbit: 81 vs. 21 females ($\chi^2 = 35.294$, $P < 0.0001$) and, to a lesser degree, man over rat: 50 vs. 31 females ($\chi^2 = 4.457$, $P = 0.035$). Rabbit was also preferred over rat: 61 vs. 18 females ($\chi^2 = 23.4051$, $P < 0.0001$).

The host type had no significant effect on mortality rates of blood-fed females ($\chi^2 = 1.199$, d.f. = 2, $P = 0.55$): the numbers of females that survived until oviposition were 42 (32%), 21 (26%) and 13 (27%) of those which fed on man, rabbit or rat, respectively. Similarly, their fecundity was not significantly affected by host type: the mean numbers of eggs laid/female were 18.6, 10.3 and 14.1 from those blood-fed on man, rabbit or rat, respectively.

Discussion

The development of *Le. major* and *Le. tropica* in *P. halepensis* was typically suprapylarian and generally consistent with the infection pattern described for proven vectors of these

Table 2. Location of *Leishmania tropica* in guts of two species of sandfly examined 3–10 days after the infective bloodmeal. PS, peritrophic sac; AMG, abdominal midgut; TMG, thoracic midgut; SV, stomodeal valve; PHAR, pharynx; PROB, proboscis.

| Sandfly | Days post-infection | No. (%) infected/dissected | Percentage of positive females with infection reaching: | | | | | |
|----------------------|---------------------|----------------------------|---|-----|-----|----|------|------|
| | | | PS | AMG | TMG | SV | PHAR | PROB |
| <i>P. halepensis</i> | 3 | 19/25 (76) | 47 | 37 | 16 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 12/16 (75) | 0 | 0 | 17 | 83 | 0 | 0 |
| | 10 | 21/28 (75) | 0 | 0 | 5 | 80 | 10 | 5 |
| <i>P. sergenti</i> | 3 | 23/29 (79) | 70 | 13 | 17 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 12/14 (86) | 0 | 0 | 25 | 75 | 0 | 0 |
| | 10 | 23/32 (72) | 0 | 0 | 0 | 82 | 9 | 9 |

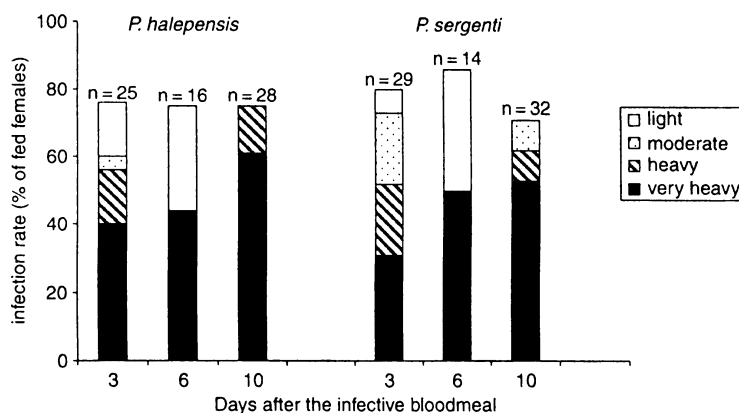


Fig. 2. *Leishmania tropica* infection rates in *Phlebotomus halepensis* and *P. sergenti* females examined 3–10 days after the infective bloodmeal. Intensity of infection categorized as: light, <100; moderate, 100–500; heavy, 500–1000; very heavy, >1000 parasites/sandfly gut.

two CL parasites (Shatova *et al.*, 1984; Warburg *et al.*, 1986; Lawyer *et al.*, 1990; Killick-Kendrick *et al.*, 1995; Ciháková & Volf, 1997). After breakdown of the peritrophic matrix, promastigotes escaped into the ectoperitrophic space of the abdominal midgut, attached to microvilli and migrated anteriorly to the thoracic midgut. Development of midgut infections was fast and the parasites attained high population intensity. Six days after the infective bloodmeal, all *Le. major* and *Le. tropica* infections colonized the thoracic midgut and more than 80% of them reached the stomodeal valve. In late-stage infections, 10-days post-bloodmeal, nearly all *P. halepensis* females had the midgut cardia and stomodeal valve filled with very high numbers of parasites. In 15% of infected *P. halepensis* females, promastigotes of *Le. tropica* were found in the pharynx (3/21) and the proboscis of one.

These findings show that, under laboratory conditions, the Jordan strain of *P. halepensis* was highly susceptible to both *Le. major* and *Le. tropica*, supporting multiplication and development of both parasite species as in their natural vectors *P. duboscqi* and *P. sergenti*, respectively. In some ways, the development of infection in *P. halepensis* was even faster than in proven vectors. For example, 3 days after infective feeding, the proportion of *Le. major* infections that colonized the ectoperitrophic space was 82% for *P. halepensis* but only 37% for *P. duboscqi*. Likewise for *Le. tropica* infections, the proportion was 53% of *P. halepensis* but only 30% of *P. sergenti*. Similar development of *Le. major* in Neotropical *Lu. longipalpis* has only theoretical significance, since this parasite/vector combination does not occur together naturally, and confirms previous observations by other workers (Molyneux *et al.*, 1975; Walters *et al.*, 1993) that *Lu. longipalpis* is susceptible to various alien *Leishmania* species including *Le. major*.

The evolutionary fit between sandfly vectors and some Old World leishmaniases is remarkably close. All proven vectors of *Le. major* (*P. duboscqi*, *P. papatasi*, *P. salehi*) are closely related members of subgenus *Phlebotomus sensu*

stricto (Killick-Kendrick, 1999). Experimental infections have shown that the midgut of *P. papatasi* is an unfavourable medium for *Leishmania* species other than *Le. major* (Shatova *et al.*, 1984; Killick-Kendrick *et al.*, 1994; Pimenta *et al.*, 1994). Similarly, *Le. tropica* shows high specificity for *P. sergenti*, unlike *Le. major* and *Le. donovani* (Killick-Kendrick *et al.*, 1994, 1995; Kamhawi *et al.*, 2000). Failure of parasite development in *P. papatasi* and *P. sergenti* coincides with defecation of the bloodmeal remnants, being correlated with the ability of promastigotes to attach to the sandfly midgut by this time (Sacks, 2001). The attachment is controlled by polymorphic, specific structures on the parasite lipophosphoglycan (LPG) as shown by binding of purified LPG to midguts *in vitro* and by LPG inhibition of the binding of promastigotes *in vitro* (Pimenta *et al.*, 1994; Kamhawi *et al.*, 2000) and by failure of LPG-deficient mutants to persist in the sandfly after bloodmeal excretion *in vivo* (Sacks *et al.*, 2000). Strong vector competence of *P. papatasi* and *P. sergenti* is attributed to selection for the unique, highly substituted LPG of both *Le. major* and *Le. tropica*, which can bind to specific midgut receptors of these sandflies (Sacks, 2001).

By contrast to *P. papatasi* and *P. sergenti* as highly specific vectors of particular leishmanias, some other species of sandflies are capable of supporting a broad range of *Leishmania* species. For example *Lu. longipalpis*, the natural vector of neotropical *Le. chagasi*, is permissive to complete development of *Le. amazonensis*, *Le. major* and *Le. mexicana* (Molyneux *et al.*, 1975; Walters *et al.*, 1993; Ismael *et al.*, 1998). Low vectorial specificity was also demonstrated for another VL vector: *P. (Euphlebotomus) argentipes*, the proven vector of *Le. donovani* in India, is permissive to *Le. amazonensis*, *Le. major* and *Le. tropica* (Pimenta *et al.*, 1994; Kamhawi *et al.*, 2000). Similarly *P. (Adlerius) halepensis*, a suspected vector of *Le. infantum*, showed low vectorial specificity in our experiments. Mechanisms underlying this broad susceptibility of some sandfly species are currently under investigation.

This work demonstrates the feasibility of *P. halepensis* being a CL vector, but this species of *Adlerius* has not yet been proved to transmit *Le. major* or *Le. tropica* in nature. Even so, the vector status of *Adlerius* has been established for *P. (A.) arabicus* with *Le. tropica* in Israel (Jacobson *et al.*, 2003). According to Killick-Kendrick (1990, 1999), the status of any given sandfly species as a vector of a particular *Leishmania* can be inferred from four criteria, only two of which have so far been fulfilled for *P. halepensis*, namely: the sandfly supports development of the parasite after the infecting bloodmeal has been digested and defecated, also the sandfly will feed on man and animal reservoir host(s). We showed that *P. halepensis* females bite various types of mammalian host opportunistically, going for the larger animal in each bilateral choice test, whereby the human forearm was preferred to rat or rabbit. As with other sandfly species (Harre *et al.*, 2001), survival and fecundity rates of *P. halepensis* were unaffected by the mammalian host type of bloodmeals. Although the natural habitat of *P. halepensis* is among rocks, the adults also enter houses (Artemiev, 1980) and bite humans naturally. Two other criteria that have not yet been satisfied are the isolation of *Leishmania* parasites from wild-caught *P. halepensis* and their transmission by bite.

Adlerius sandflies are widely regarded as the vectors of visceral leishmaniasis (WHO, 1990) and are associated with many foci of *Le. tropica* causing cutaneous leishmaniasis. Our experiments on *P. halepensis* together with the field data on *P. chinensis* in China (Zhang & Leng, 1997) and *P. longiductus* in Central Asia (Dergacheva & Strelkova, 1985) show that these *Adlerius* are quite anthropophilic. Our demonstration of the extremely high susceptibility of *P. halepensis* to experimental infections of *Le. major* and *Le. tropica*, plus the recent finding of *P. arabicus* heavily infected with *Le. tropica* of two genotypes in the field (Jacobson *et al.*, 2003) suggest that *Phlebotomus* (*Adlerius*) species are broadly competent vectors for Old World leishmaniasis across much of Eurasia. Their local roles in *Leishmania* transmission should be clarified and, where possible, counteracted by standard methods of sandfly control (Alexander & Maroli, 2003).

Acknowledgement

We thank Professor R. Killick-Kendrick for providing the *P. halepensis* colony, Dr J. Sádlo and J. Votypka for brave help with sandfly breeding and host-feeding experiments, Dr R. L. Jacobson for fruitful discussions and Dr D. Frynta for advice on statistical analysis. This study was supported (J13/981131-B4 and FRVŠ 96/0272) by the Ministry of Education of the Czech Republic.

References

Adler, S. & Theodor, O. (1957) Transmission of disease agents by phlebotomine sandflies. *Annual Review of Entomology*, **2**, 203–226.

- Alexander, B. & Maroli, M. (2003) Control of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**, 1–18.
- Aransay, A.M., Scoulica, E. & Tselentis, Y. (2000) Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sandflies by semi-nested PCR on minicircle. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 1933–1938.
- Artemiev, M.M. (1980) A revision of sandflies of the genus *Adlerius* (Diptera, Phlebotominae, Phlebotomus). *Zoologicheskii Zhurnal*, **59**, 1177–1192 (in Russian). [English translation ed. by R. Killick-Kendrick, unpublished.]
- Chung, H.L., Feng, L.C. & Feng, S.L. (1951) Observations concerning the successful transmission of kala-azar in North China by the bites of naturally infected *Phlebotomus chinensis*. *Peking Natural History Bulletin*, **19**, 302–326.
- Dergacheva, T.I. & Strelkova, M.V. (1985) Epidemiological role of sandflies *Phlebotomus smirnovi* Perfiliev, 1941 and *P. longiductus* Parrot, 1928 in visceral leishmaniasis foci in the Kazakh SSR. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **79**, 3–36.
- Dergacheva, T.I., Radionova, G.N., Turbaeva, L.I. & Zaiionchovskaya, Y.V. (1981) Some problems of *Phlebotomus longiductus* Par, 1928, ecology in the Dzhambul region of the Kazakh SSR. *Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni*, **6**, 70–75. (in Russian).
- Ciháková, J. & Volf, P. (1997) Development of different *Leishmania major* strains in the vector sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **91**, 267–279.
- Feng, L.C. & Chung, H.L. (1941) Experiments on the transmission of kala-azar from dogs to hamsters by Chinese sandflies. *Chinese Medical Journal*, **60**, 489–496.
- Harre, J.G., Dorsey, K.M., Armstrong, K.L., Burge, J.R. & Kinnamon, K.E. (2001) Comparative fecundity and survival rates of *Phlebotomus papatasi* sandflies membrane fed on blood from eight mammal species. *Medical and Veterinary Entomology*, **15**, 189–196.
- Ismaeel, A.Y., Garmson, J.C., Molyneux, D.H. & Bates, P.A. (1998) Transformation, development, and transmission of axenically cultured amastigotes of *Leishmania mexicana* in vitro and in *Lutzomyia longipalpis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **59**, 421–425.
- Jacobson, R.L., Eisenberger, C.L., Svobodova, M., Baneth, G., Szttern, J., Carvalho, J., Naseredeem, A., El Fari, M., Shalom, U., Volf, P., Votypka, J., Dedet, J.-P., Pratlong, F., Schonian, G., Schnur, L.F., Jaffe, C.L. & Warburg, A. (2003) Outbreak of cutaneous leishmaniasis in Northern Israel. *Journal of Infectious Diseases*, **188**, in press.
- Kamhawi, S., Modi, G.B., Pimenta, P.F.P., Rowton, E. & Sacks, D.L. (2000) The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology*, **121**, 25–33.
- Killick-Kendrick, R. (1990) Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, **4**, 1–24.
- Killick-Kendrick, R. (1999) The biology and control of phlebotomine sandflies. *Clinics in Dermatology*, **17**, 279–289.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M. & Tang, Y. (1994) Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan: the low susceptibility of *Phlebotomus papatasi* to *Leishmania tropica*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **88**, 252–253.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M. & Tang, Y. (1995) Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan:

- the high susceptibility of *Phlebotomus sergenti* to *Leishmania tropica*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **89**, 477.
- Lawyer, P.G., Ngumbi, P.M., Anjili, C.O. *et al.* (1990) Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **43**, 31–43.
- Lesnikova, E.V. & Sabitov, E. (1995) Evidence for the transmission of the causative agent of visceral leishmaniasis by the sandfly *Phlebotomus (Adlerius) turanicus* Artemiev, 1974 in Turkmenistan. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni*, **1995** (3), 24–28 (in Russian).
- Lewis, D.J. & Ward, R.D. (1987) Transmission and vectors. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. I, Biology and Epidemiology (ed. by W. Peters & R. Killick-Kendrick), pp. 235–262. Academic Press, London.
- Molyneux, D.H., Killick-Kendrick, R. & Ashford, R.W. (1975) *Leishmania* in phlebotomid sandflies. III. The ultrastructure of *Leishmania mexicana amazonensis* in the midgut and pharynx of *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the Royal Society London, Series B, Biology Sciences*, **190**, 341–357.
- Pimenta, P.F.P., Saraiva, E.M.B., Rowton, E. *et al.* (1994) Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphism in the surface lipophosphoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **91**, 9155–9159.
- Sacks, D.L. (2001) *Leishmania*–sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cellular Microbiology*, **3**, 1–9.
- Sacks, D.L., Modi, G., Rowton, E., Späth, G., Epstein, L., Turco, S.J. & Beverley, S.M. (2000) The role of phosphoglycans in *Leishmania*–sand fly interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **97**, 406–411.
- Shatova, S.M., Shulga, M.A., Safjanova, V.M. & Avakjan, A.A. (1984) Comparative electron microscope study of *L. major* and *L. tropica* at the experimental infection of the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Parazitologia*, **18**, 154–159. (in Russian).
- Strelkova, M.V. & Dergacheva, T.I. (1986) Experimental evaluation of the ability of different species of sandflies to transmit the agent of visceral leishmaniasis. *Parazitologia*, **20**, 174–180. (in Russian).
- Tagi-zade, T.A., Gasanzade, G.B., Safyanova, V.M. *et al.* (1989) Visceral leishmaniasis in the Orubad district of the Nakhichevan ASSR. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni*, **1989** (3), 22–27. (in Russian).
- Theodor, O. (1958) Psychodidae-Phlebotominae. *Die Fliegen der Palaearktischen Region* (ed. by E. Linder), 9c, pp. 1–55. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart. (in German).
- Walters, L.L., Irons, K.P., Modi, G.B. & Tesh, R.B. (1993) Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, **30**, 699–718.
- Warburg, A., Hamada, G.S., Schlein, Y. & Shire, D. (1986) Scanning electron microscopy of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **72**, 423–431.
- WHO (1990) *Control of the Leishmaniasis*. Technical Report Series, 793, pp 1–158. World Health Organization, Geneva.
- Zhang, L.M. & Leng, Y.J. (1997) Eighty-year research of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in China (1915–95). II. Phlebotomine vectors of leishmaniasis in China. *Parasite*, **4**, 299–306.

Accepted 5 March 2003

- 4.2. Hajmová, M., Chang, K.P., Kolli, B., Volf, P. 2004. Down regulation of gp63 in *Leishmania amazonensis* reduces its early development in *Lutzomyia longipalpis*. *Microbes and Infection* 6: 646-649.



Original article

Down-regulation of gp63 in *Leishmania amazonensis* reduces its early development in *Lutzomyia longipalpis*

Martina Hajmová^a, Kwang-Poo Chang^b, Bala Kolli^b, Petr Volf^{a,*}

^a Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University, Vinicna 7, Prague 2, Czech Republic

^b Department of Microbiology/Immunology, University of Health Sciences/Chicago Medical School, North Chicago, IL, USA

Received 22 October 2003; accepted 9 March 2004

Available online 15 April 2004

Abstract

The zinc protease (gp63) of promastigotes was found to play a role in the sand fly part of the *Leishmania* life cycle. *Lutzomyia longipalpis* females were fed with promastigotes (10⁶ per ml) of a *Leishmania amazonensis* clone whose gp63 was up- and down-regulated by directional cloning into P6.5 for sense- and anti-sense transcription. Early development was found to differ significantly between the sense- and anti-sense transfectants 2 days post-feeding. The sense transfectants overexpressing gp63 were found similar to those with the vector alone: both developed in the gut at high rates of ~90–100% and at a high density with moderate to heavy parasite loads in >70% of the infected females. In contrast, the anti-sense transfectants with gp63 down-regulated developed at a lower rate (~70%) and, significantly, at a very low density, with moderate to heavy parasite loads only in ~30% of the infected females. On day 9 post-feeding, all three groups of transfectants developed at a similar rate of ~50% with comparable parasite loads. Thus, gp63 plays a role at the early stage of *L. amazonensis* establishment in *L. longipalpis*.

© 2004 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: *Leishmania* development; Sand fly; Zinc protease gp63

1. Introduction

The major surface glycoprotein of *Leishmania*, gp63, is especially abundant in the vector stage or promastigotes. It is a zinc protease known as leishmanolysin [1], which has been reported to play multiple roles in *Leishmania* infection of the vertebrate host. The enzyme is responsible for resistance of these parasites to serum complement-mediated cytolysis [2], uptake of promastigotes by macrophages [3], protection from intracellular degradation in the phagolysosome [4], and inhibition of monocyte and neutrophil chemotaxis [5]. It is also involved in pathogenesis via degradation of the extracellular matrix and lesion formation in animals [6]. Especially relevant to this is the released form of gp63 [7,8].

The role of gp63 for *Leishmania* in the vector is less clear. It has been suggested that gp63 may degrade hemoglobin and other proteins in the blood meals, thereby providing nutrients needed for the growth of promastigotes [9]. This and addi-

tional functions may be further suggested by the finding of similar ectoproteases in other trypanosomatids (e.g. [10–12]). In contrast, gp63 is thought to play little or no role for *L. major* in the vectors, since knockout mutants were found to develop and survive as well as the wild type in three Old World *Phlebotomus* species [13,14].

Here, we report that down-regulation of gp63 in a *Leishmania amazonensis* clone adversely affects its development in a neotropical sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. *L. longipalpis* is a natural vector of *L. chagasi* [15] but in laboratory conditions, supports the full growth of *L. amazonensis* as well other *Leishmania* species [16,17]. The results we got in a *L. longipalpis*–*L. amazonensis* model suggest that gp63 is functionally important for promastigotes of this species in the sand flies and that this may vary with the parasite–vector combinations examined.

2. Material and methods

2.1. Parasites

L. amazonensis LV 78 (MPRO/BR/72/M1845) promastigotes of a virulent clone 12-1 were transfectant as follows:

* Corresponding author. Tel.: +420-2-2195-1815;

fax: +420-2-2491-9704.

E-mail address: volf@cesnet.cz (P. Volf).

vector alone (P6.5), P6.5 with gp63 gene in the same orientation with reference to the selectable marker, *nagI* [18] (P6.5/1.9) and P6.5 with this gene in a reverse orientation (P6.5/1.9R) [19]. Transfectants were maintained as promastigotes at 25 °C in medium 199 with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 25 mM HEPES (pH 7.4) under the selective pressure of tunicamycin (10 µg/ml). Western blot analysis, flow cytometry and confocal microscopy of the three transfectants prior to experimentation revealed that gp63 is up- and down-regulated, versus the P6.5 control, in transfectants with P6.5/1.9 and P6.5/1.9R, respectively [19]. Parasites were reisolated on days 2 and 9 post-feeding into medium containing tunicamycin (10 µg/ml) to gauge the plasmids of the transfectants after development in the flies.

2.2. Sand flies

L. longipalpis (Jacobina colony) was maintained at 26 °C under a 14/10 light/dark photoperiodicity. Adults had permanent access to cotton wool soaked with sugar solution. Once a week females were allowed to feed on an anesthetized mouse.

