

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta
Katedra parazitologie

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Parazitologie



Bc. Markéta Stejskalová

**Vývoj bakterií rodu *Asaia* ve flebotomech a jejich vliv na
přenos leishmanií**

Development of *Asaia* genus in sand flies and its impact on
Leishmania transmission

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Magdaléna Jančářová, Ph.D.

Praha 2022

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval(a) samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V dne

.....
Podpis autora

Poděkování:

Na prvním místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Magdaléně Jančářové, Ph.D. za vedení práce, za cenné rady a její trpělivost při zpracování této diplomové práce. Zároveň jsem též vděčná Mgr. Nikole Polanské, Ph.D. za věcné připomínky a povzbudivá slova.

Dále mé poděkování patří prof. RNDr. Petru Volfovi, CSc. za jeho přístup, rady a příležitost stát se součástí týmu Biologie hmyzích vektorů. Děkuji RNDr. Kateřině Růžičkové, Ph.D. za asistenci při laboratorních pokusech a její oporu při jejich zpracování. V neposlední řadě děkuji týmovému kolektivu za příjemnou atmosféru, která v laboratoři panuje.

A především chci poděkovat své rodině za psychickou podporu a příteli Jonášovi za oporu, jakou mi je.

Abstrakt:

Složení mikrobiomu hmyzích vektorů hraje nezastupitelnou roli při šíření lidských patogenů. Dosavadní znalosti o vzájemných vztazích mezi flebotomy, bakteriemi a patogeny jsou dost omezené. Tato diplomová práce se zabývá bakterií rodu *Asaia*, která může být součástí mikrobiomu flebotoma.

Oba testované druhy, *Asaia siamensis* i *Asaia krungthepensis*, jsou schopné kolonizovat střevo *Phlebotomus duboscqi* a navíc byl prokázán jak transstadiální přenos mezi jednotlivými larválními stádii tak kontaminativní přenosu do další generace. Při superinfekci *Ph. duboscqi* *Asaia* sp. a *Leishmania major* byl také prokázán vliv bakterii na vývoj leishmaniové infekce, což může mít výrazný epidemiologický dopad a je třeba se tímto tématem nadále zabývat.

Klíčová slova: *Phlebotomus*, superinfekce, *Asaia siamensis*, *Asaia krungthepensis*, *Leishmania major*, mikrobiom

Abstract:

The composition of the microbiome of insect vectors plays an irreplaceable role in the spread of human pathogens. Current knowledge of the interrelationships between phlebotomes, bacteria, and pathogens is quite limited. This thesis focuses on bacterias *Asaia* sp., which can be localized in a phlebotome microbiome.

Both investigated species, *Asaia siamensis* and *Asaia krungthepensis*, can colonize the gut of *Phlebotomus duboscqi*, and, in addition, both transstadial transmission between larval stages and contaminative transmission to the next generation has been proved. Considering the superinfection of *Ph. duboscqi* with *Asaia* sp. and *Leishmania major*, the influence of bacteria on the development of leishmania infection has also been demonstrated. Results can have significant epidemiological implications and should be further investigated.

Keywords: *sand fly*, superinfection, *Asaia siamensis*, *Asaia krungthepensis*, *Leishmania major*, microbiome

Obsah

Úvod a cíle práce	3
1 Literární rešerše	4
1.1 Podčeleď <i>Phlebotominae</i>	4
1.1.1 Trávicí soustava flebotomů	5
1.2 Střevní mikrobiom flebotomů	6
1.3 Bakterie rodu <i>Asaia</i>	8
1.4 <i>Leishmania</i> sp.	11
2 Metodika	15
2.1 Kolonie flebotomů	15
2.2 Bakterie	15
2.3 Příprava materiálu	15
2.3.1 Acetobacter–glukanobacter médium	15
2.3.2 Tekuté GLY médium	16
2.3.3 Cukerný roztok	16
2.3.4 Kultivační médium leishmanií	16
2.4 Standardizace infekční dávky	17
2.5 Experimentální infekce flebotomů	18
2.5.1 Příprava bakterií <i>Asaia</i> sp. na experimentální infekce	18
2.5.2 Infikování flebotomů bakterií <i>Asaia</i> sp.	19
2.5.3 Sání krve skrz membránu	20
2.5.4 Pitvy střev flebotomů	20
2.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	21
2.7 Přenosové pokusy	22
2.7.1 Transovariální přenos	22
2.7.2 Kontaminativní přenos	23
2.7.3 Transstadiální přenos	24
2.8 Experimentální superinfekce <i>Leishmania major</i> a <i>Asaia</i> sp. v <i>Ph. duboscqi</i>	25
2.8.1 Superinfekce <i>L. major</i> a <i>Asaia</i> sp. v <i>Ph. duboscqi</i>	25
2.8.2 Stanovení infekce <i>L. major</i> u <i>Ph. duboscqi</i> při superinfekci s <i>Asaia</i> sp.	26
2.8.3 Příprava mikroskopického preparátu ze střev <i>Ph. duboscqi</i> infikovaných <i>L. major</i>	27
2.8.4 Měření forem promastigotů <i>L. major</i>	27
2.9 Statistické vyhodnocení	27

3	Výsledky	29
3.1	Standardizace infekční dávky	29
3.2	Experimentální infekce flebotomů bakteriemi <i>Asaia</i> sp.	30
3.3	Transvariální přenos	31
3.4	Transstadiální přenos	33
3.5	Možnost kontaminativního přenosu	35
3.6	Experimentální superinfekce <i>Leishmania major</i> a <i>Asaia</i> sp. ve <i>Ph. duboscqi</i>	36
3.6.1	Vliv <i>Asaia</i> sp. na intenzitu infekce <i>L. major</i> v <i>Ph. duboscqi</i>	36
3.6.2	Vliv <i>Asaia</i> sp. na lokalizaci infekce <i>L. major</i> v <i>Ph. duboscqi</i>	38
3.6.3	Vliv <i>Asaia</i> sp. na zastoupení morfologických forem <i>L. major</i> v <i>Ph. duboscqi</i>	40
3.6.4	Vliv <i>L. major</i> na intenzitu infekce <i>Asaia</i> sp. v <i>Ph. duboscqi</i>	42
4	Diskuze	43
	Shrnutí	47
	Seznam použité literatury	48
	Seznam obrázků	61
	Seznam tabulek	63

Úvod a cíle práce

Zástupci nematocerních dipter, flebotomové, jsou významnými přenašeči závažných bakteriálních, protozoárních i virových onemocnění. Pro humánní medicínu jsou stěžejní dva rody, *Phlebotomus* vyskytující se ve Starém světě a *Lutzomyia*, které jsou rozšířeny v Novém světě (shrnuto v Cecílio a kol., 2022). Nejzávažnějším přenášeným patogenem jsou jednobuněční organismy rodu *Leishmania* (*Trypanosomatidae*) způsobující leishmaniózu zodpovědnou za významnou celosvětovou morbiditu a mortalitu (shrnuto v Torres-Guerrero a kol., 2017).

Vývoj parazita může být mimo jiné ovlivněn jeho interakcí s mikrobiomem daného přenašeče, čehož využívá jedna z poměrně nových kontrolních strategií označovaná jako paratransgeneze. Dochází k využívání bakterií, které jsou geneticky modifikovány, tak aby produkovaly molekuly limitující či eliminující přenášený patogen (shrnuto v Hurwitz a kol., 2011).

Zásadním krokem paratransgeneze je zvolení vhodného kandidáta, který by měl splňovat podmínku snadné kultivace, nepatogenity a snadné genetické manipulace (shrnuto v Hurwitz a kol., 2011) a takovým se jeví bakterie rodu *Asaia*. Již byly provedeny prvotní experimenty u komárů, kde byl testován vliv paratransgeních *Asaia* sp. na vývoj plazmodia (Mancini a kol., 2020). A jelikož byla tato bakterie nalezena i u flebotomů (Karimian a kol., 2022), stala se také cílem výzkumu této diplomové práce. Získané výsledky této práce by mohly být prvním krokem k pochopení vývoje a přenosu *Asaia* sp. ve flebotomech a také jejím dopadu na vývoj leishmanií ve střevech flebotomů a případnému boji proti leishmanióze.

Cíle této práce:

1. Zjistit možné cesty přenosu bakterií rodu *Asaia* sp. u *Phlebotomus duboscqi*.
2. Prozkoumat vliv superinfekce bakteriemi *Asaia siamensis* a *Asaia krungthepensis* na vývoj *Leishmania major* ve *Phlebotomus duboscqui* a porovnat je mezi sebou.

1. Literární rešerše

1.1 Podčeleď *Phlebotominae*

Flebotomové patří do řádu Diptera, podřádu Nematocera, čeledi Psychodidae podčeledi Phlebotominae, a doposud bylo popsáno více jak 1000 druhů. Flebotomové jsou rozšířeni od 50° severní šířky do 40° jižní šířky, s výjimkou Nového Zélandu a tichomořských ostrovů (shrnuto v Cecílio a kol., 2022), nicméně oblasti výskytu flebotomů se z důvodu oteplování lokalit a globalizace rozšiřují (Benallal a kol., 2022). Přestože je podčeleď rozdělena do několika rodů *Phlebotomus*, *Sergentomyia* a *Chinius* ze Starého světa a *Lutzomyia*, *Brumptomyia* a *Warileya* z Nového světa, v současnosti jsou pouze dva z nich považovány za medicínsky důležité; rod *Lutzomyia* v Novém světě a *Phlebotomus* ve Starém světě, jelikož jsou jejich zástupci prokázány přenašeči bakterií, protozoí i virů nebezpečných pro člověka (shrnuto Cecílio a kol., 2022). Nicméně se zdá, že rod *Sergentomyia*, který byl doposud považován především za parazita plazů, také může hrát roli v přenosu lidských patogenů (Sádlová a kol., 2010; Maia a Depaquit, 2016).

Nejvýznamnějšími patogeny přenášenými flebotomy jsou parazitická protozoa z rodu *Leishmania* a arboviry, především zástupci z rodu *Phlebovirus* (čeleď *Phenuiviridae*) (shrnuto v Moriconi a kol., 2017). Navíc u některých jihoamerických druhů flebotomů byl prokázán přenos *Bartonella bacilliformis*, bakterie, která je původcem bartonelózy (shrnuto v Garcia-Quintanilla a kol., 2019).

Flebotomové jsou drobný hmyz, který se od ostatních menších dipter liší postavením křídel, která v klidu svírají nad tělem úhel 40°, navíc jsou křídla silně ochlupená podobně jako zbytek jejich těla. Samci i samice flebotomů sají cukerné roztoky jako zdroj sacharidů. Samice navíc sají krev, která je bohatá na bílkoviny a je využita ke tvorbě snůšky. Některé druhy flebotomů mohou naklást snůšku i bez sání krve (autogenie) (Killick-Kendrick, 1999) a zcela výjimečně se vyskytují druhy, u kterých nakladou životaschopná vejce i neoplozené samice (partenogeneze) (Brazil a Oliveira, 1999; Alves a kol., 2011).

Samice sají krev v noci, kdy jsou podmínky pro sání nejpříznivější. Vyhledávání hostitele je mimo jiné ovlivněno teplotou vzduchu, vzdušnou vlhkostí, ale i větrem kvůli špatným leteckým schopnostem flebotomů (Killick-Kendrick, 1999; Cruaud a kol., 2021). Většina druhů dává přednost sání venku (exofágní druhy), ale některé druhy mohou sát i uvnitř místností (endofágní druhy) (Killick-Kendrick, 1999).

