

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Markéta Rehbergerová

Symbiotické bakterie rodu *Wolbachia* u flebotomů a komárů
Symbiotic bacteria of the genus *Wolbachia* in sand flies and mosquitoes

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Vít Dvořák, Ph.D.

Praha, 2019

Poděkování

Za laskavou pomoc děkuji svému školiteli RNDr. Vítu Dvořákovi Ph.D.

Prohlášení

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

V Praze, 10. 05. 2019

Markéta Rehbergerová

ABSTRAKT

Bakterie rodu *Wolbachia* (Proteobacteria, Rickettsiales, Rickettsiaceae) jsou maternálně dědičné intracelulární symbionty mnoha druhů členovců (Arthropoda) a filárií (Nematoda, Secernentea). Díky schopnostem wolbachii navodit u svých hostitelů reprodukční anomálie a redukovat infekci patogenními organismy a viry jsou hojně studovány. Tato bakalářská práce je souhrnem dostupných informací týkajících se interakcí bakterií rodu *Wolbachia* s komáry (Diptera, Culicidae) a flebotomy (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), přenašeči mnoha významných infekčních patogenů a možností jejich využití v kontrole přenosu těchto patogenů.

Klíčová slova: *Wolbachia*, Phlebotominae, Culicidae, členovci přenášená onemocnění, symbióza, metoda kontroly přenašečů

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Wolbachia* (Proteobacteria, Rickettsiales, Rickettsiaceae) are maternally inherited intracellular symbionts of many species of arthropods (Arthropoda) and filarial nematodes (Nematoda, Secernentea). Due to the ability of *Wolbachia* to induce reproductive anomalies in their hosts and to reduce their infection by pathogenic organisms and viruses, they are profoundly studied. This bachelor thesis is a summary of available information regarding interactions of *Wolbachia* with mosquitoes (Diptera, Culicidae) and sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), vectors of many important infectious pathogens, and possibilities of their use in the control of pathogen transmission.

Key words: *Wolbachia*, Phlebotominae, Culicidae, vector-borne diseases, symbiosis, vector control method

Seznam zkratk:

CI	cytoplasmatická inkompatibilita (cytoplasmic incompatibility)
CidB	CI-indukující deubikvitináza (CI-inducing deubiquitylating enzyme)
<i>COI</i>	gen pro podjednotku I cytochrom c oxidázy
Cyt b	cytochrom b
DENV	virus dengue
CHIKV	virus chikungunya
<i>groEL</i>	gen pro chaperonin groEL
miRNA	mikro RNA (micro RNA)
PiRNA	Piwi-interagující RNA (Piwi-interacting RNA)
RNAi	RNA interference
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
siRNA	malé interferující RNA (small interfering RNA)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)
WNV	virus západonilské horečky (West Nile virus)
wsp	variabilní povrchový protein bakterií rodu <i>Wolbachia</i> (<i>Wolbachia</i> surface protein)
YFV	virus žluté zimnice (Yellow fever virus)
ZIKV	virus Zika

Obsah

1. Úvod	1
2. Představení komárů, flebotomů a bakterií rodu <i>Wolbachia</i>	2
2.1 Komáři (Diptera, Culicidae)	2
2.1.1 Komáři přenášení patogenů a metody kontroly komárů	2
2.2 Flebotomové (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae)	5
2.3 Bakterie rodu <i>Wolbachia</i> (Proteobacteria, Rickettsiales, Rickettsiaceae)	7
2.3.1 Výskyt, rozšíření a přenos bakterií rodu <i>Wolbachia</i>	7
2.3.2 Reprodukční manipulace způsobené u hostitelů bakterií rodu <i>Wolbachia</i>	9
3. Bakterie rodu <i>Wolbachia</i> u komárů	10
3.1 Virulentní kmen <i>wMelPop</i>	10
3.2 Kmen <i>wMel</i>	12
3.3 Superinfekce	14
3.4 <i>Wolbachie</i> u <i>Aedes polynesiensis</i>	15
3.5 <i>Wolbachie</i> infikující komáři rodu <i>Culex</i>	16
3.6 <i>Wolbachie</i> u komárů rodu <i>Anopheles</i>	16
3.7 Negativní ovlivnění patogenů <i>wolbachie</i> mi	18
4. Symbiotické bakterie rodu <i>Wolbachia</i> u flebotomů	19
4.1 Počáteční objevy <i>wolbachie</i> u flebotomů	19
4.2 Detekce <i>wolbachie</i> u flebotomů Starého světa	20
4.3 Detekce <i>wolbachie</i> u flebotomů Nového světa	23
4.4 CI a maternální přenos <i>wolbachie</i> u <i>P. papatasi</i> z Egypta	24
4.5 Metoda injikování vajíček <i>Lutzomyia longipalpis</i>	28
4.6 Artificiální <i>wolbachie</i> ální infekce buněčných linií <i>Lutzomyia longipalpis</i>	28
5. Diskuze a závěr	28
Seznam použité literatury	30

1. Úvod

Komáři (Diptera, Culicidae) a flebotomové (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) jsou přenašeči infekčních patogenů, které ročně způsobují onemocnění stovek milionů osob. V současné době pro většinu z těchto onemocnění neexistují spolehlivé a dostupné vakcíny, a protože jsou postiženi převážně obyvatelé rozvojových zemí přístup k léčbě bývá omezený (Foster & Walker 2019; Maroli, *et al.* 2013). V boji s těmito onemocněními je využíváno převážně insekticidů sloužících ke kontrole přenašečů, jejichž narůstající rezistence však vyžaduje další řešení (Shaw & Catteruccia 2019). Tím by mohlo být i využití bakterií rodu *Wolbachia* (Proteobacteria, Rickettsiales, Rickettsiaceae).

Wolbachie jsou intracelulární symbiotické organismy, které se vyskytují u členovců a filárií. U svých hostitelů způsobují reprodukční anomálie, mezi které patří feminizace samců, navození partenogeneze, zabíjení samčích embryí a cytoplazmatická inkompatibilita (CI). CI je z těchto anomálií nejrozšířenější a projevuje se tak, že samci nesoucí kmen wolbachii se mohou úspěšně rozmnožit pouze se samicemi infikovanými stejným kmenem. Jedinci s wolbachii mají tedy potenciál nahradit populace hmyzu, jež nesou jiný kmen těchto bakterií, či populace wolbachii neinfikované (shrnutí ve Werren, *et al.* 2008). Zároveň byl pozorován negativní vliv wolbachii na patogenní organismy a viry napadající hostitele těchto bakterií. Mnoho experimentů využilo možnosti transinfikovat hmyz nepůvodními wolbachii kmeny za účelem nalezení optimální kombinace wolbachie a hostitele využitelné v kontrole vektorů infekčních patogenů.

Skutečností, že wolbachie jsou díky CI schopné rozšířit se v populacích hmyzu a že mohou redukovat či zcela inhibovat virové a patogenní infekce, vedly k výzkumům zabývajícím se možností využití těchto bakterií v boji s vektory virů, bakterií, parazitických prvoků a filárií. Mnoho výzkumů se zaměřilo na interakci wolbachii s komáry, neboť jde o skupinu hmyzu zapojenou do přenosu závažných lidských patogenů (virů, parazitických prvoků i helmintů). Tyto interakce jsou v dnešní době relativně dobře prostudované a transinfikování komáři byli úspěšně vypouštěni v terénu (Hoffmann, *et al.* 2011; Schmidt, *et al.* 2017). Výzkum zaměřující se na interakce wolbachii s flebotomy je dosud mnohem méně rozvinut a často se omezuje pouze na detekci wolbachii u různých druhů těchto významných vektorů parazitických prvoků rodu *Leishmania* (Trypanosomatida, Trypanosomatidae, Leishmaniinae), kteří způsobují leishmaniózy.

Cílem mé bakalářské práce bylo shrnout poznatky o interakcích wolbachii u flebotomů a porovnat je s dostupnými informacemi o interakcích a využití wolbachii u komárů. V první

části práce představím čeled' *Culicidae*, podčeled' *Phlebotominae* a bakteriální rod *Wolbachia*. Dále se budu zabývat interakcemi wolbachii s komáry a flebotomy a jejich možným využitím v kontrole přenosu infekčních patogenů.

2. Představení komárů, flebotomů a bakterií rodu *Wolbachia*

2.1 Komáři (Diptera, Culicidae)

Komáři, též Komárovití, (Diptera, Culicidae) jsou děleni do dvou podčeledí: Anophelinae a Culicinae. Podčeled' Anophelinae se skládá ze 3 rodů, podčeled' Culicinae z rodů 38. V současnosti je známo přibližně 3500 druhů komárů, se zástupci vyskytujícími se po celém světě mimo Antarktidu (Foster & Walker 2019).

Životní cyklus komárů je charakteristický střídáním vodní a terestrické fáze. Vajíčka komárů jsou kladena do vody, na vodní hladinu, na pevné podklady plovoucí ve vodě či na místa, která budou vodou zaplavena, a to jednotlivě nebo ve shlucích. Po vylíhnutí prochází čtyřmi larválními stadii žijícími ve vodním prostředí. Kukly komárů se vznášejí na vodní hladině. Dospělci jsou terestričtí, živí se rostlinnými šťávami a medovicí produkovanou mšicemi (Hemiptera, Aphididae), samice komárů jsou hematofágní. Díky příjmu a trávení nasáté krve dochází k zahájení vývoje vajíček. Aminokyseliny z hemoglobinu jsou použity k syntéze prekurzoru vaječného žloutku vitellogeninu. Většina druhů je pro vývoj vajíček vázána na sání krve, nicméně se vyskytují i autogenní druhy komárů. Také jsou známe druhy vyžadující pro vývoj vajíček vícenásobné sání. (Foster & Walker 2019).

2.1.1 Komáři přenášení patogeni a metody kontroly komárů

Komáři jsou významnými přenašeči virů, prvků způsobujících malárii a filárii. Na člověka přenáší komáři přibližně 100 arbovirů převážně z rodů *Alphavirus* (*Togaviridae*), *Flavivirus* (*Flaviviridae*), *Orthobunyavirus* a *Phlebovirus* (*oba Bunyaviridae*) (Foster & Walker 2019).

Viry přenášené komáry

Prvním objeveným lidským virem byl virus žluté zimnice (YFV) (*Flaviviridae*, *Flavivirus*). Spojitost žluté zimnice a komárů *Aedes aegypti* (dříve *Culex fasciatus* či *Stegomyia fasciata*) byla prokázána v roce 1900, kdy byl objasněn přenos způsobený komáry, kteří sáli krev pacientů s touto nemocí. Jako prevence proti nakažení byla navržena decimace komárů a ochrana před sáním komárů na nemocných (Reed, *et al.* 1901). Vektorem YFV v urbánním prostředí je právě *Ae. aegypti*, nicméně YFV cirkuluje především mezi opicemi v sylvatickém prostředí, kde je přenášen komáry jako např. *Aedes bromeliae*, *Ae. africanus* nebo *Haemagogus* spp. Způsobuje krvácivou horečku spojenou s bolestmi hlavy, žloutenkou,

deliriem a kómatem (Foster & Walker 2019). Proti YFV byla vyvinuta vakcína, která je využívána spolu s kontrolou přenašečů, nicméně od roku 2000 došlo k nálezům v různých zemích Afriky a v Jižní Americe (shrnutí v Huang, *et al.* 2019).

Významným zástupcem rodu *Flavivirus* je virus dengue (DENV). Ročně je tímto virem nakaženo 50 - 100 milionů lidí v tropických a subtropických regionech. DENV je přenášen *Ae. aegypti*, *Aedes albopictus* a dalšími zástupci rodu *Aedes*. Od roku 2010 proběhly nákazy virem v Číně, Malajsii, Singapuru, ale i v Evropě. Nemoc způsobená DENV, který má čtyři sérotypy (DENV-1 až DENV-4), se projevuje jako horečka (spojená převážně s malátností, bolestí hlavy a tělesnou slabostí), krvácivá horečka nebo jako šokový syndrom. Nákazy DENV přenášené *Ae. albopictus* mívají mírný průběh (shrnutí v Guo, *et al.* 2017). Je pravděpodobné, že po vystavení více sérotypům DENV po sobě během 5 let nedochází pouze k horečce dengue, ale k závažnějším projevům nemoci – krvácivé horečce dengue či šokovému syndromu dengue (Foster & Walker 2019).

Další flaviviry přenášené komáry na člověka patří do komplexu virů japonské encefalitidy. Do tohoto komplexu patří virus Zika (ZIKV) přenášený komáry rodu *Aedes*, virus je mezi lidmi přenosný také sexuálně. Nákazy virem u lidí nebyly početné, dokud se přes Mikronésii (2007) a Francouzskou Polynésii (2013 – 2014) nerozšířil v roce 2015 do Brazílie. Infekce ZIKV probíhá asymptomaticky či způsobuje mírné horečnaté onemocnění spojené s bolestí hlavy a kloubů a vyrážkou, nicméně může mít i závažný průběh, jakým je mikrocefalie novorozenců a Guillain-Barrého syndrom projevující se u dospělých (shrnutí ve White, *et al.* 2016). Do komplexu spadá rovněž virus západonilské horečky (WNV), který se od objevení v roce 1937 v Ugandě globálně rozšířil. Hostitelský cyklus zahrnuje komáry a ptáky, infikování WNV mohou být i lidé a koně. Většina lidských infekcí je asymptomatická, infekce se však může projevit jako mírná západonilská horečka nebo jako západonilské neuroinvasivní onemocnění (encefalitida, meningitida či akutní flacidní paralýza). WNV je přenášený různými druhy komárů rodu *Culex* (např. *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus* či *Culex tarsalis*), ale virus byl izolován i ze zástupců rodu *Aedes* (shrnutí v Chancey, *et al.* 2015). Do komplexu dále patří viry St. Louis encefalitidy, Murray Valley encefalitidy a japonské encefalitidy (Foster & Walker 2019).

Virus chikungunya (CHIKV) (*Togoviridae*, *Alphavirus*) způsobuje u lidí horečnaté onemocnění spojené s polyartritidou. Virus je přenášen komáry rodu *Aedes* v rurálním (např. *Aedes africanus*, *Ae. luteocephalus*) a urbánním cyklu (*Ae. aegypti* a *Ae. albopictus*). Virus se z Afriky rozšířil na ostrovy v Indickém oceánu, do Indie a jihovýchodní Asie,

Karibiku a do Ameriky (shrnutí v Silva & Dermody 2017). Antigenním subtypem CHIKV je O'nyong-nyong virus vyskytující se v Africe a přenášený komáry rodu *Anopheles* (Foster & Walker 2019).

Mezi další viry z rodu *Alphavirus* přenášené komáry patří viry koňské encefalomyelitidy východního a západního typu, jejichž rezervoárem jsou převážně ptačí hostitelé v Americe a které mohou být přeneseny i na koně a lidi. U lidí může dojít k akutní encefalitidě, horečkám, zvracení, ospalosti, letargii, křečím a kómatu. Součástí komplexu viru koňské encefalomyelitidy západního typu je virus Sindbis vyskytující se ve východní Evropě, Skandinávii, Asii, Africe a Austrálii a jeho subtyp virus Ockelbo. Dalším virem z rodu *Alphavirus* je komplex virů venezuelské koňské encefalomyelitidy. V Austrálii jsou přenášený viry Ross River virus způsobující epidemickou polyartritidu a Barmah Forest virus. Mayaro virus způsobuje u lidí nemoc podobnou horečce chikungunya, vyskytuje se v Karibiku a částech Jižní Ameriky (Foster & Walker 2019).