2.3. Sand fly infection

Females, 3–6 days old (kept in 26 °C with access to sugar solution), were fed through a chick skin membrane with 5-day-old promastigotes (late log phase) at a cell density of 10^6 cells per ml in heat-inactivated rabbit blood. Blood-engorged females were separated and maintained on 50% honey solution at 23 °C. They were sacrificed for microscopic examination and enumeration of promastigotes in the midguts on days 2 and 9 after the blood meals. Parasite density was graded according to the criteria reported previously [20], i.e. low parasite loads ≤ 100 parasites per gut; medium parasite loads 100–500 parasites per gut; heavy parasite loads ≥ 500 parasites per gut. This method is only semiquantitative, but for weak infections provides more accurate data than the hemocytometer counting and also incorporates the promastigotes attached to the midgut tissue.

2.4. Statistical analysis

The experiment was repeated five times and data were evaluated statistically using the Statgraphics 4.2 programme. Numbers of sand flies from five experiments were pooled and χ^2 -test was used for comparison of rates and density.

3. Results

Fig. 1 shows that various transfectants were found to differ significantly in the early development in the midgut on day 2 post-feeding. The transfectants with their gp63 down-regulated (P6.5/1.9R) were much lower in number than either the control (P6.5 with the vector alone) or those with

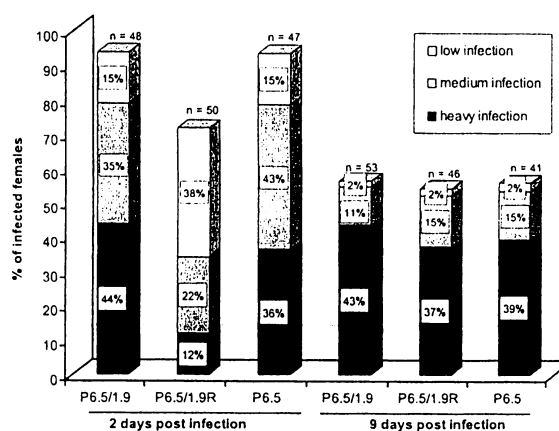


Fig. 1. Rates and density of *L. amazonensis* transfectants in the midgut of *L. longipalpis* days 2 and 9 post blood-feeding. Parasite loads were graded microscopically according to the criteria established previously as: low (white; ≤ 100 parasites per gut), medium (gray; 100–500 parasites per gut) or heavy (black; ≥ 500 parasites per gut). The number at the top of each quadrant means the number of examined flies.

up-regulated gp63 (P6.5/1.9), according to the development rate ($\chi^2 = 13.0$, $P = 0.001$) and parasite loads ($\chi^2 = 31.1$, $P = 0.00002$). The transfectants overexpressing gp63 (P6.5/1.9) behaved similarly to the controls, developed at ~ 90 – 100% of females and a high parasite density ($\sim 80\%$ medium to heavy parasite loads). In contrast, the gp63 down-regulated transfectants (P6.5/1.9R) developed at a lower rate of $\sim 70\%$ and a very low parasite density of only $\sim 30\%$ medium to heavy parasite loads (Fig. 1).

When assessed on day 9, all three groups of transfectants were found similar in their development rate of $\sim 50\%$ ($\chi^2 = 0.1$, $P = 0.97$) and parasite loads ($\chi^2 = 0.7$, $P = 0.99$) (Fig. 1). In all cases, heavy parasite loads of the midgut were observed with colonization of the stomodeal valve. From days 2 to 9, the rates of parasite development declined in all groups. This is statistically significant for gp63 up-regulated transfectants P6.5/1.9 ($\chi^2 = 18.2$, $P = 0.00002$) and the control with P6.5 alone ($\chi^2 = 17.0$, $P = 0.00004$), but not for gp63 down-regulated transfectants P6.5/1.9R ($\chi^2 = 3.2$, $P = 0.07$). Parasite density was significantly different between days 2 and 9 for all three groups of transfectants (P6.5/1.9, $\chi^2 = 25.0$, $P = 0.00001$; P6.5, $\chi^2 = 22.5$, $P = 0.00005$; P6.5/1.9R, $\chi^2 = 23.6$, $P = 0.00003$). The mortality of sand fly females was similar in all groups (about 20%).

Parasites from flies 2 and 9 days post-feeding all grew up equally well as the original transfectants in media with tunicamycin (10 µg/ml). This observation suggests that there is no significant decrease in the copy number of the plasmids in all transfectants during development in the fly guts.

4. Discussion

The results obtained suggest that the gp63 of *L. amazonensis* plays a role in development of this species in *L. longi-*

palpis. There is a significant decrease in the early establishment of this parasite (Fig. 1) when its gp63 is specifically down-regulated. The loss of successful development is evident only at the early stage, e.g. 2 days after feeding examined in the present study. However, P6.5/1.9R differs from the controls in population dynamic from days 2 to 9 (Fig. 1). Whether this may contribute to their qualitative differences and thus their subsequent transmissibility or infectivity awaits further study. The promastigotes taken in by the flies may include a small number of the transfectants with P6.5/1.9R whose gp63 may be incompletely down-regulated, giving rise eventually to a population of promastigotes as large as those seen in the controls on day 9. An incomplete down-regulation of gp63 may be expected, resulting from the absence of selective pressure in the sand fly gut, even though promastigotes recovered from infected flies seem to be equally resistant to tunicamycin in all cases. Alternatively, down-regulation of gp63 may be compensated for by the expression of “alternative or back-up genes” or the occupation of the “gp63-evacuated sites” by other pre-existing molecules, which functionally substitute gp63 only in its absence [21,22]. This alternative possibility cannot be ruled out here, as is also true for the observations that gp63 null mutations of *L. major* produce no adverse effects in its development in the sand fly vector [13,14]. Notably, these previous studies were performed at 28 °C, in contrast to 23 °C used in the present work. It is known that *Leishmania* development in sand flies can be significantly affected by using different ambient temperatures; *L. major* grew better in *Phlebotomus papatasi* in 23 °C than in 28 °C [23]. The possibility also exists that gp63 may function differently for these two different *Leishmania* spp. in their interactions with different vector species.

Gp63 can be envisioned to function in several different ways to help promastigotes survive and grow in the midgut of the sand fly vectors. *Leishmania* together with blood meals are taken into the intraperitrophic space of the midgut, where gp63 may assist the proteolysis of hemoglobin to yield heme, amino acids and peptides as nutrients essential for the growth and development of promastigotes [24,25]; recent data indicate, however, that a significant part of hemoglobin is endocytosed and degraded intracellularly [26]. In addition, gp63 may protect promastigotes from degradation by the midgut digestive enzymes. Blood-feeding is known to up-regulate the expression of midgut proteases, i.e. trypsin and chymotrypsin [27], which appear to reach peak activities about 2 days after feeding [28], interfering with parasite development [28,29]. A protective function for gp63 against these hydrolytic enzymes is suggested by the finding that gp63 down-regulated promastigotes decrease in number precipitously at this time in the fly gut (Fig. 1).

Acknowledgements

We thank M. Svobodova (Charles University) for help with *Leishmania* cultivation and with statistical analysis.

This project was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic (project 1131-00004) and GACR 206/03/0325 to M.H. and P.V. and by US-NIH AI-20486 to K.P.C.

References

- [1] J. Bouvier, P. Schneider, R. Etges, Leishmanolysin—surface metalloproteinase of *Leishmania* proteolytic enzymes: aspartic and metallo peptidases, *Method Enzymol.* 248 (1995) 614–633.
- [2] A. Brittingham, C.J. Morrison, W.R. McMaster, B.S. McGwire, K.P. Chang, D.M. Mosser, Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis, *J. Immunol.* 155 (1995) 3102–3111.
- [3] D.G. Russell, The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant c3-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes, *Eur. J. Biochem.* 164 (1987) 213–221.
- [4] G. Chaudhuri, M. Chaudhuri, A. Pan, K.P. Chang, Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 7483–7489.
- [5] A.L. Sorensen, A.S. Hey, A. Kharazmi, *Leishmania major* surface protease gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro, *APMIS* 102 (1994) 265–271.
- [6] W.R. McMaster, C.J. Morrison, M.H. MacDonald, P.B. Joshi, Mutational and functional analysis of the *Leishmania* surface metalloproteinase gp63: similarities to matrix metalloproteinases, *Parasitology* 108 (1994) S29–S36.
- [7] B.S. McGwire, W.A. O’Connell, K.P. Chang, D.M. Engman, Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 8802–8809.
- [8] B.S. McGwire, K.P. Chang, D.M. Engman, Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63, *Infect. Immun.* 71 (2003) 1008–1010.
- [9] Y. Schlein, *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission, *Parasitol. Today* 9 (1993) 255–257.
- [10] R. Etges, Identification of a surface metalloproteinase on 13 species of *Leishmania* isolated from humans, *Crithidia fasciculata*, and *Herpetomonas samuelpessoai*, *Acta Trop* 50 (1992) 205–217.
- [11] J.A. Inverso, E. MedinaAcosta, J. Oconnor, D.G. Russell, G.A.M. Cross, *Crithidia fasciculata* contains a transcribed leishmanial surface proteinase (gp63) gene homologue, *Mol. Biochem. Parasitol.* 57 (1993) 47–54.
- [12] A.C.N. de Melo, C.M. d’Avila-Levy, M.H. Branquinha, A.B. Vermelho, *Crithidia guilhermei*: gelatin and haemoglobin-degrading extracellular metalloproteinases, *Exp. Parasitol.* 102 (2002) 150–156.
- [13] P.B. Joshi, D.L. Sacks, G. Modi, W.R. McMaster, Targeted gene deletion of *Leishmania major* genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63), *Mol. Microbiol.* 27 (1998) 519–530.
- [14] P.B. Joshi, B.L. Kelly, S. Kamhawi, D.L. Sacks, W.R. McMaster, Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor, *Mol. Biochem. Parasitol.* 120 (2002) 33–40.
- [15] D.H. Molyneux, R. Killick-Kendrick, R.W. Ashford, *Leishmania* in phlebotomid sandflies. III. The ultrastructure of *Leishmania mexicana amazonensis* in the midgut and pharynx of *Lutzomyia longipalpis*, *Proc. Roy. Soc. London B Biol.* 190 (1975) 341–357.
- [16] L.L. Walters, K.P. Irons, G.B. Modi, R.B. Tesh, Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), *J. Med. Entomol.* 30 (1993) 699–718.

- [17] A.Y. Ismaeel, J.C. Garmson, D.H. Molyneux, P.A. Bates, Transformation, development, and transmission of axenically cultured amastigotes of *Leishmania mexicana* in vitro and in *Lutzomyia longipalpis*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59 (1998) 421–425.
- [18] X. Liu, K.P. Chang, The 63-kb circular amplicon of tunicamycin-resistant *Leishmania amazonensis* contains a functional *N*-acetylglucosamine-1-phosphate transferase gene that can be used as a dominant selectable marker in transfection, *Mol. Cell. Biol.* 12 (1992) 4112–4122.
- [19] D.Q. Chen, B.K. Kolli, N. Yadava, H.G. Lu, A. Gilman-Sachs, D.A. Peterson, K.P. Chang, Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro, *Infect. Immun.* 68 (2000) 80–86.
- [20] J. Cihakova, P. Volf, Development of different *Leishmania major* strains in the vector sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi*, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 91 (1997) 267–279.
- [21] R. Chakrabarty, S. Mukherjee, H.G. Lu, B.S. McGwire, K.P. Chang, M.K. Basu, Kinetics of entry of virulent and avirulent strains of *Leishmania donovani* into macrophages: a possible role of virulence molecules (gp63 and LPG), *J. Parasitol.* 82 (1996) 632–635.
- [22] K.P. Chang, B.S. McGwire, Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence, *BMC Kinetoplastid Biology and Disease* 1 (1) (2002).
- [23] A.J. Leancy, The effect of temperature on *Leishmania* in sandflies, *Parasitology* 75 (1977) 28–29.
- [24] A.J. Mukkada, in: K.P. Chang, R.S. Bray (Eds.), *Human Parasitic Diseases*, Elsevier, Amsterdam, New York, 1985, pp. 49–64.
- [25] C.S. Chang, K.P. Chang, Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 16 (1985) 267–276.
- [26] S.B. Singh, R. Tandon, G. Krishnamurthy, R. Vikram, N. Sharma, K.S. Basu, A. Mukhopadhyay, Rab5-mediated endosome–endosome fusion regulates hemoglobin endocytosis in *Leishmania donovani*, *EMBO J* 22 (2003) 5712–5722.
- [27] J.M. Ramalho-Ortigão, S. Kamhawi, E.D. Rowton, J.M.C. Ribeiro, J.G. Valenzuela, Cloning and characterization of trypsin- and chymotrypsin-like proteases from the midgut of the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*, *Insect Biochem. Mol.* 33 (2003) 163–171.
- [28] D. Borovsky, Y. Schlein, Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence, *Med. Vet. Entomol.* 1 (1987) 235–242.
- [29] P.F.P. Pimenta, G.B. Modi, S.T. Pereira, M. Shahabuddin, D.L. Sacks, A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut, *Parasitology* 115 (1997) 359–369.

- 4.3. Volf, P., Hajmová, M., Sádlová, J., Votýpka, J. 2004. Blocked and damaged stomodeal valve of the vector: similar mechanism in two Trypanosomatid – Diptera (Nematocera) models. *Int. J. Parasitol.* 34: 1221-1227. 4.2.



Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models

P. Volf^{a,*}, M. Hajmova^a, J. Sadlova^a, J. Votypka^{a,b}

^aDepartment of Parasitology, Charles University, Prague, Vinicna 7, 128 44 Prague 2, Czech Republic

^bInstitute of Parasitology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Ceske Budejovice, Czech Republic

Received 14 May 2004; received in revised form 20 July 2004; accepted 29 July 2004

Abstract

The regurgitation of metacyclic stages from the sand fly cardia is thought to be the prevailing mechanism of *Leishmania* transmission. This regurgitation may result through damage of the stomodeal valve and its mechanical block by the parasites. We found this phenomenon in three sand fly–*Leishmania* models and also in avian trypanosomes transmitted by *Culex* mosquitoes. *Phlebotomus duboscqi*, *Phlebotomus papatasi*, *Lutzomyia longipalpis*, and *Culex pipiens* were membrane-fed on blood containing *Leishmania major*, *Leishmania chagasi* (syn. *infantum*) and an unidentified avian *Trypanosoma* from *Trypanosoma corvi* clade, respectively. Females with the late-stage infections were processed for the optical and transmission electron microscopy. Localization of the parasites and changes to the stomodeal valve were in some aspects similar in all vector–parasite pairs studied: (i) a large plug of flagellates was observed in cardia region, (ii) parasites were attached to the chitin lining of the stomodeal valve by the formation of zonal hemidesmosome-like plaques. *Leishmania* promastigotes were found both attached to the valve as well as unattached in the lumen of midgut. The stomodeal valve of infected sand flies was opened, its chitin lining was destroyed and the unique filamentous structures on the apical end of cylindrical cells were degraded. In the *Culex*–*Trypanosoma* model, the whole population of epimastigotes was found in close contact with the chitin lining, and degenerative changes of the valve were less pronounced. We suggest that the phenomenon involving a blocked valve facilitating the regurgitation of parasites into the vertebrate host may occur generally in heteroxenous trypanosomatids transmitted by the bite of nematoceran Diptera.
© 2004 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Stomodeal valve; Midgut; Sand fly; Mosquito; *Leishmania*; *Trypanosoma*

1. Introduction

Transmission from an insect vector to a vertebrate host is a key moment in the life cycle of heteroxenous parasites, including trypanosomatids of the genera *Leishmania* and *Trypanosoma*. The anatomy of the alimentary tract of the vector and the localization of the parasite development within the tract play important roles in this event. The insect alimentary canal is formed by three major regions: foregut, midgut and hindgut. The foregut and hindgut arise as an ectodermal invagination and retain the capacity to secrete a chitin layer continuous with the integumentary cuticle while

the midgut is of endodermal origin and its surface is covered by microvilli. The junction between foregut and midgut is located at the point where the midgut epithelium is linked to the reflected wall of the oesophagus. In Diptera, this complex structure is called the cardia and it consists of the stomodeal valve (valvula cardiaca, cardiac valve) and the most anterior part of the midgut epithelium (for review see Romoser, 1996).

The stomodeal valve is of ectodermal origin and consists of a ring of cylindrical epithelial cells that bulges as mushroom-shaped extension of foregut cells into the cardia region. In nematoceran Diptera, including mosquitoes and sand flies, the main role of the stomodeal valve is to ensure the 'one-way' flow of food during feeding and to prevent regurgitation of the gut contents. In sand flies the valve is also supposed to play a role in controlling the destination of meals; during feeding the blood is directed to

* Corresponding author. Tel.: +420 2 2195 1815; fax: +420 2 2491 9704.

E-mail address: volf@cesnet.cz (P. Volf).

midgut while the sugar meal is diverted to the crop and Ward, 1998).

Sand fly females infected with *Leishmania* have difficulty in engorging the meal during the second blood-feeding and they probe several times when biting (for review see Molyneux and Jefferies, 1986). This phenomenon of the 'blocked fly', first mentioned by Shortt and Aminath (1928), was later accepted by other authors. Parasites colonizing the anterior part of the gut, limit the flow of the bloodmeal, and cause a backflow that carries the parasites and results in their deposition into the host skin (Killick-Kendrick et al., 1977; Jefferies et al., 1986; Molyneux and Jefferies, 1986). Moreover, promastigotes from the cardia region are entrapped in a viscous gel-like plug that occludes the gut lumen and contributes to the blockage of the stomodeal valve (Lawyer et al., 1987, 1990; Walters et al., 1987, 1989a,b; Killick-Kendrick et al., 1988; Lang et al., 1991; Rogers et al., 2002). Recently, Scherhof et al. (1999) showed that the gel-like mass is formed mainly by a parasite-derived mucin-like filamentous glycoprotein.

In addition to this mechanical block, *Leishmania* infections cause pathological changes in the sand fly alimentary canal. Schlein et al. (1991, 1992), working on *Phlebotomus papatasi* and *Leishmania major*, described damage to the chitin lining of the stomodeal valve by heavy infections, presumed to be caused by chitinolytic enzymes of the parasite. These pathological changes may influence the function of the valve and lead to the regurgitation of parasites with a backflow of ingested blood. Transmission occurs when infective parasites from the mass in the cardia region are regurgitated with repeated pump pulsation which are then ejected into the host tissue (Schlein et al., 1992; Schlein, 1993).

In the present work, we investigated the pathological changes of the stomodeal valve in different *Leishmania*-sand fly models and showed that the phenomenon of the 'blocked valve' occurs more generally in trypanosomatids transmitted by the bite of nematoceran Diptera. In addition, we described a filamentous structure in cylindrical cells of the stomodeal valve, which could be important for understanding the pathological changes that occur in infected vectors.

2. Materials and methods

2.1. Insect colonies and parasite cultures

Laboratory colonies of *Phlebotomus duboscqi* (origin from Senegal), *P. papatasi* (Turkey), *Lutzomyia longipalpis* (Jacobina, Brazil), and *Culex pipiens quinquefasciatus* (India) were used. Adults were maintained on a 50% sucrose diet, in >70% relative humidity at 25 °C. Females were allowed to feed on anaesthetized mice once a week. Different trypanosomatid parasites were used: *L. major* LV561 (MHOM/IL/67/LRC-L137 Jericho II), *Leishmania*

chagasi (syn. *infantum*) M4192 (MHOM/BR/76/150406) and *Trypanosoma* sp. (ICUL/CZ/1999/CUL1), an avian trypanosome isolated from *Culex pipiens pipiens* (Votycka et al., 2002); based on phylogeny inferred from small-subunit rDNA this trypanosome belongs to *Trypanosoma corvi* clade (Votycka et al., 2004). Parasites were maintained on SNB-9 blood agar.

2.2. Experimental infections

Female sand flies, 4–6 days old, were infected by feeding through a chick-skin membrane on heat inactivated rabbit blood containing 10^6 *Leishmania* promastigotes/ml from a 5-day old culture. Three natural parasite-vector combinations were tested: *L. major*-*P. papatasi* and *P. duboscqi*, and *L. chagasi*-*L. longipalpis*.

Twelve to 14-day old *Culex* females were infected with *Trypanosoma* sp. using membrane feeding on duck blood containing 10^7 promastigotes/ml from a 7 day old culture. Laboratory infections mimic well the natural infections observed in wild-caught mosquitoes (Votycka, unpublished).

2.3. Light and transmission electron microscopy

Engorged female sand flies and mosquitoes were separated and maintained for 10–12 days at 23 °C and a 14 h light/10 h dark photoperiod. They had free access to 50% sucrose solution. Females were anaesthetized on ice and fixed in 4% glutaraldehyde in PBS for 24 h at 4 °C. Then, the samples were washed with PBS and post-fixed in 1% osmium tetroxide for 1 h, dehydrated in a graded ethanol series and propylene oxide and embedded into Epon. For light microscopy, semithin sections (1 µm thick) were stained with toluidine blue. Thin sections of the cardia region were mounted on carbon-coated copper grids with Formvar film and stained with uranyl acetate and lead citrate and observed with 1200 JEOL electron microscope. Uninfected females, 10–12 days post blood meal, were processed in the same way and used as controls.

3. Results

In uninfected females, the stomodeal valve had a typical mushroom-like shape (Fig. 1). The apical ends of the cylindrical cells of the valve were rich in filamentous structures and covered by a thin electron-dense chitin layer (Figs. 2 and 3). Cells with these filamentous structures are present in the inner part of the valve close to the opening into stomodeum. Their position in the stomodeal valve (sv) is shown by arrows on Fig. 1.