V jedné snůšce bývá obvykle 30-60 vajec. Larvy se líhnou po zhruba týdnu a oproti jinému nematocernímu hematofágnímu hmyzu nepotřebují pro svůj vývoj vodní prostředí. Larvy flebotomů se vyvíjejí v půdě kontaminované organickými zbytky, např. v norách hlodavců nebo ve stájích a kurnících, nicméně u většiny druhů není místo líhnišť známo (Felicangeli, 2004). Apodní a eucefalní larvy procházejí čtyřmi instary (L1 – L4) a jejich vývoj trvá týdny až měsíce. V posledním, čtvrtém larválním instaru, se larva vydefekuje a

následně zakuklí. Přibližně po deseti dnech se začnou líhnout dospělí flebotomové (shrnuťo v Maroli a kol., 2013).

1.1.1 Trávicí soustava flebotomů

Flebotomové mají trávicí soustavu, podobně jako ostatní hmyz, členěnou na tři sekce: stomodeum, mezenteron a proktodeum (čili přední, střední a zadní střevo). Buňky stomodea a proktodea produkují chitinovou kutikulu a jsou ektodermálního původu. Oproti tomu mezenteron je entodermálního původu.

Základní funkcí stomodea je příjem potravy. Stomodeum začíná v sosáku (proboscis), ten se skládá z horního pysku (labrum), spodního pysku (labium), hypopharynxu, páru mandibul a páru maxil. Labium plní funkci ochranou a obklopuje ostatní části proboscis, které jsou chitinové a přizpůsobené k probodnutí pokožky hostitele (Lewis, 1975). Do penetrované pokožky vstupují všechny části proboscis kromě spodního pysku, který zůstává vně. Bodnutí je doprovázeno vstříknutím slin s antihemostatickými účinky (Ribeiro a kol., 1999). To vede ke vzniku hematomu, ze kterého samice sají krev, a proto jsou flebotomové řazeny do thelmo-fágního hmyzu (Lane, 1993). Krev je nasávána pomocí dvou pump – cibarriální a pharyngeální (Lewis, 1975). Stomodeum je od mezenteronu odděleno stomodeální valvou. Apikální konce cylindrických buněk stomodeální valvy jsou pokryty chitinovou vrstvou a jsou ektodermálního původu (Volf a kol., 2004). Hlavní úlohou stomodeální valvy je zabránit zpětnému chodu potravy a směřovat potravu do místa určení.

Mezenteron, jako jediná část trávicího traktu, nemá povrch pokrytý chitinovou výstelkou, ale je celý pokryt mikroklky, jelikož zde dochází k trávení a absorbování přijaté potravy. Pokud flebotom nasaje cukernou potravu, nejdřív směřuje do volete a teprve pak je transportována do přední části mezenteronu, kde je dále trávena a vstřebávána (Lehane, 1991; Tang a Ward, 1998). Oproti tomu nasátá krev jde přímo do mezenteronu a v důsledku roztažení střeva dochází k aktivaci buněk střevního epitelu a produkci peritrofitické matrix (PM). Semipermeabilní PM je tvořena chitinem, proteoglykany a proteiny (Billingsley a Lehane, 1996). Peritrofitická matrix ochraňuje epitel mezenteronu před mechanickým poškozením a vytváří bariéru mezi přijatou potravou a zbylou částí střeva. Mimo jiné funguje jako ochrana před patogeny, kteří mohou být do těla hmyzu přijati společně s potravou a také zde dochází k detoxikaci hemu (shrnuťo v Sádlová a Volf, 2009).

Dynamika tvorby a rozpadu PM se liší v závislosti na druhu flebotoma. U *Ph. papatasi* lze první náznaky PM pozorovat u 24 % samic již hodinu po sání krve a v případě *Se. schwetzi* je po hodině PM viditelná u všech jedinců. U *Ph. duboscqi* a *Ph. orientalis* lze tenkou vrstvou PM detekovat až po 6 hodinách, v případě *Ph. argentipes* až po 12 hodinách po sání krve. Rozpad PM v důsledku působení střevních chitináz flebotoma byl nejrychlejší u *Ph. argentipes*, kde se PM vyskytovala pouze u třetiny samic 48 hodin po sání, nicméně u všech zbývajících druhů došlo k degradaci PM mezi druhým a třetím dnem po sání (Sádlová a Volf, 2009; Pruzinova a kol., 2015). Zdá se, že doba mezi rozpa-

dem PM a defekací je jedním z významných faktorů ovlivňujících vektorovou kompetenci flebotomů vůči leishmaniím (Sadlova a kol., 2013; Pruzinova a kol., 2015; Sadlova a kol., 2018). Dříve se předpokládalo, že leishmanie se sami podílejí na rozpadu PM (Schlein a kol., 1991), nicméně tyto úvahy byly vyvráceny novějšími studiemi; například Sádlová a Volf (2009) nezaznamenali u *Ph. duboscqi* žádné výrazné rozdíly v rozpadu matrix u infikovaných a neinfikovaných samic *L. major*, což indikuje, že za rozpad PM zodpovídají chitinázy flebotoma (Ramalho-Ortigão a kol., 2005; Coutinho-Abreu a kol., 2010).

Poslední část střeva, proktodeum, se skládá z pyloru, ilea, rektální ampule a je zakončeno rektem. Od mezenteronu jej odděluje pylorická valva. Do proktodea, konkrétně do pyloru, vyústuje vylučovací soustava, která je tvořena Malpighickými trubice. Z rekta odchází nejen nestrávené zbytky potravy, ale také přebytečná voda (Billingsley a Lehane, 1996).

1.2 Střevní mikrobiom flebotomů

Mikrobiota je označení pro společenstvo všech živých mikroorganismů vyskytujících se v jedné ekologické nice, zatímco mikrobiom označuje mikroorganismy včetně jejich genů a metabolitů v jedné ekologické nice (shrnuto v Sebastián-Domingo a Sánchez-Sánchez, 2018). Postavení fágů, virů, prionů a plazmidů je v rámci těchto definic nejasné, jelikož nejsou považovány za živé organismy a nelze je tedy zahrnout pod pojem mikrobiota. Nicméně původní definice pojmu mikrobiom dle Whipps a kol. (1988) do mikrobiomu řadí i interakce v rámci jedné ekologické niky, což do mikrobiomu řadí právě i priony, viry, plazmidy a fágy (shrnuto v Berg a kol., 2020). Přestože se tedy jedná o dva odlišné pojmy, velmi často se zaměňují a jejich výklad ještě stále není zcela ustálený. Vzhledem k charakteru diplomové práce, kde se v experimentální části řeší interakce mezi bakterií a patogenem, je používán v dalším textu pojem mikrobiom.

Hmyz se během svého života setkává s řadou mikroorganismů, které mohou kolonizovat kutikulu, střevo, reprodukční orgány, slinné žlázy a také další části těla hmyzu. Tady je ovšem nutno podotknout, že ne všechny mikroorganismy, s nimiž se jedinec setká, se stávají součástí jeho mikrobiomu a to například díky přítomnosti mechanických bariér, trávících enzymů či působení imunitního systému. Některé druhy bakterií také projdou střevem společně s přijatou potravou a jsou vydefekovány (shrnuto v Douglas, 2015).

Mikrobiom je zpravidla specifický pro jednotlivé druhy organismů a může být složen z bakterií, hub, protist, virů i dalších skupin mikroorganismů (shrnuto v Engel a Moran, 2013). Přítomnost a složení mikrobiomu může mít výrazný vliv na svého hostitele; hraje roli při vývoji, v imunitních reakcích a také může ovlivnit odolnost vůči patogenům či zvládání tepelného stresu (Chouaia a kol., 2012; Brown a kol., 2020). Některé složky mikrobiomu jsou symbionti zajišťující hostiteli lepší trávení či snadnější vstřebávání látek z potravy (Fierer a kol., 2012). U dipter bylo prokázáno, že střevní mikrobiota rozkla-

dem sloučenin a poskytováním živin (esenciální aminokyseliny a vitaminy), přispívá k výživě (shrnuto v Engel a Moran, 2013). Příkladem je zákeřnice *Rhodnius prolixus*, která získává vitamín B od svého střevního symbionta *Rhodococcus rhodnii* (Eichler a Schaub, 2002).

Provedením rozsáhlé metaanalýzy střevního mikrobiomu flebotomů z Nového i Starého světa bylo alespoň částečně zjištěno zastoupení mikroorganismů ve střevech flebotomů. Na základě těchto analýz bylo zjištěno, že nejčastějšími zástupcem střevního mikrobiomu jsou bakterie, konkrétně bakterie z kmene Proteobacteria (*Enterobacter* sp., *Acinetobacter* sp. a *Pseudomonas* sp.), Firmicutes (*Clostridium* sp., *Bacillus* sp) (Karimian a kol., 2022). Další nalezenou složkou byly i houbové organismy nebo kvasinky (rod *Penicillium*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Fusarium* a *Malassezia*) (shrnuto v Tabbabi a kol., 2022).

Mikrobiom larev a dospělých jedinců flebotomů se nejčastěji vytváří pozřením potravy obsahující různé druhy mikroorganismů (Telleria a kol., 2018), ale může dojít k přenosu i transtadiálně (z larev přes kukly na dospělé) (Dillon a kol., 1996; Volf a kol., 2002a), sexuálně při pohlavním rozmnožování (Damiani a kol., 2008) a u některých intracelulárních mikroorganismů i transovariálně z infikované samice do snůšky vajec a další generace (Szklarzewicz a Michalik, 2017). Řada studií ukázala, že složení i množství střevního mikrobiomu se u flebotomů mění v průběhu života (Gouveia a kol., 2008; Mukhopadhyay a kol., 2012; Vivero a kol., 2016; Fraihi a kol., 2017; Vivero a kol., 2019a).

Dospělci, kteří vylétnou z kukly, mají ve střevním mikrobiomu menší počet bakterií, ve srovnání se staršími jedinci, jelikož larvy před zakuklením defekují střevní obsah. Po několika dnech po vylíhnutí se u dospělců bakteriální počty zněkolikanásobí v důsledku množení bakterií ve střevech a přijímání potravy obsahující bakterie (Dillon a kol., 1996). Dalším významným faktorem výrazně ovlivňujícím mikrobiom je příjem krve. Po sání stoupá množství bakterií, nicméně klesá diverzita střevního mikrobiomu a teprve po defekaci se vrací na obdobnou úroveň jako u samic krmených cukrem (Volf a kol., 2002a; Kelly a kol., 2017).

Střevní mikrobiom je regulován pomocí imunitního systému flebotoma, čímž se předchází přemnožení mikroorganismů, které může vést až k sepsi a smrti. U flebotomů zatím nejsou popsány přesné mechanismy tohoto procesu, ale předpokládá se podobná imunitní odpověď jako u komárů a *Drosophila* sp. (Telleria a kol., 2018). Bakterie při svém dělení ve střevě uvolňují peptidoglykan, který je odbouráván negativním regulátorem IMD imunitní dráhy a to PGRP-LB (peptidoglycan recognition protein LB). Pokud nastane dysbalance či dojde k nějaké infekci bakteriemi, PGRP-LB již není schopen odbourávat všechny přítomný peptidoglykan a ten se naváže do receptoru IMD dráhy (immune deficiency pathway) (shrnuto v Engel a Moran, 2013) a dojde k její aktivaci a expresi antimikrobiálních peptidů (AMPs). Dalším regulačním mechanismem ve střevě je syntéza reaktivní formy kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species), což vede k oxidativnímu stresu a následné regulaci jejich vývoje (shrnuto v Saraiva a kol., 2016).

Role mikrobiomu u flebotomů zatím není příliš prozkoumána. Přítomnost střevního mikrobiomu může mít pozitivní vliv na plodnost a životaschopnost flebotomů, což ve své studii prokázali Peterkova-Koci a kol. (2012). Samice krmené potravou obsahující fermentovaný a nesterilní králíčí trus kladly více vajíček nežli samice, kterým byla podávána strava sterilizována od bakterií. Zároveň u larev krmených sterilní potravou byla vyšší mortalita a prodloužila se doba líhnutí. Výsledky studie Kelly a kol. (2017) ukazují, že mikrobiom flebotomů je ovlivněn druhem potravy i přítomností leishmanií. Ve studii vztahu mezi *Lu. longipalpis*, jejím střevním mikrobiomem a *L. infantum* měly samice, které sály pouze na cukerném zdroji, rozmanitější mikrobiom než samice, kterým byla podána i krev, čímž bylo prokázáno, že po sání na krvi diverzita mikrobiomu klesá (Kelly a kol., 2017).