Komplex viru kalifornské encefalidity (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) má 14 sérotypů. Virus kalifornské encefalidity je přenášený vektory *Aedes melanimom* a *Culex tarsalis*, nicméně od jeho objevení bývá málokdy spojován s lidským onemocněním. Do komplexu dále patří virus encefalidity La Crosse, který u dětí způsobuje horečku, jež může vyústit v encefalitidu a následnou smrt. Virus je rozšířen na východě USA a hlavním přenašečem je *Aedes triseriatus*. Dalšími viry z komplexu jsou viry Ťahyňa, Keystone, Trivittatus, Jamestown Canyon, Snowshoe Hare, Inkoo, San Angelo, Lumbo, Melao, Serra do Navio a Guaroa (Foster & Walker 2019).

Virus horečky údolí Rift (*Bunyaviridae*, *Phlebovirus*) se vyskytuje v částech Afriky. Infekce probíhá po přenosu vektorem, po kontaktu s krví nakažených hospodářských zvířat či po vdechnutí viru. Virus způsobuje horečky, bolesti hlavy, myalgie a retinitis. Mezi přenašeče patří *Culex pipiens*, *Aedes mcintoshi* a další druhy komárů (Foster & Walker 2019).

***Plasmodium* spp. (Haemosporida, Plasmodiidae)**

Komáři rodu *Anopheles* přenášejí prvoky rodu *Plasmodium* způsobující lidské malárie. Malárie se projevuje jako periodicky se opakující záchvaty horečky, které doprovází bolesti hlavy, letargie, únava a pocení. Příznaky a závažnost onemocnění závisí na druhu *Plasmodia*. *P. falciparum* způsobuje maligní třídenní malárii (záchvaty horečky se opakují každé tři dny), *P. vivax* benigní třídenní malárii, *P. malariae* čtyřdenní malárii a *P. ovale* méně častou třídenní malárii s lehčím průběhem (Foster & Walker 2019). Smrtelné případy lidské malárie mohou být způsobeny i *P. knowlesi*, postihujícím především opice (Cox-Singh, *et al.* 2008).

Dle odhadu Světové zdravotnické organizace (WHO) se v roce 2017 vyskytlo 219 milionů případů malárie, 435 000 z těchto případů bylo smrtelných (WHO 2018b).

Filárie (Rhabditida, Filarioidea, Onchocercidae)

Dalšími patogeny přenášenými komáry jsou filárie *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* a *Brugia timori* způsobující lymfatické filariózy. Přenašeči jsou zástupci rodů *Culex*, *Mansonia*, *Aedes* a *Anopheles*. Lymfatické filariózy mají akutní a chronickou formu. Během akutní formy dochází k horečce, otokům, bolestem a zánětům lymfatických uzlin a lymfatických cév. V chronické fázi se lymfa hromadí v končetinách, prsou, vulvě či šourku a dochází k jejich zvětšení, tzv. elefantiáze (Foster & Walker 2019).

Metody kontroly komárů

V boji s komáry se uplatňují různé postupy při likvidaci dospělců a vodních larválních stadií. V současné době je hlavní metodou kontroly komárů využití insekticidů. Používány jsou moskytiéry napuštěné insekticidy a postřiky interiérů, které cílí na komáry rodu *Anopheles* sajícím na spících osobách uvnitř domů. Dále jsou používány pasti s insekticidy a letecké postřiky, tyto metody jsou zaměřené na vektory sající krev přes den v exteriérech. Problémem je nárůst resistance vektorů proti insekticidům. Jako alternativní postupy by mohly být využity látky sterilizující vektory či blokující vývoj patogenů ve vektorech. Další strategií je úprava regulace imunitních faktorů komárů metodami genového inženýrství, která by vedla k zablokování přenosu patogenů. Metody genového inženýrství jsou využitelné i pro vypouštění sterilních samců, či vypouštění vektorů nesoucích dominantní letální alelu. Využití bakterií redukujících přenos patogenů či entomopatogenních hub zabíjejících hmyz je také alternativní metodou kontroly vektorů (shrnutí v Shaw & Catteruccia 2019). Bakterie rodu *Wolbachia*, kterým se věnuje tato bakalářská práce, nabízejí kombinaci inhibice patogenů a snadného rozšíření se v populaci díky CI.

2.2 Flebotomové (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae)

Flebotomové jsou krev sající hmyz náležející do řádu Diptera, podřádu Nematocera, čeledi Psychodidae, a podčeledi Phlebotominae. V současnosti je popsáno více než 800 druhů zástupců této podčeledi, jež je dle konzervativních kritérií rozdělena do šesti rodů – ve Starém světě se jedná o rody *Phlebotomus*, *Sergentomyia* a *Chinius* a v Novém světě o rody *Lutzomyia*, *Brumptomyia* a *Warileya* (Akhoundi, et al. 2016).

Ve Starém světě se zástupci rodu *Phlebotomus* vyskytují od Středomoří přes afrotropickou oblast, Střední východ až po centrální Asii. Zástupci tohoto rodu sají krev

převážně na savcích a patří do něj všichni vektorové kutánní a viscerální leishmaniózy v Eurasii a Africe. Rod *Sergentomyia* dominuje v tropech Starého světa a samice sají krev převážně studenokrevných obratlovců. Rodu *Chinius* zastupují pouze čtyři druhy, ty se vyskytují v hornatých regionech. V Novém světě se zástupci rodu *Lutzomyia* vyskytují převážně v lesnatých částech neotropické oblasti a jihu nearktické oblasti. Někteří zástupci jsou významní vektorové leishmanióz. Rody *Brumptomyia* a *Warileya* jsou relativně nepočtené (Akhoundi, *et al.* 2016).

Životní cyklus flebotomů se skládá z vajíčka, 4 stadií larev, kukly a dospělce, všechna stadia jsou terestrická (Beaty & Marquardt 1996). Samice pro dozrání vajíček sají krev, vajíčka kladou 4 až 8 dní po nasátí na vlhká místa bohatá na organický materiál. Hostitele pro sání krve si vybírají s různou specifitou a obvyklé je sání při soumraku a v noci. Některé druhy flebotomů jsou autogenní – jsou schopny naklásat vajíčka i bez sání na hostiteli. Zimu či období dešťů jsou schopni flebotomové přečkat ve stadiu čtvrté larvy či jako vajíčka. Dospělci se živí dostupnými zdroji cukru, např. medovicí. Samci krev nesají (Killick-Kendrick 2002). Flebotomové nejsou moc dobří letci, jejich denní dolet je přibližně 1,5 km (Akhoundi, *et al.* 2016), dospělci se proto obvykle zdržují v blízkosti místa, kde byla nakladena vajíčka (Maroli, *et al.* 2013).

Samice flebotomů jsou významnými přenašeči prvků rodu *Leishmania* (Trypanosomatida, Leishmaniinae), bakterií *Bartonella bacilliformis* (Proteobacteria, Rhizobiales, Bartonellaceae) a některých arbovirů (Beaty & Marquardt 1996).

Leishmanióza je způsobena prvky rodu *Leishmania*, kteří jsou přenášeni takřka výhradně flebotomy, výjimku tvoří *Forcipomyia (Lasiohelea)* (Diptera, Ceratopogonidae, Forcipomyiinae), potenciální vektor leishmanií v Austrálii (Dougall, *et al.* 2011). Pouze 98 druhů flebotomů z rodů *Lutzomyia* a *Phlebotomus* je potvrzenými nebo předpokládanými přenašeči leishmanií na člověka (Maroli, *et al.* 2013). Leishmanií způsobujících lidské leishmaniózy je přes 20 druhů (WHO 2018a). Existují čtyři formy leishmaniózy: viscerální (zvaná též kala-azar), post-kala-azar dermální, kutánní a mukokutánní leishmanióza. Podle spektra hostitelů leishmaniózy rozdělujeme na zoonózy a antroponózy (WHO 2018a). Viscerální leishmaniózou ročně onemocní odhadem 0,2 – 0,4 milionu osob, nejvíce zasaženy jsou následující země: Indie, Súdán, Jižní Súdán, Etiopie, Bangladěš a Brazílie. Odhad počtu nových případů kutánní leishmaniózy je 0,7 – 1,2 milionu za rok (Alvar, *et al.* 2012). Leishmanióza ohrožuje převážně obyvatele z rozvojových zemí, pro které není diagnóza

nemoci a následná léčba dostupná. Dalšími rizikovými faktory jsou válečné konflikty, migrace, odlesňování a urbanizace (Maroli, *et al.* 2013).

Bartonelóza neboli Cairrónova nemoc je způsobena bakterií *B. bacilliformis* přenášenou na člověka flebotomy rodu *Lutzomyia* a to v Ekvádoru, Peru a Kolumbii (Maroli, *et al.* 2013). Má akutní (horečka Oroya) a chronickou fázi (Peruánské bradavice) (Maroli, *et al.* 2013). Během akutní fáze dochází k bolestem hlavy, horečce, bolestem svalů a kloubů, deliriu a ke kómatu, neléčená akutní fáze může být smrtelná. V chronické fázi se objevuje kožní vyrážka způsobená proliferací endoteliálních buněk (Maroli, *et al.* 2013).

Mezi viry přenášené evropskými flebotomy patří zástupci rodů *Phlebovirus* (*Bunyaviridae*), *Vesiculovirus* (*Rhabdoviridae*) a *Orbivirus* (*Reoviridae*). Onemocnění způsobená sicilským, neapolským a toskánským virem (vše *Phlebovirus*) jsou endemická ve Středomoří (Depaquit, *et al.* 2010). Virus Chandipura (*Vesiculovirus*) je původcem případů encefalitidy v Indii. Další mimoevropské viry rodu *Vesiculovirus* infikující lidské hostitele jsou virus Isfahan, Alagoas a virus vezikulární stomatitidy (Maroli, *et al.* 2013).

2.3 Bakterie rodu *Wolbachia* (Proteobacteria, Rickettsiales, Rickettsiaceae)

2.3.1 Výskyt, rozřazení a přenos bakterií rodu *Wolbachia*

Bakterie rodu *Wolbachia* (Proteobacteria, Rickettsiales, Rickettsiaceae) jsou gramnegativní, maternálně dědičné intracelulární symbionty členovců (*Arthropoda*) a filárií (*Nematoda*, *Secernentea*). Jejich vztah k hostiteli se pohybuje od mutualistického k parazitickému v závislosti na druhu hostitele a kmenu bakterie. Wolbachie jsou u svých hostitelů schopné manipulovat reprodukci (shrnuto ve Werren, *et al.* 2008), blokovat či inhibovat vývoj virů a patogenů (Hedges, *et al.* 2008; Moreira, *et al.* 2009) a u hlístic se podílejí na vývoji larev (Bandi, *et al.* 1999).

Rickettsiím podobné bakterie byly poprvé sledovány dvojicí Hertig a Wolbach v roce 1924, a to v reprodukčních tkáních komára *Culex pipiens* (Hertig & Wolbach 1924). Hertig je později popsal a pojmenoval *Wolbachia pipientis* (Werren 1997). Odhaduje se, že wolbachie se nacházejí 40 % terestrických členovců (Zug & Hammerstein 2012). Wolbachie mohou být infikovány fágem WO (Kent & Bordenstein 2010).

Kromě přenosu v mateřské linii jsou wolbachie přenášeny i horizontálně, a to u hostitelů, u nichž nekoreluje fylogeneze mitochondriálních a wolbachialních genomů, které jsou oba děděny maternálně a cytoplasmaticky. Příkladem může být důkaz horizontálního přenosu wolbachii u pavouků rodu *Agelenopsis* (Araneae, Agelenidae) (Baldo, *et al.* 2008).

Mezi faktory umožňující horizontální přenos wolbachii patří zjištění, že wolbachie jsou schopné vydržet minimálně týden v extracelulárním prostředí (v médiu s vysokým obsahem aminokyselin) a následně buněčnou linii reinfikovat (Rasgon, *et al.* 2006) a že DNA wolbachii je pomocí PCR detekovatelná i několik týdnů po té, co DNA buněk z infikované buněčné linie degradovala (Fallon 2008).

U hmyzu může být vliv bakterií rodu *Wolbachia* negativní i pozitivní. Naproti tomu se u filárií jedná o mutualistický vztah (shrnutí ve Werren, *et al.* 2008) a na wolbachii závisí vývoj larev, což bylo dokázáno experimenty využívajícími antibiotika k odstranění těchto bakterií z hostitelských tkání, při kterých byla pozorována inhibice vývoje filárií (Bandi, *et al.* 1999).

Bakterie *Wolbachia* jsou fylogeneticky děleny do superskupin reprezentujících evoluční linie. Klasické rozdělení na čtyři skupiny A, B, C, D, v němž superskupiny A a B představovaly wolbachie infikující členovce (Werren, *et al.* 1995) a superskupiny C a D symbionty filárií (Bandi, *et al.* 1998), se rozrostlo v 16 superskupin označených A – Q (s výjimkou G). Lo, *et al.* (2002) potvrdil existenci skupiny E u chvostoskoka *Folsomia candida* (Entomobryomorpha, Isotomidae, Proisotominae) a objevil skupinu F u *Kaloterme flavicollis* (Blattodea, Kalotermitidae) a *Microcerotermes* sp. (Blattodea, Termitidae). U termitů *Zootermopsis angusticollis* a *Zootermopsis nevadensis* (Blattodea, Termopsidae) byly objeveny wolbachie spadající do superskupiny H (Bordenstein & Rosengaus 2005). Existence superskupiny I byla navržena po objevení wolbachii u fytoparazitického háďátka *Radopholus similis* (Tylenchida, Pratylenchidae) (Haegeman, *et al.* 2009). Superskupina K byla navržena pro wolbachie vyskytující se u svilušky *Bryobia* (Trombidiformes, Tetrachynidae), i když wolbachie některých zástupců tohoto rodu náleží do superskupiny B (Ros, *et al.* 2009). U zástupců podčeledí mšic *Lachninae*, *Aphinidae*, *Chaitophorinae*, *Eriosomatinae* a *Drepanosiphinae* byly objeveny wolbachie patřící do superskupin A a B a do nových superskupin M a N (Augustinos, *et al.* 2011). Při studiu wolbachiiální infekce byly wolbachie z molice *Bemisia tabaci* (Hemiptera, Aleyrodidae) zařazeny do superskupiny B a do nové superskupiny O (Bing, *et al.* 2014). Wolbachie z pěti ze třinácti zkoumaných druhů *Syringophilidae* (Trombidiformes, Cheyletoidea) byly zařazeny do tří superskupin a to již známé F a dvou navržených nových superskupin P a Q (Glowska, *et al.* 2015). Superskupina G byla definována pouze pomocí vysoce rekombinantního genu pro variabilní povrchový protein wolbachii (wsp) a ukázalo se, že ve skutečnosti spadá mezi superskupiny A a B (Baldo & Werren 2007) (Ros, *et al.* 2009). Existence superskupiny R vyskytující se

u jeskynních pavouků rodu *Telema* (Araneae, Telemidae) navržená Wang, *et al.* (2016) nebyla potvrzena a Gerth (2016) po zanalyzování jeho dat podal důkazy o zařazení wolbachii z těchto pavouků do superskupiny A.