Late stage infections of *Leishmania* in the sand flies *P. papatasi*, *P. duboscqi* and *L. longipalpis* resulted in high numbers of parasites which filled the whole gut lumen of

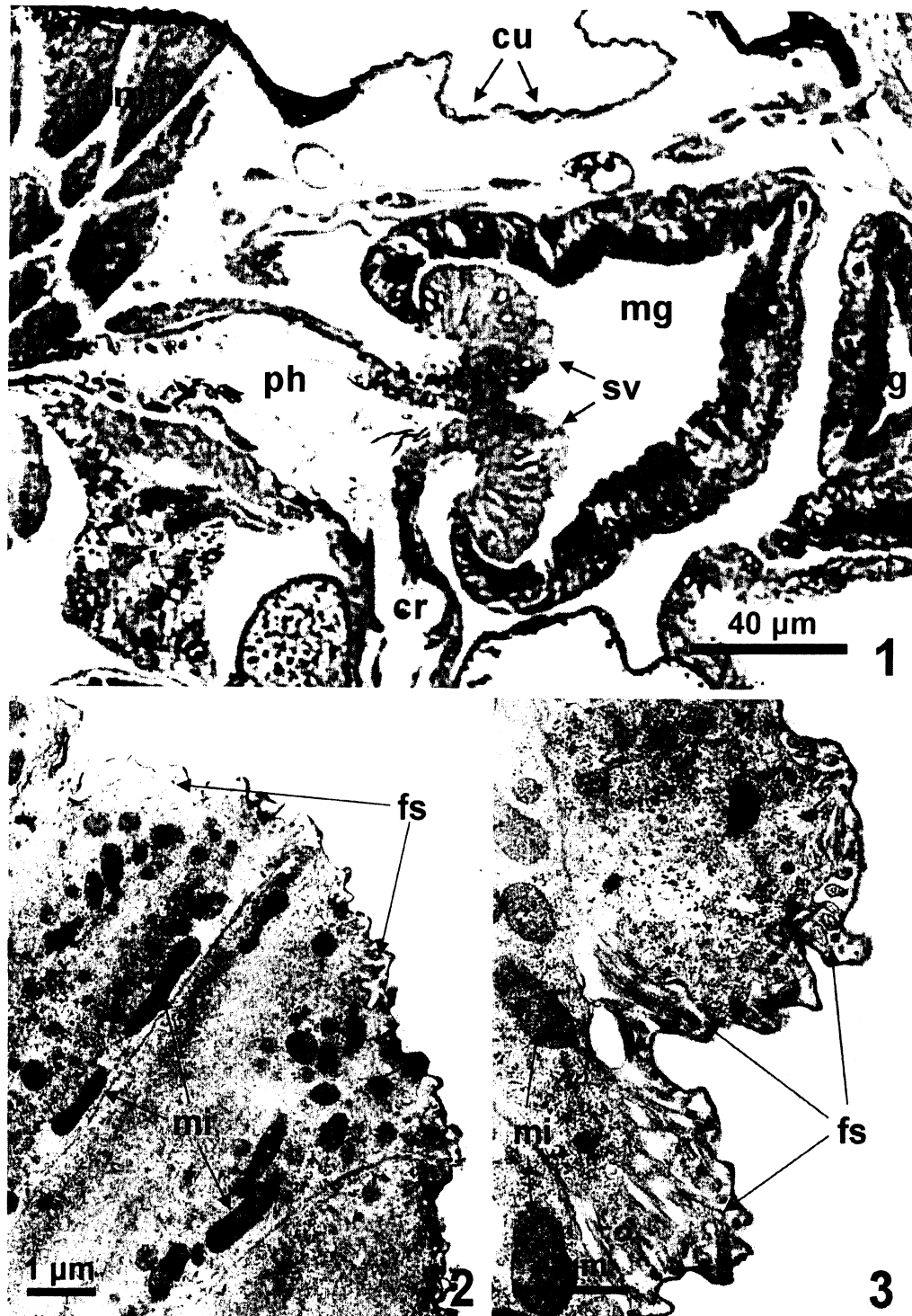
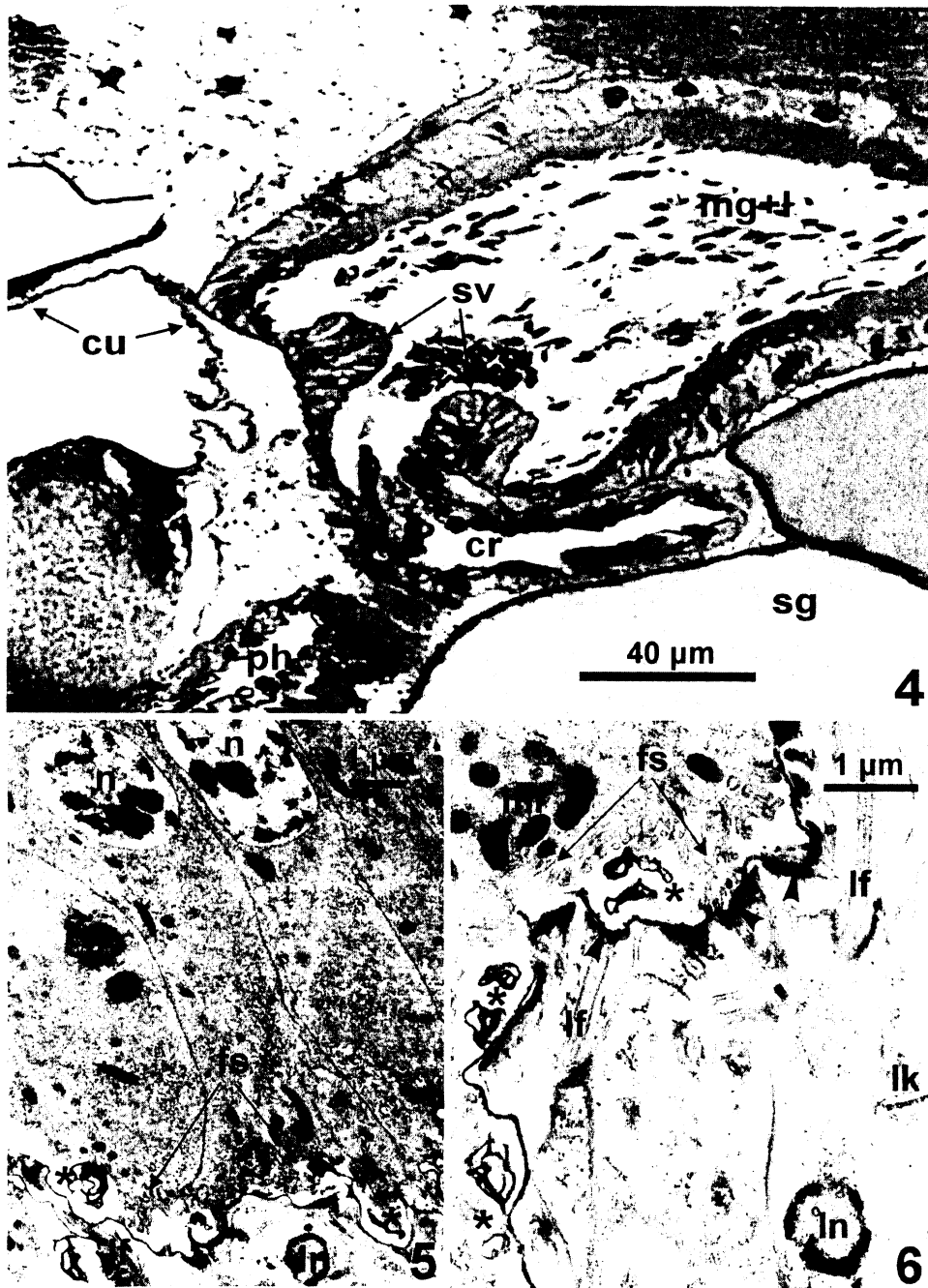


Fig. 1–3. Stomodeal valve of uninfected sand fly females. Semithin section of *Phlebotomus duboscqi* embedded in LR White resin and stained by toluidin blue. The position of filamentous structures in the stomodeal valve is shown by arrows (Fig. 1). Electron microscopy of the cylindrical cells in the inner part of stomodeal valve of *P. duboscqi* (Fig. 2) and *Phlebotomus papatasi* (Fig. 3). Abbreviations: cr, crop; cu, cuticle; fs, filamentous structures; mi, mitochondria; mg, midgut; mg + l, midgut containing *Leishmania*; mu, muscles; mv, microvilli of the thoracic midgut; n, nucleus of epithelial cells of the stomodeal valve; fl, *Leishmania* flagellum; lk, *Leishmania* kinetoplast; ln, *Leishmania* nucleus; oe, oesophagus; ph, pharynx; sg, salivary glands; sv, stomodeal valve; t, trachea; arrowheads, hemidesome-like plaques on parasite flagellum; *, degradation of the chitin layer.

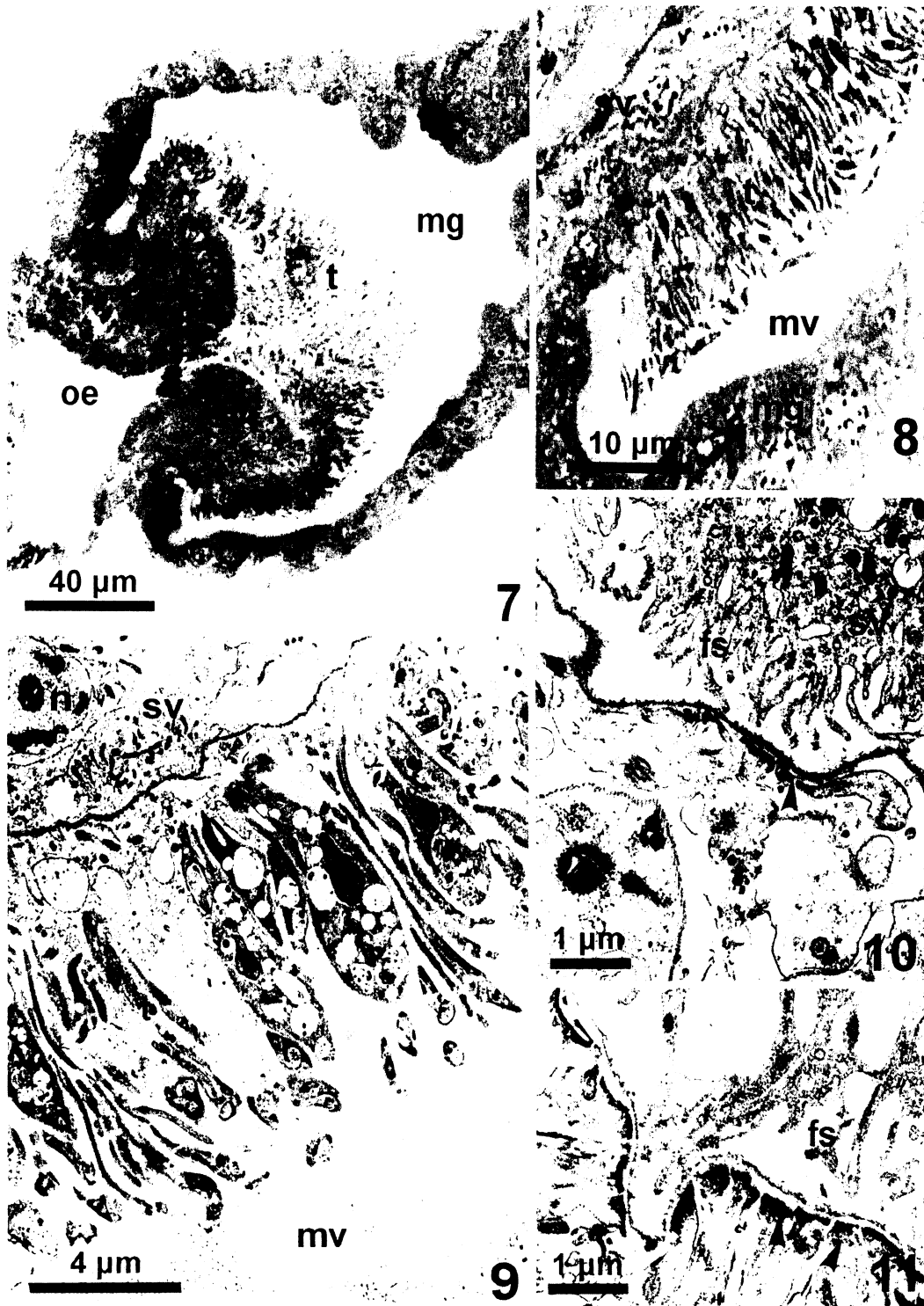


Figs. 4–6. Stomodeal valve of sand fly females infected by *Leishmania* parasites. Semithin section of *Phlebotomus dubosqi* infected by *Leishmania major*. Sample is embedded in LR White resin and stained by toluidin blue. The position of degraded filamentous structures in the stomodeal valve is showed by arrows (Fig. 4). Electron microscopy of the cylindrical cells of the stomodeal valve in sand flies infected by *L. major* pathological changes of the filamentous structures and the chitin lining of *Phlebotomus papatasi* (Fig. 5) and *P. dubosqi* (Fig. 6). For abbreviations refer the caption of Figs. 1–3.

the cardia and anterior midgut. Some promastigotes were found in close contact with the midgut microvilli or with the cuticle lining of the valve, others were swimming freely in the midgut lumen. The stomodeal valve was permanently

opened, its shape was changed and cylindrical cells appear to be reduced in size (Fig. 4).

Under the electron microscope, degenerative changes of the cylindrical cells were observed in all heavily infected



Figs. 7–11. *Culex pipiens quinquefasciatus* infected by *Trypanosoma* sp. Semithin sections of the stomodeal valve embedded in LR White resin and stained by toluidin blue (Figs. 7–8). Electron microscopy of the apical end of cylindrical cells and the chitin lining (Figs. 9–11). For abbreviations refer the caption of Figs. 1–3.

flies. The chitin layer was separated from the apical end of the cell and the filamentous structures were degraded. However, the nuclei and mitochondria of cylindrical cells appeared the same as in uninfected controls. The *Leishmania* promastigotes attached to the chitin layer of the valve by their flagella, the adhesions occurred by the formation of zonal hemidesmosome-like plaques. On some occasions, electron-dense debris of the chitin layer were observed between the apical end of the cells and the lining (Figs. 5 and 6).

Avian trypanosomes developing in *C. pipiens quinquefasciatus* caused the enlargement of the stomodeal valve of infected females; these changes were visible even during the dissections under the stereomicroscope. *Trypanosoma* epimastigotes were found attached to the stomodeal valve of *Culex* mosquitoes (Figs. 8 and 9) and, in contrast to the *Leishmania*–sand fly model, no free parasites were observed swimming in the lumen of mosquito cardia. Epimastigotes were orientated with their apical ends to the chitin lining of the valve and were attached by flagella forming hemidesmosome-like plaques. Destruction of the valve, the apical end of the cylindrical cells and their chitin lining appeared to be less pronounced than in *Leishmania* infections (Figs. 7–10).

4. Discussion

Our study showed that various trypanosomatid parasites colonizing the anterior part of the midgut of nematoceran Diptera used the same 'strategy', they block the cardia region and the stomodeal valve of the vector. Destruction of the valve or impairment of its function could facilitate the transmission of these parasites into their vertebrate hosts. In sand flies this is supposed to be a prevailing mechanism of *Leishmania* transmission (Schlein et al., 1992; Schlein, 1993). Data obtained in the *Culex*–*Trypanosoma* model showed that this specific feature of vector–pathogen interaction is similar to changes caused by late-stage infections of *Leishmania* in sand flies.

In sand flies, the damage occurring to the stomodeal valve during heavy *Leishmania* infections was first described by Schlein et al. (1992). They presented a picture drawn from sections and a scheme for the feeding mechanisms of *P. papatasi* showing the permanently opened valve and explaining the impaired ingestion of blood in females infected by *L. major*. They also reported various degrees of disruption of cylindrical cells of the valve, separation of individual cells from the tissue and a decrease in their volume or the loss of the cell membrane. In our study, some of these pathological changes were observed in semi-thin or ultra-thin sections. The valve of heavily infected females was opened and the cytoplasm of cylindrical cells was separated from the chitin layer. Similar detachment of the valve lining from the epithelial cells was also visible in electron micrographs presented by Walters et al. (1987, 1989b) and Walters (1993) in three *Lutzomyia*

species, and we conclude that it is a general feature accompanying heavy *Leishmania* infections.

Filamentous structures at the apical end of cylindrical cells were observed in females of all models studied, including the *Culex* mosquitoes. They have not been described in previous ultrastructural studies; however, similar structures appear to be present in the micrographs of Walters (1993). The filaments connect the cell membrane to the inner layer of the chitin lining of the valve. We suggest that these structures are contractile and participate in the function of the stomodeal valve as a pump and/or valve. In the micrographs presented by Schlein et al. (1992) the filaments are not seen because of the orientation of the ultra-thin sections. They are present only in cells at the apical end of the valve where the valve closes the entrance into the midgut and where the cylindrical cells are needed to control the valve entrance. In infected sand fly females these filaments were separated from the chitin layer of the valve and were degraded.

Schlein et al. (1991, 1992) presumed that the chitinolytic enzymes of the parasite degraded the inner softer layer of the chitin of the stomodeal valve. Recent data obtained using *Leishmania* mutants differing in their production of chitinase (Rogers et al., unpublished) suggest that this enzyme really has an important role in the damage of the stomodeal valve. Such degradation of the chitin lining may cause its detachment from the cylindrical cells and expose the underlying tissues to the harmful effects of other parasite-secreted substances. Pathological changes observed in our experiments on the apical end of cylindrical cells, mainly the destruction of filamentous structures, suggest that *Leishmania* proteases such as leishmanolysin gp63 could be involved in this process.

In conclusion, the mechanical block of the stomodeal valve by the parasites embedded in the gel-like matrix resulted in partial dysfunction of the stomodeal valve and facilitates the transmission of the *Leishmania* and *Trypanosoma* parasites into the vertebrate host. In *Leishmania* infection this event is also facilitated by destruction of the chitin lining of the valve and by the degradation of the cylindrical cells, especially their apical ends with unique filamentous structures. We propose that the phenomenon of the 'blocked valve' may occur more generally in trypanosomatids transmitted by the bite of nematoceran Diptera.

Acknowledgements

We thank Dr P.A. Bates and Prof. R.D. Ward for valuable comments on the manuscript. The study was supported by the Grant Agency of Charles University (project 147/2002/B-Bio) and by the Ministry of Education of the Czech Republic (project 113100004 and FRVS 2356/2002).

References

- Jefferies, D., Livesey, J.L., Molyneux, D.H., 1986. Fluid mechanics of bloodmeal uptake by *Leishmania* infected sandflies. *Acta Trop.* 43, 43–53.
- Lick-Kendrick, R., Leaney, A.J., Ready, P.D., Molyneux, D.H., 1977. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 196, 105–115.
- Lick-Kendrick, R., Wallbanks, K.R., Molyneux, D.H., Lavin, D.R., 1988. The ultrastructure of *Leishmania major* in the foregut and proboscis of *Phlebotomus papatasi*. *Parasitol. Res.* 74, 586–590.
- Ng, T., Warburg, A., Sacks, D.L., Croft, S.L., Lane, R.P., 1991. Transmission and scanning EM-immunogold labeling of *Leishmania major* lipophosphoglycan in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Eur. J. Cell Biol.* 55, 362–372.
- Swyer, P.G., Young, D.G., Butler, J.F., Akin, D.E., 1987. Development of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 24, 347–355.
- Swyer, P.G., Ngumbi, P.M., Anjili, C.O., Odongo, S.O., Mebrathu, Y.M., Githure, J.I., Koech, D.K., Roberts, C.R., 1990. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43, 31–43.
- Molyneux, D.H., Jefferies, D., 1986. Feeding behaviour of pathogen infected vectors. *Parasitology* 92, 721–736.
- Rogers, M.E., Chance, M.L., Bates, P.A., 2002. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 124, 495–507.
- Tomoser, W.S., 1996. The vector alimentary system, in: Beaty, J.B., Marquart, W.C. (Eds.), *The Biology of Disease Vectors*. University Press of Colorado, Niwot, CO, pp. 298–302.
- Schlein, Y., 1993. *Leishmania* and sandflies-interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol. Today* 9, 255–258.
- Schlein, Y., Jacobson, R.L., Shlomai, J., 1991. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* 245, 121–126.
- Schlein, Y., Jacobson, R.L., Messer, G., 1992. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and impede parasite transmission by bite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9944–9948.
- Shortt, H., Swaminath, C.S., 1928. The method of feeding of phlebotomus argentipes with relation to its bearing on the transmission of kala azar. *Ind. J. Med. Res.* 15, 827–836.
- Stierhof, Y.D., Bates, P.A., Jacobson, L.R., Rogers, M.E., Schlein, J., Handman, E., Ilg, T., 1999. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *Eur. J. Cell Biol.* 78, 675–689.
- Tang, Y.S., Ward, R.D., 1998. Stomodaeal valve ultrastructure in the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Med. Vet. Entomol.* 12, 132–135.
- Votýpka, J., Lukes, J., Obornik, M., 2004. Phylogenetic relationship of *Trypanosoma corvi* with other avian trypanosomes. *Acta Protozool.* 43, 225–231.
- Votýpka, J., Obornik, M., Volf, P., Svobodová, M., Lukeš, J., 2002. *Trypanosoma* arium of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. *Parasitology* 125, 253–263.
- Walters, L.I., 1993. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. *J. Eukaryot. Microbiol.* 40, 196–206.
- Walters, L.I., Modi, G.B., Tesh, R.B., Burrage, T., 1987. Host-parasite relationship of *Leishmania mexicana mexicana* and *Lutzomyia abnormis* (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36, 294–314.
- Walters, L.I., Modi, G.B., Chaplin, G., Tesh, R.B., 1989a. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41, 295–317.
- Walters, L.I., Chaplin, G.L., Modi, G.B., Tesh, R.B., 1989b. Ultrastructural biology of *Leishmania* (Viannia) panamensis (= *Leishmania braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40, 19–39.