1.3 Bakterie rodu *Asaia*

Jednou ze složek mikrobiomu hmyzu mohou být i bakterie rodu *Asaia*. Rod *Asaia* nese jméno po japonském profesorovi Toshinobu Asai, který se věnoval systematice bakterií octového kvašení (Yamada a kol., 2000). Patří mezi obligátně aerobní gramnegativní bakterie z čeledi *Acetobacteraceae*, jejíž zástupci jsou díky své schopnosti oxidace etanolu na kyselinou octovou označovány jako bakterie octového kvašení. Nicméně, zástupci rodu *Asaia* tuto schopnost nemají, neoxidují kyselinu octovou vůbec nebo pouze slabě, ale umí oxidovat acetát a laktát na oxid uhličitý a vodu (Yamada a kol., 2000; Kersters a kol., 2006; Ano a kol., 2008). U *Asaia siamensis* a *Asia borogensis* je přítomná funkční nitrogenáza a jsou tudíž schopné vázat dusík (Samaddar a kol., 2011). Bakterie rodu *Asaia* jsou nesporulující gramnegativní aerobní tyčinky, které na agarových plotnách tvoří leskle růžové vyklenuté kolonie. Pohyb některým druhům *Asaia* sp. umožňuje peritrichální bičík, který u jiných druhů chybí, a proto se tyto druhy vůbec nepohybují (Asai a kol., 1964; Yamada a kol., 2000).

V současnosti je popsáno osm druhů rodu *Asaia*: *A. bogorensis* (Yamada a kol., 2000), *A. siamensis* (Katsura a kol., 2001), *A. krungthepensis* (Yukphan a kol., 2004), *A. lan-naensis* (Malimas a kol., 2008), *A. astilbes*, *A. platycodi* (Suzuki a kol., 2010) a *A. prunnellae* (Kommanee a kol., 2010).

Většina dosud objevených bakterií *Asaia* sp. pochází z tropických rostlin z jihovýchodní Asie. Některé druhy *Asaia* byly nalezeny v severních a středních částech Japonska, což dokazuje, že výskyt není limitován pouze na tropická pásma (Suzuki a kol., 2010), viz tabulka 1.1.

Tabulka 1.1: Zastoupení druhů *Asaia* sp.

Druh	Izolována z:	Zdroj
<i>A. bogorensis</i>	olověnce ouškatého (<i>Plumbago auriculata</i>), z orchidejí (<i>Bauhinia purpurae</i>)	(Yamada a kol., 2000)
<i>A. siamensis</i>	rostlin křínu asijského (<i>Crinum asiaticum</i>), keře <i>Ixora chinensis</i> , plcholodu podvinutého (<i>Calostropis gigantea</i>)	(Katsura a kol., 2001)
<i>A. krungthepensis</i>	rostliny <i>Heliconia</i>	(Yukphan a kol., 2004)
<i>A. lannaensis</i>	cibuloviny <i>Lycoris radiata</i>	(Malimas a kol., 2008)
<i>A. spathodea</i>	spatodei zvonkovité (<i>Spathodea campanulata</i>)	(Kommanee a kol., 2010)
<i>A. astilbes</i>	z platykodonu velkokvětého (<i>Platycodon grandiflorum</i>), černohlávku obecného (<i>Prunella vulgaris</i>), čechravy (<i>Astilbe thunbergii</i> var. <i>congesta</i>)	(Suzuki a kol., 2010)
<i>A. platycodi</i>	z platykodonu velkokvětého (<i>Platycodon grandiflorum</i>), černohlávku obecného (<i>Prunella vulgaris</i>), čechravy (<i>Astilbe thunbergii</i> var. <i>congesta</i>)	(Suzuki a kol., 2010)
<i>A. prunella</i>	z platykodonu velkokvětého (<i>Platycodon grandiflorum</i>), černohlávku obecného (<i>Prunella vulgaris</i>), čechravy (<i>Astilbe thunbergii</i> var. <i>congesta</i>)	(Suzuki a kol., 2010)

Kromě výše uvedených druhů existuje ještě řada izolátů, především z hmyzu, které stále čekají na svou charakterizaci, zařazení a druhové jméno. Tyto izoláty mají mnohem větší velikost genomu než druhy asociované s rostlinami, což poukazuje i na jejich adaptovatelnost (Comandatore a kol., 2021; Chen a kol., 2021)

U lidí bylo evidováno několik případů, kdy byly bakterie *Asaia* sp. (*A. bogorensis*, *A. lannensis*) nalezeny u imunosuprimovaného pacienta v kombinaci s dalším onemocněním. Může se tedy jednat o oportunní patogeny, nicméně bližší studie na toto téma zatím nebyly provedeny (Snyder a kol., 2004; Antolak a kol., 2015).

U hmyzu byla *Asaia* sp. detekována ve střevech, reprodukčních orgánech i Malpighických trubicích kříška *Scaphoideus titanus*, což je vektor závažného onemocnění vinné révy (Marzorati a kol., 2006; Crotti a kol., 2009). Dále byla bakterie rodu *Asaia* objevena u přenašečů malárie – komárů *Anopheles stephensi*, *An. maculipennis* a *An. gambiae*, a to u larev i dospělců. U těchto druhů komárů je *Asaia* sp. ve střevním mikrobiálním společenstvu hojně zastoupena (Favia a kol., 2007; Crotti a kol., 2009). Pomocí fluorescenční a konfokální mikroskopie byla dokázána schopnost kolonizace nejen střev, ale i slinných žláz a samčích i samičích reprodukčních orgánů komárů bakterií *Asaia* sp. (Favia a kol., 2007). Zdá se, že *Asaia* sp. se objevuje u velkého množství hmyzu. Například z izolátů mravenců *Tetraponera rufonigra* byly pomocí fenotypové a molekulární charakterizace identifikovány kmeny patřící mezi *Asaia* sp. (Samaddar a kol., 2011), další kmen byl vyizolován z komárů rodu *Anopheles* (Bassene a kol., 2019). Další hmyz u kterého byla *Asaia* sp. objevena byl hymenopterní hyperparazitoid *Marietta leopardina* (Matalon a kol., 2007). *Asaia* sp. byla

nalezena i u larev motýla *Pieris rapae* (Robinson a kol., 2010). V tomto roce byla poprvé nalezena *Asaia* sp. i u flebotomů, konkrétně u druhu *Ph. perfiliewi* (Karimian a kol., 2022).

Přenos *Asaia* sp. u hmyzu může pravděpodobně probíhat více způsoby. Jednak může docházet k infekci z kontaminovaného prostředí, například při sání na cukru. *Asaia* sp. je totiž schopná kontaminovat rostliny prostřednictvím infikovaných jedinců, kteří z rostlin sají nektar a ty pak fungují jako zdroj nákazy pro další vektory (Bassene a kol., 2020). *Asaia* sp. se tak může přenášet horizontálně nejen v rámci téhož druhu, ale může kolonizovat hmyz i z fylogeneticky vzdálených řádů (Favia a kol., 2007; Favia a kol., 2008). U komárů je prokázán přenos při pohlavním rozmnožování, který byl zaznamenán u *An. stephensi*. Dalším možným přenosem bakterií *Asaia* sp. je vertikální z matky na potomstvo. Nejedná se však o transovariální přenos, jelikož bakterie byly nalezeny pouze na povrchu vajíčka a nikoli uvnitř embrya. Larvy se tak nakazí bezprostředně po vylíhnutí požitím bakteriálních reziduí z povrchu vajíčka (Favia a kol., 2007; Damiani a kol., 2008). Při studiu přenosu u *S. titanus* bylo pozorováno, že lokalizace *Asaia* sp. se na povrchu vajíček mění v souvislosti s jeho vývojem. U nezralých vajíček byly *Asaia* sp. po celém povrchu. Později se bakterie přesouvaly na apikální konce vajíček, nicméně způsob přemístování bakterií po povrchu vajíčka nebyl autory blíže zkoumán (Crotti a kol., 2009).

Ukazuje se, že *Asaia* sp. může hrát v životě hmyzu řadu rolí, někdy je dokonce řazena mezi sekundární symbionty hmyzu (Crotti a kol., 2009). Bakterie *Asaia* sp. měly pozitivní vliv na vývoj larev *An. stephensi*. Různá vývojová stádia larev *An. stephensi* byla ošetřena antibiotiky účinnými proti *Asaia* sp. a takto ošetřené larvy měly vývoj zpomalený a výskyt jednotlivých stádií byl nesynchronizovaný. Standardní doba vývoje byla obnovena u larev, kterým byla podána antibiotika a zároveň byly doplněny o kmen *Asaia* rezistentní proti antibiotikům (Chouaia a kol., 2012). Stejného efektu bylo docíleno i u *An. gambiae*, kterým byla *Asaia* sp. jednorázově přidána do krmení. U takto nakrmených larev byl zaznamenán rychlejší vývoj larev. Larvy dosáhly stádia kukly o 48 hodin dříve při podání *Asaia* sp. než larvy krmené potravou bez bakterie (Mitraka a kol., 2013). Pokud jsou tedy komáři zbaveni *Asaia* sp. vývoj larev se zpomalí (Chouaia a kol., 2012), naopak pokud se do organismu komárů přidají další *Asaia* sp. dojde ke zrychlení vývoje (Mitraka a kol., 2013). Pozitivní vliv byl pozorován i u dospělých jedinců komárů *An. stephensi*, u kterých byla sledována délka života. Komárům byla vpravena protilátka proti *Asaia* do těla, což způsobilo smrt všech samců do třetího dne. U samic nebyl sledován žádný vliv na dobu přežití. Mechanismus vysvětlující, jak monoklonální protilátka proti *Asaia* funguje, zatím není známá (Mancini a kol., 2020).

Doposud byly v reprodukčních orgánech komárů prokázány pouze dvě bakterie: *Wolbachia* sp. a *Asaia* sp. (Ricci a kol., 2012). V přírodě se u rodu *Anopheles* nevyskytuje *Wolbachia* sp. (Rossi a kol., 2015), zato u nich dominuje *Asaia* sp. (Favia a kol., 2007; Crotti a kol., 2009). Schopnost kolonizace reprodukčních orgánů bakteriemi *Asaia* sp. a *Wolbachia* sp. může vést ke konkurenčnímu boji o stejnou anatomickou niku (Rossi a kol.,

2015). Tato hypotéza je podpořena studií Hughes a kol. (2014), kde bylo prokázáno, že u komárů rodu *Anopheles* bakterie rodu *Asaia* sp. negativně ovlivňují možnost mateřského přenosu bakterií rodu *Wolbachia*. Pokud byla samici *An. stephensi* nakažené *Wolbachia* sp. podána *Asaia* sp. možnost mateřského přenosu *Wolbachia* sp. byl znemožněn. Oproti tomu přenos *Wolbachia* sp. do další generace u samic bez *Asaia* sp. byl úspěšný a *Wolbachia* sp. byla detekována u 83 % larev (Hughes a kol., 2014).

1.4 *Leishmania* sp.

Podle lokalizace vývoje ve střevě flebotoma se leishmanie dělí na tři skupiny: Suprapylaria, Hypopylaria a Peripylaria. Druhy patřící do skupiny Suprapylaria prodělávají vývoj u flebotomů v mezenteronu a stomodeu. Druhy vyvíjející se pouze v prostředí proktodea patří do skupiny Hypopylaria. Peripylaria se vyvíjejí skrz celý trávicí trakt (Kamhawi, 2006). Vývoj ve střevě flebotoma koreluje s rozdělením leishmanií na podrody. K původním třem podrodům *Leishmania*, *Viannia* a *Sauroleishmania* v roce 2016 přibyl další podrod *Mundinia* (Espinosa a kol., 2018). Většina prací uvádí, že podrod *Leishmania* a nově i *Mundinia* se vyvíjí suprapylárním způsobem, podrod *Viannia* peripylárně a *Sauroleishmania* má vývoj hypopylární (Becvar a kol., 2021).