Wolbachie se vyskytují v reprodukčních i tělních orgánech svých hostitelů. Protein wsp byl u různých hostitelů detekován v mozku, svalech, mesenteronu, slinných žlázách, Malpighických trubicích, hemolymfě, křídlech, vaječnicích, varlatech a v tukovém tělese. Při studiu zástupců rodu *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae, Drosophilinae) bylo zjištěno, že delší symbióza mezi bakteriemi *Wolbachia* a hostitelem vede k nižším hladinám těchto bakterií v tělesných tkáních (Dobson, *et al.* 1999). Některé wolbachie inhibují vývoj patogenů v tělech svých hostitelů vektorů, a to pravděpodobně kompeticí o zdroje či změnami regulace exprese imunitních genů, čemuž se věnuji v kapitole 3.7.

2.3.2 Reprodukční manipulace způsobené u hostitelů bakterií rodu *Wolbachia*

Mezi manipulace reprodukce, které jsou bakterie rodu *Wolbachia* schopny navodit u členovců, patří feminizace samců, zabíjení samčích embryí, navození partenogeneze a CI. Wolbachie jsou na potomstvo přeneseny vertikálně v mateřské linii v cytoplazmě vajíčka (shrnutí ve Werren, *et al.* 2008). Z evolučního hlediska je pro wolbachie výhodnější, aby co nejvíce potomků infikované matky byly samice, díky nimž se následně dostanou do dalších generací.

K feminizaci samců dochází u některých zástupců řádů stejnoonožců (Isopoda) (Bouchon, *et al.* 1998) a motýlů (Lepidoptera) (Kageyama, *et al.* 2002). Mechanismem feminizace samců u *Armadillidium vulgare* (Isopoda, Armadillidiidae) je zablokování vývoje androgenní žlázy, následkem čehož se genetičtí samci (pohlavní chromozomy ZZ) vyvíjejí jako samice. Z infikovaných populací dokonce vymizel samičí vývoj určující chromozom W a pohlaví je determinováno přítomností (u samic) či nepřítomností (u samců) intracelulárních bakterií rodu *Wolbachia* (shrnutí v Charlat, *et al.* 2003).

Zabíjení samců je další z reprodukčních manipulací způsobených wolbachii, vyskytuje se u některých zástupců řádů brouci (Coleoptera), motýli (Lepidoptera) a dvoukřídli (Diptera). Samičí larvy mohou využít mrtvá samčí embrya ze snůšky jako zdroj potravy, dále je sníženo riziko inbreedingu a nižší kompetice mezi sourozenci (shrnutí v Charlat, *et al.* 2003).

Dalším možným účinkem wolbachii na jejich hostitele je indukce partenogeneze, ke které dochází u haplodiploidních hostitelů. Projevuje se u některých blanokřídých (Hymenoptera), trásnokřídých (Thysanoptera) a roztočů (Acari). U haplodiploidních hostitelů

je pohlaví udáváno počtem chromozomů, samci jsou haploidní (vyvíjejí se z neoplozených vajíček) a samice diploidní (vyvíjejí se z oplozených vajíček). Wolbachie indukují zdvojení chromozomů ve vajíčku a potomci infikovaných samiček jsou tedy diploidní samičky (shrnutí v Charlat, *et al.* 2003).

Poslední z reprodukčních manipulací navozených bakteriemi rodu *Wolbachia* je CI, která nastává, pokud se samec infikovaný těmito bakteriemi páří s neinfikovanou samicí (jednosměrná CI) či se samicí nesoucí jiný kmen wolbachii (dvousměrná CI). Wolbachie totiž modifikují spermie a životaschopná embrya vzniknou pouze, pokud je ve vajíčku přítomný příslušný „záchranný faktor“ (rescue factor), který vyváží modifikaci spermie (shrnutí ve Werren, *et al.* 2008). CI je pravděpodobně zapříčiněna proteiny CidA a CidB, kódovanými v operonu *cidA-cidB*, pocházejícím od fága WO či analogickými systémy. Předpokládá se, že CI-indikující deubikvitináza (CidB) způsobuje modifikace embrya a CidA působí jako záchranný faktor, tím, že se váže na CidB (Beckmann, *et al.* 2017). CI může být, stejně jako maternální přenos wolbachii, úplná nebo částečná, u některých hostitelů nemusí být navozena vůbec, což je zmiňováno v následujících kapitolách.

3. Bakterie rodu *Wolbachia* u komárů

Komáři jsou významnými přenašeči mnoha infekčních patogenů. Mnoho druhů komárů je přirozeně infikováno wolbachii či jimi byly laboratorně transinfikovány. V této kapitole se zabývám interakcemi mezi komáry a wolbachii.

3.1 Virulentní kmen wolbachii *wMelPop*

Kmen wolbachii *wMelPop* (původně nazvaný jako *popcorn* kmen) byl objeven u kolonie *Drosophila melanogaster*, jež vykazovala degeneraci mozku a sítnice a významně zkrácenou životní délku v důsledku zvýšené proliferace rickettsií podobných organismů u dospělců drozofil. Při laboratorních kříženích *D. melanogaster* nebyla pozorována indukce CI (Min & Benzer 1997). Po transinfekci *wMelPop* do *Drosophila simulans* však k CI došlo, což indikovalo, že k CI nedochází pouze vlivem bakteriálního genomu, ale v rámci interakce s hostitelem (McGraw, *et al.* 2001).

Zkrácení délky života komárů transinfekcí *wMelPop* by mohlo zamezit přenosu patogenů, protože přenášené patogenní organismy vyžadují vnější inkubační dobu – dobu od sání vektora na infikovaném hostiteli po rozšíření patogenů do slinných žláz, a tedy schopnost infikovat dalšího hostitele. McMeniman, *et al.* (2009) zkoumali zkrácení délky života u *wMelPop* transinfikovaných a neinfikovaných komárů *Ae. aegypti* v různých teplotách. Při

25 °C žily neinfikované samice komárů 61 dní, samice komárů wMelPop žily 27 dní, podobný výsledek vykazovali i samci. Při 30 °C došlo ke zkrácení délky života všech komárů, neinfikované samice žily 43 dní, infikované 21 dní. Při kolísající teplotě a vlhkosti a každodenním přístupu k lidské krvi žily neinfikované samice 50 dní a infikované 21 dní. Infekce wMelPop byla u *Ae. aegypti* spolehlivě maternálně přenosná. V jedné ze dvou zkoumaných linií komárů byla wolbachii ovlivněna plodnost samic, a to negativně o 19 %. Plodnost druhé linie ovlivněna nebyla (McMeniman, *et al.* 2009).

Wolbachie wMelPop-CLA (wMelPop izolované z *D. melanogaster* a 3,5 roku pasážované v komáří buněčné linii (Woolfit, *et al.* 2013)) zároveň významně redukuje infekci virem DENV-2 v tělech komárů *Ae. aegypti* a to po požití viru obsaženého v uměle podané krvi či po infikování pomocí intrathorakální injekce (Moreira, *et al.* 2009). Tento kmen wolbachii v *Ae. aegypti* rovněž redukoval infekci CHIKV. U komárů *Ae. aegypti* byla v přítomnosti wMelPop sledována upregulace několika imunitních genů. Také byla testována schopnost wMelPop-CLA redukovat infekci komárů *Ae. aegypti* prvokem *Plasmodium gallinaceum* způsobujícím ptačí malárii. Tito komáři byli využiti, protože v dané době nebyla známá přirozená infekce komárů *Anopheles* wolbachii a ani neexistovala stabilní transinfikovaná linie. Jako negativní kontrola byli využiti *Ae. aegypti* neinfikovaní wolbachii a komáři *Aedes fluviatilis*. Po sání krve na nakažených kuřatech wolbachie wMelPop-CLA v *Ae. aegypti* snížily počet komárů v populaci infikovaných oocystami *P. gallinaceum* ze 74 % na 42 % sedm dní po infekci. qPCR ukázalo 26x méně častou přítomnost genomové DNA *P. gallinaceum* u komárů infikovaných wMelPop-CLA 15 dní po infekci. V populaci *Ae. fluviatilis* bylo oocystami *P. gallinaceum* infikováno 89 % jedinců, i přes to, že díky protilátkám proti wsp bylo zjištěno, že *Ae. fluviatilis* je přirozeně infikovaný wolbachii. Kmen wolbachii byl pojmenován wFlu, patří do superskupiny B, vyskytuje se v hustotách asi 20 × nižších než wMelPop-CLA a nachází se pouze ve vaječnicích, Malphigických trubicích a hlavě (Moreira, *et al.* 2009).

Spojení schopnosti wMelPop zkrátit životní délku svých hostitelů (McMeniman, *et al.* 2009) spolu s redukcí schopnosti přenosu patogenů nabízela případnou možnost kontroly přenosu patogenů (Moreira, *et al.* 2009). Experimentální vypouštění komárů *Ae. aegypti* na dvou lokalitách v Austrálii a na jedné ve Vietnamu však ukázalo, že ačkoli wolbachii infekce v závěrečných týdnech vypouštění dosáhla 70 – 80 % komárů v daných lokalitách, po skončení vypouštění frekvence komárů s wolbachii prudce poklesla – pravděpodobně kvůli negativnímu efektu tohoto kmenu wolbachii na své hostitele. Infekce wolbachii wMelPop

v populaci tedy zřejmě není udržitelná bez nutnosti kontinuálního vypouštění komárů s wolbachii (Nguyen, *et al.* 2015).

3.2 Kmen wolbachii wMel

Kmen wolbachii wMel izolovaný z octomilky *D. melanogaster* byl úspěšně transinfikován do komárů *Ae. aegypti* a byl využit v experimentálním nahrazení populací komárů poblíž Cairns v Austrálii (Hoffmann, *et al.* 2011; Walker, *et al.* 2011). Po transinfekci komárů *Ae. aegypti* wolbachii wMel byla pozorována silná CI při křížení s linií neobsahující wolbachie. wMel se vyskytovaly ve vysokých koncentracích ve vaječnicích a slinných žlázách, nevyskytovaly se v Malphigických trubicích, tukovém tělese, hrudních gangliích a mozku. Negativní efekt na fitness u tohoto kmenu wolbachii byl minimální. Po vystavení viru DENV-2 byla genetická informace viru detekována v tělech komáru v mnohonásobně menším množství než u kontrol neobsahujících wolbachie. Ve vzorcích slin wMel komárů nebyly obsaženy virové infekční částice. Rovněž byl v podmínkách simulujících přirozené prostředí testován invazivní potenciál komárů *Ae. aegypti* transinfikovaných wolbachii wMel a v experimentu byla dosažena fixace linie wMel (Walker, *et al.* 2011).

V navazujících experimentech byli komáři wMel *Ae. aegypti* po dobu 9 – 10 týdnů vypouštěni v Gordonvale a Yorkeys Knob poblíž města Cairns v Austrálii. Každý týden bylo v jednotlivých městech vypuštěno 10 000 – 22 000 komárů v závislosti na průběžných frekvencích wMel komárů v populacích. Po pěti týdnech od ukončení vypouštění komárů bylo v Yorkeys Knob dosaženo limitů blízkých fixaci wMel komárů a v Gordonvale bylo dosaženo 90% fixace. Během vypouštění komárů byl nahlášen jeden případ nakažení DENV, k nakažení pravděpodobně došlo mimo oblast vypouštění komárů a v oblasti nedošlo k dalšímu přenosu viru (Hoffmann, *et al.* 2011). Rok po vypouštění komárů bylo pozorováno, že si infikovaní komáři uchovali schopnost redukovat diseminaci DENV. Také docházelo po sání krve k zvýšení počtu bakterií v jedincích (Frentiu, *et al.* 2014). Po třech letech od vypouštění byla sledována stabilita infekce wMel. Infekce přetrvala, nicméně v populacích se udrželi i neinfikovaní komáři a infekce se nerozšířila mimo území původního vypouštění komárů. V Yorkeys Knob se nacházel větší poměr neinfikovaných komárů, což může být zapříčiněno jeho menší izolací v porovnání s Gordonvale, a tedy vyšší potenciální migrací z okolí. U komárů s wolbachii byl redukován počet kladených vajíček a vylíhnutých larev oproti komárům neinfikovaným. Nicméně oproti komárům z původní infikované linie udržované v laboratoři se počty signifikantně nelišily. Maternální přenos infekce ani CI pravděpodobně nebyly ovlivněny (Hoffmann, *et al.* 2014).

V roce 2013 byli v období ledna až dubna vypouštěni komáři *Ae. aegypti* infikovaní wMel na třech lokalitách přímo v Cairns. Po následující dva roky byl sledován průběh infekce. Na dvou dostatečně velkých lokalitách o rozlohách 0,97 km² a 0,52 km² došlo k ustanovení wMel v populaci *Ae. aegypti*, které trvalo minimálně po dobu pozorování, a navíc došlo k rozšíření infikovaných komárů do okolí v průměru o 100 až 200 metrů za rok. Během dvou let se rozlohy oblastí s komáry infikovanými wMel přibližně zdvojnásobily. Na třetí lokalitě o rozloze 0,11 km², jež byla menší než teoretická prahová hodnota pro lokální ustanovení infekce, ke stabilní infekci wMel nedošlo. Výsledky pozorování poukazují na možnost využití vypouštění transinfikovaných komárů nejen na izolovaných lokalitách, nýbrž i ve větších oblastech, kde by postupné šíření infekce z oblastí vypouštění napomohlo jejich ustanovení po celé oblasti (Schmidt, *et al.* 2017).

Efekt wolbachii wMel u *Ae. aegypti* byl testován i u CHIKV, YFV a ZIKV. Po krmení krví obsahující CHIKV byla prevalence infekce virem nižší u wMel komárů než u „wild type“ kontrol a kontrol léčených tetracyklinem. Také bylo detekováno méně infikovaných vzorků slin u komárů s wolbachii ve srovnání s tetracyklinem léčenou kontrolou. Vizualizace virové infekce ve slinných žlázách pomocí imunofluorescence 12 dní po infekci detekovala virus ve 27 % wMel komárů a v 67 % komárů bez wolbachii. Po infekci CHIKV intrathorakální injekcí nebyl redukční vliv wolbachii na virovou infekci patrný. Po infekci YFV pomocí intrathorakální injekce nebyl pozorován vliv wolbachii wMel na infekci. Při experimentu s wolbachii wMelPop-CLA došlo při určité koncentraci viru ke snížení prevalence infekce YFV oproti *Wolbachia* negativním kontrolám a u jedinců, kteří byli virem infikováni, nebyla pozorována diseminace viru do hlav komárů (van den Hurk, *et al.* 2012). U komárů *Ae. aegypti* infikovaných bakteriemi wMel byl redukován ZIKV. Po infikování dvěma různými izoláty viru z Brazílie bylo pozorováno snížení prevalence infekce virem u komárů s wolbachii oproti „wild type“. Byla také snižená prevalence infekce virem a nižší počty virových částic ve slinách infikovaných komárů. Po infikování „wild type“ komárů vzorky slin obsahujícími virus se infekce ZIKV u žádného z 80 jedinců infikovaných slinami wMel komárů neprojevila oproti 68 z 80 komárů, kteří se virem ze slin „wild type“ komárů nakazili (Dutra, *et al.* 2016).