5. Souhrn výsledků a závěry

5.1. Náchylnost *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* vůči různým druhům leishmanií

Podrod *Adlerius* (Diptera: Psychodidae) zahrnuje cca 20 známých druhů rozšířených ve Starém světě. Jejich taxonomie je velmi obtížná a je založena zpravidla na morfologických znacích přítomných u samců. Některé druhy jsou suspektními vektory viscerální leishmaniózy, nejméně u jednoho druhu, *P. arabicus*, byl potvrzen přenos kožní leishmaniózy působené druhem *L. tropica* (*P. arabicus* (Jacobson a kol., 2003)).

Výskyt druhu *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* se shoduje s výskytem jak kožní (*L. major*, *L. tropica*), tak i viscerální (*L. infantum*) leishmaniózy. Abychom posoudili vektorovou kompetenci druhu ke kožním leishmaniózám, provedli jsme experimentální infekce druhu leishmaniemi *L. major* a *L. tropica* a porovnali jsme je s infekcemi v jejich přirozených (*L. major* – *P. duboscqi*, *L. tropica* – *P. sergenti*) i nepřirozených vektorech (*Lu. longipalpis*).

Při infekcích flebotomů *P. halepensis*, *P. duboscqi* a *Lu. longipalpis* druhem *L. major* bylo třetí den po sání nakaženo více než 90% samic všech zkoumaných modelů. Převládaly silné až velmi silné infekce. Třetí den po sání parazité počali unikat přes peritrofickou matrix do ektoperitrofického prostoru – nejpomaleji u druhu *P. duboscqi*. U druhu *P. halepensis* v tu dobu převládaly dlouhé nektomonády lokalizované v ektoperitrofickém prostoru a přítomnost parazitů ve zbytku nestrávené krve uvnitř peritofické matrix byla velmi sporadická. Šestý den po sání byly infekce opět u více než 90% samic druhů *P. halepensis* a *Lu. Longipalpis*, u druhu *P. duboscqi* bylo nakaženo 75-80% samic.

Do šestého dne po sání byla strávena veškerá krev a nestrávené zbytky byly defekovány u všech druhů. Leishmanie migrovaly anteriorně směrem ke stomodeální valvě. Infekce u druhu *P. halepensis* byly silné až velmi silné, u druhů *P. duboscqi* a *Lu. longipalpis* byly signifikantně slabší. Do šestého dne po sání byla kolonizována stomodeální valva z 88% u druhu *P. halepensis*, ze 67% u druhu *P. duboscqi*, naproti tomu u druhu *L. longipalpis* pouze z 28%. Desátý den po sání převládaly u všech zkoumaných druhů silné infekce – parazité kolonizovali thorakální střevo a stomodeální valvu ve většině případů. Infekce v proboscis a pharynx byly pouze ojedinělé.

Při infekcích flebotomů *P. halepensis* a *P. sergenti* druhem *L. tropica* bylo po celou dobu sledování (od třetího po desátý den po sání) nakaženo mezi 70 a 85% samic obou druhů. Rozdíl byl patrný mezi pozorovanými vektory pouze v době, kdy leishmanie unikaly z peritrofického prostoru. Zatímco u druhu *P. halepensis* bylo třetí den po sání v endoperitofickém prostoru pouze 47% leishmanií, u druhu *P. sergenti* jich zůstávalo 70%. Do šestého dne po sání byly všechny leishmanie v oblasti thorakálního střeva a do oblasti stomodeální valvy dosahovaly u druhu *P. halepensis* z 83% a u druhu *P. sergenti* ze 75%. Desátý den po sání převládaly u obou druhů masivní infekce stomodeální valvy, v některých případech infekce dosahovala až do pharynx a proboscis.

Studium experimentálních infekcí druhů *L. major* a *L. tropica* prokázalo, že *P. halepensis* je vysoce náchylný na oba uvedené kmeny leishmanií a že

vývoj těchto druhů leishmanií je zcela srovnatelný s jejich vývojem v přirozených vektorech.

Naše experimentální studie prokázala, že *P. halepensis* by mohl být vektorem kožní leishmaniózy. Podle Killick-Kendricka (1999) musí být splněna čtyři základní kritéria, aby mohl být určitý druh flebotoma považován za potvrzeného přenašeče určitého druhu leishmanie. První z nich je persistence parazitů při experimentální infekci, včetně přestání defekace (viz výsledky výše), druhou pak schopnost sání na člověku a zvířecím rezervoáru.

My jsme pozorovali, že samice druhu *P. halepensis* při sání preferovaly člověka před králíkem (81 vs. 21 samic), dále člověka před krysou (50 vs. 31), stejně pak králíka před krysou (61 vs. 18). To znamená, že samice vždy preferovaly jako zdroj krevní potravy většího živočicha. Výběr hostitele neměl žádný signifikantní vliv ani na mortalitu samic ani na jejich plodnost (počet nakladených vajec) ve srovnání s ostatními druhy flebotomů (Harre a kol., 2001).

Třetí kritérium pro úspěšné potvrzení vektora leishmaniózy je úspěšný a zdokumentovaný přenos leishmanií sáním na dalším hostiteli (Killick-Kendrick, 1999). V naší studii jsme se o tento přenos pokusili, celkem 137 samic všech tří druhů v pozdním stádiu infekce sálo na devíti křečcích. Ačkoli se u dvou křečků objevily v místech vpichu samic slabé edémy, veškeré kultivační pokusy zůstaly negativní. Experimentální přenos *L. major* druhem *P. halepensis* se tedy prozatím nezdařil.

Posledním (čtvrtým) kritériem pro potvrzení *P. halepensis* jako přenašeče *L. major* by byla izolace parazitů z flebotomů odchycených v terénu. Toto kritérium též do dnešního dne nebylo naplněno zejména kvůli determinačním obtížím při určování samic podrodu *Adlerius*.

5.2. Nové poznatky o roli metaloproteázy gp63 v přenašeci

Gp63 je hlavním povrchovým proteinem leishmanií, který je přítomen zejména v promastigotních stádiích leishmanií. V hostiteli zastává řadu funkcí, jeho funkce ve vektoru však zůstává neobjasněna. Byla vyslovena domněnka, že gp63 by se mohla účastnit při získávání živin z krevní potravy degradací hemoglobinu a dalších proteinů (Schlein, 1993). V naší studii jsme pro experimentální infekci druhu *Lu. longipalpis* použili tři linie *L. amazonensis* lišící se expresí metaloproteinázy gp63 na svém povrchu: kontrolní (s běžnou úrovní exprese), mutanty, kteří měli produkci gp63 zablokovanou a mutanty, kteří gp63 overexprimovali. Porovnávali jsme infekce těchto tří experimentálních skupin mezi sebou.

Linie *L. amazonensis* se významně lišily v raných fázích infekce, to jest druhý den po sání. Kontroly a overexprimující mutanti ukazovali vyšší infektivitu pro flebotomy (okolo 90%), převažoval výskyt středních a velmi silných infekcí (až 80%). Naopak mutanti se zablokovanou expresí gp63 měli infektivitu okolo 70%. Převažovaly střední a slabé infekce, velmi silných infekcí bylo dosaženo pouze ve 30% případů. Výsledky nasvědčují, že gp63 hraje určitou úlohu ve vývoji *L. amazonensis* a to zejména v rané fázi infekce.

Naproti tomu v pozdních fázích infekce (devátý den po sání) se jednotlivé linie od sebe významně neodlišovaly. Všechny se vyskytovaly

zhruba u 50% samic s maximálně převažujícími velmi silnými a středními infekcemi. Ve všech případech byla infekce lokalizována do oblasti stomodeální valvy a thorakálního střeva.

Stav infekce a její nesignifikantní rozdíly u zkoumaných skupin mutantů v pozdním stádiu je možné vysvětlit několika způsoby. Teoreticky by bylo možné, že produkce gp63 nebyla u této linie potlačena irreverzibilně a že v nepřítomnosti selekčního tlaku tunikamycinu se během vývoje ve flebotomech obnovila. Reizolace parazitů ze střev infikovaných samic do média obsahujícího tunikamycin však tento výklad vyloučila. Reizolace parazitů byla úspěšná jak druhý tak devátý den po infekci flebotomů. K odvržení plasmidu zodpovědného za regulaci produkce gp63 tedy během vývoje ve vektoru nedochází. Je však možné, že funkce gp63 byla u mutantů nahrazena expresí jiných proteinů (Chakrabarty a kol., 1996, McGwire a kol., 2002).

Experimenty s gp63 mutanty prováděli též Joshi a kol. (1998 a 2002) u *L. major*. Tito autoři nezaznamenali žádné rozdíly ve vývoji a síle infekce mezi skupinou s knockakutovanými geny pro gp63 a kontrolní skupinou produkující gp63 v běžné míře. Experimenty však byly prováděny při 28°C, narozdíl od našich experimentů, které byly prováděny při 23°C. Je známo, že vývoj leishmanií ve vektoru je ovlivňován teplotou okolního prostředí a vývoj infekcí *L. major* je rychlejší při teplotě 28°C než při teplotě 23°C (Leaney, 1977). Dále pak je samozřejmě možné, že gp63 může mít různou funkci ve zkoumaných druzích leishmanií (rozdíl mezi *L. major* a *L. mexicana*) a v jejich interakci s různými vektory (*P. papatasi* oproti *Lu. longipalpis*).

5.3. Mechanismus „regurgitační“ teorie - zjištění poškození či blokace stomodeální valvy flebotomů v pozdních stádiích infekce leishmaniemi

V nematocerních dvoukřídých je hlavní úlohou stomodeální valvy (SV) zajištění jednosměrného toku potravy během sání a zabránění regurgitace střevního obsahu. U flebotomů je úlohou SV navíc směřování potravy podle jejího charakteru buď do střeva nebo do volete (Tang a Ward, 1998). Bylo popsáno, že samice flebotomů infikované leishmaniemi mají problémy s opětovným sáním krve na hostiteli – sají opakovaně a krátce (review Molyneux a Jefferies, 1986). Leishmanie kolonizují přední část střeva, omezují příjem krve a zapříčiňují zpětný tok střevního obsahu společně s parazity do hostitelské tkáně (Killick-Kendrick a kol., 1977, Jefferies a kol., 1986, Molyneux a Jefferies, 1986). Navíc u plně rozvinutých infekcí jsou promastigoti v oblasti SV obklopeni viskózním gelem. Ten je vytvářen parazity (Stierhof a kol., 1999) a zřejmě se podílí na blokaci SV (Lawyer a kol., 1987, 1990; Walters a kol., 1987, 1989a,b; Killick-Kendrick a kol., 1988; Rogers a kol., 2002). Zároveň byly popsány degenerativní patologické změny stomodeální valvy (Schlein, a kol., 1992, Schlein 1993). V těchto studiích byly prezentovány různé stupně destrukce cylindrických buněk formujících valvu, separace individuálních buněk od tkáně a jejich zmenšení nebo ztráta jejich buněčné membrány. Narušení funkce SV opět způsobuje regurgitaci obsahu mesenteronu do potravní léze (Schlein a kol., 1992; Schlein, 1993). Tato zajímavá hypotéza o

narušení SV však nebyla přesvědčivě prokázána a nedostatečný materiál v publikacích Schleina a kol. (1992), Walterse a kol., (1987, 1989b) a Walterse (1993) byl předmětem sporů mezi zastánci a odpůrci této teorie.

Abychom potvrdili či vyvrátili Schleinovu hypotézu, pokusili jsme se o co nejdokonalejší zobrazení leishmanií v trávicím traktu flebotomů a o zdokumentování případných změn, ke kterým při infekcích dochází v oblasti stomodeální valvy. Nejprve jsme inkubovali střeva se SV infekčních samic flebotomů s FITC značenými protilátkami proti tubulinu (poskytnuty MBÚ AVČR, Praha Krč) pro zobrazení leishmanií. Pro značení struktur trávicího traktu jsme vyzkoušeli dva lektiny (WGA a PNA), protilátky proti kutikulární výstelce (prof. Pimenta, Centro de Pasquisas Rene Rachou, Belo Horizonte, Brazílie) a calcofluor (optický bělič, který se váže na celulózu a chitin). Pozorování byla prováděna na fluorescenčním mikroskopu Olympus BX51 a na konfokálním mikroskopu Olympus Fluoview. Výsledky nebyly uspokojivé, protože samotná inkubace střeva *in vitro* s uvedenými látkami patrně nebyla dostačující k jejich proniknutí do tkáně a neposkytla možnost pozorovat leishmanie uvnitř stomodeální valvy a střeva.

Poté byla využita technika kapilárového sání, kdy jsou samice flebotomů přinuceny sát přesně definovaný roztok (v tomto případě směsi protilátek uvedené výše) z tenké kapiláry, která je jim nasazena na ústní ústrojí. Ohrnutí spodního pysku přitom spouští samovolný sací reflex. Fluorescenčně značené protilátky se tak mohly dostat do trávicího traktu samic *in vivo*. Pozorování na konfokálním mikroskopu Olympus Fluoview však přesto nedala uspokojivou odpověď na otázku způsobu přichycení parazitů a opět nebylo možné pozorovat ani případná poškození stomodeální valvy.

Proto jsme přistoupili k přípravě vzorků pro elektronovou mikroskopii. Pomocí transmisní elektronové mikroskopie (1200 Jeol) jsme pořídili detailní fotodokumentaci zdravé stomodeální valvy. Apikální konce cylindrických buněk valvy jsou u zdravé stomodeální valvy pokryty tenkou elektrondensní chitinovou výstelkou a v oblasti vnitřní části valvy u jejího otevírání se do stomodea jsou patrné filamentární struktury. Tyto filamentární struktury dosud nebyly popsány v žádné studii ultrastruktury flebotomů, ačkoli podobné struktury jsou patrné i na mikrofotografiích prezentovaných Waltersem a kol., (1987, 1989b) a Waltersem (1993). Filamenty spojují buněčnou membránu a vnitřní vrstvu chitinu SV; jsou zřejmě kontraktilní a hrají úlohu při pohybech valvy. Ve Schleinových studiích (Schlein a kol., 1992) tyto filamenty nejsou patrné kvůli nevhodné orientaci ultratenkých řezů použitých pro fotodokumentaci. Tyto filamentární struktury jsou přítomny pouze v buňkách apikálního konce valvy, kde se valva uzavírá a kde cylindrické buňky kontrolují vstup do valvy a tím do střeva.

Pomocí transmisní a rastrovací elektronové mikroskopie jsme pozorovali též vyvinuté infekce leishmanií ve flebotomech (10-12 dní po sání). Parazitě zcela zaplňovali lumen anteriorní části střeva. Leishmanie byly přichyceny ke střevním mikrovillům a chitinózní výstelce stomodeální valvy nebo se volně pohybovaly v lumen střeva. Stomodeální valva byla otevřená a měla pozměněný tvar. Chitinózní výstelka valvy byla odtržená od apikálních konců buněk, filamentární struktury v apikálním konci SV byly degradované. Naproti tomu jádra a mitochondrie cylindrických buněk zůstaly nezměněné. Leishmanie se přichytávaly k chitinózní výstelce pomocí hemidesmozómů,

v některých případech byly u apikálních konců cylindrických buněk pozorovány zbytky degradovaného chitinu.

Schlein a kol. (1991, 1992) vyslovili hypotézu, že k degradaci chitinózní výstelky SV dochází zřejmě působením parazitické chitinázy. K potvrzení této domněnky jsme provedli infekce mutantními kmeny *L. amazonensis* overexprimujícími chitinázu. Infekce těmito mutanty ukázala větší poškození stomodeální valvy ve srovnání s kmeny produkujícími normální úroveň parazitické chitinázy (Rogers a kol., nepublikováno). Degradace chitinózní výstelky by mohla vystavovat tkáň ležící pod ní účinku dalších hydrolytických enzymů parazita, jako například metaloproteázy gp63.

Pro srovnání vlivu parazitů na stomodeální valvu jiných přenašečů jsme provedli infekce komárů trypanosomami. Trypanosomy způsobovaly zbytnění stomodeální valvy, které bylo pozorovatelné již během pitvání pod stereomikroskopem. Pomocí transmisní a rastrovací elektronové mikroskopie byly zobrazeny epimastigoti trypanosom v pozdních stádiích infekce – (12-14 dní po sání). Parazité byli přichyceni ke stomodeální valvě, na rozdíl od leishmaniových infekcí nebyly pozorovány žádné trypanosomy lokalizované volně v lumen střeva. Destrukce kutikulární výstelky valvy a cylindrických buněk formujících valvu nebyla tak výrazná, jako u leishmaniového modelu, ale byla též patrná.

Naše studie ukázala, že různé trypanosomatidě kolonizují anteriorní část střeva nematocerních Dipter a blokují oblast SV svého vektora. Destrukce valvy nebo blokace její funkce a následná regurgitace parazitů do hostitele při sání krve je zřejmě všeobecnějším fenoménem vyskytujícím se u trypanosomatidů přenášených nematocerním dvoukřídlym hmyzem.

6. Seznam citací

- Aebischer, T., D. Harbecke, and T. Ilg.** 1999. Proteophosphoglycan, a major secreted product of intracellular *Leishmania mexicana* amastigotes, is a poor B-cell antigen and does not elicit a specific conventional CD4(+) T-cell response. *Infection And Immunity* **67**: 5379-5385.
- Alexander, B., and D.G. Young.** 1992. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Phlebotomidae) in a Colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **87**: 397-403.
- Artemiev, M.M.** 1980. A revision of sandflies of the subgenus *Adlerius* (Diptera, Phlebotominae, Phlebotomus). *Zoologicheskiy Zhurnal* **59**: 1177-1192.
- Bahr, V., Y.D. Stierhof, T. Ilg, M. Demar, M. Quinten, and P. Overath.** 1993. Expression of Lipophosphoglycan, High-Molecular Weight Phosphoglycan and Glycoprotein-63 in Promastigotes and Amastigotes of *Leishmania-Mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**: 107-121.
- Bates, P.A., I. Hermes , and D.M. Dwyer.** 1989. *Leishmania donovani*: immunochemical localization and secretory mechanism of soluble acid phosphatase. *Exp. Parasitol.* **68**: 335-46.
- Bates, P.A., and L. Tetley.** 1993. *Leishmania mexicana* - Induction of Metacyclogenesis by Cultivation of Promastigotes at Acidic pH. *Exp. Parasitol.* **76**: 412-423.
- Beach, R., G. Kichu, and J. Leeuwenburg.** 1985. Modification of sandfly biting behaviour by *Leishmania* leads to increased parasite transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**: 279-283.
- Belkaid, Y., S. Kamhawi, G. Modi, J. Valenzuela, N. Noben-Trauth, E. Rowton, J. Ribeiro, and D.L. Sacks.** 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. *J. Exp. Med.* **188**: 1941-1953.
- Billingsley, P.F. and W. Rudin.** 1992. The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of *Plasmodium* species. *J. Parasitol.* **78**: 430-440.
- Blackburn, K., K.R. Wallbanks, D.H. Molyneux, D.R. Lavin, and S.L. Winstaley.** 1988. The peritrophic membrane of the female sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **82**: 613-619.
- Blackwell, J.M., R.A.B. Ezekowitz, M.B. Roberts, J.Y. Channon, R.B. Sim, and S. Gordon.** 1985. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *J. Exp. Med.* **162**: 324-331.
- Borovsky, D. and Y. Schlein.** 1987. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Med. Vet. Entomol.* **1**: 235-242.
- Bouvier, J., R. Etges, and C. Bordier.** 1987. Identification of the promastigote surface protease in seven species of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **24**: 73-79.
- Bouvier, J., C. Bordier, H. Vogel, R. Reichelt, and R. Etges.** 1989. Characterization of the promastigote surface protease of *Leishmania* as a membrane-bound zinc endopeptidase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **37**: 235-246.

- Bouvier, J., P. Schneider, R. Etges, and C. Bordier.** 1990. Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*. *Biochemistry* **29**: 10113-10119.
- Bouvier, J., P. Schneider, and R. Etges.** 1995. Leishmanolysin: surface metalloproteinase of *Leishmania*. *Methods Enzymol.* **248**: 614-33.
- Bozza, M., M.B.P. Soares, P.T. Bozza, A.R. Satoskar, T.G. Diacovo, F. Brombacher, R.G. Titus, C.B. Shoemaker, and J.R. David.** 1998. The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. *Eur. J. Immunol.* **28**: 3120-3127.
- Bray, R.S.** 1983. *Leishmania*: chemotactic responses of promastigotes and macrophages in vitro. *J. Protozool.* **30**: 322-329.
- Brittingham, A., C.J. Morrison, W.R. McMaster, B.S. McGwire, K.P. Chang, and D.M. Mosser.** 1995. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J. Immunol.* **155**: 3102-3111.
- Cerna, P, L. Mikes, and P. Volf.** 2002. Salivary gland hyaluronidase in various species of phlebotomine sand flies (Diptera: psychodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**: 1691-1697.
- Chakrabarty R, Mukherjee S, Lu HG, McGwire BS, Chang KP, Basu MK.** 1996. Kinetics of entry of virulent and avirulent strains of *Leishmania donovani* into macrophages: a possible role of virulence molecules (gp63 and LPG). *J. Parasitol.* **82**: 632-635.
- Chang, K.P.** 1997. Leishmaniasis, p. 275-281. In Anonymous Encyclopedia of human biology. Academic Press
- Charlab, R., R.B. Tesh, E.D. Rowton, and J.MC. Ribeiro.** 1995. *Leishmania amazonensis*: Sensitivity of different promastigote morphotypes to salivary gland homogenates of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Exp. Parasitol.* **80**: 167-175.
- Charlab, R., J.G. Valenzuela, E.D. Rowton, and J.M.C. Ribeiro.** 1999. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **96**: 15155-15160.
- Charlab, R., E.D. Rowton, and J.M.C. Ribeiro.** 2000. The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Exp. Parasitol.* **95**: 45-53.
- Chaudhuri, G. and K.P. Chang.** 1988. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. *Mol.Biochem.Parasitol.* **27**: 43-52.
- Chaudhuri, G., M. Chaudhuri, A. Pan, and K.P. Chang.** 1989. Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. *J. Biol. Chem.* **264**: 7483-7489.
- Cihakova, J. and P. Volf.** 1997. Development of different *Leishmania major* strains in the vector sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **91**: 267-279.
- Courret, N., E. Prina, E. Mougneau, E.M. Saraiva, D.L. Sacks, N. Glaichenhaus, and J.C. Antoine.** 1999. Presentation of the *Leishmania* antigen LACK by infected macrophages is dependent upon the virulence of the phagocytosed parasites. *Eur. J. Immun.* **29**: 762-773.