Životní cyklus leishmanií je dvojhospitelský, kdy se střídá extracelulární vývoj v trávicí soustavě přenašeče a intracelulární vývoj v leukocytech, zpravidla makrofázích, obratlovčího hostitele. Krev s bezbičíkatými stádii parazita (amastigot) je nasáta do abdominální části mezenteronu. Zvýšené pH a pokles teploty iniciuje transformaci amastigotů na procyklické promastigoty v endoperitrofickém prostoru. Procykličtí promastigoti se mnohonásobně dělí a po několika dnech se transformují na takzvané dlouhé nektomonády, které po rozpadu peritrofické matrix unikají do ektoperitrofického prostoru mezenteronu. Tam nektomonády pomocí bičíku adherují mezi mikrovily epitelu a dělí se (Rogers a kol., 2004; Wilson a kol., 2010). Během dalšího vývoje část promastigotů migruje z abdominálního do thorakálního mezenteronu. Část z nich adheruje k chitinové vrstvě stomodeální valvy a transformuje se na haptomonády. V přední části mezenteronu se zároveň objevují pohybliví metacykličtí promastigoti, kteří jsou vysoce infekčními formami pro obratlovce. Vývoj od amastigotů k metacyklickým promastigotům trvá zpravidla šest až devět dní v závislosti na druhu vektora a leishmanie (Rogers a kol., 2002; Kamhawi, 2006; Dostálová a Volf, 2012). Leishmanie pomocí chitinázy narušují výstelku stomodeální valvy (Volf a kol., 2004) a sekretují gelovou zátku (složenou převážně z proteofosfoglykanu), která je produktem pravděpodobně leptomonád (Rogers a kol., 2002; Rogers a kol., 2008), čímž usnadňují přenos z flebotoma do hostitele. Leishmanie tak ztěžují sání flebotomů, kteří musejí sát opakovaně a část nasáté krve regurgitují s metacyklickými formami parazita zpět do hostitele (Rogers a kol., 2002).

Vývoj leishmanií v trávicí soustavě flebotomů je ovlivňován mechanickými bariérami,

imunitním systémem, defekací a také střevním mikrobiomem (Telleria a kol., 2018). U flebotomů, kteří mohou vzhledem ke své životní strategii mikroorganismy získávat z půdy a rostlin, se celý životní cyklus leishmanií odehrává v trávicím traktu, ve kterém vzniká prostor k interakcím mezi leishmaniemi a mikrobiomem.

Kelly a kol. (2017) se zabývali zmíněnými interakcemi v pokusu, ve kterém podávali antibiotika (penicilin, gentamicin a klindamycin) samicím infikovaným *L. infantum* po pěti dnech od infekce. Již po první dávce antibiotik byl u flebotomů redukován počet bakterií a byl zaznamenán úbytek promastigotů. Následně došlo k narušení metacyklogeneze, což vedlo i ke snížení schopnosti přenést infekci na hostitele (Kelly a kol., 2017).

Louradour a kol. (2017) provedli podobný pokus s antibiotiky (penicilin a streptomycin), která podávala *Ph. duboscqi*, kteří již byli infikováni leishmanií *L. major*. Antibiotika byla přidána od pátého dne po infekci do krve a cukerného zdroje nebo pouze do cukerného zdroje. Podání antibiotik do krve i cukerného zdroje v prvních šesti dnech nevedlo k žádné změně ve vývoji promastigotů, ale v dalších dnech došlo k viditelnému snížení intenzity infekce *L. major*. Tento jev se opakoval i při podání antibiotik pouze do cukru, ale nikdy při podání antibiotik pouze do krve. Snižování mikrobiální rozmanitosti ve střevech *Ph. duboscqi* vedlo k zhoršení přenosových vlastností patogenu; snížená intenzita infekce a snížený počet promastigotů; oproti kontrolní skupině. Přidáním rezistentních bakterií do krve částečně pomohlo k vývoji leishmanií v *Ph. duboscqi* (Louradour a kol., 2017).

V další práci došlo k bližšímu studiu složek mikrobiomu, které mohou interagovat s leishmaniemi. Sant'Anna a kol. (2014) si k tomuto účelu vybrali bakterie *Asaia* sp. a *Ochrobactrum intermedium* (kmen Proteobacteria, třída Betaproteobacteria) a sněť *Pseudozyma* sp. (říše Fungi, třída Ustilaginomycetes, čeleď *Ustilaginaceae*), které se běžně vyskytují v mikrobiomu volně žijících i laboratorně chovaných *Lu. longipalpis*. U flebotomů *Lu. longipalpis*, kterým byl před sáním infikované krve s *L. mexicana* podáván cukr obsahující houby a bakterie, dojde ke snížení schopnosti leishmanií kolonizovat mezenteron. V případě samic, které měly střevo kolonizováno *O. intermedium*, docházelo k snižování intenzity infekce a k vyšší mortalitě nakažených samic. Ke zvýšení mortality samic *Lu. longipalpis* došlo i při nákaze kombinací *O. intermedium* a *Asaia* sp. nebo *Pseudozyma* sp. a *Asaia* sp. (Sant'Anna a kol., 2014). Důvodem mortality *Lu. longipalpis* a snížení intenzity infekce *L. mexicana* může být teorie o ekologii společenstev, kdy se předpokládá, že čím je diverzita střevního mikrobiomu větší, tím spíše se stane rezistentnější vůči patogenům (Case, 1990; Sant'Anna a kol., 2014). Dalším vysvětlením tohoto jevu může být funkce imunitního systému hostitele, který mohl být spuštěn přítomností zvýšeného počtu bakterií (Kelly a kol., 2017).

Sant'Anna a kol. (2014) se také zabývali myšlenkou, zdali je možné, aby přítomnost leishmanie ve střevě flebotoma byla pro vektory prospěšná. Nejdříve byly *Lu. longipalpis* infikovány *L. mexicana*, a až poté jim byly podány bakterie *Serratia marcescens*. U tohoto entomopatogenního druhu bakterií je potvrzené, že jsou letální pro leishmanie *in vitro*

a zároveň se vyskytují u volně žijících *Lu. longipalpis* (Moraes a kol., 2008; McCarthy a kol., 2011). Mortalita flebotomů, kterým byla poddána krev bez přítomnosti leishmanií a cukerný zdroj s bakterií *S. marcescens*, byla vysoká: šestého dne se dožilo pouze 11 %. Výrazně vyšší přežívání (56 %) bylo u flebotomů, kterým byli nejdříve společně s krví podáni amastigoti *L. mexicana* a až poté cukr se *S. marcescens*. Leishmanie způsobovaly pokles bakterií v mikrobiomu včetně *S. marcescens*. Tento výsledek prokazuje pozitivní interakci mezi vektorem a leishmanií (Sant'Anna a kol., 2014). V kapitole 1.2 bylo uvedeno, že po sání stoupá množství bakterií, ale klesá diverzita střevního mikrobiomu, a teprve po defekaci se vrací na obdobnou úroveň jako u samic krmených cukrem (Volf a kol., 2002a; Kelly a kol., 2017). Tato teze může být narušena přítomností leishmanií. Samice *Lu. longipalpis* infikované *L. infantum* měly po defekaci krve stále klesající trend počtu bakterií, narozdíl od samic neinfikovaných *L. infantum*, kterým se po defekaci vrátil počet bakterií na úroveň před sáním. Infikovaným samicím se také změnilo složení mikrobiomu. Množství bakterií z čeledi *Pseudomonadaceae*, které dominovaly v ranné infekci začaly klesat a začala dominovala čeleď *Acetobacteraceae*, která v rané fázi nebyla nalezená vůbec. Byla sledována nepřímá úměrnost mezi diverzitou bakterií a intenzitou infekce leishmanií (Kelly a kol., 2017).

Kromě mikrobiomu mohou leishmanie ve flebotomovi interagovat i s dalšími mikroorganismy a patogeny s nimiž kocirkulují na stejném území. Může dojít ke koinfekci, tzn. že flebotom se nakazí více mikroorganismy současně nebo ke superinfekci, kdy nákaza proběhne s časovým rozstupem (Kwon a kol., 2020). Během koinfekce/superinfekce může následně docházet k třem situacím:

1. mikroorganismy spolu nebudou interagovat ani se vzájemně ovlivňovat,
2. alespoň jeden z mikroorganismů bude z této situace profitovat,
3. kompetice.

Navíc do této situace vstupuje ještě imunitní systém hostitele, a jak už bylo zmíněno výše tak například mikrobiom (Stecher a Hardt, 2011; Cirimotich a kol., 2011; Vivero a kol., 2019b). V přirozených podmínkách k těmto situacím zřejmě běžně dochází, ale o jejich významu není u flebotomů mnoho známo.

Porovnání vývoje *L. tropica* u flebotomů *Ph. sergenti* z dvou oblastí, kdy jedna skupina byla přirozeně infikována gregarinami *Psychodiella sergenti* (Apicomplexa: Eugregarinorida) neprokázala signifikantní rozdíl ve vývoji leishmanií mezi skupinami (Jancarova a kol., 2015).

Je zaznamenáno několik superinfekcí *Leishmania* sp. a *Endotrypanum* sp. nalezených jak u hmyzího vektora, tak i u definitivního hostitele (Barbosa a kol., 2006). Někteří autoři se domnívají, že jde možná i o častější jev, než je dokumentováno, jelikož si je morfologie i vývoj *Endotrypanum* sp. a *Leishmania* sp. ve střevech flebotomů podobný (Shaw, 1992; Franco a kol., 1997), což může vést ke zkreslení infekcí.

Barbosa a kol. (2006) porovnávali infekčnost *Endotrypanum* sp. a *L. (Vianna) guyanensis* u *Lu. longipalpis* při superinfekcích. *L. guyanensis* inhibovala vývoj *Endotrypanum* sp. v *Lu. longipalpis*, u kterých zároveň docházelo k vyšší mortalitě. *Endotrypanum* sp. a *Leishmania* sp. od sebe autoři odlišovali pomocí izoenzymové elektroforézy (Barbosa a kol., 2006). Díky relativně novým molekulárním metodám lze již tyto infekce odlišit (Jirku a kol., 2012).

Ergunay a kol. (2014) při monitoringu flebotomů ve východním Turecku a severním Řecku objevili společnou cirkulaci Toscana viru a *L. infantum* u *Ph. tobbi* na jednom území. Dále byla prokázána kocirkulace leishmanií a flebovirů na dalších místech, například společný výskyt leishmanie a Toscana viru byl prokázán opět v Turecku (Özbel a kol., 2020), dále v Tunisku (Fares a kol., 2020), Maroku (Daoudi a kol., 2022) a na území Francie byla nalezena kocirkulace *L. infantum* a Massilia viru (Faucher a kol., 2014). Kromě entomologických screeningů je tento jev potvrzen i pomocí protilátkových studií u zvířat i lidí (Bichaud a kol., 2011; Moriconi a kol., 2017). Je zajímavé, že i přes četné záznamy společného výskytu leishmanií a virů na stejném území, nebyl nikdy nalezen koinfikovaný vektor a tento fakt zatím čeká na detailnější průzkum (Ergunay a kol., 2014; Moriconi a kol., 2017).