Nezisková organizace World Mosquito Program, původně známá jako Eliminate Dengue, se zabývá vypouštěním transinfikovaných komárů *Ae. aegypti* s cílem potlačit virové infekce přenášené komáry. Tato organizace se podílela na vypouštění komárů již ve výše zmíněném experimentu v Austrálii v roce 2011. V současnosti jsou komáři vypouštěni

i v Brazílii, Kolumbii, Indonésii a Vietnamu a spolupráce je připravována v Indii, Mexiku, na Srí Lance, Fidži, Kiribati, Vanuatu a na Nové Kaledonii. Wolbachiiální infekce byla na většině míst vypouštění komárů stabilní až 8 let bez nutnosti vypouštění dalších komárů (<https://www.worldmosquitoprogram.org/>).

Ae. albopictus je vektorem ZIKV, DENV, CHIKV (Guo, *et al.* 2017; Silva & Dermody 2017; White, *et al.* 2016). U většiny kmenů *Ae. albopictus* pocházejících z různých lokalit byla pozorována přirozená superinfekce dvěma kmeny wolbachii (Sinkins, *et al.* 1995) nazvanými *wAlbA* a *wAlbB* (Zhou, *et al.* 1998). Po léčbě tetracyklinem a transinfekci kmenem *wMel* byla pozorována dvousměrná CI mezi transinfikovanou a „wild type“ linií komárů a jednosměrná CI mezi transinfikovanými a tetracyklinem léčenými komáry. Rovněž úplná inhibice schopnosti přenosu DENV – ve slinách transinfikovaných komárů nebyly nalezeny žádné infekční virové částice. Zároveň byla pozorována přibližně sedmkrát zvýšená koncentrace wolbachii v buňkách transinfikované linie oproti kolonizovaným „wild type“ komárům (Blagrove, *et al.* 2012). V dalším experimentu byla prokázána schopnost wolbachii *wMel* zcela inhibovat přenos CHIKV komáry *Ae. albopictus*. Také bylo pozorováno signifikantní prodloužení délky života infikovaných samců, ačkoli životní délka infikovaných samic se neodlišovala od „wild type“ či neinfikovaných linií (Blagrove, *et al.* 2013).

3.3 Superinfekce

Za účelem vypuštění potenciálně co nejmenšího množství komárů k nahrazení populací *Ae. albopictus* byla zkoumána možnost vytvoření tzv. superinfikované linie (linie infikované více kmeny wolbachii), jež by vykazovala jednosměrnou CI. Příkladem může být trojná infekce *wAlbAwAlbBwRi*, která byla vytvořena injikováním „wild type“ embryí komárů *Ae. albopictus* kmenem wolbachii *wRi* pocházejícím z *D. simulans*. Během křížení s „wild type“ populací komárů *wAlbAwAlbB* byla jednosměrná CI navozena. Nebyl pozorován negativní vliv trojné infekce na plodnost samic a linie *wAlbAwAlbBwRi* vykazovala spolehlivý maternální přenos (Fu, *et al.* 2010).

Následoval pokus o sloučení výše popsaných pozitivních efektů *wMel* u komárů *Ae. albopictus* a jednosměrné CI s „wild type“ populací nesoucí infekci *wAlbAwAlbB*. Byla vytvořena linie komárů se superinfekcí *wAlbAwAlbBwMel*. Při laboratorním křížení trojitě infikovaných komárů *Ae. albopictus* (*wAlbAwAlbBwMel*) s „wild type“ (*wAlbAwAlbB*) a *Wolbachia* negativními komáry však byla pozorována vzájemná nekompatibilita v linii *wAlbAwAlbBwMel* a také silná CI v křížení samic *wAlbAwAlbBwMel* s *wAlbAwAlbB*

samci. Zároveň bylo pozorováno snížení hustoty wlbachií wAlbA ve vaječnicích komárů wAlbAwAlbBwMel, což naznačuje, že wlbachie wAlbA přítomné v samicích pravděpodobně nebyly schopny zachránit embrya s příslušnou modifikací spermií. Vzájemná nekompatibilita linie wAlbAwAlbBwMel znamená, že nebude využitelná v boji s dengue a dalšími chorobami (Ant & Sinkins 2018).

3.4 Wolbachie u *Aedes polynesiensis*

Ae. polynesiensis, primární vektor filárie *Wuchereria bancrofti* a sekundární vektor DENV v Jižním Pacifiku (Plichart, *et al.* 2005), má vrozenou infekci wlbachií wPolA (Andrews, *et al.* 2012) spadající do skupiny wMel v superskupině A (Dean & Dobson 2004). Tyto wlbachie u něj nenavozují redukci patogenů. Po vytvoření kolonie *Ae. polynesiensis* obsahující wlbachie wAlbB, byl u těchto komárů sledován spolehlivý maternální přenos wlbachií a dvousměrná CI při křížení s „wild type“ *Ae. polynesiensis*. Po krmení krví byla pozorována nižší hladina reaktivních forem kyslíku (ROS) u transinfikovaných komárů. U transinfikovaných komárů bylo také pozorováno snížení počtu infekčních stadií modelové filárie *Brugia pahangi* po krmení infikovanou krví a kratší přežití po krmení krví, obě tato pozorování představují fenotyp vhodný ke snížení přenosu lymfatických filarióz. Transinfikovaný kmen by dle spekulací autorů mohl být využit k redukování a nahrazení původních populací *Ae. polynesiensis* v Jižním Pacifiku (Andrews, *et al.* 2012).

Po infekci *Ae. polynesiensis*, transinfikovaného bakteriemi wAlbB, DENV-2 došlo ke snížení počtu virových genomů v tělech komárů wAlbB $1,4 \times 10^4$ krát při infekci virem krmením a 28,3 krát při infekci pomocí intrathorakální injekce oproti „wild type“ kontrolám (*Ae. polynesiensis* s wPolA). Rovněž byla pozorována snížená virová replikace ve středních střevech komárů a diseminace viru do hlav komárů oproti „wild type“. Komáři infikovaní virem krmením vykazovali snížení potenciálu přenosu viru – 3,6 % vzorků slin transinfikovaných komárů obsahovalo virové částice oproti 21,4 % u „wild type“. Po infekci intrathorakální injekcí se virové částice nacházely ve všech vzorcích, nicméně u transinfikovaných komárů v nižším počtu. Při infekci krmením prochází virus přes stěnu středního střeva, která je silně infikována wlbachiemi, což by mohl být důvod vyšších inhibičních efektů, než jaké byly pozorovány u intrathorakálně infikovaných komárů. U transinfikovaných komárů měly wlbachie vyšší hustotu ve slinných žlázách, tukových těleších a středních střevech oproti „wild type“, hustota ve vaječnicích však zůstala nezměněna. Je možné, že koevolucí *Ae. polynesiensis* a wAlbB by došlo ke snížení wlbachií

v tělních tkáních. *Ae. polynesianensis* obsahující wAlbB by mohl být využit v rámci kontroly přenosu infekčních patogenů (Bian, *et al.* 2013b).

3.5 Wolbachie infikující komáry rodu *Culex*

Culex quinquefasciatus a *Culex pipiens* jsou vektory WNV (Chancey, *et al.* 2015). Oba druhy komárů jsou přirozeně infikovány wlbachiemi wPip (Zhou, *et al.* 1998). U laboratorní kolonie *Cx. quinquefasciatus*, později nazvané Ben95 tyto wlbachie dvakrát až třikrát redukovaly diseminaci viru do těla a obsah WNV ve slinách oproti tetracyklinem léčeným komárům. Jednalo se o první důkaz, že přirozená infekce komárů wlbachiemi může redukovat přenos arbovirů. Redukce přenosu viru způsobená wlbachiemi naznačovala, že kompetence některých přírodních populací *Cx. quinquefasciatus* k přenosu viru západonilské horečky by mohly být infekcí wlbachiemi ovlivněny, za předpokladu, že hustoty wlbachií se mezi jednotlivými populacemi liší (Glaser & Meola 2010).

Při porovnávání hustoty wlbachií mezi dvěma koloniemi *Cx. quinquefasciatus*, nejméně 40 let udržovanou kolonií Ben95 a přibližně 2 roky udržovanou kolonií Arg12, přibližně 9 let udržovanou kolonií *Cx. pipiens* Pa04 a mezi v terénu a z pastí sesbíranými vajíčky *Cx. pipiens* bylo zjištěno, že nejvíce wlbachií se nacházelo v kolonii Ben95. U déle kolonizovaných komárů *Cx. quinquefasciatus* Ben95 byla pozorována 3000 × vyšší hustota wlbachií než u Arg12. U kolonizované Pa04 *Cx. pipiens* byla hustota wlbachií vyšší 17 × než u komárů vylíhnutých se z vajíček sesbíraných v terénu. Rovněž byla zkoumána schopnost wlbachií u kolonie Pa04 redukovat přenos viru západonilské horečky, ale ukázalo se, že ani jedinci s nejvyšší hustotou wlbachií nebyli ve schopnosti redukovat přenos viru zvýhodněni a že hustota wlbachií v kolonii *Cx. pipiens* Pa04 byla pravděpodobně příliš nízká, než aby mohla přenos viru ovlivnit. Proto přirozené infekce komárů *Cx. pipiens* a *Cx. quinquefasciatus* pravděpodobně nebudou hrát roli v rámci kontroly vektorů viru západonilské horečky (Micieli & Glaser 2014).

3.6 Wolbachie u komárů rodu *Anopheles*

Transinfekce komára z rodu *Anopheles* byla poprvé popsána ve studii Bian, *et al.* (2013a), konkrétně se jednalo o transinfekci komára *Anopheles stephensi*, vektora malárie na Středním východě a v jižní Asii, wlbachiemi wAlbB. Dříve byli pro výzkum interakcí mezi komáry *Anopheles* a wlbachiemi využívány pouze transientní somatické infekce vzniklé injikováním wlbachií do těl dospělců (např. Hughes, *et al.* (2011)). U wAlbB transinfikovaných komárů byl pozorován úplný maternální přenos wlbachií a silná CI. Wolbachie však měly negativní

vliv na líhnutí vajíček při křížení mezi transinfikovanými jedinci, vylíhlo se 52,4 % vajíček. Redukce v líhnutí vajíček však mohla být způsobena použitím myší krve místo krve lidské při sání komárů. Během osmi generací došlo k fixaci infekce v klecových populacích po počátečním uvedení 5 – 20 % infikovaných samic a každogeneračním vypuštění dvojnásobného množství infikovaných samců oproti samcům neinfikovaným. Po infekci komárů původcem malárie *P. falciparum*, bylo u infikovaných komárů pozorováno snížení prevalence a počtu oocyst patogena na bazální straně středního střeva a k ještě výraznějšímu snížení počtu sporozoitů ve slinných žlázách. Redukce infekce plasmodií může být zapříčiněna zvýšenou hladinou ROS, u infikovaných komárů byly pozorovány vyšší hladiny H₂O₂ než u neinfikovaných kontrol. Wolbachie se nacházely ve všech orgánech infikovaných komárů, nejvýraznější výskyt byl v tukovém tělese. Výsledky experimentů nasvědčují tomu, že wolbachie wAlbB by mohly být využity k boji s malárií (Bian, *et al.* 2013a).

První přírodní populace komárů rodu *Anopheles* přirozeně infikovaného wolbachiemí byly objeveny v Burkině Faso v západní Africe, a to u vektorů malárie *An. coluzzii* a *An. gambiae*. Wolbachie byly pojmenované wAnga a zřejmě nepatří ani do superskupiny A, ani do superskupiny B. Autorům se pomocí PCR screeningu nepodařilo detekovat *wsp*, který by, dle jejich spekulací, mohlo být přerušeno transpozony. Maternální přenos se pohyboval mezi 56 až 100 % (Baldini, *et al.* 2014). Infekce *An. coluzzii* byla sledována v dalším výzkumu, nebyla zjištěna indukce CI. Bylo pozorováno, že infikované samičky kladly vajíčka v kratší době po sání krve než samičky neinfikované, nebylo však zjištěno zda tento jev nesouvisí se zkrácením délky života. Ve vzorku samiček, u nichž byla pozorována infekce plasmodiem, signifikantně převládaly samičky neinfikované wolbachiemí, což naznačuje, že wAnga by mohly ovlivňovat přenos patogena. Infekce wAnga byla dále objevena v *Anopheles arabiensis* (Shaw, *et al.* 2016).

Wolbachie byly také objeveny u *An. gambiae* a *An. coluzzi* v další zemi západní Afriky, Mali, a to ve vesnicích Kanieroba a Dangassa. Geneticky byly wolbachie wAnga-Mali bližší wolbachii infikujícími blechy *Ctenocephalides* (Siphonaptera, Pulicidae, Archaeopsyllinae) než wolbachii wAnga z Burkiny Faso, což naznačuje, že infekce populací komárů *Anopheles* v Mali a Burkině Faso proběhly odděleně. V roce 2010 byly wolbachie nalezeny u 61 % samic z Dangassy a 76 % samic z Kanieroby. V roce 2015 však bylo v Dangasse infikováno pouze 46 % samic a v Kanierobě 78 % samic. Samice komárů infikované wolbachiemí vykazovaly v obou časových obdobích nižší prevalenci infekce *Plasmodium falciparum* než samice bez wolbachii. V kolonii *An. coluzzi* z vesnice Dangassa

vytvořené v roce 2015 byl po infekci *P. falciparum* oproti očekávání pozorován nárůst počtu oocyst ve středním střevě komárů, nicméně prevalence infekce a počet sporozoitů byl u wolbachiemi infikovaných vzorků výrazně nižší (Gomes, *et al.* 2017). Wolbachie byly dále identifikovány u 3,1 - 7,5 % vzorků *An. arabiensis* z údolí Kilombero v Tanzánii (Baldini, *et al.* 2018).

3.7 Negativní ovlivnění patogenů wolbachiemi

Mechanismus inhibice patogenů wolbachiemi není v současné době zcela objasněn. Roli hrají pravděpodobně ovlivnění regulace imunitních genů a antimikrobiálních látek a kompetice o zdroje v hostitelské buňce. Hmyz nemá adaptivní imunitu, proti patogenům se brání pomocí RNA interference (RNAi) a vrozené imunity. RNAi probíhá díky malým interferujícím RNA (siRNA), mikro RNA (miRNA) a Piwi-interagujícím RNA (piRNA) (shrnuto v Blair & Olson 2014). U mutantních drozofil bylo prokázáno, že siRNA, které inhibují replikaci RNA virů, nejsou pro inhibici virů wolbachiemi nutné (Hedges, *et al.* 2012). Tři dráhy využívané pro imunitní signalizaci hmyzu jsou Toll, Imd a JAK/STAT (shrnuto v Blair & Olson 2014). Upregulace imunitních genů a redukce plasmodií a virů DENV a CHIKV byly pozorovány např. u *Ae. aegypti* transinfikovaného wMelPop-CLA (Moreira, *et al.* 2009). I u *Ae. aegypti* s wolbachiemi wAlbB došlo k upregulaci imunitních genů, také byla pozorována redukce počtu larválních stadií filárií v komárech s touto wolbachiální infekcí (Kambris, *et al.* 2009). Mohlo by se tedy zdát, že wolbachie redukují patogenní infekce regulováním imunitních genů. Nicméně ve studii srovnávající vliv wolbachií wMel a wMelPop na expresi imunitních genů *D. melanogaster* a *Ae. aegypti* nedošlo u drozofil k signifikantní upregulaci imunitních genů konzistentní s upregulací pozorovanou u *Ae. aegypti*, ačkoli u obou hostitelů dochází v přítomnosti wolbachií k regulaci DENV, což naznačuje, že upregulace imunitních genů není k potlačení viru nutná (Rancès, *et al.* 2012).