- Daba S., N.S. Mansour, F.G. Youssef, N.M. Shanbaky, M.G. Shehata, and B.M. Sawaf.** 1997a. Vector-host-parasite inter-relationships in leishmaniasis. II. Influence of blood meal from natural vertebrate hosts with and without *Leishmania infantum* and *L. major* on the proteolytic activity in the gut of *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). J. Egypt. Soc. Parasitol. **27**: 639-649.
- Daba S., N.S. Mansour, F.G. Youssef, N.M. Shanbaky, M.G. Shehata, and B.M. Sawaf.** 1997b. Vector-host-parasite inter-relationships in leishmaniasis. III. Impact of blood meal from natural vertebrate hosts on the survival and the development of *Leishmania infantum* and *L. major* in *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). J. Egypt. Soc. Parasitol. **27**: 781-794.
- Davies, C.R., A.M. Cooper, C. Peacock, R.P. Lane, and J.M. Blackwell.** 1990. Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. Parasitology **101**: 337-343.
- Descoteaux, A., Y. Luo, S.J. Turco, and S.M. Beverley.** 1995. A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. Science **269**: 1869-1872.
- Desjardins, M. and A. Descoteaux.** 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. J.Exp.Med. **185**: 2061-2068.
- Dillon, R.J. and R.P. Lane.** 1993a. Bloodmeal Digestion in the Midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. Med. Vet. Entomol. **7**: 225-232.
- Dillon, R.J. and R.P. Lane.** 1993b. Influence of *Leishmania* Infection on Blood-Meal Digestion in the Sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. langeroni*. Parasitol. Res. **79**: 492-496.
- Donnelly, K.B., H.C. Lima, and R.G. Titus.** 1998. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. J. Parasitol. **84**: 97-103.
- Doyle, P.S. and D.M. Dwyer.** 1993. *Leishmania* - Immunochemical Comparison of the Secretory (Extracellular) Acid Phosphatases from Various Species. Exp. Parasitol. **77**: 435-444.
- EIKammah, K.M.** 1973. Studies of autogeny in *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol. **10**: 261-263.
- Etges, R., J. Bouvier, R. Hoffman, and C. Bordier.** 1985. Evidence that the major surface proteins of three *Leishmania* species are structurally related. Mol. Biochem. Parasitol. **14**: 141-149.
- Etges, R., Bouvier J., and Bordier C.** 1986a. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. J. Biol. Chem. **261**: 9098-9101.
- Etges, R., Bouvier J., and Bordier C.** 1986b. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is anchored in the membrane by a myristic acid-labeled phospholipid. EMBO J. **5**: 597-601.
- Etges, R., J. Bouvier, and C. Bordier.** 1989. The promastigote surface protease of *Leishmania* pH optimum and effects of protease inhibitors, p. 627-633. In D.T. Hart (ed.), *Leishmaniasis*. Plenum Publishing Corp.,

- Etges, R.** 1992. Identification of a Surface Metalloproteinase on 13 Species of *Leishmania* Isolated from Humans, *Crithidia fasciculata*, and *Herpetomonas samuelpessoai*. *Acta Trop.* **50**: 205-217.
- Fong, D. and K.P. Chang.** 1982. Surface antigenic change during differentiation of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana*: identification by monoclonal antibodies. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **79**: 7366-7370.
- Frankenburg, S., V. Leibovici, N. Mansbach, S.J. Turco, and G. Rosen.** 1990. Effect of glycolipids of *Leishmania* parasites on human monocyte activity. Inhibition by lipophosphoglycan. *J. Immun.* **145**: 4284-4289.
- Frankenburg, S., A. Gross, and V. Leibovici.** 1992. *Leishmania major* and *Leishmania donovani* - Effect of LPG- Containing and LPG-Deficient Strains on Monocyte Chemotaxis and Chemiluminescence. *Exp.Parasitol.* **75**: 442-448.
- Gemetchu, T.** 1974. The morphology and fine structure of the midgut and peritrophic membrane of the adult female, *Phlebotomus longipes* Parrot and Martin (Diptera: Psychodidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **68**: 111-124.
- Gottlieb, M. and D.M. Dwyer.** 1982. Identification and partial characterization of an extracellular acid phosphatase activity of *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 76-81.
- Grimm, F., L. Jenni, J. Bouvier, R. Etges, and C. Bordier.** 1987. The promastigote surface protease of *Leishmania donovani* infantum in the midgut of *Phlebotomus perniciosus*. *Acta Trop.* **44**: 375-377.
- Hall, L.R. and R.G. Titus.** 1995. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J. Immunol.* **155**: 3501-6.
- Handman, E., C.L. Greenblatt, and J.W. Goding.** 1984. An amphipatic sulphated glycoconjugate of *Leishmania*: characterization with monoclonal antibodies. *EMBO J.* **3**: 2301-2306.
- Handman, E. and J.W. Goding.** 1985. The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid containing glycoconjugates. *EMBO J.* **4**: 329-336.
- Harre, J.G., K.M. Dorsey, K.L. Armstrong, J.R. Burge, K.E. Kinnamon.** 2001 Comparative fecundity and survival rates of *Phlebotomus papatasi* sandflies membrane fed on blood from eight mammal species. *Med. Vet. Entomol.* **15**: 189-196.
- Hasko, G., C. Szabo, Z.H. Nemeth, V. Kvetan, S.M. Pastores, and E.S. Vizi.** 1996. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J. Immunol.* **157**: 4634-4640.
- Hasko, G., D.G. Kuhel, Z.H. Nemeth, J.G. Mabley, R.F. Stachlewitz, L. Virag, Z. Lohinai, G.J. Southan, A.L. Salzman, and C. Szabo.** 2000. Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *J Immunol.* **164**: 1013-9.
- Hatzigeorgiou, D.E., J. Geng, B. Zhu, Y. Zhang, K. Liu, W.N. Rom, M.J. Fenton, S.J. Turco, and J.L. Ho.** 1996. Lipophosphoglycan from *Leishmania* suppresses agonist-induced interleukin 1 beta gene

- expression in human monocytes via a unique promoter sequence. *Nat. Acad. Sci. USA.* **93**: 14708-14713
- Horton, M.R., M.D. Burdick, R.M. Strieter, C. Bao, P.W. Noble.** 1998. Regulation of hyaluronan-induced chemokine gene expression by IL-10 and IFN-gamma in mouse macrophages. *J. Immunol.* **160**: 3023-30.
- Huang, C.C. and S.J. Turco.** 1993. Defective Galactofuranose Addition in Lipophosphoglycan Biosynthesis in a Mutant of *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **268**: 24060-24066.
- Ilg T., B. Menz, G. Winter, D.G. Russell, R. Etges, D. Schell, and P. Overath.** 1991. Monoclonal antibodies to *Leishmania mexicana* promastigote antigens. I. Secreted acid phosphatase and other proteins share epitopes with lipophosphoglycan. *J. Cell Sci.* **99**: 175-80.
- Ilg, T., R. Etges, P. Overath, M.J. Mcconville, J. Thomasoates, J. Thomas, S.W. Homans, and M.A.J. Ferguson.** 1992. Structure of *Leishmania mexicana* Lipophosphoglycan. *J. Biol. Chem.* **267**: 6834-6840.
- Ilg, T., D. Harbecke, and P. Overath.** 1993. The lysosomal gp63-related protein in *Leishmania mexicana* amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acidic pH optimum. *FEBS. Lett.* **327**: 103-107.
- Ilg, T., P. Overath, M.A.J. Ferguson, T. Rutherford, D.G. Campbell, and M.J. Mcconville.** 1994. O- and N-glycosylation of the *Leishmania mexicana*-secreted acid phosphatase - Characterization of a new class of phosphoserine-linked glycans. *J. Biol. Chem.* **269**: 24073-24081.
- Ilg, T., Y.D. Stierhof, M.J. Mcconville, and P. Overath.** 1995. Purification, partial characterization and immunolocalization of a proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Eur. J. Cell Biol.* **66**: 205-215.
- Ilg, T., Y.D. Stierhof, D. Craik, R. Simpson, E. Handman, and A. Bacic.** 1996. Purification and structural characterization of a filamentous, mucin-like proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* parasites. *J. Biol. Chem.* **271**: 21583-21596.
- Ilg, T., D. Craik, G. Currie, G. Multhaupt, and A. Bacic.** 1998. Stage-specific proteophosphoglycan from *Leishmania mexicana* amastigotes - Structural characterization of novel mono-, di-, and triphosphorylated phosphodiester- linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem* **273**: 13509-13523.
- Ilg, T., J. Montgomery, Y.D. Stierhof, and E. Handman.** 1999. Molecular cloning and characterization of a novel repeat-containing *Leishmania major* gene, ppg1, that encodes a membrane-associated form of proteophosphoglycan with a putative glycosylphosphatidylinositol anchor. *J. Biol. Chem.* **274**: 31410-31420.
- Ilg, T.** 2000. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Para. Today* **16**: 489-497.
- Inverso, J.A., E. Medinaacosta, J. Oconnor, D.G. Russell, and G.A.M. Cross.** 1993. *Crithidia fasciculata* Contains a Transcribed Leishmanial Surface Proteinase (gp63) Gene Homologue. *Mol. Biochem. Parasitol.* **57**: 47-54.
- Ip, H.S., A. Orn, D.G. Russell, and G.A.M. Cross.** 1990. *Leishmania mexicana mexicana* gp63 is a site-specific neutral endopeptidase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **40**: 163-172.

- Jacobson, R.L., C.L. Eisenberger, M. Svobodova, G. Baneth, J. Sztern, J. Carvalho, A. Nasereddin, M. El Fari, U. Shalom, P. Volf, J. Votypka, J.P. Dedet, F. Pratloug, G. Schonian, L.F. Schnur, C.L. Jaffe, and A. Warburg. 2003. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in northern Israel. *J. Infect. Dis.* **188**: 1065-1073.
- Jarvis, E.K. and L.C. Rutledge. 1992. Laboratory observations on mating and leklike aggregations in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* **29**: 171-177.
- Jefferies, D., J.L. Livesey, D.H. Molyneux. 1986. Fluid mechanics of bloodmeal uptake by *Leishmania*-infected sandflies. *Acta Trop.* **43**: 43-53.
- Joshi, P.B., D.L. Sacks, G. Modi, and W.R. McMaster. 1998. Targeted gene deletion of *Leishmania major* genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63). *Mol. Microbiol.* **27**: 519-530.
- Joshi, P.B., B.L. Kelly, S. Kamhawi, D.L. Sacks, and W.R. McMaster. 2002. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol. Biochem. Parasitol.* **120**: 33-40.
- Joshi, M.B., M.E. Rogers, A.M. Shakarian, M. Yamage, S.A. Al-Harhi, P.A. Bates, and D.M. Dwyer. 2005. Molecular characterization, expression, and in vivo analysis of LmexCht1: the chitinase of the human pathogen, *Leishmania mexicana*. *J. Biol. Chem.* **280**: 3847-3861.
- Kaddu, J.B. and M.J. M. 1981. *Leishmania* in Kenyan Phlebotomine sandflies. 1. *Leishmania aethiopica* in the midgut of naturally infected *Phlebotomus pedifer*. *Insect Sci. Appl.* **2**: 245-247
- Kahl, L.P. and D. McMahon-Pratt. 1987. Structural and antigenic characterization of a species- and promastigote-specific *Leishmania mexicana amazonensis* membrane protein. *J. Immunol.* **138**: 1587-1595.
- Kamhawi, S., Abdel-Hafez S.K., Molyneux D.H. 1991. The behaviour and dispersal of sandflies in Ras el Naqb, south Jordan with particular emphasis on *Phlebotomus kazeruni*. *Parassitologia.* **33**: 307-314.
- Kamhawi, S., G.B. Modi, P.F.P. Pimenta, E. Rowton, and D.L. Sacks. 2000a. The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology* **121**: 25-33.
- Kamhawi, S., Y. Belkaid, G. Modi, E. Rowton, and D. Sacks. 2000b. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* **290**: 1351-1354.
- Kamhawi, S., M. Ramalho-Ortigao, V.M. Pham, S. Kumar, P.G. Lawyer, S.J. Turco, C. Barillas-Mury, D.L. Sacks, and J.G. Valenzuela. 2004. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* **119**: 329-341.
- Katz, O., J.N. Waitumbi, R. Zer, and A. Warburg. 2000. Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **62**: 145-150.
- Kelleher, M., S.F. Moody, P. Mirabile, A.H. Osborn, A. Bacic, and E. Handman. 1995. Lipophosphoglycan blocks attachment of *Leishmania major* amastigotes to macrophages. *Infect. Immun.* **63**: 43-50.
- Killick-Kendrick, R. 1979. The biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies, p. 395-460. In W.H.R. Lumsden and D.A. Evans (eds.), *Biology of Kinetoplastida*. Academic Press, London.

- Killick-Kendrick, R.** 1985. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. *Bull.Soc.Path.Ex.* **78**: 747-755.
- Killick-Kendrick, R.** 1987. Breeding places of *Phlebotomus ariasi* in the cevennes focus of leishmaniasis in the south of France. *Parassitologia* **29**: 181-91.
- Killick-Kendrick, R.** 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol.* **17**: 279-289.
- Killick-Kendrick, R. and M. Killick-Kendrick.** 1987. The laboratory colonization of *Phlebotomus ariasi* (Diptera: Psychodidae). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **62**: 354-356.
- Killick-Kendrick, R. and D.H. Molyneux.** 1981. Transmission of leishmaniasis by the bite of phlebotomid sandflies: possible mechanisms. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **75**: 152-154.
- Killick-Kendrick, R., D.H. Molyneux, R.W. Ashford.** 1974. Ultrastructural observations on the attachment of *Leishmania* in the sandfly. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **68**:269.
- Killick-Kendrick, R., A.J. Leaney, P.D. Ready, and D.H. Molyneux.** 1977. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. *Proc.R.Soc.Lond.[Biol.]* **196**: 105-115.
- Killick-Kendrick, R., T.J. Wilkes, M. Bailly, I. Bailly, and L.A. Righton.** 1986. Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80**: 138-142.
- Killick-Kendrick, R., K.R. Wallbanks, D.H. Molyneux, and D.R. Lavin.** 1988. The ultrastructure of *Leishmania major* in the foregut and proboscis of *Phlebotomus papatasi*. *Parasitol. Res.* **74**: 586-590.
- Klein, C., U. Gopfert, N. Goehring, Y.D. Stierhof, and T. Ilg.** 1999. Proteophosphoglycans of *Leishmania mexicana*. Identification, purification, structural and ultrastructural characterization of the secreted promastigote proteophosphoglycan pPPG2, a stage-specific glycoisoform of amastigote aPPG. *Biochem. J.* **344**: 775-786.
- Kweider, M., J. Lemesre, F. Darcy, J.P. Kusnierz, A. Capron, and F. Santoro.** 1987. Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65000 dalton surface antigen. *J. Immunol.* **138**: 299-305.
- Lainson, R. and J.J. Shaw.** 1987. Evolution, classification and geographical distribution, p. 1-120. In W. Peters and R. Killick-Kendrick (eds.), *The leishmaniasis in biology and medicine*. Academic Press, London.
- Lane, R.P.** 1993. Sandflies (Phlebotominae), p. 79-119. In R.P. Lane and R.W. Crosskey (eds.), *Medical insects and arachnids*. London: Chapman & Hall
- Lane, R.P., M.M. Pile , F.P. Amerasinghe.** 1990. Anthropophagy and aggregation behaviour of the sandfly *Phlebotomus argentipes* in Sri Lanka. *Med. Vet. Entomol.* **4**: 79-88.
- Lanzaro, G.C., A.H.C.S. Lopes, J.M.C. Ribeiro, C.B. Shoemaker, A. Warburg, M. Soares, and R.G. Titus.** 1999. Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Insect Mol. Biol.* **8**: 267-275.

- Lawyer, P.G. and D.G. Young.** 1987. Experimental transmission of *Leishmania mexicana* to hamsters by bites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from the United States. *J Med Entomol.* **24**(4): 458-62.
- Lawyer, P.G., P.M. Ngumbi, C.O. Anjili, S.O. Odongo, Y.M. Mebrathu, J.I. Githure, D.K. Koech, and C.R. Roberts.** 1990. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop.Med.Hyg.* **43**: 31-43.
- Lawyer, P.G., Y.B. Mebrahtu, P.M. Ngumbi, J.P. Mwanyumba, J. Mbugua, G. Kiilu, D. Kipkoech, J. Nzouu, and C.O. Anjili.** 1991. *Phlebotomus guggisbergi* (Diptera: Psychodidae), a vector of *Leishmania tropica* in Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **44**: 290-298.
- Leaney, A.J.** 1977. The effect of temperature on *Leishmania* in sandflies. *Parasitology* **75**: 28-29
- Lerner, E.A., J.M.C. Ribeiro, R.J. Nelson, and M.R. Lerner.** 1991. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J. Biol. Chem.* **266**: 11234-11236.
- Lewis, D.J.** 1973 *Phlebotominae and Psychodidae (Sand-flies & Moth-flies.* Pp.: 155 – 179. In: SMITH K.G.V. (ed.): *Insects and Other Arthropods of Medical Importance.* London: British Museum, 561pp.
- Lewis, D.J.** 1982. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bull.Br.Mus.nat.Hist.(Ent.)* **45**:121-209.
- Lima, H.C. and R.G. Titus.** 1996. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect. Immun.* **64**: 5442-5445.
- Lira, R., S. Mendez, L. Carrera, C. Jaffe, F. Neva, and D. Sacks.** 1998. *Leishmania tropica*: The identification and purification of metacyclic promastigotes and use in establishing mouse and hamster models of cutaneous and visceral disease. *Exp. Parasitol.* **89**: 331-342.
- Liu, X. and K.P. Chang.** 1992. Extrachromosomal Genetic Complementation of Surface Metalloproteinase (gp63)-Deficient *Leishmania* Increases Their Binding to Macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4991-4995.
- Lo, S.K., L. Bovis, R. Matura, B.X. Zhu, S.H. He, H. Lum, S.J. Turco, and J.L. Ho.** 1998. *Leishmania* lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: Modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractants. *J. Immunol.* **160**: 1857-1865.
- Lovelace, J.K., D.M. Dwyer, M. Gottlieb.** 1986. Purification and characterization of the extracellular acid phosphatase of *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **20**: 243-251.
- Lukes, J. and J. Votypka.** 2000. *Trypanosoma avium*: Novel features of the kinetoplast structure. *Exp. Parasitol.* **96**: 178-181.
- Lukes, J., D.L. Guilbride, J. Votypka, A. Zikova, R. Benne, and P.T. Englund.** 2002. Kinetoplast DNA network: Evolution of an improbable structure. *Eukaryotic Cell* **1**: 495-502.
- Ma, D., D.G. Russell, S.M. Beverley, and S.J. Turco.** 1997. Golgi GDP-mannose uptake requires *Leishmania* LPG2. *J. Biol. Chem.* **272**: 3799-3805.

- Mbow, M.L., J.A. Bleyenbergh, L.R. Hall, and R.G. Titus.** 1998. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. J. Immun. **161**: 5571-5577.
- McConville, M.J. and J.M. Blackwell.** 1991. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. J. Biol. Chem. **266**: 15170-15179.
- McConville, M.J., S.W. Homans, J.E. Thomas-Oates, A. Dell, and A. Bacic.** 1990. Structures of the glycoinositolphospholipids from *Leishmania major*. A family of novel galactofuranose-containing glycolipids. J. Biol. Chem. **265**: 7385-7394.
- McConville, M.J. and A. Bacic.** 1990. The glycoinositolphospholipid profiles of two *Leishmania major* strains that differ in lipophosphoglycan expression. Mol. Biochem. Parasitol. **38**: 57-67.
- McConville, M.J. and A. Bacic.** 1989. A family of glycoinositol phospholipids from *Leishmania major*. Isolation, characterization, and antigenicity. J. Biol. Chem. **264**: 757-66.
- McConville, M.J.** 1991. Glycosylated-phosphatidylinositols as virulence factors in *Leishmania*. Cell Biol. Int. Rep. **15**: 779-98.
- McConville, M.J., J.E. Thomas-Oates, M.A.J. Ferguson, and S.W. Homans.** 1990. Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. J. Biol. Chem. **265**: 19611-19623.
- McConville, M.J., S.J. Turco, M.A.J. Ferguson, and D.L. Sacks.** 1992. Developmental Modification of Lipophosphoglycan During the Differentiation of *Leishmania major* Promastigotes to an Infectious Stage. EMBO.J. **11**: 3593-3600.
- McConville, M.J. and S.W. Homans.** 1992. Identification of the Defect in Lipophosphoglycan Biosynthesis in a Non-Pathogenic Strain of *Leishmania major*. J. Biol. Chem. **267**: 5855-5861.
- McConville, M.J., L.F. Schnur, C. Jaffe, and P. Schneider.** 1995. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: Inter- and intra-specific polymorphism in old world species. Biochem. J. **310**: 807-818.
- McConville, M.J.** 1991. Glycosylated-phosphatidylinositols as virulence factors in *Leishmania*. Cell Biol. Int. Rep. **15**: 779-798.
- McConville, M.J. and J.M. Blackwell.** 1991. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. J. Biol. Chem. **266**: 15170-15179.
- McGwire, B. and K.P. Chang.** 1994. Genetic rescue of surface metalloproteinase (gp63)- deficiency in *Leishmania amazonensis* variants increases their infection of macrophages at the early phase. Mol. Biochem. Parasitol. **66**: 345-347.
- McGwire, B.S., W.A. O'Connell, K.P. Chang, and D.M. Engman.** 2002. Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis - Implications for parasite virulence. J. Biol. Chem. **277**: 8802-8809.