Nejsou vyloučené ani společné infekce dvou druhů leishmanií *L. infantum* a *L. brasiliensis*, které mohou cirkulovat na jednom území zároveň. To vedlo ke zkoumání jejich vývoje při experimentální superinfekci u přenašečů *Lu. longipalpis* a *Lu. migonei* (Alexandre a kol., 2020). Pomocí fluorescenčního mikroskopu byly určeny lokalizace jednotlivých druhů leishmanií. Když došlo ke koinfekci, *L. brasiliensis* se vyvíjela peripylárně a *L. infantum* suprapylárně stejně jako při infekcích pouze jedním druhem. *L. infantum* způsobovala silnější infekce a rostla rychleji než *L. brasiliensis*. Nicméně obě leishmanie dokončily svůj vývojový cyklus a vytvořily metacykly (Alexandre a kol., 2020). Obdobný trend byl pozorován i při koinfekci *L. major* a *L. turanica* ve střevech flebotomů *Ph. papatasi* a *Ph. duboscqi*. Nebyl zpozorován rozdíl v lokalizacích a intenzitě infekce a to ani u různých infekčních dávek promastigotů a oba druhy leishmanií kolonizovaly stomodeální valvu a stejně jako v předešlé studii si navzájem nekonkurovaly (Chajbullinova a kol., 2012). Ani jedna z uvedených studií nesledovala dopad infekcí na přenos leishmanie do definitivního hostitele.

2. Metodika

2.1 Kolonie flebotomů

Na pokusy byla používána kolonie flebotomů druhu *Phlebotomus duboscqi*. Kolonie je součástí chovů na katedře parazitologie Univerzity Karlovy v Praze od roku 2008 a pochází ze Senegalu. Detailní informace o chovu jednotlivých druhů flebotomů jsou shrnuty v publikaci Volf a Volfova (2011).

Flebotomové jsou umístěni v místnostech se stálou a monitorovanou teplotou 25 – 26 °C, 60 – 70 % vlhkostí a fotoperiodou 14 hodin světlo a 10 hodin tma. Dospělí samci i samice mají neustálý přístup k cukernému zdroji (50 % roztok sacharózy). Samicím je obvykle jednou týdně podle preferencí druhu flebotoma podán zdroj krve (myš kmene BALB/c, králík Český albín, popřípadě gekon). Po defekaci jsou nasáté samice přemístěny do sádkou vylitých navlhčených kelímků, které slouží k udržování vlhkosti. Kelímky jsou kryty tenkou prodyšnou tkaninou (monofilem). Samice po vykladení vajec hynou a jsou z kelímku odstraněny. Z vajíček se po několika dnech vylíhnou larvy, které jsou krmeny namletou fermentovanou směsí pelet a králíčího trusu (Volf a Volfova, 2011).

2.2 Bakterie

Pro účely této diplomové práce byly vybrány dva druhy bakterií rodu *Asaia* sp.; *Asaia siamensis* a *Asaia krungthepensis*. Použitý izolát *Asaia siamensis* (7132^T) pochází z thajského keře *Calotropis gigantea*. *Asaia krungthepensis* (7333^T) je původně vyizolována z exotické rostliny *Heliconia* sp., která roste v Bangkoku (Katsura a kol., 2001; Yukphan a kol., 2004). Izoláty byly poskytnuty Českou sbírkou mikroorganismů sídlící v Brně. Vyizolované bakterie byly rozočkovány na doporučené médium, viz kapitola 2.3.1, a kultivovány dle doporučených podmínek.

2.3 Příprava materiálu

2.3.1 Acetobacter–glukanobacter médium

Pro růst bakterií *Asaia* sp. bylo dle doporučení České sbírky mikroorganismu použito selekční agarové Acetobacter–glukanobacter médium. Na přípravu agarových ploten bylo potřeba smíchat:

- 25 g uhličitanu vápenatého (Lach-Ner s.r.o.),
- 6,25 g (Sigma-Aldrich s.r.o.),
- 2,5 g kvasnicového extraktu (Lach-Ner s.r.o.),

- 25 g glukózy(Lach-Ner s.r.o.).

K připravené směsi bylo přidáno 250 ml destilované vody. Roztok se nechal vyklávkovat a po vychlazení se ve sterilním boxu rozlil do Petriho misek, které byly následně sterilizovány pod UV světlem. Po vysvícení byly misky s agary skladovány ve sterilizačních pytlích v lednici při teplotě 4 °C po dobu maximálně jednoho měsíce.

2.3.2 Tekuté GLY médium

Pro růst bakterií *Asaia* sp. bylo dle práce Yukphan a kol. (2004) připraveno GLY médium smícháním:

- 5 ml tekutého glycerolu (Lach-Ner s.r.o.),
- 2,5 g kvasnicového extraktu (Sigma-Aldrich s.r.o).

Ke směsi bylo přidáno 250 ml destilované vody a vzniklý roztok byl promícháván magnetickou míchačkou (Ohaus Guardian 5000) a zároveň se měřila hodnota pH metrem (WTW inoLab). Do roztoku se dle potřeby přidávala kyselina chlorovodíková, dokud nebylo dosaženo požadovaného pH 5,5. Výsledný roztok byl vyklávkován a uchován v lednici o teplotě 4 °C.

2.3.3 Cukerný roztok

V dalších pokusech byl za účelem infekce bakteriemi flebotomům podáván nabarvený 20 % cukerný roztok, díky kterému bylo možné rozlišit, která samice se na cukru nasála.

Ve 100 ml destilované vody bylo rozmícháno 20 g třtinového cukru a roztok byl třikrát přiveden k varu v mikrovlnné troubě. Vychlazený roztok se po přidání modrého potravinářského barviva (AROMA a.s.) přefiltroval pomocí sterilního filtru s membránou (0,22 µm, Millipore Millex).

2.3.4 Kultivační médium leishmanií

Pro přípravu kultivačního média bylo smícháno:

- 5 ml inaktivovaného fetálního kravského séra (GIBCO),
- 1 ml sterilní moči,
- 0,5 ml BME vitamínů (Sigma-Aldrich s.r.o),
- 0,4 ml amikinu (Bristol-Myers Squibb).

Zbytek objemu bylo doplněno médiem M199 (Sigma-Aldrich s.r.o) do 50 ml. Takto připravené kultivační médium je skladováno v lednici po dobu maximálně 2 měsíců.

2.4 Standardizace infekční dávky

Pro začátek bylo nezbytné optimalizovat metodu, která by řekla kolik bakterií se při dané optické densitě nachází ve vzorku. Díky tomu je pak možné určit, jak dlouho je nutné inkubovat bakterie, abychom dosáhli optické density, která odpovídá námi požadované infekční dávce ($1,8 - 4 \times 10^8$ CFU/ml). Tento experiment byl pro každou bakterii proveden ve třech opakováních.

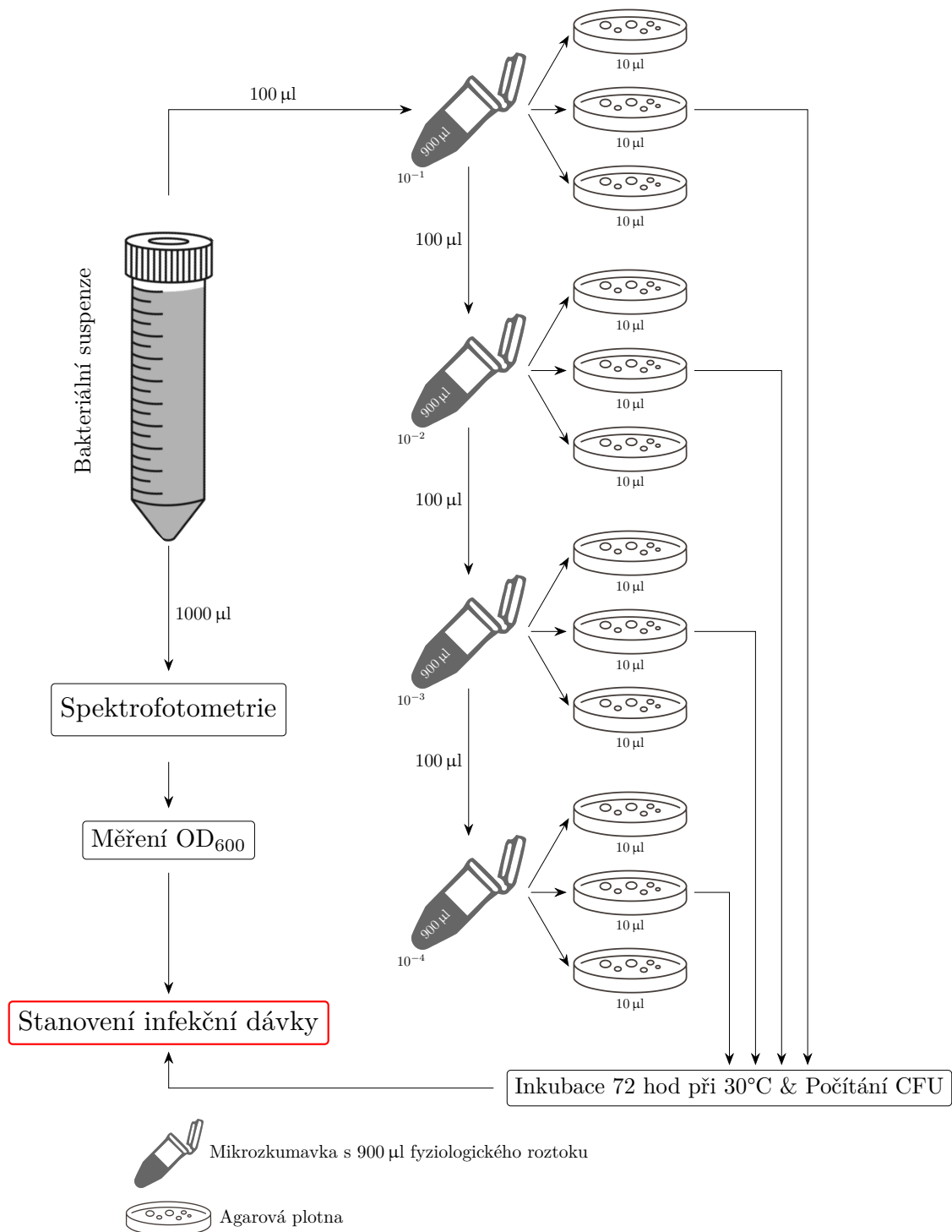
Do 40 ml GLY média byla pomocí očkovacích kliček přenesena kolonie z tuhého média. Připravená suspenze byla kultivována v třepačce při teplotě 30°C a o rychlosti třepání 200 rpm s nedovřeným víčkem pro přístup vzduchu v 50 ml falkoně.

V předem určené intervaly (2, 4, 6, 10, 24, 30, 48 a 72 hodin po inokulaci) bylo ze středního válce suspenze odebráno 1000 μl a byla změřena optická hustota na spektrofotometru (Biochrom S800). Zároveň byly vždy připravené mikrozkuhavky (Eppendorf Tubes) s 900 μl fyziologického roztoku, které sloužily pro přípravu ředící řady od $10^{-1} - 10^{-4}$, viz obrázek 2.1. Do první mikrozkuhavky se přidalo 100 μl ze středního válce suspenze, obsah byl resuspendován a stejnou špičkou bylo přeneseno 100 μl do další mikrozkuhavky, což bylo opakováno až do ředění 10^{-4} . Následně bylo z každého ředění inokulováno 10 μl na agarové plotny, viz obrázek 2.1, a nanesená suspenze byla rozprostřena očkovací hokejkou po celém povrchu agarové plotny, což později umožnilo snadnější počítání jednotlivých bakteriálních kolonií.

Připravené plotny byly kultivovány po dobu 72 hodin při teplotě 30°C . Po 72 hodinách byly spočítány jednotlivé kolonie v jednotce CFU (colony forming units). Výsledné počty kolonií z určitého ředění a určitého intervalu byly vždy sečteny a výsledek byl zprůměrován. Následně se zprůměrovaly i všechny výsledné hodnoty ze všech tří opakování zvlášť pro každý druh bakterií. Výsledná hodnota CFU na 1 ml média byla stanovena dle vzorce

$$\text{CFU/ml} = N \times H \times 10^2, \quad (2.1)$$

kde N je počet kolonií a H je hodnota ředění s kladným exponentem. Požadovaná infekční dávka $1,8 - 4 \times 10^8$ CFU/ml poté odpovídá $\text{OD}_{600} = 0,5$.