Wolbachie nemají geny pro syntézu lipopolysacharidů (Wu, *et al.* 2004), a proto do své vnější membrány pravděpodobně začleňují cholesterol z buněk svých hostitelů, tak jako bylo pozorováno u jiných zástupců čeledi Anaplasmataceae (Lin & Rikihisa 2003). Bylo zjištěno, že zvýšená hladina cholesterolu ve stravě drozofil snižuje úroveň blokování *Drosophila C* viru (*Dicistroviridae*, *Cripavirus*) wolbachiemi (Caragata, *et al.* 2013). Flaviviry využívají cholesterol v různých krocích svého životního cyklu (Martín-Acebes, *et al.* 2016) a následující studie ukazuje, že změny v homeostázi cholesterolu negativně ovlivňují replikaci viru dengue v buněčné linii *Ae. aegypti* nesoucí infekci wMelPop. V porovnání s kontrolními buňkami došlo k akumulaci cholesterolu v lipidových kapénkách a změnám v transportu

cholesterolu v buňce. V infikovaných buňkách docházelo ke snížené replikaci DENV. Přidání derivátu cyklodextrinu, používaného k návratu cholesterolu do stavu homeostáze, vedlo k redukci akumulace cholesterolu a k opětovné replikaci DENV. Komáři *Ae. aegypti* nesoucí *wMel* vykazovali podobné změny v proteomu jako buňky s infekcí *wMelPop* (Geoghegan, *et al.* 2017).

4. Symbiotické bakterie rodu *Wolbachia* u flebotomů

Oproti výzkumu zabývajícím se symbiotickými bakteriemi rodu *Wolbachia* u komárů je studium interakce těchto bakterií s flebotomy teprve v počátcích a mnohdy se omezovalo pouze na detekci wolbachii pomocí PCR screeningu genu pro wolbachiiální povrchový protein *wsp* či bylo součástí výzkumů mikrobiomů jednotlivých druhů flebotomů. Všechny uváděné infekce wolbachii u flebotomů jsou shrnuty v Tabulce 1. Dnes již existuje první uměle infikovaná buněčná linie flebotomů (da Silva Gonçalves, *et al.* 2019) a zároveň byla popsána metoda infekce vajíček (Jeffries, *et al.* 2018) otevírající možnosti dalšímu studiu a potenciálnímu využití wolbachii v boji s patogeny přenášenými flebotomy.

4.1 Počáteční objevy wolbachii u flebotomů

Zhou, *et al.* (1998) klonovali a sekvenovali gen pro *wsp* u wolbachii infikujících různé druhy hmyzu a představili primery pro PCR použitelné pro klasifikaci wolbachii do skupin. V jejich experimentu použili pouze jednoho zástupce flebotomů, a to vzorky *Phlebotomus papatasi* pocházející z Izraele. Wolbachie infikující tyto flebotomy byly nazvány *wPap* a zařazeny do superskupiny A a do podskupiny Pap (Zhou, *et al.* 1998).

V první studii zaměřující se na wolbachiiální infekci u flebotomů byly pomocí screeningu zkoumány geny pro *wsp* a 16S rRNA 6 druhů flebotomů z 11 laboratorních kolonií a vzorků ze čtyř lokalit v Hondurasu. Wolbachie byly objeveny u 3 laboratorních kolonií *P. papatasi* pocházejících z Izraele, Saudské Arábie a severního Sinaje v Egyptě. U kolonie *P. papatasi* z Jordánska nebyla wolbachiiální infekce detekována (Cui, *et al.* 1999).

Do dalšího systematického výzkumu bylo zahrnuto 53 vzorků náležejících do 15 druhů flebotomů ze Starého a Nového světa, kteří pocházeli z laboratorních kolonií i z odchytů v terénu. Při PCR screeningu zjišťujícím přítomnost genu pro *wsp* byl tento gen nalezen u 9 vzorků čítajících několik jedinců ze 4 druhů: *P. papatasi*, *Phlebotomus perniciosus*, *Lutzomyia shannoni* a *Lutzomyia whitmani*. Pět z těchto vzorků bylo následně sekvenováno pro fylogenetickou analýzu. *L. shannoni* a *L. whitmani*, relativně vzdáleně příbuzné druhy, měly shodnou sekvenci *wsp*. To indikuje možnost nedávného horizontálního

přenosu mezi těmito dvěma druhy, protože infekce jejich předka a následná ztráta wolbachii u jiných zástupců rodu není příliš pravděpodobná. Wolbachie infikující tyto dva druhy byly nazvány wWhi a spolu s wolbachii z *P. papatasi* byly zařazeny do superskupiny A, v níž vznikla nová podskupina Whi. Sekvence *wsp* z *P. papatasi* se s rozdílem v jedné bázi shodovala se sekvencí známou z výzkumu Zhou, *et al.* (1998). Wolbachie infikující *P. perniciosus* byly pojmenovány wPrn a dle sekvence *wsp* byly zařazeny do nové podskupiny Prn superskupiny B. Rozdělení do různých superskupin naznačuje, že flebotomové byli infikováni wolbachii vícekrát v historii (Ono, *et al.* 2001).

Benlarbi & Ready (2003) studovali wolbachiiální infekci u divokých populací flebotomů. Konkrétně u přenašeče *Leishmania major* způsobující zoonotickou kutánní leishmaniózu v severní Africe a v Asii, *P. papatasi*, a u *P. perniciosus*, který působí jako přenašeč *Leishmania infantum* způsobující leishmaniózy dětí a psů v jihovýchodní Evropě a severovýchodní Africe. Vzorky *P. papatasi* byly odchyceny na jedné lokalitě ve Španělsku a čtyřech lokalitách v Íránu. Ve 125 ze 153 jedinců byl pomocí PCR screeningu detekován *wsp*, sekvenování odhalilo pouze jeden haplotyp napříč populacemi, tento haplotyp byl již známý z výzkumů. *P. perniciosus* byl získán ze tří lokalit ve Španělsku a z lokalit ve Francii a Tunisku, zařazen byl i laboratorní kmen z Itálie. Wolbachie byly detekovány u 38 ze 63 jedinců a opět byl nalezen pouze jeden, již známý, haplotyp. Wolbachie byly detekovány u samců i samic obou druhů flebotomů. U obou vektorů byl sekvenován i fragment mitochondriálního genu pro cytochrom b (Cyt b). U *P. perniciosus* se vyskytovaly dvě linie Cyt b – typická a Iberská, u *P. papatasi* se vyskytovala jediná pro tento druh typická linie. I přes malé odlišnosti v genu pro Cyt b u *P. papatasi* a výskyt dvou mitochondriálních linií u *P. perniciosus* nebyly mezi jedinci zastupujícími u jednoho druhu různé linie pozorovány rozdílné haplotypy *wsp*, ačkoli se oba geny dědí maternálně (Benlarbi & Ready 2003).

4.2 Detekce wolbachii u flebotomů Starého světa

P. papatasi je specifickým přenašečem *Le. major* způsobující zoonotickou kutánní leishmaniózu v řadě zemí Starého světa včetně Íránu (Maroli, *et al.* 2013). Při studiu diferenciace tamní populace byl *wsp* použit jako jeden z maternálně dědičných genetických markerů. Vzorky flebotomů pocházely z terénu z provincií Isfahán, Teherán a Hamadán. *wsp* byl detekován u 72,6 % ze 124 samců a 93,9 % z 49 samic *P. papatasi*. Jednalo se o již známý haplotyp patřící mezi wPap v superskupině A (Parvizi, *et al.* 2003).

Phlebotomus mongolensis a *Phlebotomus caucasicus* jsou potenciálními přenašeči zoonotické kutánní leishmaniózy v Íránu (Parvizi & Ready 2008) způsobené *Le. major*

(Maroli, *et al.* 2013). Wolbachie byly detekovány u 36,5 % jedinců pocházejících z regionu Turkmen Sahra v severovýchodním Íránu. Jednalo se o první detekci wolbachii u těchto druhů flebotomů. Byly identifikovány dva kmeny wolbachii jeden známý, blízký haplotypům z *P. papatasi*, a jeden nový (označený Turk07), oba náležející do superskupiny A (Parvizi, *et al.* 2013a). Tento nový haplotyp detekovali u 10 jedinců *P. mongolensis* a *P. causicus* pocházejících ze stejného regionu také Bordbar, *et al.* (2014).

Wolbachie byly pomocí PCR screeningu *wsp* detekovány také u *Phlebotomus perfiliewi transcausicus* a u *Phlebotomus kandelakii*. Flebotomové byli odchyceni v íránských provinciích Ázerbajdžán a Ardabil. Do studie bylo zahrnuto 183 jedinců flebotomů, infikováno wolbachii bylo 9 ze 41 jedinců *P. perfiliewi transcausicus*, 2 blíže neurčené samice z podrodu *Adlerius* a 1 z 50 jedinců *P. kandelakii*, nicméně udávané počty infikovaných flebotomů nejsou v textu konzistentní. Sekvenování vzorů odhalilo u *P. perfiliewi transcausicus* dva haplotypy, jeden již známý shodný s haplotypem z *P. papatasi* a jeden nový haplotyp (Parvizi, *et al.* 2013b).

V další studii sledující přítomnost wolbachii u flebotomů v Íránu byla wolbachiiální infekce detekována u 241 ze 638 zástupců následujících druhů flebotomů: *P. papatasi* (155 infikovaných z 262 jedinců), *Phlebotomus sergenti* (20/44), *Phlebotomus mongolensis* (27 z 85 samců), *Phlebotomus causicus* (5 ze 7 samců), 16 z 57 samic *P. mongolensis/P. causicus*, *Phlebotomus alexandri* (6/10), *Phlebotomus perfiliewi* (9/41), *Phlebotomus kandelakii* (1/50) a u 2 z 36 samic rodu *Adlerius*, jejichž druh se nepodařilo morfologicky určit. U 158 infikovaných jedinců se podařilo sekvenovat gen *wsp* a byly rozpoznány 3 jeho haplotypy. Jeden známý, shodný s haplotypem izolovaným z kmene wPap z *P. papatasi*, patří do wolbachiiální superskupiny A, izolovaný ze 144 jedinců a dva další. Haplotyp izolovaný z 10 jedinců náležejících do druhů *P. mongolensis* a *P. causicus* se shodoval s haplotypem, který izolovali Parvizi, *et al.* (2013a). Haplotyp izolovaný ze 4 jedinců druhu *P. perfiliewi* se pouze záměnou jedné báze lišil od sekvence známé z wolbachiiálního kmene wPrn známého z *P. perniciosus* náležejícího do skupiny B. (Bordbar, *et al.* 2014).

Phlebotomus sergenti působí v Íránu jako důležitý vektor *Leishmania tropica* zapříčínující kutánní leishmaniózu (Maroli, *et al.* 2013). Po odchycích flebotomů na pěti lokalitách v Íránu, kde je kutánní leishmanióza endemická a kde se *P. sergenti* a *P. papatasi* vyskytují sympatricky, bylo z 2953 jedinců flebotomů identifikováno 18,2 % jako *P. papatasi* a 12,7 % jako *P. sergenti*. U *P. papatasi* bylo infikováno wolbachiiemi 83 % jedinců,

u *P. sergenti* 76 % jedinců. Bylo identifikováno 9 haplotypů sekvence *wsp*, všechny byly zařazeny do superskupiny A. Sekvence z *P. sergenti* zformovaly novou podskupinu superskupiny A, *wSerg*. Některé sekvence izolované z *P. papatasi* spadaly rovněž do podskupiny *wSerg*, většina však spadala do podskupiny *wPap*. Obě dvě skupiny wolbachii současně byly nalezeny u laboratorního kmene pocházejícího z provincie Isfahán v Íránu a v jedincích chycených v severozápadním Íránu (Karimian, *et al.* 2018). Karimian, *et al.* (2018) uvádějí, že laboratorní kolonie se obtížně udržuje a spekuluji, že důvodem by mimo jiné mohla být i CI způsobenou infekcí dvěma skupinami wolbachii.

Wolbachie byly detekovány i ve flebotomech chycených v Marseille a Allauch ve Francii ve studii zabývající se detekcí bakterií čeledi Anaplasmataceae, do níž patří i wolbachie, u flebotomů. Testováno bylo 557 jedinců flebotomů rozdělených do 48 „poolů“ vzorků. K detekci byl využit PCR screening genu pro 16S rRNA Anaplasmataceae, který byl u pozitivních vzorků z neurčených jedinců *Phlebotomus* a ve vzorcích *P. perniciosus* a *Sergentomyia minuta* následně sekvenován. Byly objeveny dvě odlišné sekvence. U vybraných vzorků byl sekvenován také *wsp*. Sekvence *wsp* nalezené u neurčených jedinců a *P. perniciosus* byly shodné s již známou sekvencí z *P. perniciosus*. U vzorků ze *Sergentomyia minuta* se sekvence *wsp* z 99 % podobala sekvenci známé z potměníka *Tribolium confusum* (Coleoptera, Tenebrionidae). Wolbachie ze *S. minuta* pravděpodobně představují nový kmen. Oba detekované kmény náleží do superskupiny B (Matsumoto, *et al.* 2008).

Phlebotomus chinensis je vektor, který v Číně přenáší *Le. infantum* způsobující viscerální leishmaniózy (Maroli, *et al.* 2013). Při výzkumu porovnávajícím mikrobiom *P. chinensis* v Sečuánu a Henanu byly wolbachie detekovány pouze u 8,6 % jedinců z henanské populace a konsenzus sekvence jejich genu pro 16S rRNA z 99% odpovídala sekvenci *wRi* (Li, *et al.* 2016), jednomu z kmenů infikujících *D. simulans* patřícímu do podskupiny Riv v superskupině A (Zhou, *et al.* 1998).

Wolbachie byly detekovány i u *P. papatasi* v Turecku (Karakuş, *et al.* 2017), hlavního přenašeče *Le. major* způsobujícího zoonotickou kutánní leishmaniózu v oblasti od severní Afriky po Indii (Maroli, *et al.* 2013), a to u vzorků z přírodních populací ze 4 lokalit a u laboratorní kolonie. Během výzkumu byl studován mikrobiom středního střeva flebotomů a wolbachie se v něm vyskytovaly nejčastěji ze všech detekovaných bakterií (Karakuş, *et al.* 2017).