- McGwire, B.S., K.P. Chang, and D.M. Engman.** 2003. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Inf. Immun.* **71**: 1008-1010.
- McMaster, W.R., C.J. Morrison, M.H. Macdonald, and P.B. Joshi.** 1994. Mutational and functional analysis of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63: Similarities to matrix metalloproteinases. *Parasitology.* **108**: S29-S36
- McNeely, T.B. and S.J. Turco.** 1990. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *J. Immunol.* **144**: 2745-2750.
- McNeely, T.B., G. Rosen, M.V. Londner, and S.J. Turco.** 1989. Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochem. J.* **259**: 601-604.
- McKee, C.M., C.J. Lowenstein, M.R. Horton, J. Wu, C. Bao, B.Y. Chin, A.M. Choi, and P.W. Noble.** 1997. Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor kappaB-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **272**: 8013-8.
- Mendez, S., F.J. Fernandez-Perez, C. De la Fuente, M. Cuquerella, M.T. Gomez-Munoz, and J.M. Alunda.** 1999. Partial anaerobiosis induces infectivity of *Leishmania infantum* promastigotes. *Parasitol. Res.* **85**: 507-509.
- Molyneux, D.H and D. Jefferies.** 1986. Feeding behaviour of pathogen-infected vectors. *Parasitology.* **92**: 721-36.
- Molyneux, D.H. and R. Killick-Kendrick.** 1987. Morphology, ultrastructure and life cycles, p. 121-176. In W. Peters and R. Killick-Kendrick (eds.), *The leishmaniasis in biology and medicine.* Academic Press, London.
- Moody, S.F.** 1993. Molecular Variation in *Leishmania*. *Acta Trop.* **53**: 185-204.
- Moore, J.S., T.B. Kelly, R. Killick-Kendrick, M. Killick-Kendrick, K.R. Wallbanks, and D.M. Molyneux.** 1987. Honeydew sugars in wild-caught *Phlebotomus ariasi* detected by high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC). *Med. Vet. Entomol.* **1**: 427-434.
- Mosser, D.M., and Edelson P.J.** 1985. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J. Immunol.* **135**: 2785-2789.
- Mosser, D.M., H. Vlassara, P.J. Edelson, and A. Cerami.** 1987. *Leishmania* promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation endproducts. *J. Exp. Med.* **165**: 140-145.
- Mosser, D.M., T.A. Springer, and M.S. Diamond.** 1992. *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell Biol.* **116**: 511-520.
- Murray, P.J., T.W. Spithill, E. Handman.** 1989. The PSA-2 glycoprotein complex of *Leishmania major* is a glycosylphosphatidylinositol-linked promastigote surface antigen. *J. Immunol.* **143**: 4221-6.
- Noyes, H.** 1998. Can Trypanosoma trees be trusted? *Parasitol. Today* **14**: 49-50.

- Oliveira, J.S., M.N. Melo, and N.F. Gontijo.** 2000. A sensitive method for assaying chemotactic responses of *Leishmania* promastigotes. *Exp. Parasitol.* **96**: 187-189.
- Oliveira, S.M., R.C.D. Afonso, C. Maria, G. Dias, and R.P. Brazil.** 1994. Description of a new species of sand fly *Lutzomyia (Pressatia) mamedei* n.sp. (Diptera: Psychodidae) from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **89**: 319-320.
- Opat, A., K. Ng, G. Currie, E. Handman, and A. Bacic.** 1996. Characterization of lipophosphoglycan from a Ricin-resistant mutant of *Leishmania major*. *Glycobiology.* **6**: 387-397.
- Overath, P. and T. Aebischer.** 1999. Antigen presentation by macrophages harboring intravesicular pathogens. *Parasitol. Today* **15**: 325-332.
- Peters, C., Y.D. Stierhof, and T. Ilg.** 1997. Proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes causes vacuole formation in macrophages. *Infect. Immun.* **65**: 783-786.
- Piani, A., T. Ilg, A.G. Elefanty, J. Curtis, and E. Handman.** 1999. *Leishmania major* proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function. *Microbes And Infection* **1**: 589-599.
- Pimenta, P.F.P., E.M.B. Saraiva, and D.L. Sacks.** 1991. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Exp. Parasitol.* **72**: 191-204.
- Pimenta, P.F.P., S.J. Turco, M.J. Mcconville, P.G. Lawyer, P.V. Perkins, and D.L. Sacks.** 1992. Stage-Specific Adhesion of *Leishmania* Promastigotes to the Sandfly Midgut. *Science* **256**: 1812-1815.
- Pimenta, P.F.P., E.M.B. Saraiva, E. Rowton, G.B. Modi, L.A. Garraway, S.M. Beverley, S.J. Turco, and D.L. Sacks.** 1994. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 9155-9159.
- Pimenta, P.F.P., G.B. Modi, S.T. Pereira, M. Shahabuddin, and D.L. Sacks.** 1997. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* **115**: 359-369.
- Proudfoot, L., C.A. Odonnell, and F.Y. Liew.** 1995. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* **25**: 745-750.
- Proudfoot, L., A.V. Nikolaev, G.J. Feng, X.Q. Wei, M.A.J. Ferguson, J.S. Brimacombe, and F.Y. Liew.** 1996. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 10984-10989.
- Puentes, S.M., R.P. DaSilva, D.L. Sacks, C.H. Hammer, and K.A. Joiner.** 1990. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J. Immunol.* **145**: 4311-4316.
- Quate, L.W.** 1964. Phlebotomus sandflies of the Paloich area in the Sudan (Diptera, Psychodidae). *J. Med. Entomol.* **1**:213-268.
- Ramalho-Ortigao, J.M. and Y.M. Traub-Cseko.** 2003. Molecular characterization of Lchit1, a midgut chitinase cDNA from the

- leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*. Insect Bio. Mol. Biol. **33**: 279-287.
- Ribeiro, J.M.C.** 1987. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. Ann. Rev. Entom. **32**: 463-478.
- Ribeiro, J.M.C.** 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? Infect. Agent. Dis. **4**: 143-152.
- Ribeiro, J.M., O. Katz, L.K. Pannell, J. Waitumbi, and A. Warburg.** 1999. Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. J. Exp. Biol. **202**: 1551-1559.
- Ribeiro, J.M.C., R. Charlab, E.D. Rowton, and E.W. Cupp.** 2000. Simulium vittatum (Diptera : Simuliidae) and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera : Psychodidae) salivary gland hyaluronidase activity. J. Med. Ent. **37**: 743-747.
- Rizvi, F.S., M.A. Ouaisi, B. Marty, F. Santoro, A. Capron.** 1988. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a fibronectin-like molecule. Eur. J. Immunol. **18**: 473-476.
- Rogers, M.E., M.L. Chance, and P.A. Bates.** 2002. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Parasitology **124**: 495-507.
- Rogers, M.E., T. Ilg, A.V. Nikolaev, M.A.J. Ferguson, and P.A. Bates.** 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. Nature **430**: 463-467.
- Russell, D.G.** 1987. The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant c3-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes. Eur. J. Biochem. **164**: 213-221.
- Russell, D.G., and H. Wilhelm.** 1986. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. J. Immunol. **136**: 2613-2620.
- Russell, D.G., and S.D. Wright.** 1988. Complement receptor type 3 (CR 3) binds to an arg-gly-asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp 63, of *Leishmania* promastigotes. J. Exp. Med. **168**: 279-292.
- Ryan, K.A., L.A. Garraway, A. Descoteaux, S. J. Turco, and S.M. Beverley.** 1993. Isolation of virulence genes directing surface glycosylphosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*. Natl. Acad. Sci. USA. **90**: 8609-8613.
- Sacks, D. and S. Kamhawi.** 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. Annu. Rev. Microbiol. **55**: 453-83.
- Sacks, D.L., T. Brodin, and S.J. Turco.** 1990. Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. Mol. Biochem. Parasitol. **42**: 225-234.
- Sacks, D.L., E.M. Saraiva, E. Rowton, S.J. Turco, and P.F. Pimenta.** 1994. The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. Parasitology. **108**: S55-S62
- Sacks, D.L., P.F.P. Pimenta, M.J. Mcconville, P. Schneider, and S.J. Turco.** 1995. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand

- fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* **181**: 685-697.
- Sacks, D.L., G. Modi, E. Rowton, G. Spath, L. Epstein, S.J. Turco, and S.M. Beverley.** 2000. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 406-411.
- Sadlova, J.** 1999. The life history of *Leishmania* (kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta Soc. Zool. Bohem.* **63**: 331-366.
- Sadlova, J. and P. Volf.** 1999. Occurrence of *Leishmania major* in sandfly urine. *Parasitology* **118**: 455-460.
- Samuelson J., E. Lerner, R. Tesh, R. Titus.** 1991. A mouse model of *Leishmania braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J. Exp. Med.* **173**: 49-54.
- Saraiva, E.M.B., P.F.P. Pimenta, T.N. Brodin, E. Rowton, G.B. Modi, and D.L. Sacks.** 1995. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology.* **111**: 275-287.
- Service, M.W.** 1996. Phlebotominae sandflies (Phlebotominae). Pp. 95-103. In.: *Medical Entomology for Students*. London: Chapman & Hall.
- Schlein, Y.** 1993. *Leishmania* and Sandflies - Interactions in the Life Cycle and Transmission. *Parasitol. Today.* **9**: 255-258.
- Schlein, Y. and H. Romano.** 1986. *Leishmania major* and *L. donovani*: effects on proteolytic enzymes of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *Exp. Parasitol.* **62**: 376-380.
- Schlein, Y. and R.L. Jacobson.** 1994. Haemoglobin inhibits the development of infective promastigotes and chitinase secretion in *Leishmania major* cultures. *Parasitology.* **109**: 23-28.
- Schlein, Y. and R.L. Jacobson.** 1998. Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloodmeal. *Parasitology* **117**: 467-473.
- Schlein, Y. and A. Warburg.** 1986. Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *J. Med. Entomol.* **23**: 11-15.
- Schlein, Y., S. Borut, and R.L. Jacobson.** 1990a. Oviposition diapause and other factors affecting the egg-laying of *Phlebotomus papatasi* in the laboratory. *Med. Vet. Entomol.* **4**: 69-78.
- Schlein, Y., L.F. Schnur, and R.L. Jacobson.** 1990b. Released glycoconjugate of indigenous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**: 353-355.
- Schlein, Y., R.L. Jacobson, and J. Shlomai.** 1991. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proc. R. Soc. Lond.* **245**: 121-126.
- Schlein, Y., R.L. Jacobson, and G. Messer.** 1992. *Leishmania* Infections Damage the Feeding Mechanism of the Sandfly Vector and Implement Parasite Transmission by Bite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9944-9948.
- Schneider, P., J.P. Rosat, A. Ransijn, M.A.J. Ferguson, and M.J. Mcconville.** 1993. Characterization of Glycoinositol Phospholipids in the Amastigote Stage of the Protozoan Parasite *Leishmania major*. *Biochem. J.* **295**: 555-564.

- Shahabuddin, M., T. Toyoshima, M. Aikawa, and D.C. Kaslow.** 1993. Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **90**: 4266-4270.
- Shakarian, A.M. and D.M. Dwyer.** 1998. The *Ld Cht1* gene encodes the secretory chitinase of the human pathogen *Leishmania donovani*. *Gene*. **208**: 315-22.
- Shakarian, A.M. and D.M. Dwyer.** 2000a. Pathogenic *Leishmania* secrete antigenically related chitinases which are encoded by a highly conserved gene locus. *Exp. Parasitol.* **94**: 238-242.
- Shakarian, A.M. and D.M. Dwyer.** 2000b. Structurally conserved soluble acid phosphatases are synthesized and released by *Leishmania major* promastigotes. *Exp. Parasitol.* **95**: 79-84.
- Shaw, J.J.** 1994. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz* **89**: 471-478
- Soares, M.B.P., R.G. Titus, C.B. Shoemaker, J.R. David, and M. Bozza.** 1998. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *J. Immunol.* **160**: 1811-1816.
- Sorensen, A.L., A.S. Hey, and A. Kharazmi.** 1994. *Leishmania major* surface protease Gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. *APMIS.* **102**: 265-271.
- Spath, G.F., L. Epstein, B. Leader, S.M. Singer, H.A. Avila, S.J. Turco, and S.M. Beverley.** 2000. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 9258-9263.
- Stierhof, Y.D., T. Ilg, D.G. Russell, H. Hohenberg, and P. Overath.** 1994. Characterization of Polymer Release from the Flagellar Pocket of *Leishmania mexicana* Promastigotes. *J. Cell Biol.* **125**: 321-331.
- Stierhof, Y.D., M. Wiese, T. Ilg, P. Overath, M. Haner and U. Aebi.** 1998. Structure of a filamentous phosphoglycoprotein polymer: the secreted acid phosphatase of *Leishmania mexicana*. *J. Mol. Biol.* **282**:137-148.
- Stierhof, Y.D., P.A. Bates, R.L. Jacobson, M.E. Rogers, Y. Schlein, E. Handman, and T. Ilg.** 1999. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *Eur. J. Cell Biol.* **78**: 675-689.
- Svobodova, M., P. Volf, R. Killick-Kendrick.** 1996. Agglutination of *Leishmania* promastigotes by midgut lectins from various species of phlebotomine sandflies. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **90**: 329-36.
- Talamas-Rohana, P., S.D. Wright, M.R. Lennartz, and D.G. Russell.** 1990. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150,95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. *J. Immunol.* **144**: 4817-4824.
- Tang, Y., R.D. Ward.** 1998. Sugar feeding and fluid destination control in the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Med. Vet. Entomol.* **12**: 13-19.

- Theodos, C.M. and R.G. Titus.** 1993. Salivary Gland Material from the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* Has an Inhibitory Effect on Macrophage Function In vitro. *Parasite Immunol.* **15**: 481-487.
- Theodos, C.M., J.M.C. Ribeiro, and R.G. Titus.** 1991. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infect. Immun.* **59**: 1592-1598.
- Thomas, J.R., M.J. McConville, J.E. Thomas-Oates, S.W. Homans, M.A. Ferguson, P.A. Gorin, K.D. Greis and S.J. Turco.** 1992. Refined structure of the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **267**: 6829-33.
- Thomaz-Soccol, V., G. Lanotte, J.A. Rioux, F. Pratlong, A. Martinidumas, and E. Serres.** 1993. Monophyletic Origin of the Genus *Leishmania* Ross, 1903. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **68**: 107-108.
- Titus, R.G. and J.M.C. Ribeiro.** 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* **239**: 1306-1308.
- Turco, S.J. and A. Descoteaux.** 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 65-94.
- Tzinia, A.K. and K.P. Soteriadou.** 1991. Substrate-dependent pH optima of gp63 purified from seven strains of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **47**: 83-89.
- Valenzuela, J.G., Y. Belkaid, M.K. Garfield, S. Mendez, S. Kamhawi, E.D. Rowton, D.L. Sacks, and J.M.C. Ribeiro.** 2001. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: Characterization of a protective salivary protein. *J. Exp. Med.* **194**: 331-342.
- Volf, P., A. Kiewegova, and M. Svobodova.** 1998. Sandfly midgut lectin: effect of galactosamine on *Leishmania major* infections. *Med. Vet. Entomol.* **12**: 151-154.
- Volf, P., S. Skarupova, and P. Man.** 2002. Characterization of the lectin from females of *Phlebotomus duboscqi* sand flies. *Biochem.* **269**: 6294-301.
- Voth, B.R., B.L. Kelly, P.B. Joshi, A.C. Ivens, and W.R. McMaster.** 1998. Differentially expressed *Leishmania major* gp63 genes encode cell surface leishmanolysin with distinct signals for glycosylphosphatidylinositol attachment. *Mol. Biochem. Parasitol.* **93**: 31-41.
- Wallbanks, K.R., G.A. Ingram, D.H. Molyneux.** 1986. The agglutination of erythrocytes and *Leishmania* parasites by sandfly gut extracts: evidence for lectin activity. *Trop. Med. Parasitol.* **37**: 409-13.
- Walters, L.I.** 1993. *Leishmania* Differentiation in Natural and Unnatural Sand Fly Hosts. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**: 196-206.
- Walters, L.I., G.B. Modi, R.B. Tesh, and T. Burrage.** 1987. Host-parasite relationship of *Leishmania mexicana mexicana* and *Lutzomyia abonnenci* (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **36**: 294-314.
- Walters, L.I., G.L. Chaplin, G.B. Modi, and R.B. Tesh.** 1989a. Ultrastructural biology of *Leishmania (Viannia) panamensis* (= *Leishmania braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**: 19-39.

- Walters, L.I., G.B. Modi, G. Chaplin, and R.B. Tesh.** 1989b. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **41**: 295-317.
- Walters, L.I., K.P. Irons, G.B. Modi, and R.B. Tesh.** 1992. Refractory barriers in the sandfly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to infection with *Leishmania panamensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **46**: 211-228.
- Walters, L.I., K.P. Irons, H. Guzman, and R.B. Tesh.** 1993a. Formation and Composition of the Peritrophic Membrane in the Sand Fly, *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae). *J. Med. Entomol.* **30**: 179-198.
- Walters, L.I., K.P. Irons, G. Chaplin, and R.B. Tesh.** 1993b. Life Cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Neotropical Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). *J. Med. Entomol.* **30**: 699-718.
- Warburg, A. and Y. Schlein.** 1986. The effect of postbloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**: 926-930.
- Warburg, A., G.S. Hamada, Y. Schlein, and D. Shire.** 1986. Scanning electron microscopy of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Z. Parasitenkd.* **72**: 423-431.
- Ward, R.D. and I.E. Morton.** 1991. Pheromones in mate choice and sexual isolation between siblings of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). *Parassitologia.* **33**: 527-533.
- Ward, R.D., J.G.C. Hamilton, M. Dougherty, and A.L. Falcao.** 1991. Pheromones in Old and New World Sandflies (Diptera, Psychodidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **85**: 667-668.
- Wilson, M.E. and R.D. Pearson.** 1986. Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. *J. Immun.* **136**: 4681-4688.
- Wyler, D.J., J.P. Sypek, and J.A. McDonald.** 1985. In vitro parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: possible role of fibronectin in parasite attachment. *Infect. Immun.* **49**: 305-311.
- Young D.C. and P.V. Perkins.** 1984. Phlebotomine sand flies of North America (Diptera: Psychodidae). *J. Amer. Mosquito Cont.* **44**: 263-304
- Yuval B., A. Warburg and Y. Schlein.** 1988. Leishmaniasis in the Jordan Valley. V. Dispersal characteristics of the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Med. Vet. Entomol.* **2**: 391-395.
- Zakai, H.A., M.L. Chance, and P.A. Bates.** 1998. In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. *Parasitology* **116**: 305-309.
- Zufferey, R., S. Allen, T. Barron, D.R. Sullivan, P.W. Denny, I.C. Almeida, D.F. Smith, S.J. Turco, M.A. Ferguson and S.M. Beverley.** 2003. Ether phospholipids and glycosylinositolphospholipids are not required for amastigote virulence or for inhibition of macrophage activation by *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* **278**: 44708-44718.

7. Příloha

- 7.1. **Secundino, N.F.C., Nacif-Pimenta, R., Hajmova, M., Volf, P., Pimenta, P.F.P.** 2005. Midgut muscle network in *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus duboscqi* sand flies: spatial organization and structural modification after blood meal. *Arthropod Structure & Development* **34**: 167-178



Midgut muscle network in *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus duboscqi* sand flies: spatial organization and structural modification after blood meal

N.F.C. Secundino^a, R. Nacif-Pimenta^a, M. Hajmova^b, P. Volf^b, P.F.P. Pimenta^{a,*}

^aLaboratory of Medical Entomology, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz-MG, Av. Augusto Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP, Brazil

^bDepartment of Parasitology, Faculty of Sciences Charles University, Vinicna 7 128 44 Prague 2, Czech Republic

Received 25 May 2004; received in revised form 27 September 2004; accepted 13 December 2004

Abstract

Sand flies are leishmaniasis vectors in vertebrates including man, from whom female flies get their blood meal to have their eggs developed. Hematophagy is an exclusive behavior of females, which have the blood meal stored and digested in their midgut. The physiology and fly alimentary tract greatly influences its vectorial capacity in transmitting diseases since the pathogens are ingested with the blood meal. We describe and compare the spatial organization and the modifications of the midgut muscle fibers after the blood meal process of two leishmaniasis vectors, *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus duboscqi*. Muscular components are placed in the entire midgut region as transverse and longitudinal fibers forming a well-arranged muscle network. The muscle fibers are striated due to the alignment of the actin filaments demonstrated by Phalloidin labeling. The thoracic midguts do not distend after blood meal and do not change the arrangement of muscle networks. On the other hand, abdominal midguts suffer several modifications in the muscle network organization, which are related to the blood meal passage. After the digestion of the blood meal has finished, the muscle fibers of the *P. duboscqi* midgut returned to a better-reorganized muscle network than those of *L. longipalpis*. Knowledge on the structure of the sand fly midgut muscles is important for a better understanding of the organ physiology and events accompanying disease transmission by these insects. © 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Muscle network; Actin; Leishmaniasis vectors

Introduction

Sand flies of the genera *Lutzomyia* and *Phlebotomus* are leishmaniasis vectors, important infectious diseases in tropical and subtropical regions. Sand flies are able to feed on plant nectars and vertebrate blood, but hematophagy is an essential and exclusive behavior of females, which need the blood meal to have their eggs developed. During blood ingestion, the sand fly gut can be exposed to pathogens like helminthes, bacteria, viruses and protozoa. Several pathogens like *Leishmania*

can adapt to the gut environment of some sand fly species and be transmitted from one vertebrate to another (Schlein and Romano, 1986; Pimenta et al., 1982; 1994; 1997a,b; Dillon and Lane, 1993a,b; Schlein and Jacobson, 1998; Nieves and Pimenta, 2000; 2002). Therefore, the physiology of sand fly alimentary tract may greatly influence its vectorial capacity in transmitting diseases.