Obrázek 2.1: Schématické znázornění určení infekční dávky bakterií *Asaia* sp. pomocí měření optické denzity a počítání kolonií z agarových ploten.

2.5 Experimentální infekce flebotomů

2.5.1 Příprava bakterií *Asaia* sp. na experimentální infekce

Bakterie *Asaia* sp. bez ohledu na druh byla pomocí očkovací kličky inokulována z agarové plotny do falkony se 40 ml GLY média. Suspenze byla kultivována v třepačce při teplotě

30 °C a o rychlosti třepání 200 rpm do dovršení $OD_{600} = 0,5$.

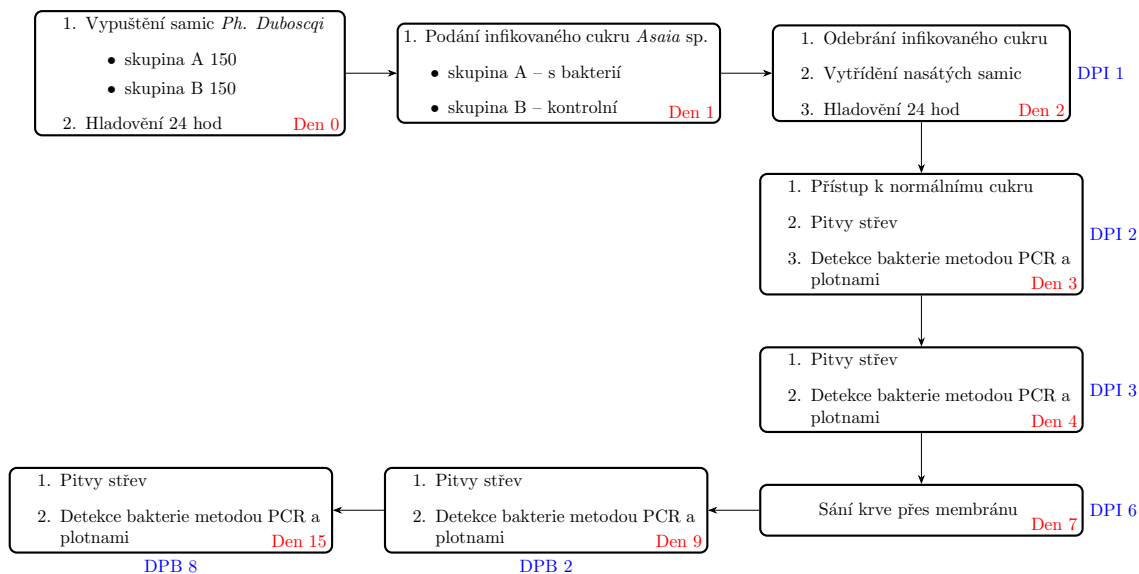
Ze středního válce bakteriální suspenze bylo odebráno 500 μ l, které byly centrifugovány rychlostí 6500 rpm po dobu 5 minut. Po první centrifugaci byl odebrán supernatant a zbylý pelet byl resuspendován v 500 μ l sterilního fyziologického roztoku a centrifugován rychlostí 6500 rpm po dobu 5 minut, tento krok se provedl ve dvou opakováních, což zastavilo další množení bakterií. Po dvojnásobném promytí se k peletu přidalo 500 μ l obarveného modrého roztoku, viz kapitola 2.3.3, směs byla resuspendována a celý objem byl přenesen na vat, která se následně umístila k flebotomům do sítě. Díky přítomnosti barviva bylo možné odlišit nenasáté samice a nasáté, viz obrázek 2.2, protože modré barvivo prosvítá skrze kutikulu flebotomů. Jako negativní kontrola byl použit stejně připravený cukr, ale bez přítomnosti bakterií, který sloužil jako ukazatel případného negativního vlivu modrého barviva na samice.



Obrázek 2.2: Porovnání samic *Phlebotomus duboscqi* po podání infikovaného nabarveného cukru. (A) – nenasátá samice, (B) – nasátá samice.

2.5.2 Infikování flebotomů bakterií *Asaia* sp.

Do natažených sítěk ve tvaru krychle s hranou 20 cm bylo vypuštěno 150 samic *Ph. duboscqi* starých jeden až tři dny. Průběh pokusu je schematicky znázorněn na obrázku 2.3. Po vypuštění byli flebotomové 24 hodin bez přístupu k cukru, aby došlo k jejich vyhladovění a poté (DEN1) jim byl na dalších 24 hodin podáván infekční modrý cukr s *Asaia* sp. Po uplynutí 24 hodin (DPI1) byl cukr odebrán a nenasáté samice byly odstraněny. Nasáté samice byly následně dalších 24 hodin bez přístupu k cukru z důvodu správného trávení a následující dny (od DPI2) měly již neomezený přístup k neinfekčnímu cukru. Šestý den po infikování (DPI 6) se flebotomům podala krev skrze krmítko, viz kapitola 2.5.3. Druhý a osmý den po sání krve (DPB 2,8) bylo odebráno 10 samic, kterým byla vypitvána střeva, ve kterých byla následně detekována přítomnost bakterií.



Obrázek 2.3: Schématické znázornění experimentální infekce *Ph. duboscqi* bakterií *Asaia* sp., **DPI**–day post infection, **DPB**–day post blood-meal

2.5.3 Sání krve skrz membránu

Pro výrobu membrány byla používána třídení kuřata, která jsou skladována v teplotě -20°C . V den přípravy jsou kuřata nejdříve rozmrazena a poté jsou zbavena peří v oblasti zad a břicha. V laminárním boxu (Alpina) byla za pomoci nůžek a pinzet kuřata stažena z kůže, která následně prošla promýváním. Nejdříve byla kůže promyta dvakrát po deseti minutách v 70 % ethanolu a dále dvakrát po deseti minutách ve fyziologickém roztoku. Připravené kůžičky byly uloženy zatažené parafilmem (Bemis™) v Petriho miskách. Kuřečí membrány byly skladovány v mrazáku o teplotě -20°C .

V den experimentu byly kůžičky z mrazáku vytaženy a rozmrazeny. Následně bylo potřeba inaktivovat defibrinovanou beraní krev (LabMediaServis s.r.o.) ve vodní lázni při teplotě 56°C po dobu 35 minut. Mezitím byla na skleněné krmítko pomocí parafilmu připravená natažená kůžička kuřete. Do takto připraveného krmítka byly přeneseny 3 ml inaktivované krve. Krmítko se připevnilo do chemického stojanu a připojilo k vodní lázni s externí cirkulací (JULABO), ve které cirkulovala voda o teplotě 37°C . Nakonec se na krmítko nasadily sítky s flebotomy, kteří měli přístup ke krvi jednu až dvě hodiny (Volf a Volfova, 2011). Po sání byly nenasáté samice vytříděny pomocí exhaustoru, přeneseny na led a následně usmrceny ethanollem. Sítky s nasátými samicemi mající neomezený přístup k cukernému zdroji byly umístěny v termostatu při teplotě 26°C .

2.5.4 Pitvy střev flebotomů

Samice byly pitvány druhý a třetí den po infekci (DPI 2, DPI 3) a následně ještě druhý a osmý den po nasátí krve (DPB 2, DPB 8). V daný časový interval bylo deset samic odchyceno a uspáno na ledu. Následně jim byly odstraněny končetiny a povrch torza byl

kvůli povrchové kontaminaci omyt v několika fázích: v destilované vodě s jarem, dvakrát v destilované vodě, v 70 % ethanolu, ve kterém je samice ponořena 15 vteřin, a nakonec jednu minutu ve fyziologickém roztoku. Omytý flebotom byl položen na podložní sklíčko do kapky fyziologického roztoku. Pod binokulární lupou (Olympus SZ61) byla pomocí pinzety a pitvátek (špejle do níž je zasazena minucie (MONARCH) o průměru 0,20 mm) odstraněna nejprve hlava a následně skrze abdomen vytaženo střevo. Střevo bylo poté opláchnuto v čisté kapce fyziologického roztoku a přeneseno do mikrozkušavky se 100 µl fyziologického roztoku a pomocí homogenizačních tyčinek manuálně rozmělněno.

Deset mikrolitrů homogenátu bylo inokulováno na agarovu plotnu a rozetřeno sterilní skleněnou hokejkou po celé ploše pro oddělení kolonií. Následně byly plotny inkubovány v termostatu po dobu 72 hodin a teplotě 30 °C. Pokud se během inkubace objevily kolonie bakterií, byla potvrzena přítomnost a životaschopnost bakterií *Asaia* sp.

Do zbytku homogenátu bylo přidáno 200 µl lyzačního pufru a takto připravený vzorek sloužil k celkové izolaci DNA ze střeva, která probíhala pomocí kitu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), dle pokynů výrobce. V posledním kroku uvolnění DNA z kolonky bylo z důvodu optimalizace namísto 100 µl elučního pufru přidáno 100 µl injekční vody (TaKaRa BIO INC.). Vyizolovaná DNA byla použita k prokázání přítomnosti bakterie polymerázovou řetězovou reakcí (PCR).

2.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Získaná DNA ze střeva flebotomů byla použita pro molekulární detekci bakterií rodu *Asaia* pomocí primerů Asafor a Asarev (koncentrace 0,025 µM), viz tabulka 2.1, které amplifikují 181 bp dlouhý úsek v oblasti genu kódující podjednotku 16S rRNA *Favia* a kol. (2007).

Tabulka 2.1: Použité primery.

Amplifikovaný gen	Název	Určení	Sekvence (5' → 3')
16 rDNA	Asarev	Reverse	AGCGTCAGTAATGAGCCAGGTT
16 rDNA	Asafor	Forward	GCGCGTAGGCGGTTTACAC

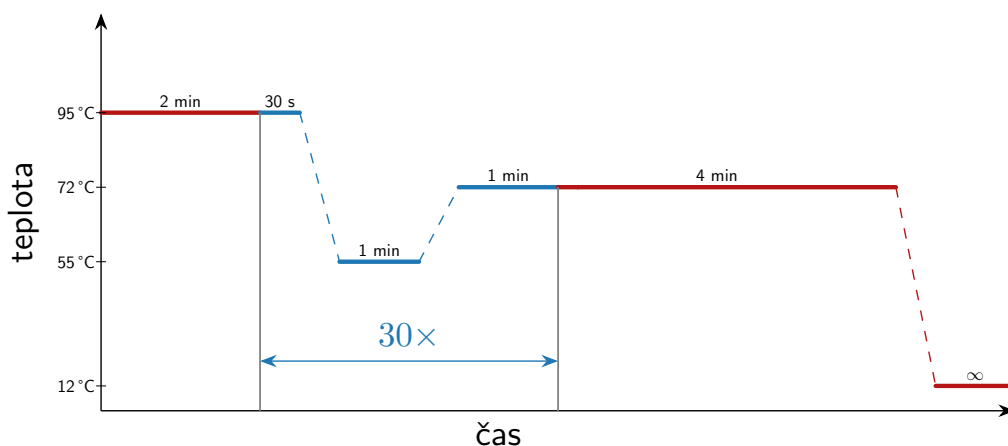
Výsledné množství reakční směsi bylo 20 µl, kdy se k 2 µl vyizolované DNA přidalo:

- 10 µl Emerald Amp GT PCR Master Mix green (TaKaRa BIO INC.),
- 1 µl Primer forward (ASAFOR) (Sigma-Aldrich s.r.o),
- 1 µl Primer reverse (ASAREV) (Sigma-Aldrich s.r.o),
- 6 µl PCR vody (TaKaRa BIO INC.).

Jako negativní kontrola bylo místo 2 µl vyizolované DNA přidáno stejné množství PCR vody a jako pozitivní kontrola byla použita vyizolovaná DNA *A. krungthepensis* získaná

z rozočkované narostlé kultury.