Ve studii zabývající se infekcí tureckých flebotomů bakteriemi rodů *Wolbachia* a *Spiroplasma* byly wolbachie detekovány pomocí PCR screeningu genů *wsp* a *groEL*. Jednalo se o studii zahrnující pouze 40 jedinců flebotomů rodu *Phlebotomus* pocházejících z Antalijské provincie, nezařazených do druhů. Wolbachie byly detekovány u 70 % z nich, a to u 76 % samců a 63 % samic. Dle sekvencí *wsp* a *groEL* získaných ze tří jedinců, u nichž se pro každý z genů sekvence shodovala, wolbachie zřejmě náležely do superskupiny A (Karatepe, *et al.* 2018).

4.3 Detekce wolbachii u flebotomů Nového světa

V Novém světě byly wolbachie objeveny u tří z osmnácti druhů flebotomů rodu *Lutzomyia* odchycených na ostrově Barro Colorado v Gatúnské přehradě v Panamě. U druhu *Lutzomyia vespertilionis*, který není antropofilní, bylo wolbachie infikováno 73,3 % jedinců. Infikován byl i jediný zástupce kryptického druhu či špatně diagnostikovaný jedinec podobný druhu *L. vespertilionis*. Wolbachie u těchto dvou druhů se geneticky lišily, což může být způsobeno oddělenými infekcemi horizontálním transportem. Druh *Lutzomyia trapidoi* měl 53,3 % zkoumaných jedinců infikovaných wolbachie a 43,3 % jedinců infikovaných *Leishmania naiffi*, nicméně současná infekce wolbachii i leishmanií se nacházela pouze u 23,3 % jedinců. Wolbachie *L. trapidoi* měly 3 ze 6 alel shodné s alelami wolbachii výše zmíněného kryptického či špatně diagnostikovaného druhu *L. vespertilionis*. Populace flebotomů *L. trapidoi* v Panamě do té doby nebyla spojována s infekcí *Le. naiffi*, nýbrž s infekcí *Leishmania panamensis*. Ani u jednoho ze dvou zkoumaných druhů flebotomů rodu *Brumptomyia* z ostrova Barro Colorado nebyla pozorována wolbachiiální infekce. Ani u *Lu. vespertilionis*, ani u *Lu. trapidoi* nebyla infekce pozorována u všech jedinců (Azpurua, *et al.* 2010), což by, jak spekulovali Azpurua, *et al.* (2010), mohlo být způsobeno neúplným maternálním přenosem wolbachii, u flebotomů pozorovaným dvojicí Kassem & Osman (2007) (viz kapitola 4.4) u druhu *P. papatasi*.

Při výzkumu zaměřujícím se na detekování wolbachii a leishmanií u vzorků flebotomů odchycených na kávových plantážích v regionu Soconusco na jihu Mexika pomocí PCR screeningu genů pro 16S rRNA a *wsp* byly wolbachie detekovány pouze u jedné samice *Lutzomyia cruciata* z 206 identifikovaných jedinců zastupujících druhy *Lu. ovalesi*, *Lu. shannoni*, *Lu. texana*, *Lu. carpenteri* a *Lu. cruciata*, leishmanie nebyly u žádného z jedinců detekovány (Mikery-Pacheco, *et al.* 2012). *Lu. cruciata* je podezříváným vektorem *Leishmania mexicana* způsobujícím kutánní leishmaniózu v Mexiku (Pech-May, *et al.* 2010).

Přítomnost wolbachii spolu s použitím restričních enzymů štěpicích mitochondriální gen *COI* (Cytochrom c oxidáza podjednotka I) u *Lutzomyia stewarti* byly navrženy jako znaky použitelné k rozlišení od *Lutzomyia vexator* (Hughes, *et al.* 2014). Oba druhy jsou severoameričtí přenašeči plazích parazitických prvoků *Plasmodium mexicanum* (Ayala & Lee 1970). Wolbachie byly detekovány u 93 % vzorků *L. stewarti* z Kalifornie, byly pojmenovány wSte a zařazeny do superskupiny A, monofyleticky patřily k wolbachiiím z mravenců *Formica oculata* (Hymenoptera, Formicidae, Formicinae) a broukům *Ceutorhynchus obstrictus* (Coleoptera, Curculionidae). Wolbachie se nevyskytovaly v žádném ze vzorků *L. vexator* (Hughes, *et al.* 2014).

Při výzkumu zabývajícím se střevními bakteriemi u *Lutzomyia evansi* pocházejících z pobřeží Karibského moře v Kolumbii nebyly v DNA ze střev pomocí PCR screeningu *wsp* detekovány ani wolbachie, ani leishmanie (Vivero, *et al.* 2016). *L. evansi* je přitom známým vektorem *Le. infantum* v Kolumbii a Venezuele (Maroli, *et al.* 2013). V další studii však ve stejném regionu, pomocí PCR screeningu *wsp*, wolbachie v *L. evansi* v nízké frekvenci u samců detekovány byly, po sekvenování byly určeny jako nový kmen wLev. V nízkých frekvencích byly wolbachie detekovány také u *Lutzomyia c. cayennensis* a *Lutzomyia dubitans*, u obou druhů u samců i samic. U *Lu. dubitans* se jednalo o kmen wLev, u *Lu. c. cayennensis* dva kmény, wLev a nový kmen wLcy. Oba nové kmény byly zařazeny do podskupiny wLeva superskupiny B. U dalších zkoumaných druhů *Lutzomyia trinidadensis*, *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia rangeliana*, *Lutzomyia atroclavata* wolbachie detekovány nebyly (Vivero, *et al.* 2017).

U *Lutzomyia longipalpis* byly wolbachie poprvé detekovány při screeningu cílicím na wolbachiiální infekci flebotomů v Camaçari v Brazílii, oblasti endemického výskytu viscerální leishmaniózy. Nacházely se u 3 samců a 2 samic z 200 flebotomů *L. longipalpis*. Šlo o 5 různých haplotypů 16S rRNA, přičemž 4 z nich byly blízké wolbachiiím drozofil a 1 wolbachiiím komárů rodu *Culex* (Da Rocha, *et al.* 2018). Autoři této studie spekulují, že by infekce wolbachii u *L. longipalpis* mohla být potenciálně využita v kontrole vektorů viscerální leishmaniózy.

4.4 CI a maternální přenos wolbachii u *P. papatasi* z Egypta

V následujících dvou studiích byly zkoumány CI a maternální přenos wolbachii infikujících flebotomy *P. papatasi* v laboratorní kolonii ustanovené z populace flebotomů na severu Sinajského poloostrova v Egyptě. Sekvence *wsp* těchto wolbachii odpovídala již známým sekvencím detekovaným Ono, *et al.* (2001). U ostatních zkoumaných laboratorních kolonií

z Egypta (*P. papatasi* z Alexandrie, *Phlebotomus langeroni* a *Phlebotomus bergeroti*) wolbachie detekovány nebyly. Byla pozorována CI mezi flebotomy ze sinajské kolonie zbavenými wolbachialní infekce pomocí léčby tetracyklinem a mezi neléčenými zástupci této kolonie. Po křížení léčených samic s neléčenými samci se vylíhlo pouze 25 % vajíček oproti kontrolnímu křížení neléčených komárů, po němž se vylíhlo 57 % vajíček. Nicméně snížené líhnutí bylo pozorováno i po křížení léčených samic a léčených samců, kdy se vylíhlo 42 % vajíček. Tato pozorování naznačují, že infekce wolbachiem může být pro flebotomy výhodná. Další pozorovanou anomálií bylo, že při kříženích ústících v CI docházelo ke změnám poměru pohlaví potomků ve prospěch samců (Kassem, *et al.* 2003).

V navazující studii byl proveden přenos wolbachialní infekce ze sinajské na alexandrijskou kolonii křížením infikovaných samic a neinfikovaných samců. V F1 generaci byl maternální přenos wolbachii sledován pouze u 5 z 23 úspěšných křížení mezi infikovanými samicemi a neinfikovanými samci. Mezi potomky byly wolbachie detekovány pouze u samic. Infekce wolbachiem u samců v této generaci mohla být příliš slabá na to, aby byla detekována. V F3 generaci bylo wolbachiem infikováno 18 z 25 testovaných samic a 8 z 25 testovaných samců pocházejících z křížení infikovaných samic a neinfikovaných samců. Při žádném z křížení nebyla pozorována CI (Kassem & Osman 2007).

Tab. 1.: Znamé wolbachialní infekce u různých druhů flebotomů z různých geografických oblastí. Řazeno dle roku publikace. X a Y označují kmeny wolbachii, které se liší, ale nebyly dříve určeny. * označuje kryptický či špatně diagnostikovaný druh.

Druh	Kmen wolbachii	Super-skupina	Podskupina	Lokalita	Původ	Studie
<i>P. papatasai</i>	wPap	A	Pap	Izrael		(Zhou, <i>et al.</i> 1998)
<i>P. papatasi</i>				Izrael Saúdská Arábie Egypt	kolonie kolonie kolonie	(Cui, <i>et al.</i> 1999)
<i>P. papatasi</i>	wPap	A	Pap	Indie Izrael	kolonie odchyt	(Ono, <i>et al.</i> 2001)
<i>P. perniciosus</i>	wPrn	B	Prn	Itálie	kolonie	

<i>L. whitmani</i>	wWhi	A	Whi	Brazílie	kolonie	
<i>L. shannoni</i>	wWhi	A	Whi	Kolumbie	odchyt	
<i>P. papatasi</i>	wPap	A	Pap	Španělsko Írán	odchyt odchyt	(Benlarbi & Ready 2003)
<i>P. perniciosus</i>	wPrn	B	Prn	Itálie Španělsko Francie Tunisko	kolonie odchyt odchyt odchyt	
<i>P. papatasi</i>	wPap	A	Pap	Írán	odchyt	(Parvizi, et al. 2003)
<i>P. papatasi</i>	wPap	A	Pap	Egypt (Sinaj)	kolonie	(Kassem, et al. 2003)
<i>Phlebotomus</i> sp.	wPrn	B	Prn	Francie	odchyt	(Matsumoto, et al. 2008)
<i>P. perniciosus</i>	wPrn	B	Prn	Francie	odchyt	
<i>Se. minuta</i>	„Wolbachia detected in <i>Se. minuta</i> “	B		Francie	odchyt	
<i>L. vespertilionis</i>	X			Panama	odchyt	(Azpurua, et al. 2010)
<i>L. vespertilionis</i> *	Y			Panama	odchyt	
<i>L. trapidoi</i>				Panama	odchyt	
<i>L. cruciata</i>				Mexiko	odchyt	(Mikery-Pacheco, et al. 2012)
<i>P. mongolensis</i>	wPap/ Turk 07	A	Pap	Írán	odchyt	(Parvizi, et al. 2013a)
<i>P. caucasicus</i>	wPap/ Turk07	A	Pap	Írán	odchyt	
<i>P. perfiliewi transcaucasicus</i>	wPap/ nový	A	Pap	Írán	odchyt	(Parvizi, et al. 2013b)

	haplotyp					
<i>P. kandelakii</i>				Írán	odchyt	
<i>P. mongolensis</i>	Turk07	A	Pap	Írán	odchyt	(Bordbar, <i>et al.</i> 2014)
<i>P. caucasicus</i>	Turk07	A	Pap	Írán	odchyt	
<i>P. perfiliewi</i>	wPrn	B	Prn	Írán	odchyt	
<i>P. sergenti</i>				Írán	odchyt	
<i>P. alexandri</i>				Írán	odchyt	
<i>P. papatasi</i>				Írán	odchyt	
<i>P. kandelakii</i>				Írán	odchyt	
<i>Adlerius</i>				Írán	odchyt	
<i>L. stewarti</i>	wSte	A		USA	odchyt	(Hughes, <i>et al.</i> 2014)
<i>P. chinensis</i>	wRi	A	Riv	Čína (Henan)	odchyt	(Li, <i>et al.</i> 2016)
<i>L. evansi</i>	wLev	B	Leva	Kolumbie	odchyt	(Vivero, <i>et al.</i> 2017)
<i>L. c. cayennensis</i>	wLev/ wLcy	B	Leva	Kolumbie	odchyt	
<i>L. dubitans</i>	wLev	B	Leva	Kolumbie	odchyt	
<i>P. papatasi</i>				Turecko	odchyt a kolonie	(Karakuş, <i>et al.</i> 2017)
<i>P. papatasi</i>		A	Pap, Serg	Írán	odchyt a kolonie	(Karimian, <i>et al.</i> 2018)
<i>P. sergenti</i>		A	Serg	Írán	odchyt a kolonie	
<i>Phlebotomus spp.</i>		A		Turecko	odchyt	(Karatepe, <i>et al.</i> 2018)
<i>L. longipalpis</i>	různé haplotypy			Brazílie	odchyt	(Da Rocha, <i>et al.</i> 2018)

4.5 Metoda injikování vajíček *Lutzomyia longipalpis*

Za účelem možného využití kontrolních strategií vůči přenosu leishmanií byla vytvořena metoda injikování vajíček flebotomů *Lutzomyia longipalpis*. Těmito kontrolními strategiemi by mohla být infekce wolbachielemi či vytvoření transgenních linií flebotomů např. pomocí metody CRISPR/Cas 9. Pro vyvinutí metody byly použity wolbachie wMel, izolované z *D. melanogaster*, jako marker úspěšného injikování vajíčka. Injiována byla slabě melanizovaná vajíčka v preblastodermálním stadiu, a to poblíž posteriorní části. Z 1815 injikovaných vajíček bylo pouze 6 vylíhnutých samic plodných a 3 z nich nesly wolbachialní infekci. Z nich se povedlo ustavit dvě linie, ve kterých docházelo k maternálnímu přenosu wolbachie, nicméně bakterie byly přenášeny pouze v nízkém množství. V paté generaci došlo ke ztrátě infekce wolbachielemi. Nedošlo tedy k vytvoření stabilně infikované linie (Jeffries, *et al.* 2018).

4.6 Artificiální wolbachialní infekce buněčných linií *Lutzomyia longipalpis*

První stabilní wolbachialní infekce buněčné linie flebotomů byla provedena teprve v současnosti. Wolbachielemi wMelPop-CLA byla stabilně infikována buněčná linie *Lutzomyia longipalpis* Lulo. Při procesu byla rovněž testována infekce u další linie *Lu. longipalpis*, a to LL-5, a kmen wolbachie wMel. Během 72 hodin po infekci LL-5 wolbachielemi wMelPop-CLA a wMel došlo ke zvýšení exprese některých imunitních genů a počet wolbachie v buňkách se během této doby postupně snižoval. Kmen wMelPop-CLA při pokusech o stabilní infekci wolbachielemi obstál v obou buněčných liniích. Infikovanou buněčnou linii Lulo – wMelPop-CLA se podařilo udržet již přes 1,5 roku. Infekce wMelPop-CLA v LL-5 byla méně stabilní a wolbachie se v buňkách nacházely v nižších hustotách. Pokus o infekci buněčných linií kmenem wMel se nezdařil. S ustanovenými liniemi byla zkoumána exprese vybraných imunitních genů. V linii LL-5 infikované wMelPop-CLA nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly v expresi zvolených genů oproti kontrole. V linii Lulo wMelPop-CLA měly wolbachie vyšší průměrnou hustotu než v LL-5 a byla pozorována změna exprese některých imunitních genů. Po infekci Lulo buněčné linie s wMelPop-CLA *Le. infantum* nebyl pozorován žádný efekt wolbachie na interakci *Le. infantum* s buňkami oproti kontrole (da Silva Gonçalves, *et al.* 2019).