The alimentary tract of insects is generally divided into three regions: foregut, midgut and hindgut (for review see Billingsley, 1990). The midgut itself can be divided into two topographic regions, according to their location: thoracic and abdominal midguts (Billingsley and Lehane, 1996). Histological studies have shown that the sand fly midgut is composed by a columnar single epithelium of microvillar cells supported by a basal membrane. This membrane forms a continuous sheet

*Corresponding author. Tel.: +55 31 295 3566; fax: +55 31 295 3115.
E-mail address: pimenta@cpqrr.fiocruz.br (P.F.P. Pimenta).

0039-1039/\$ - see front matter © 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.asd.2005.01.002



neath the epithelium, which is surrounded by muscle fibers (Gemetchu, 1974; Rudin and Hecker, 1982). The junctions of these muscle fibers are related with distension and contraction of the organ, as well as the peristaltic movement control, which determines the functional compartmentalization of the food passage throughout the alimentary tract.

Sand flies, like mosquitoes, store and digest blood meal in the midgut. In mosquito vectors of human diseases, some investigations have shown distinct structural aspects of the muscle fiber network over the external side of the midgut. Schaeffer et al. (1967), using transmission electron microscopy, described in *Anopheles quadrimaculatus* midgut a network of longitudinal and circular fibers composed of myosin filaments surrounded by actin ones. Recently, Sark and Shahabuddin (2000) have compared the structural organization and modification of the midgut muscle fibers during blood meal ingestion in *Aedes aegypti* and *Anophelesambiae*. There is no similar information on sand flies. Immediately after the blood ingestion, the sand fly midgut expands about five times its original volume to accommodate a large amount of meal, but after 2–6 days, as a result of the digestion and excretion processes, the organ returns to its original shape (Nieves and Pimenta, 2002). How the sand fly midgut is adapted to such large variation is unknown. The muscles surrounding the midgut have to regulate their configuration to adapt its shape during the feeding process. Indeed, the structural organization and changes in the midgut muscles of the sand fly, during the ingestion and digestion of the blood meal, have not drawn attention up to the present moment and no investigation has yet raised this issue.

In the current work, we are aimed at studying how the sand fly midgut proceeds to keep changes related with the hematophagy behavior. To do so, we have compared the spatial organization and the modifications of the midgut muscle fibers in blood-fed sand flies, *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus duboscqi*. These are two important zoonotic vectors in the New and Old World, respectively. We have used two parallel techniques: fluorescent phalloidin as a marker for actin filaments to unveil muscle fibers under fluorescence microscopy and the scanning electron microscopy to show the topography of the muscle fibers on the midgut. In fact, we show a number of novel features of the muscle arrangement concerning the midgut junction.

2. Material and methods

2.1. Sand flies

Lutzomyia longipalpis colony (origin Lapinha cave, 35 km from Belo Horizonte) and *P. duboscqi* colony (origin Senegal) were maintained in standard conditions. Young females (3–4 days-old *L. longipalpis* and 5–6 days-old *P. duboscqi*) were fed on anesthetized hamsters. The fully engorged ones were separated and maintained on 50% sucrose ad libitum at 25 °C.

2.2. Midgut dissection and fixation

The sand fly midguts were dissected in phosphate buffer saline (PBS) solution, pH 7.2, unfed or at different periods after blood meal up to the time of complete digestion (72 h for *L. longipalpis* and 96 h for *P. duboscqi*). The samples were fixed in 4% formaldehyde solution in PBS buffer for the actin labeling or in 2.5% glutaraldehyde solution in 0.1 M cacodylate buffer for scanning electron microscopy. The samples were incubated in the fixatives at room temperature for 2 h and stored in PBS buffer at 4 °C until processing (Pimenta and De Souza, 1983).

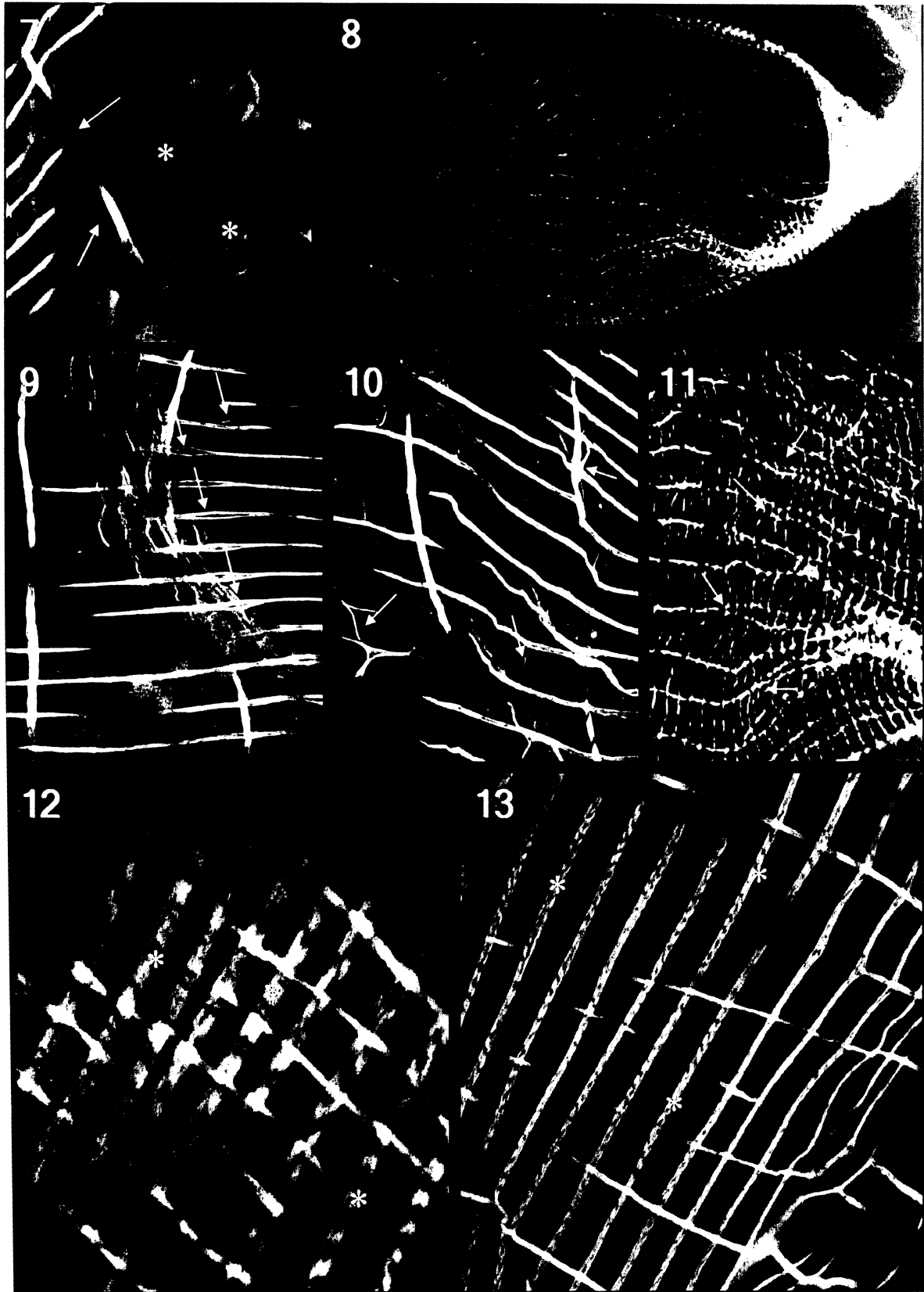
2.3. Actin labeling

The formaldehyde-fixed midguts were washed three times with PBS buffer and incubated in fluorescent Phalloidin-Alexia® (Molecular Probes, Eugene, OR) diluted in the same buffer (1:100) for 1 h in the dark on ice. After incubation, the samples were washed several times in the same buffer, mounted with Vectashield® medium (Vector) and observed under fluorescence microscope.

2.4. Scanning electron microscopy (SEM)

The samples were processed as described previously (Pimenta and De Souza, 1983; Secundino and Pimenta, 1999). Briefly, the glutaraldehyde-fixed midguts were washed three times in PBS and post-fixed in 1% osmium tetroxide solution in 0.8% potassium ferricyanide and 0.1 M cacodylate buffer at pH 7.2. The samples were dehydrated in a graded acetone series, dried by critical point method

Fig. 1–6. Fluorescent midguts labeled with Phalloidin. Views of unfed blood midguts. Fig. 1: Observe the structural array of the muscle fibers forming a muscle network over the entire organ in *L. longipalpis*. Th, thoracic midgut; Ab, Abdominal midgut. Magnification: 350×. Fig. 2: Details of the thoracic regions of *L. longipalpis*, showing the presence of more compacted fibers in this region. Magnification: 650×. Fig. 3: Observe the structural array of the muscle fibers forming a muscle network over the entire organ in *P. duboscqi*. Magnification: 350×. Fig. 4: Fluorescent midguts labeled with Phalloidin. Details of the thoracic regions of *P. duboscqi*, showing the presence of more compacted fibers in this region. The muscle fibers have a special array in the globular area of the tomodaeal valve, which separate the abdominal midgut from the anterior gut. Magnification: 700×. Fig. 5: Fluorescent midguts labeled with Phalloidin. Aspect of the cytoskeleton of the midgut epithelial cells (asterisks) beneath the muscle fibers (arrows). Magnification: 700×. Fig. 6: Thirty-minute blood-fed midguts of *L. longipalpis*, it is possible to observe a completely stretched muscle network with a concentric array surrounding the pyloric region (Pt). Magnification: 350×.



sing liquid CO₂, coated with gold and analyzed by SEM JEOL JSM 5600).

3.5. Morphometry

The whole midguts and details of actin labeled muscle fibers were measured under optical or fluorescence microscope, using a microscopic scale. Measurements and SEM pictures of the midguts and their muscle fibers were carried out with an analytical software program from SEM (JEOL JSM 5600).

3. Results

The organization of the muscle network in the sand fly midguts was analysed immediately after blood meal ingestion until its complete digestion, following the periods up to 72 h for *L. longipalpis* and up to 96 h for *P. duboscqi*, since they finished their digestive processes at different times.

3.1. Actin labeled muscle fibers

The fluorescent Phalloidin labeled the sand fly muscle fibers demonstrating the presence of actin filaments. In the unfed midgut of both sand fly species, the muscle fibers formed a network over the entire midgut (Figs. 1 and 3). The network was more compact in the thoracic midgut (Figs. 2 and 4) and was composed of circular fibers forming a ring around the organ and the longitudinal fibers disposed as a continuous tape over the circular ones (Figs. 1–4 and 6). The circular fibers appeared to be thicker and sometimes composed by two units with a small bifurcation joining two rings, distinctly from the thinner single longitudinal fibers (Figs. 2 and 4). The muscle fibers revealed that the sarcomeres are organized in parallel arrays and double helix structures. In the thoracic midgut (Figs. 2 and 4), they appeared individualized mainly in the circular fibers, since these are less stretched in this region. In some midguts, the actin labeled cytoskeleton of epithelial cells was seen beneath the muscle fibers (Fig. 5).

In blood-fed females of both species, the thoracic midguts did not change their volume after the blood

ingestion (not shown). The muscle fibers in this region have the same appearance when compared with the unfed sand flies. In contrast, the muscle fibers of the abdominal midguts changed, depending on the period after the blood meal. At 30 min after the blood meal, the muscle network was completely extended and concentric arrays of circular fibers were seen in the pylorus region (Fig. 6). Under large magnification, it was also possible to distinguish the polygonal epithelial cells, which were more extended than in the unfed midguts (Fig. 7).

At 3–24 h after the blood meal, the muscle network appeared to be well formed but the muscle fibers were less extended (Figs. 8–11). Tiny actin filaments connected the circular fibers but were absent in the longitudinal ones (Fig. 10). The nuclei of muscle cells were seen in the circular fibers (Fig. 9) and the epithelial cells with polygonal shapes were visualized beneath the muscle fibers (Figs. 9 and 10). The longitudinal fibers of the *P. duboscqi* midguts presented several ramifications (Fig. 11), which were not seen in the *L. longipalpis* midguts (Figs. 9 and 10). However, the specific aspects of the sarcomeres with parallel arrays and the double-helix organization, very similar to that observed in the thoracic midgut of unfed sand flies, was observed in both sand fly species (Figs. 12 and 13).

At 48 h after the blood meal, the anterior portion of the abdominal midgut was almost empty contrasting with the presence of an amount of digestive bolus in the posterior portion (Fig. 14). Consequently, the muscle network was completely disorganized in anterior portion but remained well organized in the posterior one (Figs. 14 and 15). In *L. longipalpis*, the digestion process was finished and remains defecated 72 h after the blood meal. The muscle network was completely disorganized with discontinuous fibers (not shown). The similar aspects appeared in the *P. duboscqi* midgut when the digestion was finished (Fig. 16).

3.2. Scanning electron microscopy

The measurement of the midguts of unfed sand flies under SEM confirmed the sizes of the organs observed by the optical microscope (not shown). *L. longipalpis* midgut (length $877 \pm 28.8 \mu\text{m}$ and width $97.1 \pm 12.4 \mu\text{m}$) showed to be smaller than that of *P. duboscqi* (length $1250 \pm 0.2 \mu\text{m}$ and width $196 \pm 41 \mu\text{m}$).

Figs. 7–13. Fig. 7 shows the polygonal aspects of extended epithelial cells with the cytoskeleton labeled (asterisks), located beneath the muscle net (arrows). Magnifications: 1200×. Fig. 8: Three-hour blood-fed midgut of *P. duboscqi* revealing a well-formed muscle network with less stretched fibers. Magnification: 700×. Fig. 9: Details of 3 h blood-fed midgut of *L. longipalpis* showing the nuclei of circular muscle fibers (arrows) and labeled epithelial cells with polygonal shapes beneath the fibers. Magnifications: 1200×. Fig. 10: Details of 3 h blood-fed midguts of *L. longipalpis*. Tiny filaments are connecting the circular fibers at several sites (arrows). Magnifications: 1200×. Fig. 11: Details of 3 h blood-fed midgut of *P. duboscqi* showing several ramifications of the longitudinal fibers (arrows). Magnification: 900×. Fig. 12: Large magnification view of the muscle nets showing 12 h blood-fed midgut of *L. longipalpis*. Note the details of the sarcomeres presenting intercalated dark and fluorescent areas due to the actin labeling (asterisks) and the helicoidal shapes easily shows in the longitudinal fibers. Magnification: 1800×. Fig. 13: Large magnification view of the muscle nets showing 24 h blood-fed midgut of *P. duboscqi*. Note the details of the sarcomeres presenting intercalated dark and fluorescent areas due to the actin labeling (asterisks) and the helicoidal shapes easily shows in the longitudinal fibers. Magnification: 1600×.



Figs. 14–16. Fluorescent midguts labeled with Phalloidin. Fig. 14: Forty-eight h blood-fed midgut of *L. longipalpis* showing partially digested blood meal in the posterior region (B) still showing an organized muscle network. Note that the anterior region is almost empty of blood with a disordered muscle network (asterisks). The muscle network in thoracic midgut (Th) is completely organized. Magnification: 750 \times . Fig. 15: Large magnification of the posterior regions of 48 h blood-fed midgut. Note the details of the extended fibers linked by tiny and small filaments (arrows) and the muscle fiber nuclei (asterisks). Magnification: 1600 \times . Fig. 16: Seventy-two-hour blood-fed midgut of *P. duboscqi* showing a completely disorganized muscle net. Note also the presence of muscle fibers linked by small and tiny filaments (arrows). Magnification: 1200 \times .

The SEM showed the general structural topography of the outer surface of the sand fly midguts (Fig. 17) and confirmed that the entire organ was externally covered by a muscle network composed by circular and longitudinal fibers (Figs. 17–31), as visualized in the actin labeled preparations. In the unfed midguts, mainly in the thoracic part, the muscle network was relaxed and some fibers had wavy shape (Figs. 18 and 19). The longitudinal fibers were positioned always over the circular ones (Figs. 18–22), this aspect was more obvious in the thoracic midgut (Figs. 18 and 19). In the stomodaeal valve, the muscle fibers were larger (Fig. 18) and in the pyloric region, they were completely packed covering the whole region (Fig. 22).

The freshly fed midguts of *L. longipalpis* (up to 24 h) and *P. duboscqi* (up to 48 h) showed an increased stretching of the muscle fibers revealing better details of their structures. The transitional area between the thoracic and abdominal midguts showed stretched fibers dislocated from the organ surface (Fig. 3). The longitudinal fibers were seen in parallel arrays (Figs. 4–26) with some ramifications in the *P. duboscqi* midguts (Fig. 25). The presence of several tiny fibers linking each other to the stretched circular fibers was observed, being better visualized in *P. duboscqi* (Figs. 27–29).

Rounded protuberances detected in both, circular and longitudinal fibers are probably nuclear projections of the muscle cells. They were seen in a smaller number in the longitudinal fibers and well aligned in the circular ones (Figs. 25 and 29). Small membrane shrivels seen on the surface of muscular fibers were probably myofibrils from the sarcomer units (Figs. 27, 29 and 31). They were better visualized in the longitudinal fibers of the *P. duboscqi* midguts as the blood meals were digested and the muscle fibers shrank (Fig. 31).

After the digestion of the blood meals, 72 h for *L. longipalpis* and 96 h for *P. duboscqi*, the midguts of both sand flies appeared contracted with a disorganized muscle network (Figs. 30 and 31). In *L. longipalpis*, the longitudinal fibers lost their original parallel arrangements, distinctly from the circular ones that kept their displays. In several places, large and small pieces of the basal lamina bud off between the muscle fibers (Fig. 30). Distinctly, the longitudinal fibers of *P. duboscqi* midguts kept their parallel arrangements, but it was not possible to visualize the circular ones. They were covered by the basal lamina, which bud off small pieces all over the muscle network between the fibers, and made the midgut surface appear completely rugated (Fig. 31).

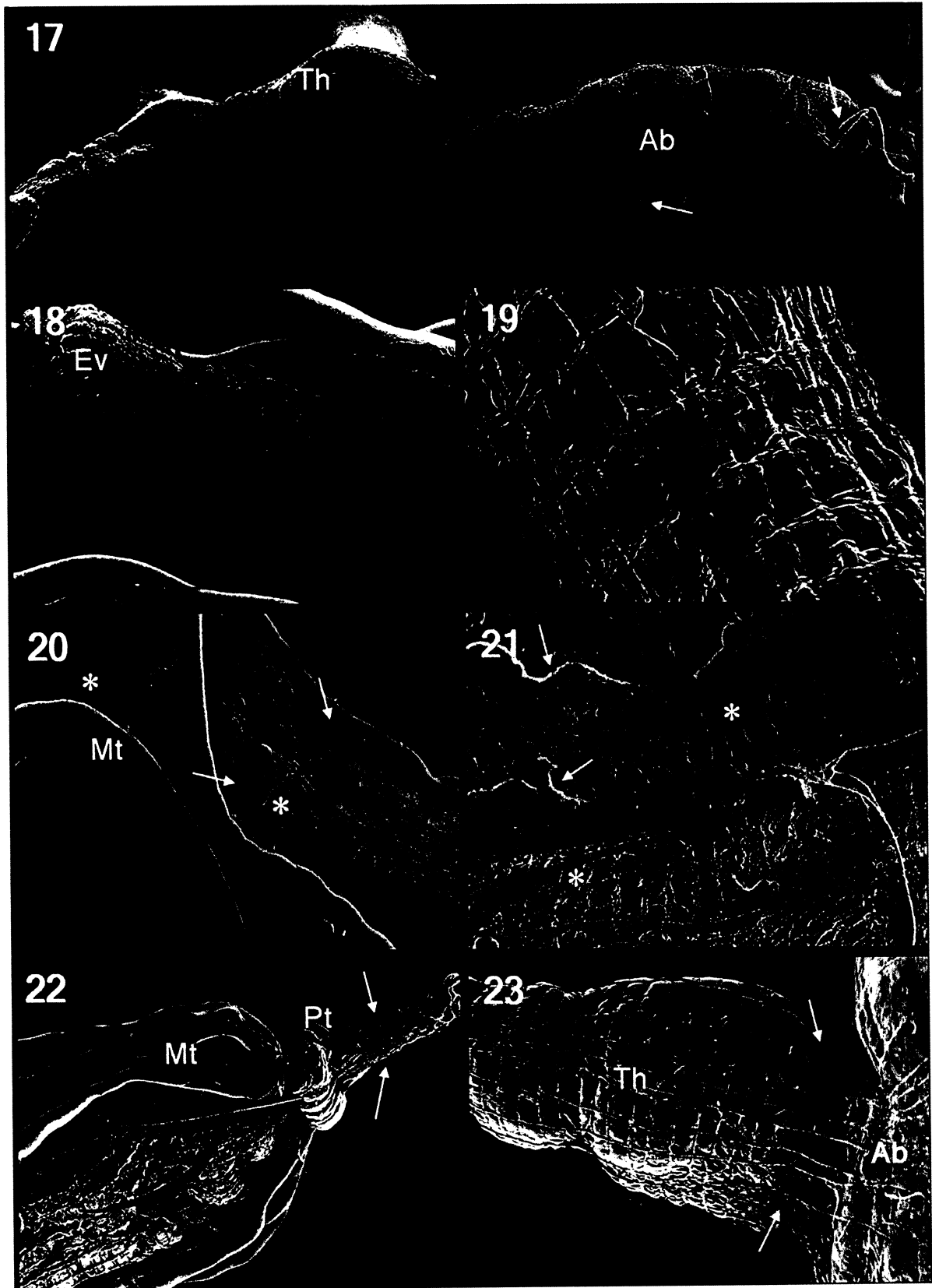
Discussion

We have analyzed the midgut muscle organization of two species of sand flies, important vectors of human leishmaniasis. We have also provided a physiological explanation of how the organ suddenly changes its morphology increasing its volume, in order to accommodate a large

amount of ingested blood meal, and returning to its original shape after digestion. The importance of the muscle fiber organization in the changes of the organ during the feeding process has been distinguished. The gut enlargement is possible due to the presence of a muscle network surrounding the entire organ. This network is formed by well-organized interconnections of longitudinal and circular muscle fibers. Although this muscle network is covering the entire organ, its arrangements only permit the enlargement of the abdominal midgut, the place where the ingested blood is stored and digested. In the fully engorged midgut, the muscle fibers are completely stretched and when the digestion process is completed, they return to their original morphology.