Polymerázová řetězová reakce probíhá na Biorad T100 Thermal cycler dle programu znázorněném na obrázku 2.4.



Obrázek 2.4: Schématické znázornění cyklů PCR programu.

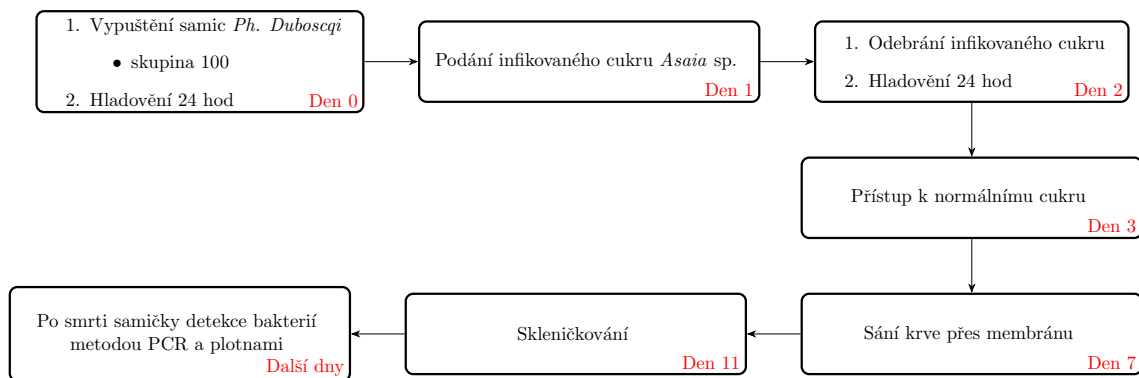
Výsledný produkt PCR byl hodnocen pomocí horizontální agarózové elektroforézy, kdy byl PCR produkt nanesen na 1 % agarózový gel připravený z: práškové agarózy (BioReagent, Sigma), 50x TAE pufru Electrophoresis Buffer (Thermo Scientific) a ze SYBR safe (ThermoFisher Scientific), který slouží k vizualizaci DNA. Do jamek na gelu bylo pipetováno vždy 10 μ l PCR produktu. Do první a poslední jamky bylo nanášeno 10 μ l GeneRuler100bp DNA Ladder (Thermo Scientific), který funguje jako velikostní standard. Gelová elektroforéza byla spuštěna při napětí 90-120 V dle velikosti gelu po dobu 20-55 minut. Gel byl vizualizován a focen v zobrazovacím přístroji (VILBER) pod modrým světlem a následně vyhodnocen.

2.7 Přenosové pokusy

2.7.1 Transovariální přenos

Cílem tohoto experimentu bylo ověření, zdali u flebotomů funguje přenos bakterií *Asaia* sp. pomocí transovariálního přenosu. Samice druhu *Ph. duboscqi* byly rozděleny do tří skupin po 150 jedincích, kdy první skupině byl podán cukr s *A. siamensis*, druhé s *A. krungthe-pensis* a třetí bez přítomnosti bakterie.

Všechny skupiny byly stejně jako v předchozím pokusu, viz kapitola 2.5.2, šestý den po podání infekčního cukru nasáty na krvi skrz membránu, viz kapitola 2.3.3. Osmý den pokusu (DPB 2) byly samice po jedné pomocí exhaustoru přeneseny do skleniček. Schéma pokusu je popsáno na obrázku 2.5.



Obrázek 2.5: Schéma transovariálního pokusu.

Do skleniček, viz obrázek 2.6, byl předem vložen filtrační papír, který sloužil k udržování vlhkosti. Skleničky byly utěsněny monofilem s otvorem pro přemístění samice, který byl uzavřen vatou. Samice byly ve skleničkách skladovány v termostatu v krabicích vyplněnými filtračním papírem zvlhčeným destilovanou vodou, který udržoval stálou vlhkost. Na monofil každé skleničky byla položena vata nasátá cukerným zdrojem, která byla měněna každý den. Jakmile samice nakladla vajíčka a následně zemřela, její tělo bylo přeneseno do 100 μ l fyziologického roztoku a zhomogenizováno. Vykladená vajíčka byla pomocí štětce přenesena také do mikrozkušavky se 100 μ l fyziologického roztoku a následně rozmělněna pomocí homogenizátoru. Ze snůšek i samic byla vyizolována celková DNA, ve které byla následně detekována přítomnost bakterie *Asaia* sp. pomocí PCR a horizontální agorózové elektroforézy, viz kapitola 2.6.

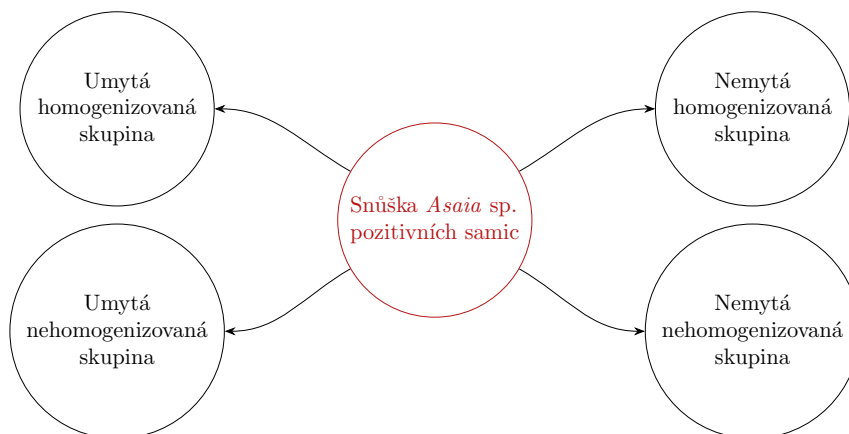


Obrázek 2.6: Sklenička na separaci samic flebotomů.

2.7.2 Kontaminativní přenos

Abychom vyvrátili možnost kontaminace snůšek reziduí bakterií *Asaia* sp., které se zachytí na povrchu vajíček, byl proveden pokus, kde byla vajíčka omývána.

Samice *Ph. duboscqi* byly stejně jako v pokusu s experimentálními infekcemi nakaženy bakteriemi *A. siamensis* a *A. krungthepensis* a nasáty, viz kapitola 2.3.3 a 2.5.2. Po defekaci (8. den, tedy 2 dny po sání na krvi) byly samice přeneseny do kelímků. Po vykladení snůšky vajec byly odstraněny mrtvé samice a vajíčka byla rozdělena do 4 experimentálních skupin, viz obrázek 2.7.



Obrázek 2.7: Rozdělení *Asaia* sp. pozitivních snůšek samic *Ph. duboscqi* do čtyř experimentálních skupin.

Následně byly dvě skupiny snůšek omývány a zbylé dvě byly ponechány s případnými nečistotami na povrchu vajec. Dvě omývané skupiny byly promyty destilovanou vodou, vajíčka zalita 500 μ l 70 % nedenaturovaným etanolem, který působil 5 minut, a nakonec byly snůšky promyty v roztoku chlornanu sodného (SAVO), který působil po stejnou dobu. Po každém kroku byla vajíčka promývána v destilované vodě po dobu 5 minut (Poinar a Thomas, 1984). Jedna ze skupin omytých a neomytých vajec byla následně zhomogenizována.

Každá skupina byla rozočkována na tři agarové plotny, na kterých se dále vyhodnotila životaschopnost bakterií. Ze zbytku objemu byla vyizolována DNA a následně byl proveden test na detekci bakterií pomocí PCR, viz kapitola 2.6.

2.7.3 Transstadiální přenos

Stejně jako u předchozích pokusů bylo potřeba nejdříve samice *Ph. duboscqi* experimentálně infikovat bakteriemi *Asaia* sp., a pak nechat nasát na krvi, viz kapitola 2.5.2,. Dva dny po sání krve byli flebotomové přemístěni do kelímků. Po vykladení a smrti samic byl pokus prováděn dvěma různými způsoby:

- po smrti byly samice vysbírány,
- po smrti byly samice ponechány v kelímku.

Po vylíhnutí larev byl každý instar (L1, L3, L4 nedefekovány, L4 defekovány) pitván včetně vylétnutých dospělých samic. Pitvy probíhaly obdobně jako pitvy samičích střev.

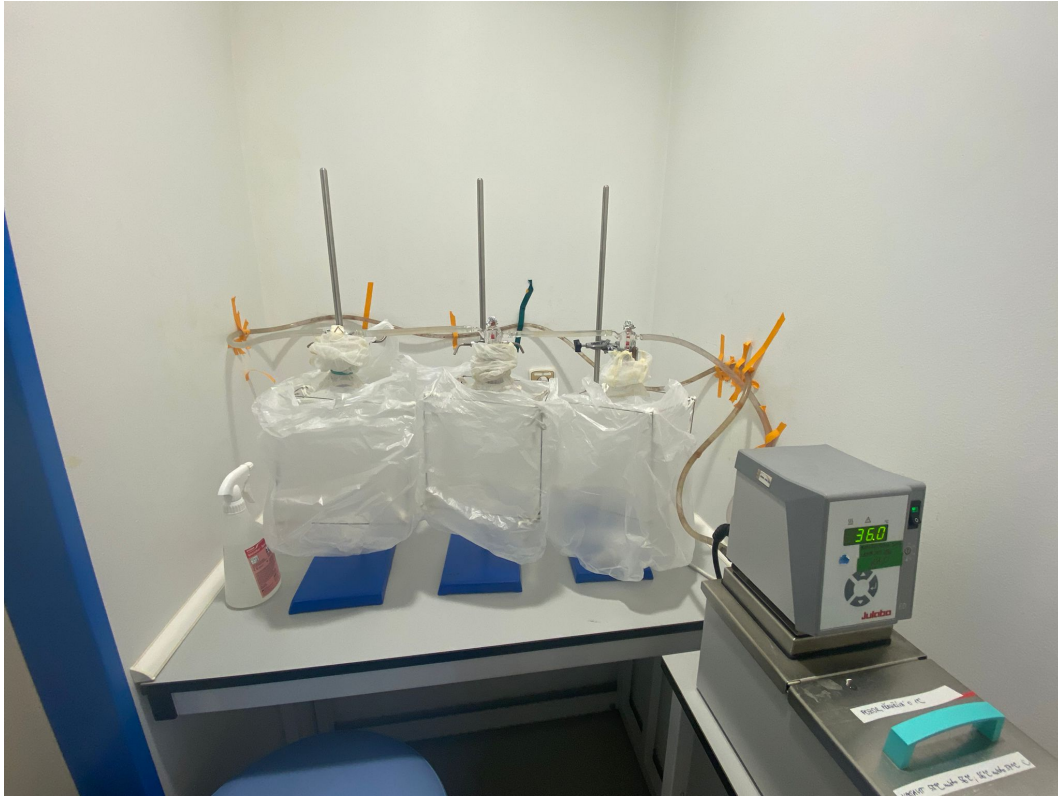
Larva byla z kelímku přendána do kapky fyziologického roztoku a pomocí pinzety a pitvátka bylo střevo vytlačeno. Střevo se opláchno v čisté kapce fyziologického roztoku a přeneslo se do mikrozkuřavky se 100 μ l fyziologického roztoku, kde bylo následně zhomogenizováno. Na agarovou plotnu bylo nanášeno 10 μ l homogenátu pro vyhodnocení životaschopnosti bakterie a ze zbytku objemu vyizolována DNA. Detekce *Asaia* sp. byla provedena pomocí PCR, viz kapitola 2.6.