5. Diskuze a závěr

Komáři a flebotomové přenášejí velké množství patogenů, kteří ohrožují lidské zdraví (Foster & Walker 2019; Maroli, *et al.* 2013). Jedná se o viry, parazitické prvoky, bakterie a filárie.

Nedostatečné možnosti prevence a léčby onemocnění jako malárie, chikungunya, dengue či leishmanióza spolu s rozšířenou rezistencí hmyzu vůči insekticidům, vedlo ke studiu intracelulárních symbiotických bakterií rodu *Wolbachia*, jejichž inhibující vliv na přenos infekčních patogenů je v současnosti využíván a dále zkoumán u komárů. Interakce wolbachií s flebotomy nejsou dosud příliš prostudovány.

Vypouštění komárů transinfikovaných wolbachiemi nabízí mnoho výhod. Díky cytoplasmatické inkompatibilitě a maternálními přenosu jsou schopni stabilně nahradit stávající populace komárů, a dokonce postupně rozšiřovat oblasti výskytu. Nahrazení populace rovněž zmírňuje změny v ekosystému v porovnání s decimováním populace např. pomocí transgenních samců nesoucích letální alely. Ačkoli může být obtížné najít vhodnou kombinaci přenašeče a kmenu wolbachií, tak aby zároveň redukovaly či inhibovaly přenášené patogenní organismy, bylo prokázáno, že strategie využívající wolbachie je plně funkční.

Komáři transinfikovaní wolbachiemi vykazují redukci či inhibici virů DENV, CHIKV, ZIKV, YFV, WNV, parazitických prvoků *P. falciparum* a *P. gallinaceum* i filárií *B. pahangi*. Transinfikovaní komáři jsou díky iniciativě World Mosquito Program vypouštěni v několika zemích světa (<https://www.worldmosquitoprogram.org/>).

Nabízí se otázka, zda by pomocí wolbachií bylo možné redukovat přenos prvoků rodu *Leishmania*, kteří zodpovídají za onemocnění leishmaniózu. Je nutné podotknout, že míra poznání interakcí wolbachií a flebotomů není dosud rozsáhlá. Wolbachie byly detekovány přibližně ve dvou desítkách druhů flebotomů Starého a Nového světa, mnohdy pouze ve zlomku získaných vzorků. Studium se většinou zaměřilo pouze na detekci těchto bakterií, případně na jejich fylogenetické zařazení do superskupin označujících hlavní vývojové linie wolbachií. U *P. papatasi* bylo také sledováno navození CI s flebotomy, jejichž přirozená infekce byla odstraněna pomocí antibiotik. Rovněž se podařilo infekci přenést na laboratorní kolonii *P. papatasi*, která není wolbachiemi infikována přirozeně, nicméně maternální přenos infekce do dalších generací nebyl úplný (Kassem, *et al.* 2003; Kassem & Osman 2007). Komáři, kteří jsou vypouštěni do terénu, bývají wolbachiemi transinfikováni, protože druhy komárů buďto nejsou přirozenými nositeli wolbachií, nebo jejich přirozená infekce nevykazuje požadované vlastnosti. První krok pro transinfekci flebotomů wolbachiemi byl učiněn při experimentu zabývajícím se injikováním bakterií *wMel* do vajíček flebotomů (Jeffries, *et al.* 2018). Tato metoda však vyžaduje další výzkum, protože v průběhu pěti generací došlo ke ztrátě wolbachiální infekce. Řešením by mohlo být využití buněčné linie,

v níž by došlo k postupnému ustanovení wolbachii tak, aby se bakterie adaptovaly na nového hostitele – tato strategie byla využita během transinfikování komárů (McMeniman, *et al.* 2008). V současné době se podařilo vytvořit buněčné linie *Lu. longipalpis*, které nesou infekci wolbachii wMelPop, nicméně v linii obsahující wolbachie nebylo pozorováno negativní ovlivnění leishmanií interagujících s buňkami (da Silva Gonçalves, *et al.* 2019). Ačkoli je vytvoření buněčné linie stabilně infikované wolbachiami významným krokem vpřed, problémem by mohlo být využití právě tohoto kmenu wolbachii, jelikož u svých hostitelů sebou způsobuje významnou ztrátu fitness (Min & Benzer 1997).

Obecným problémem týkajícím se potenciálních efektů wolbachii na přenos leishmanií je biologie tohoto prvoka. Kontakt leishmanií s flebotomy je totiž omezen na trávicí trakt na rozdíl od plasmodií a virů, kteří během svého vývoje v těle komárů více migrují. Důležitým bodem výzkumu by tedy mohlo být studium výskytu wolbachii v tkáních flebotomů a popis vlivu wolbachii na leishmanie.

Je možné, že wolbachie by u flebotomů mohly ovlivnit i přenos virů, nicméně arboviry přenášené flebotomy nezpůsobují onemocnění tak významná jako viry přenášené komáry. Flebotomové na rozdíl od komárů přenášejí i patogenní bakterie, a to *B. bacilliformis*. Případné ovlivnění přenosu těchto bakterií wolbachiami by odhalilo ještě širší možnosti využití bakterií rodu wolbachia v kontrole přenosu infekčních patogenů.

Seznam použité literatury

- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D. 2016. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS neglected tropical diseases* 10(3):e0004349-e0004349.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, Team WHO. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLOS ONE* 7(5):e35671-e35671.
- Andrews ES, Crain PR, Fu Y, Howe DK, Dobson SL. 2012. Reactive Oxygen Species Production and *Brugia pahangi* Survivorship in *Aedes polynesiensis* with Artificial Wolbachia Infection Types. *PLOS Pathogens* 8(12):e1003075.
- Ant TH, Sinkins SP. 2018. A Wolbachia triple-strain infection generates self-incompatibility in *Aedes albopictus* and transmission instability in *Aedes aegypti*. *Parasites & vectors* 11(1):295-295.
- Augustinos AA, Santos-Garcia D, Dionyssopoulou E, Moreira M, Papapanagiotou A, Scarvelakis M, Doudoumis V, Ramos S, Aguiar AF, Borges PAV, Khadem M, Latorre A, Tsiamis G, Bourtzis K. 2011. Detection and characterization of Wolbachia infections in natural populations of aphids: is the hidden diversity fully unraveled? *PLOS ONE* 6(12):e28695-e28695.
- Ayala SC, Lee D. 1970. Saurian Malaria: Development of Sporozoites in Two Species of Phlebotomine Sandflies. *Science* 167(3919):891-892.

- Azpurua J, De La Cruz D, Valderama A, Windsor D. 2010. *Lutzomyia* Sand Fly Diversity and Rates of Infection by *Wolbachia* and an Exotic *Leishmania* Species on Barro Colorado Island, Panama. *PLoS neglected tropical diseases* 4(3):e627.
- Baldini F, Rougé J, Kreppel K, Mkandawile G, Mapua SA, Sikulu-Lord M, Ferguson HM, Govella N, Okumu FO. 2018. First report of natural *Wolbachia* infection in the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* in Tanzania. *Parasites & vectors* 11(1):635-635.
- Baldini F, Segata N, Pompon J, Marcenac P, Robert Shaw W, Dabiré RK, Diabaté A, Levashina EA, Catteruccia F. 2014. Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae*. *Nature Communications* 5:3985.
- Baldo L, Ayoub NA, Hayashi CY, Russell JA, Stahlhut JK, Werren JH. 2008. Insight into the routes of *Wolbachia* invasion: high levels of horizontal transfer in the spider genus *Agelenopsis* revealed by *Wolbachia* strain and mitochondrial DNA diversity. *Molecular Ecology* 17(2):557-569.
- Baldo L, Werren JH. 2007. Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on WSP: spurious lineages and discordance with MLST. *Current Microbiology* 55(1):81-87.
- Bandi C, Anderson TJ, Genchi C, Blaxter ML. 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proceedings. Biological sciences* 265(1413):2407-2413.
- Bandi C, McCall JW, Genchi C, Corona S, Venco L, Sacchi L. 1999. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*. *International Journal for Parasitology* 29(2):357-364.
- Beatty BJ, Marquardt WC. 1996. *The Biology of Disease Vectors*. Niwot, CO: University Press of Colorado.
- Beckmann JF, Ronau JA, Hochstrasser M. 2017. A *Wolbachia* deubiquitylating enzyme induces cytoplasmic incompatibility. *Nature Microbiology* 2:17007-17007.
- Benlarbi M, Ready PD. 2003. Host-specific *Wolbachia* strains in widespread populations of *Phlebotomus perniciosus* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae), and prospects for driving genes into these vectors of *Leishmania*. *Bulletin of Entomological Research* 93(5):383-391.
- Bian G, Joshi D, Dong Y, Lu P, Zhou G, Pan X, Xu Y, Dimopoulos G, Xi Z. 2013a. *Wolbachia* Invades *Anopheles stephensi* Populations and Induces Refractoriness to *Plasmodium* Infection. *Science* 340(6133):748-751.
- Bian G, Zhou G, Lu P, Xi Z. 2013b. Replacing a native *Wolbachia* with a novel strain results in an increase in endosymbiont load and resistance to dengue virus in a mosquito vector. *PLoS neglected tropical diseases* 7(6):e2250-e2250.
- Bing X-L, Xia W-Q, Gui J-D, Yan G-H, Wang X-W, Liu S-S. 2014. Diversity and evolution of the *Wolbachia* endosymbionts of *Bemisia* (Hemiptera: Aleyrodidae) whiteflies. *Ecology and evolution* 4(13):2714-2737.
- Blagrove MSC, Arias-Goeta C, Di Genua C, Failloux A-B, Sinkins SP. 2013. A *Wolbachia* wMel Transinfection in *Aedes albopictus* Is Not Detrimental to Host Fitness and Inhibits Chikungunya Virus. *PLoS neglected tropical diseases* 7(3):e2152.
- Blagrove MSC, Arias-Goeta C, Failloux A-B, Sinkins SP. 2012. *Wolbachia* strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(1):255-260.
- Blair CD, Olson KE. 2014. Mosquito immune responses to arbovirus infections. *Current Opinion in Insect Science* 3:22-29.
- Bordbar A, Soleimani S, Fardid F, Zolfaghari MR, Parvizi P. 2014. Three strains of *Wolbachia pipientis* and high rates of infection in Iranian sandfly species. *Bulletin of Entomological Research* 104(2):195-202.

- Bordenstein S, Rosengaus R. 2005. Discovery of a Novel Wolbachia Supergroup in Isoptera. *Current Microbiology* 51(6):393-398.
- Bouchon D, Rigaud T, Juchault P. 1998. Evidence for widespread Wolbachia infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proceedings. Biological sciences* 265(1401):1081-1090.
- Caragata EP, Rancès E, Hedges LM, Gofton AW, Johnson KN, O'Neill SL, McGraw EA. 2013. Dietary Cholesterol Modulates Pathogen Blocking by Wolbachia. *PLOS Pathogens* 9(6):e1003459.
- Cox-Singh J, Davis TME, Lee K-S, Shamsul SSG, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. 2008. Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 46(2):165-171.
- Cui L, Chang S, Strickman D, Rowton E. 1999. Frequency of Wolbachia infection in laboratory and field sand fly (Diptera: Psychodidae) populations. *Journal of the American Mosquito Control Association* 15(4):571-572.
- Da Rocha NO, Lambert SM, Dias-Lima AG, Julião FS, Souza BMPS. 2018. Molecular detection of Wolbachia pipientis in natural populations of sandfly vectors of Leishmania infantum in endemic areas: first detection in Lutzomyia longipalpis. *Medical And Veterinary Entomology* 32(1):111-114.
- da Silva Gonçalves D, Iturbe-Ormaetxe I, Martins-da-Silva A, Telleria EL, Rocha MN, Traub-Csekö YM, O'Neill SL, Sant'Anna MRV, Moreira LA. 2019. Wolbachia introduction into Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) cell lines and its effects on immune-related gene expression and interaction with Leishmania infantum. *Parasites & vectors* 12(1):33-33.
- Dean JL, Dobson SL. 2004. Characterization of Wolbachia infections and interspecific crosses of Aedes (Stegomyia) polynesiensis and Ae.(Stegomyia) riversi (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 41(5):894-900.
- Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry P, Peyrefitte C. 2010. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro Surveillance* 15(10):19507.
- Dobson SL, Bourtzis K, Braig HR, Jones BF, Zhou W, Rousset F, O'Neill SL. 1999. Wolbachia infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29(2):153-160.
- Dougall AM, Alexander B, Holt DC, Harris T, Sultan AH, Bates PA, Rose K, Walton SF. 2011. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of Leishmania in Australia. *International Journal for Parasitology* 41(5):571-579.
- Dutra Heverton Leandro C, Rocha Marcele N, Dias Fernando Braga S, Mansur Simone B, Caragata Eric P, Moreira Luciano A. 2016. Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian Aedes aegypti Mosquitoes. *Cell Host & Microbe* 19(6):771-774.
- Fallon AM. 2008. Cytological properties of an Aedes albopictus mosquito cell line infected with Wolbachia strain AlbB. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 44(5):154-161.
- Foster WA, Walker ED. 2019. Chapter 15 - Mosquitoes (Culicidae). *Medical and Veterinary Entomology (Third Edition)*: Academic Press. p 261-325.
- Frentiu FD, Zakir T, Walker T, Popovici J, Pyke AT, van den Hurk A, McGraw EA, O'Neill SL. 2014. Limited dengue virus replication in field-collected Aedes aegypti mosquitoes infected with Wolbachia. *PLoS neglected tropical diseases* 8(2):e2688-e2688.