Digestion process in blood-fed females of sand flies differs according to temperature and species studied. In general, it takes from 2 to 6 days (Killick-Kendrick, et al. 1977; Lawyer et al., 1990; Volf and Killick-Kendrick, 1996) and is preceded by mighty diuresis (Sadlova et al., 1998). Accordingly, various sand fly species appear to differ in dynamics of midgut protease activities after blood feeding (Schlein and Romano, 1986; Dillon and Lane, 1993a, Pimenta et al., 1997a,b). The time required for blood digestion in *P. duboscqi* is longer than in *L. Longipalpis* fed with the same type of blood meal. Although the organization of muscle fibers in the two studied sand flies has shown to be similar in their general arrays, the muscle network in the *P. duboscqi* midgut is more complex with more extensive interconnections between the longitudinal fibers. The large number of interconnected and branched longitudinal fibers present in the muscle network of *P. duboscqi* might help the distention of the organ in order to have a higher storage capacity, and consequently, a longer time for digestion requirement. Therefore, the midgut physiology of these two sand fly vectors has to deal with distinct vectorial capacity for pathogens. For instance, it has been demonstrated that the digestive enzymes affect the pathogens survival inside the midgut (Dillon and Lane, 1993a; Pimenta et al., 1997a,b; Borovsky and Schlein, 1987; Schlein and Romano, 1986) and, only after the blood digestion, *Leishmania* parasites are differentiated into vertebrate infective form inside the midgut (Sacks and Perkins, 1985; Sacks, 1989).

As observed in other insects, the thoracic midguts of the two sand flies do not distend after the blood meal. The muscle fibers in this region are closer to each other forming a condensed network, probably sustaining the tubular structure for the thoracic midgut not to change its volume. A detailed observation on the longitudinal fibers over the midgut have shown the same units running all over the organ, but after they reach the abdominal midgut, they become more distant from each other forming a more expanded network. In bloodsucking Nematocera, including sand flies, blood is directed through the thoracic midgut into the abdominal midgut where it is stored and digested. The digestion is accompanied by the production of digestive enzyme, formation and degradation of peritrophic matrix,



absorption of the nutrients, and finally by the elimination of the non-digested food throughout the hindgut (Beaty and Marquardt, 1996). The organization and the changes in the muscle network over this part of midgut appeared to be completely related to the blood meal passage. The sand fly abdominal midgut enlarges rapidly to hold a relatively large amount of blood in a very short period of time (1–3 min., personal observation) and the only part of the organ containing blood, appeared to be retained by stretched fibers until the excretion of the non-digested meals.

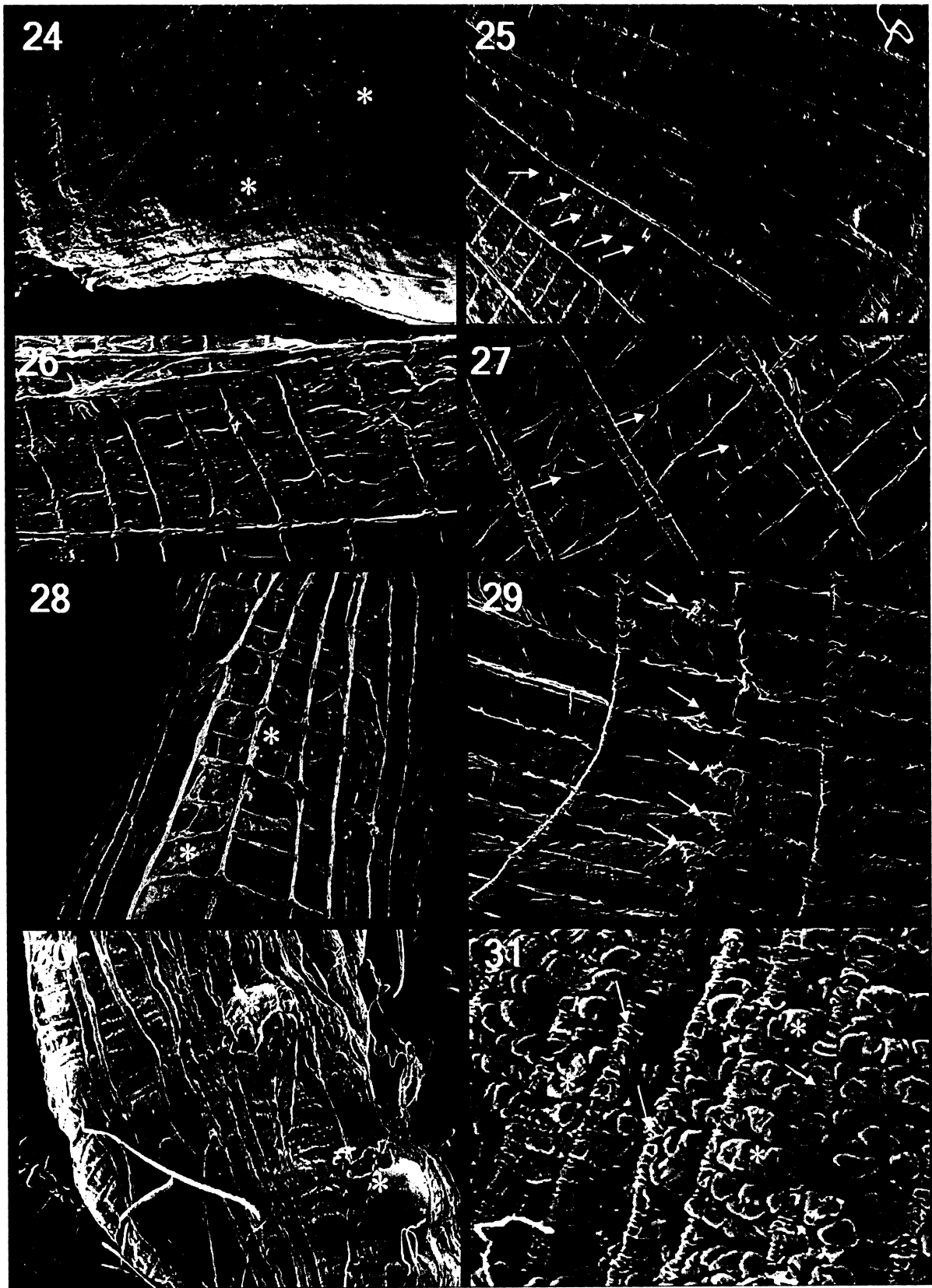
Sand flies as other Diptera have gonadotrophic regulation, i.e. after the blood meal digestion, they develop and lay eggs. Consequently, observation of the structures of genital organs is used in epidemiological evaluations for distinguishing parous from nulliparous sandflies (Scorza et al., 1968; Chaniotis and Anderson, 1967; Chaniotis and Anderson, 1968). In new tropical sand flies, morphological changes of the ovaries and accessory glands can be used routinely (Lewis et al., 1970) but in the Old World species these aspects are not so easy to be recognized (Foratini, 1973). Therefore, changes in other structures such as the Malpighian tubules and fat body after blood meal have been also proposed for the recognition of parous females (Detinova, 1962) but they are not useful for most of the sandflies (Lewis, 1965; Chaniotis and Anderson, 1967). In our study, it is remarkable that after digestion of the blood meal has been finished, the midguts showed complete disorganized muscle network, with the muscle fibers of *P. duboscqi* midgut returned to a better-organized network than those in *L. longipalpis*. This fact could be due to the differences in the arrangements of the muscle network of the two sand fly midguts. Therefore, our results demonstrated that after the blood meal, at least in two studied species of *Lutzomyia* and *Phlebotomus* sand flies, the muscle network organization changed drastically. These aspects can be used as an exceptional mark to recognize female sand flies that were already blood fed and consequently reached the gonadotrophic cycle.

Muscle fibers, in general, are responsible for contraction and distention of any organ that contains muscular tissues including the ones responsible for body movements. The muscle contractions can be voluntary or not. In vertebrates, the muscle fibers related to voluntary movements are composed by striated fibers (i.e. skeleton muscles) contrasting with those, which cannot be controlled by the

individual, which are formed by smooth fibers (i.e. visceral muscles) (Bloom and Fawcett, 1975). This concept does not apply to the insect visceral muscle including the sand flies. Smith et al. (1966) and Nagai and Graham (1974) described the visceral muscles of insects as containing striated fibers. In the sand fly midguts, the muscle fibers are striated due to the alignment of the filaments, clearly demonstrated by Phalloidin labeling and SEM. Therefore, they resemble skeletal muscles contrasting with the visceral muscles of vertebrates, which are not striated. The striations of the muscular fibers are due to the arrangements of their molecules such as actin, myosin and tropomyosin, forming units called 'sarcomeres' (Bloom and Fawcett, 1975). The actin filaments consist of two chains of actin molecules twisted around each other. In skeletal muscles, flight muscles and visceral muscles each myosin filament is surrounded by 12 actin filaments (Smith, 1984). The sarcomeres were revealed here in the midguts of the two sand fly species mainly by actin fluorescent staining. They were arranged helicoidally in the midgut fibers. These aspects were also visible by the SEM in relaxed muscle fibers. Similar aspects have been recently observed in the midguts of *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* (Park and Shahabuddin, 2000). These authors also observed that the longitudinal and circular muscles lie more or less orthogonal to form a grid.

In conclusion, the actin labeling with fluorescent Phalloidin and SEM methodologies allowed us to visualize in details the midgut muscle organization of two sand fly species. The muscular components are placed over the entire midgut region as circular and longitudinal fibers, forming a well-arranged muscle network. This muscle network in the midguts presented structural modifications related with ingestion, storage and digestion of the blood meals. It is interesting to note that although *L. longipalpis* and *P. duboscqi* have been evolutionarily separated for millions of years (Harland et al., 1982), their midgut muscle network has shown a similar general pattern, differing from each other in some morphological details, which might mirror their molecular and cellular different aspects. Such knowledge allowed us to better understand the organ physiology and disease transmission by these insects.

Figs. 17–23. SEM images. Fig. 17: Whole midgut of *P. duboscqi* showing the thoracic (Th) and the abdominal (Ab) regions. Muscle fibers are forming a muscle network over the entire organ. Note also the presence of several tracheoles over the organ (arrows). Magnification: 200×. Fig. 18: Unfed blood midgut showing thoracic regions of *L. longipalpis*. Ev, stomodaeal valve. Magnifications: 630×. Fig. 19: Unfed blood midgut showing thoracic regions of *P. duboscqi*. The muscle fibers are seen very relaxed with a wavy aspect. Note the longitudinal fibers over the circular ones in this figure. Magnifications: 2100×. Fig. 20: Unfed midgut of *P. duboscqi* showing the thoracic regions. The muscle network is very relaxed revealing aspect of the protruding basal lamina (asterisks). Tracheoles, arrows; Malpighian tube, Mt. Magnification: 700×. Fig. 21: Unfed midgut of *P. duboscqi* showing the abdominal region. The muscle network is very relaxed revealing aspect of the protruding basal lamina (asterisks). Tracheoles, arrows; Magnification: 1300×. Fig. 22: Unfed midgut of *L. longipalpis* showing the limit region between abdominal midgut and the non-extended hindgut (arrows). Note the pack of muscle fibers around the pyloric region (Pt) and the insertion of the Malpighian tubules, Mt. Magnification: 700×. Fig. 23: Thirty-minute blood-fed midgut of *L. longipalpis* showing the transitional area (arrows) between the thoracic (Th) and abdominal (Ab) regions (arrows). Magnification: 700×.



Acknowledgements

The SEM and actin labeling studies were accomplished at the Laboratory of Medical Entomology of Centro de Pesquisas René Rachou of Fundação Oswaldo Cruz in Minas Gerais State, Brazil. This work was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) and Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). We thank Denise N. Pimenta and Paola R. S. Eiras for reading and comments about this article.

References

- Beatty, B.J., Marquardt, W.C., 1996. The Biology of Disease Vectors. University Press of Colorado.
- Billingsley, P.F., 1990. The mid gut ultrastructure of haematophagous insects. Annual Review of Entomology 35, 219–248.
- Billingsley, P.F., Lehane, M.J., 1996. Structure and ultrastructure of the insect mid gut, in: Lehane, P.F., Billingsley, M.J. (Eds.), Biology of the Insect Mid Gut. Chapman and Hall, London, pp. 3–30.
- Bloom, W., Fawcett, D.W., 1975. A Textbook of Histology, tenth ed W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
- Borovsky, D., Schlein, Y., 1987. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. Medical Veterinary Entomology 1, 235–242.
- Chaniotis, B.N., Anderson, J.R., 1967. Age structure, population dynamics and vector potential of *Phlebotomus* in Northern California. I. Distinguishing parous from nulliparous flies. Journal of Medical Entomology 4, 251–254.
- Chaniotis, B.N., Anderson, J.R., 1968. Age structure, population dynamics and vector potential of *Phlebotomus* in Northern California. II Field population dynamics and natural flagellate infections in parous females. Journal of Medical Entomology 5, 273–292.
- Detinova, T.S., 1962. Age-grouping methods in Diptera of medical importance. World Health Organization, Geneva. WHO-Monograph series, 47.
- Dillon, R.J., Lane, R.P., 1993a. Influence of *Leishmania* infection on blood-meal digestion in the sand flies *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. Parasitology Research 19, 429–496.
- Dillon, R.J., Lane, R.P., 1993b. Bloodmeal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. Medical Veterinary Entomology 7, 225–232.
- Forattini, O.P., 1973. in: Blucher, E. (Ed.), Entomologia Médica, vol. 4, p. 658.
- Jemetchu, T., 1974. The morphology and fine structure of the mid gut and peritrophic membrane of the adult female, *Phlebotomus longipes*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 68, 111–124.
- Harland, W.B., Cox, A.V., Llewellyn, P.G., Pickton, C.A.G., Simth, A.G., Walters, R., 1982. A Geographic Time Scale. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Killick-Kendrick, R., Lehane, A., Ready, P.D., 1977. The Establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lu. longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Journal of Medical Entomology 13, 429–440.
- Lawyer, P.G., Ngumbi, P.M., Anjili, C.O., Odongo, S.O., Mebrahtu, Y.B., Githre, J.I., Koech, D.K., Roberts, C.R., 1990. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqui* and sergentomyia *schwetzi*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 43, 41–43.
- Lewis, D.J., 1965. Internal structural features of some central American Phlebotominae sand flies. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 59, 375–385.
- Lewis, D.J., Lainson, R., Shaw, J.J., 1970. Determination of parous rates in Phlebotomine sand flies with special reference to Amazonian species. Bulletin Entomological Research 60, 209–219.
- Nagai, T., Graham, W., 1974. Insect visceral muscle. Fine structure of the proctodeal muscle fibers. Journal of Insect Physiology 20, 1999–2013.
- Nieves, E., Pimenta, P.F.P., 2000. Development of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* and *Leishmania* (Leishmania) *amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). Journal of Medical Entomology 37, 134–140.
- Nieves, E., Pimenta, P.F.P., 2002. Influence of vertebrate blood meals on the development of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* and *Leishmania* (Leishmania) *amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 67, 640–647.
- Pimenta, P.F.P., De Souza, W., 1983. *Leishmania mexicana amazonensis*: surface charge of amastigote and promastigote forms. Experimental Parasitology 56, 194–206.
- Park, S.S., Shahabuddin, M., 2000. Structural organization of posterior mid gut muscles in mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. Journal of Structural Biology 129, 30–37.
- Pimenta, P.F.P., Turco, S.J., McConville, M., Lawyer, P., Perkins, P.V., Sacks, D., 1982. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midgut. Science 256, 1812–1815.
- Pimenta, P.F.P., Saraiva, E., Rowton, E., Modi, G., Cilmi, S., Beverley, S., Sacks, D., 1994. Evidence that the vectorial competence of phlebotomines sand flies for different species of leishmania is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 91, 9155–9159.
- Pimenta, P.F.P., Modi, G., Pereira, S.T., Sacks, D., 1997a. A novel role for the peritrophic membrane in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. Parasitology 115, 359–369.
- Pimenta, P.F.P., Modi, G.B., Pereira, S.T., Shahabuddin, M., Sacks, D.L., 1997b. A novel role for the Peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic of sand fly midgut. Parasitology 115, 359–396.
- Rudin, N., Hecker, H., 1982. Functional morphology of midgut of a sandfly as compared to the other haematophagous nematocera. Tissue and Cell 14, 751–758.
- Sacks, D.L., 1989. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. Experimental Parasitology 69, 100–103.

Figs. 24–31. SEM images. Fig. 24: Thirty-minute blood-fed midgut of *L. longipalpis*. The muscle fibers are stretched over the basal lamina (asterisks). Magnification: 630×. Fig. 25: Thirty-minute blood-fed midgut, of *P. duboscqi*. The muscle fibers are stretched over the basal lamina. Note the alignment of the circular fiber nuclei (arrows). Magnification: 850×. Fig. 26: Twenty-four-hour blood-fed midgut of *L. longipalpis* showing details of the muscle fibers. Magnification: 3200×. Fig. 27: Twenty-four-hour blood-fed midgut of *P. duboscqi* showing details of the muscle fibers. Note the presence of several tiny filaments linking the circular muscle fibers (arrows). Magnification: 2000×. Fig. 28: Forty-eight-hour blood-fed midgut of *L. longipalpis* showing stretched fibers in the region where the blood meal is present (asterisks). Magnification: 1300×. Fig. 29: Forty-eight-hour blood-fed midgut of *P. duboscqi* showing stretched fibers in the region where the blood meal is present and in several muscle fibers nuclei arranged in line (arrows). Magnification: 2400×. Fig. 30: Seventy-two-hour blood-fed midgut of *L. longipalpis* after complete digestion of the blood meal showing a disorganized muscle network. Magnification: 300×. Fig. 31: Ninety-six-hour blood-fed midgut of *P. duboscqi* after complete digestion of the blood meal showing the basal lamina corrugated and protruded over the muscle net (asterisks) and covering the circular fibers. Note the relaxed aspect of the longitudinal fibers (arrows). Magnification: 4100×.

- Sacks, D.L., Perkins, P.V., 1985. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* 34, 456–459.
- Sadlova, J., Reishig, J., Volf, P., 1998. Prediuresis in female sandflies (Diptera: Psychodidae). *European Journal of Entomology* 95, 643–747.
- Schaeffer, C.W., Vanderberg, J.P., Rhodim, J., 1967. The fine structure of mosquito midgut muscle. *Journal Cell Biology* 34, 905–911.
- Schlein, Y., Jacobson, R.L., 1998. Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloodmeal. *Parasitology* 117, 467–473.
- Schlein, Y., Romano, H., 1986. *Leishmania major* and *Leishmania donovani*: effects of proteolytic enzymes of *Phlebotomus papatasi*. *Experimental Parasitology* 62, 376–380.
- Scorza, J.V., Ortiz, J., Gomes, J., 1968. Observaciones biológicas sobre algunos flebotomos de 'Rancho Grande' (Venezuela). 6-sobre los factores microclimáticos que determinan la endemicidad de la flebotomofauna de 'Rancho Grande'. *Acta Biologica Venezuelana* 6, 76–83.
- Secundino, N.F.C., Pimenta, P.F.P., 1999. Scanning electron microscopic study of the egg and immature stages of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Acta Microscopica* 8, 33–38.
- Smith, D.S., 1984. The structure of insect muscles, in: King, R.C., Akai, H. (Eds.), *Insect Ultrastructure*. Plenum Press.
- Smith, D.S., Grupta, B.L.U., Smith, U., 1966. The organization and myofilament array of insect visceral muscles. *Journal Cell Science* 1, 49–57.
- Volf, P., Killick-Kendrick, R., 1996. Post-engorgement dynamic of haemagglutination activity in the midgut of six species of Phlebotominae sand flies. *Medical Veterinary Entomology* 10, 247–250.