- Fu Y, Gavotte L, Mercer DR, Dobson SL. 2010. Artificial Triple Wolbachia Infection in *Aedes albopictus* Yields a New Pattern of Unidirectional Cytoplasmic Incompatibility. *Applied and Environmental Microbiology* 76(17):5887-5891.
- Geoghegan V, Stainton K, Rainey SM, Ant TH, Dowle AA, Larson T, Hester S, Charles PD, Thomas B, Sinkins SP. 2017. Perturbed cholesterol and vesicular trafficking associated with dengue blocking in Wolbachia-infected *Aedes aegypti* cells. *Nature Communications* 8(1):526-526.
- Gerth M. 2016. Classification of Wolbachia (Alphaproteobacteria, Rickettsiales): No evidence for a distinct supergroup in cave spiders. *Infection, Genetics and Evolution* 43:378-380.
- Glaser RL, Meola MA. 2010. The Native Wolbachia Endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* Increase Host Resistance to West Nile Virus Infection. *PLOS ONE* 5(8):e11977.
- Głowska E, Dragun-Damian A, Dabert M, Gerth M. 2015. New Wolbachia supergroups detected in quill mites (Acari: Syringophilidae). *Infection, Genetics and Evolution* 30:140-146.
- Gomes FM, Hixson BL, Tyner MDW, Ramirez JL, Canepa GE, Alves E Silva TL, Molina-Cruz A, Keita M, Kane F, Traoré B, Sogoba N, Barillas-Mury C. 2017. Effect of naturally occurring Wolbachia in *Anopheles gambiae* s.l. mosquitoes from Mali on *Plasmodium falciparum* malaria transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(47):12566-12571.
- Guo C, Zhou Z, Wen Z, Liu Y, Zeng C, Xiao D, Ou M, Han Y, Huang S, Liu D, Ye X, Zou X, Wu J, Wang H, Zeng EY, Jing C, Yang G. 2017. Global Epidemiology of Dengue Outbreaks in 1990-2015: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7:317-317.
- Haegeman A, Vanholme B, Jacob J, Vandekerckhove TTM, Claeys M, Borgonie G, Gheysen G. 2009. An endosymbiotic bacterium in a plant-parasitic nematode: Member of a new Wolbachia supergroup. *International Journal for Parasitology* 39(9):1045-1054.
- Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN. 2008. Wolbachia and Virus Protection in Insects. *Science* 322(5902):702-702.
- Hedges LM, Yamada R, O'Neill SL, Johnson KN. 2012. The small interfering RNA pathway is not essential for Wolbachia-mediated antiviral protection in *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology* 78(18):6773-6776.
- Hertig M, Wolbach SB. 1924. Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects. *The Journal of medical research* 44(3):329-374.7.
- Hoffmann AA, Iturbe-Ormaetxe I, Callahan AG, Phillips BL, Billington K, Axford JK, Montgomery B, Turley AP, O'Neill SL. 2014. Stability of the wMel Wolbachia Infection following Invasion into *Aedes aegypti* Populations. *PLoS neglected tropical diseases* 8(9):e3115.
- Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, Greenfield M, Durkan M, Leong YS, Dong Y, Cook H, Axford J, Callahan AG, Kenny N, Omodei C, McGraw EA, Ryan PA, Ritchie SA, Turelli M, O'Neill SL. 2011. Successful establishment of Wolbachia in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature* 476:454.
- Huang Y-JS, Higgs S, Vanlandingham DL. 2019. Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. *Current Opinion in Virology* 34:104-109.
- Hughes GL, Koga R, Xue P, Fukatsu T, Rasgon JL. 2011. Wolbachia Infections Are Virulent and Inhibit the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* in *Anopheles Gambiae*. *PLOS Pathogens* 7(5):e1002043.

- Hughes GL, Samuels SK, Shaikh K, Rasgon JL, Vardo-Zalik AM. 2014. Discrimination of the *Plasmodium mexicanum* vectors *Lutzomyia stewarti* and *Lutzomyia vexator* by a PCR-RFLP assay and *Wolbachia* infection. *Journal of Vector Ecology* 39(1):224-227.
- Chancey C, Grinev A, Volkova E, Rios M. 2015. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *BioMed Research International* 2015:376230-376230.
- Charlat S, Hurst GDD, Merçot H. 2003. Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends in Genetics* 19(4):217-223.
- Jeffries C, Rogers M, Walker T. 2018. Establishment of a method for *Lutzomyia longipalpis* sand fly egg microinjection: The first step towards potential novel control strategies for leishmaniasis [version 2; peer review: 2 approved]. *Wellcome Open Res* 3(55).
- Kageyama D, Nishimura G, Hoshizaki S, Ishikawa Y. 2002. Feminizing *Wolbachia* in an insect, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Heredity* 88:444.
- Kambris Z, Cook PE, Phuc HK, Sinkins SP. 2009. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science* 326(5949):134-136.
- Karakuş M, Karabey B, Orçun Kalkan Ş, Özdemir G, Oğuz G, Erişöz Kasap Ö, Alten B, Töz S, Özbel Y. 2017. Midgut Bacterial Diversity of Wild Populations of *Phlebotomus* (*P.*) *papatasi*, the Vector of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) in Turkey. *Scientific reports* 7(1):14812-14812.
- Karatepe B, Aksoy S, Karatepe M. 2018. Investigation of *Wolbachia* spp. and *Spiroplasma* spp. in *Phlebotomus* species by molecular methods. *Scientific reports* 8(1):10616-10616.
- Karimian F, Vatandoost H, Rassi Y, Maleki-Ravasan N, Choubdar N, Koosha M, Arzamani K, Moradi-Asl E, Veysi A, Alipour H, Shirani M, Oshaghi MA. 2018. wsp-based analysis of *Wolbachia* strains associated with *Phlebotomus papatasi* and *P. sergenti* (Diptera: Psychodidae) main cutaneous leishmaniasis vectors, introduction of a new subgroup wSerg. *Pathogens and Global Health* 112(3):152-160.
- Kassem H, Hassan A, Abdel-Hamid I, Osman G, M El Khalab E, Madkour MA. 2003. *Wolbachia* infection and the expression of cytoplasmic incompatibility in sandflies (Diptera : Psychodidae) from Egypt. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 97:639-44.
- Kassem H, Osman G. 2007. Maternal transmission of *Wolbachia* in *Phlebotomus papatasi* (Scopoli). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 101:435-40.
- Kent BN, Bordenstein SR. 2010. Phage WO of *Wolbachia*: lambda of the endosymbiont world. *Trends in Microbiology* 18(4):173-181.
- Killick-Kendrick R. 2002. *Phlebotomine Sand Flies: Biology and Control*. Leishmania. Boston, MA: Springer US. p 33-43.
- Li K, Chen H, Jiang J, Li X, Xu J, Ma Y. 2016. Diversity of bacteriome associated with *Phlebotomus chinensis* (Diptera: Psychodidae) sand flies in two wild populations from China. *Scientific reports* 6:36406-36406.
- Lin M, Rikihisa Y. 2003. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* Lack Genes for Lipid A Biosynthesis and Incorporate Cholesterol for Their Survival. *Infection and Immunity* 71(9):5324-5331.
- Lo N, Casiraghi M, Salati E, Bazzocchi C, Bandi C. 2002. How Many *Wolbachia* Supergroups Exist? *Molecular Biology and Evolution* 19(3):341-346.
- Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. 2013. *Phlebotomine* sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical And Veterinary Entomology* 27(2):123-147.

- Martín-Acebes MA, Vázquez-Calvo Á, Saiz J-C. 2016. Lipids and flaviviruses, present and future perspectives for the control of dengue, Zika, and West Nile viruses. *Progress in Lipid Research* 64:123-137.
- Matsumoto K, Izri A, Dumon H, Raoult D, Parola P. 2008. First Detection of *Wolbachia* spp., Including a New Genotype, in Sand Flies Collected in Marseille, France. *Journal of Medical Entomology* 45(3):466-469.
- McGraw EA, Merritt DJ, Droller JN, O'Neill SL. 2001. *Wolbachia*-mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila*. *Proceedings. Biological sciences* 268(1485):2565-2570.
- McMeniman CJ, Lane AM, Fong AWC, Voronin DA, Iturbe-Ormaetxe I, Yamada R, McGraw EA, O'Neill SL. 2008. Host adaptation of a *Wolbachia* strain after long-term serial passage in mosquito cell lines. *Applied and Environmental Microbiology* 74(22):6963-6969.
- McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, Wang Y-F, O'Neill SL. 2009. Stable Introduction of a Life-Shortening *Wolbachia* Infection into the Mosquito *Aedes aegypti*. *Science* 323(5910):141-144.
- Mieli MV, Glaser RL. 2014. Somatic *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Levels in *Culex quinquefasciatus* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) and Resistance to West Nile Virus Infection. *Journal of Medical Entomology* 51(1):189-199.
- Mikery-Pacheco O, Marina-Fernández C, Ibáñez-Bernal S, Sánchez-Guillen D, Castillo-Vera A. 2012. Infección natural de *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) con *Wolbachia* en cafetales de Chiapas, México / Natural infection of *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) with *Wolbachia* in coffee plantations from Chiapas, Mexico. *Acta zoológica mexicana*(2):401.
- Min K-T, Benzer S. 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(20):10792-10796.
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, van den Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL. 2009. A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* 139(7):1268-1278.
- Nguyen TH, Nguyen HL, Nguyen TY, Vu SN, Tran ND, Le TN, Vien QM, Bui TC, Le HT, Kutcher S, Hurst TP, Duong TTH, Jeffery JAL, Darbro JM, Kay BH, Iturbe-Ormaetxe I, Popovici J, Montgomery BL, Turley AP, Zigterman F, Cook H, Cook PE, Johnson PH, Ryan PA, Paton CJ, Ritchie SA, Simmons CP, O'Neill SL, Hoffmann AA. 2015. Field evaluation of the establishment potential of wMelPop *Wolbachia* in Australia and Vietnam for dengue control. *Parasites & vectors* 8:563-563.
- Ono M, Braig H, E. Munstermann L, Ferro C, O'Neill S. 2001. *Wolbachia* Infections of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 38:237-41.
- Parvizi P, Benlarbi M, Ready PD. 2003. Mitochondrial and *Wolbachia* markers for the sandfly *Phlebotomus papatasi*: little population differentiation between peridomestic sites and gerbil burrows in Isfahan province, Iran. *Medical And Veterinary Entomology* 17(4):351-362.
- Parvizi P, Bordbar A, Najafzadeh N. 2013a. Detection of *Wolbachia pipientis*, including a new strain containing the *wsp* gene, in two sister species of *Paraphlebotomus* sandflies, potential vectors of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 108(4):414-420.

- Parvizi P, Fardid F, Soleimani S. 2013b. Detection of a New Strain of *Wolbachia pipientis* in *Phlebotomus perfilewii transcaucasicus*, a Potential Vector of Visceral Leishmaniasis in North West of Iran, by Targeting the Major Surface Protein Gene. *Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases* 7(1):46-55.
- Parvizi P, Ready PD. 2008. Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA fragments detect three *Leishmania* species of gerbils in sandflies from Iranian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Tropical Medicine & International Health* 13(9):1159-1171.
- Pech-May A, Escobedo-Ortegón FJ, Berzunza-Cruz M, Rebollar-Téllez EA. 2010. Incrimination of four sandfly species previously unrecognized as vectors of *Leishmania* parasites in Mexico. *Medical And Veterinary Entomology*(2):150.
- Plichart C, Legrand A-MJTAjotm, hygiene. 2005. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae) var. *pacifica* and *Aedes* (*Stegomyia*) *polynesiensis* (Diptera: Culicidae). *The American journal of tropical medicine and hygiene* 73(2):354-358.
- Rancès E, Ye YH, Woolfit M, McGraw EA, O'Neill SL. 2012. The Relative Importance of Innate Immune Priming in *Wolbachia*-Mediated Dengue Interference. *PLOS Pathogens* 8(2):e1002548.
- Rasgon JL, Gamston CE, Ren X. 2006. Survival of *Wolbachia pipientis* in Cell-Free Medium. *Applied and Environmental Microbiology* 72(11):6934-6937.
- Reed W, Carroll J, Agramonte A. 1901. The Etiology Of Yellow Fever: An Additoonal Note. *Journal of the American Medical Association* XXXVI(7):431-440.
- Ros VID, Fleming VM, Feil EJ, Breeuwer JAJ. 2009. How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Applied and Environmental Microbiology* 75(4):1036-1043.
- Shaw WR, Catteruccia F. 2019. Vector biology meets disease control: using basic research to fight vector-borne diseases. *Nature Microbiology* 4(1):20-34.
- Shaw WR, Marcenac P, Childs LM, Buckee CO, Baldini F, Sawadogo SP, Dabiré RK, Diabaté A, Catteruccia F. 2016. *Wolbachia* infections in natural *Anopheles* populations affect egg laying and negatively correlate with *Plasmodium* development. *Nature Communications* 7:11772-11772.
- Schmidt TL, Barton NH, Rašić G, Turley AP, Montgomery BL, Iturbe-Ormaetxe I, Cook PE, Ryan PA, Ritchie SA, Hoffmann AA, O'Neill SL, Turelli M. 2017. Local introduction and heterogeneous spatial spread of dengue-suppressing *Wolbachia* through an urban population of *Aedes aegypti*. *PLoS biology* 15(5):e2001894-e2001894.
- Silva LA, Dermody TS. 2017. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *The Journal of clinical investigation* 127(3):737-749.
- Sinkins SP, Braig HR, O SL, apos, Neill. 1995. *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 261(1362):325-330.
- van den Hurk AF, Hall-Mendelin S, Pyke AT, Frentiu FD, McElroy K, Day A, Higgs S, O'Neill SL. 2012. Impact of *Wolbachia* on infection with chikungunya and yellow fever viruses in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *PLoS neglected tropical diseases* 6(11):e1892-e1892.
- Vivero RJ, Cadavid-Restrepo G, Herrera CXM, Soto SIU. 2017. Molecular detection and identification of *Wolbachia* in three species of the genus *Lutzomyia* on the Colombian Caribbean coast. *Parasites & vectors* 10(1):110-110.
- Vivero RJ, Jaramillo NG, Cadavid-Restrepo G, Soto SIU, Herrera CXM, Vectors. 2016. Structural differences in gut bacteria communities in developmental stages of natural

- populations of *Lutzomyia evansi* from Colombia's Caribbean coast. *Parasites & vectors* 9(1):496.
- Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, Leong YS, Dong Y, Axford J, Kriesner P, Lloyd AL, Ritchie SA, O'Neill SL, Hoffmann AA. 2011. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature* 476:450.
- Wang G-H, Jia L-Y, Xiao J-H, Huang D-W. 2016. Discovery of a new *Wolbachia* supergroup in cave spider species and the lateral transfer of phage WO among distant hosts. *Infection, Genetics and Evolution* 41:1-7.
- Werren JH. 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Review Of Entomology* 42:587-609.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* 6:741-751.
- Werren JH, Zhang W, Guo LR. 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 261(1360):55-63.
- White MK, Wollebo HS, David Beckham J, Tyler KL, Khalili K. 2016. Zika virus: An emergent neuropathological agent. *Annals of neurology* 80(4):479-489.
- WHO. 2018a. Surveillance of leishmaniasis in the WHO European Region, 2016, Global leishmaniasis surveillance update, 1998–2016. *Weekly Epidemiological Report* 93(40):521-540.
- WHO. 2018b. World malaria report 2018. World Health Organization.
- Woolfit M, Iturbe-Ormaetxe I, Brownlie JC, Walker T, Riegler M, Seleznev A, Popovici J, Rancès E, Wee BA, Pavlides J, Sullivan MJ, Beatson SA, Lane A, Sidhu M, McMeniman CJ, McGraw EA, O'Neill SL. 2013. Genomic evolution of the pathogenic *Wolbachia* strain, wMelPop. *Genome biology and evolution* 5(11):2189-2204.
- Wu M, Sun LV, Vamathevan J, Riegler M, Deboy R, Brownlie JC, McGraw EA, Martin W, Esser C, Ahmadinejad N, Wiegand C, Madupu R, Beanan MJ, Brinkac LM, Daugherty SC, Durkin AS, Kolonay JF, Nelson WC, Mohamoud Y, Lee P, Berry K, Young MB, Utterback T, Weidman J, Nierman WC, Paulsen IT, Nelson KE, Tettelin H, O'Neill SL, Eisen JA. 2004. Phylogenomics of the Reproductive Parasite *Wolbachia pipientis* wMel: A Streamlined Genome Overrun by Mobile Genetic Elements. *PLoS biology* 2(3):e69.
- Zhou W, Rousset F, O'Neill S. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *265(1395):509-515*.
- Zug R, Hammerstein P. 2012. Still a host of hosts for *Wolbachia*: Analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PLOS ONE* 7(6).

Internetové zdroje

<https://www.worldmosquitoprogram.org/>.