2.8 Experimentální superinfekce *Leishmania major* a *Asaia* sp. v *Ph. duboscqi*

2.8.1 Superinfekce *L. major* a *Asaia* sp. v *Ph. duboscqi*

Samicím nakaženým bakterií *Asaia* sp. byla sedmý den po infekci *Asaia* sp. podána defibrinovaná beraní krev, viz kapitola 2.5.3, s promastigoty leishmanií. Kultury *Leishmania major* byly staré 3 – 5 dnů, kultivované v médiu, viz kapitola 2.3.4, a promyté fyziologickým roztokem. Tento krok bylo možné opakovat v závislosti na přítomnosti selekčních antibiotik. K 10 μ l promyté kultury bylo přidáno 990 μ l ředícího roztoku, což usmrtí žijící leishmanie a následně umožní stanovit koncentraci pomocí Bürkerovy komůrky (Assistent™). Leishmanie byly naředěny fyziologickým roztokem na základě výpočtu, tak aby bylo dosaženo výsledné koncentrace 1×10^6 buněk/ml krve.

Mezitím probíhala inaktivace beraní krve stejně jako v kapitole 2.5.3. Inaktivovaná krev s přesnou koncentrací leishmanií byla plněna do skleněného krmítka pomocí sterilní Pasteurovy pipety. Síť se skupinami *Ph. duboscqi* (*A. siamensis* pozitivní, *A. krunghepensis* pozitivní, *Asaia* sp. negativní, viz obrázek 2.8) byly k chemickým stojanům s připevněnými skleněnými krmítky přichyceny, aby mohli flebotomové sít po dobu jedné hodiny při 26 °C v naprosté tmě. Podmínky sání mohou být v průběhu sání modifikovány dle aktivity flebotomů. Po sání byly odebrány nenasáté samice. Síťky s nasátými samicemi byly vráceny do termostatu, kde měly neomezený přístup k cukernému zdroji.



Obrázek 2.8: Sání jednotlivých skupin flebotomů napojených na vodní cirkulaci A-kontrolní skupina, B-*Asaia siamensis* pozitivní skupina, B-*Asaia krungthepensis* pozitivní skupina.

2.8.2 Stanovení infekce *L. major* u *Ph. duboscqi* při superinfekci s *Asaia* sp.

Pitvy střev samic infikovaných *Asaia* sp. a *L. major*, viz kapitola 2.8.1 probíhaly vždy druhý, pátý a osmý den po sání (DPB2, DPB5, DPB8). Vždy bylo pitváno 20 samic z každé skupiny (*A. siamensis* pozitivní, *A. krungthepensis* pozitivní, *Asaia* sp. negativní). Samice byly přeneseny na led a po imobilizaci jim byly odstraněny končetiny. Torzo samic bylo položeno na podložní sklíčko do kapky fyziologického roztoku. Pod binokulární lupou (Olympus SZ61) byla pomocí pinzety a pitvátek odstraněna nejprve hlava a následně skrze abdomen vytaženo střevo. Vypitvané střevo bylo přeneseno do čisté kapky fyziologického roztoku a přikryto krycím sklíčkem a pod mikroskopem (Olympus CX31) byla hodnocena intenzita infekce a lokalizace leishmanií ve střevě. Intenzita byla hodnocena podle síly infekce do čtyř kategorií (Myskova a kol., 2008), viz tabulka 2.2.

Tabulka 2.2: Kategorie intenzity infekce.

Kategorie	Počet buněk ve střevě
Bez infekce	0
Slabá infekce	1–100
Střední infekce	100–1000
Silná infekce	>1000

Po prohlédnutí střev pod mikroskopem bylo pomocí 100 μl fyziologického roztoku střevo spláchnuto do mikrozkumavky, zhomogenizováno a 10 μl homogenátu bylo přeneseno na agarovou plotnu, aby stejně jako v předešlých pokusech bylo možné prokázat životaschopnost bakterií. Ze zbytku homogenátu byla vyizolována DNA a provedeno PCR, viz kapitola 2.6.

2.8.3 Příprava mikroskopického preparátu ze střev *Ph. duboscqi* infikovaných *L. major*

Při předešlém pokusu, viz kapitola 2.8.2, bylo vždy několik pozitivních střev na *L. major* rozetřeno krycím sklíčkem po ploše podložního sklíčka. Rozetřené střevo bylo po uschnutí na sklíčku zafixováno methanolem a po jeho zaschnutí byla na sklíčko pomocí Pasteurovy pipety nanášena vrstva roztoku Giemsy (Sigma-Aldrich s.r.o) a destilované vody (v poměru 1:19) na dobu cca 15 – 20 minut a poté byla vrstva roztoku pod malým proudem vody smyta.

2.8.4 Měření forem promastigotů *L. major*

Připravené preparáty, viz kapitola 2.8.3, byly prohlíženy mikroskopem (Olympus BX51) s integrovanou kamerou DP-70. K prohlížení preparátu bylo používáno 1000 \times zvětšení a imerzní olej. K vyfocení leishmanií byl použit program QuickPHOTO MICRO 2.2 (Olympus). Nafoceným leishmáníím byla měřena délka bičíku, šířka a délka těla za pomoci programu ImageJ Java. Morfologická forma byla určena u leishmanií ze 4 preparátů z každé skupiny (*A. siamensis* pozitivní, *A. krungthepensis* pozitivní, *Asaia* sp. negativní) ve dvou opakování. Hodnoty měření byly statisticky zpracovány a přesné formy byly určeny podle Sádlová a kol. (2010) do tří kategorií, které jsou vypsány v tabulce 2.3.

Tabulka 2.3: Morfologické formy leishmanií.

Morfologická forma	Rozměry
Krátký promastigot	délka těla < 14 μm a délka bičíku < 2 \times délka těla
Metacyklický promastigot	délka těla < 14 μm a délka bičíku \geq 2 \times délka těla
Dlouhá nektomonáda	délka těla \geq 14 μm

2.9 Statistické vyhodnocení

Statistické testování výsledků bylo provedeno v programu StudioR (<http://cran.r-project.org>) pro zjištění signifikantních rozdílů v intenzitě infekce a lokalizace *L. major* mezi skupinou se superinfekcí *L. major* a *A. siamensis* i *A. krungthepensis* a skupinou bez bakterie *Asaia* sp. nakažené *L. major*. Vzhledem k charakteru dat (kategoriální) byl použit Pear-

sonův Chí-kvadrát test nebo Fisherův exaktní test s ohledem na počet vzorků. Nulová hypotéza byla zamítána na 5% hladině významnosti.

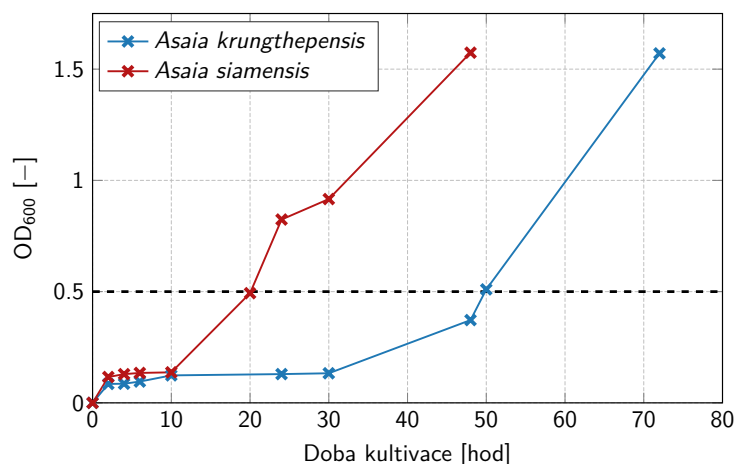
3. Výsledky

3.1 Standardizace infekční dávky

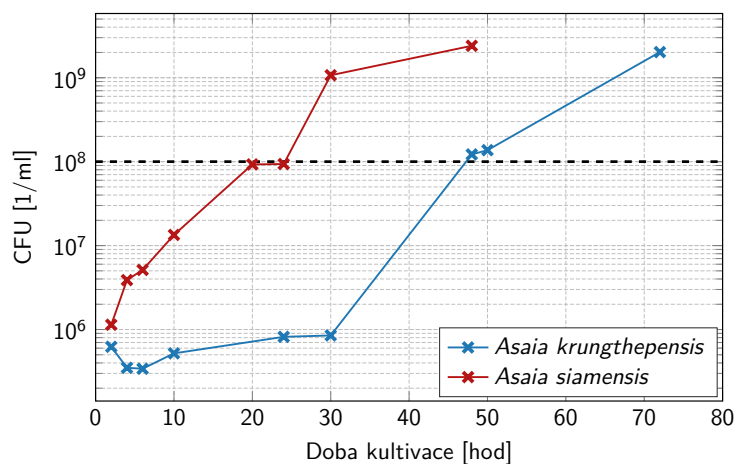
Cílem pokusu bylo stanovit za jakou dobu bakterie *A. krungthepensis* a *A. siamensis* dosáhnou požadované koncentrace při kultivaci v tekutém médiu.

A. siamensis měla mnohem rychlejší růstový potenciál než *A. krungthepensis*, viz graf 3.1. *A. siamensis* dosáhla požadované standardizované infekční dávky

$1,7 - 4 \times 10^8$ CFU/ml, již za 20 hodin. Zatímco *A. krungthepensis* k dosažení potřebovala 50 hodin, viz graf 3.2.



Graf 3.1: Časový vývoj optické denzity (OD₆₀₀) bakterií *A. siamensis* a *A. krungthepensis* v tekutém médiu, OD₆₀₀—optická denzita vzorků měřená při vlnové délce 600 nm



Graf 3.2: Množení bakterií *A. siamensis* a *A. krungthepensis* v tekutém médiu, CFU—Colony Forming Units

3.2 Experimentální infekce flebotomů bakteriemi *Asaia* sp.

Klíčovým aspektem pro tuto práci bylo zjištění schopnosti přežívání bakterií *A. siamensis* a *A. krungthepensis* ve *Ph. duboscqui*. Proto byly vždy v určité dny po infekci bakteriemi a taky po sání krve otestována střeva pomocí PCR a natřením střevního homogenátu na agarové plotny. Pokud byl vzorek PCR pozitivní, vždy byly bakterie přítomny i na plotně, což potvrzuje, že bakterie zachycené molekulární metodou byly zároveň i živé. Pokus byl pro každou bakterii proveden ve třech nezávislých opakováních a výsledky byly sloučeny.

Na přítomnost *A. krungthepensis* ve střevech flebotomů bylo celkem otestováno 120 samic. Druhý den po podání infekčního cukru byla bakterie *A. krungthepensis* detekována u 87 % samic a třetí den po infekci byla nalezena u 93 % samic. Po nasátí krve klesl počet *A. krungthepensis* pozitivních samic na 60 % a osm dní po sání (DPB 8) byla bakterie nalezena u 77 % samic, viz graf 3.3 a tabulka 3.1.

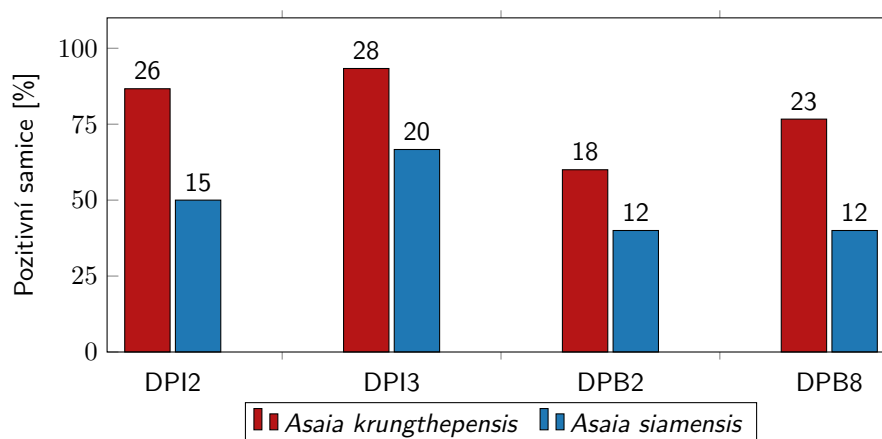
Tabulka 3.1: Počet pozitivních samic *Ph. duboscqi* na *A. krungthepensis*. **DPI**–day post infection, **DPB**–day post blood-meal

	<i>A. krungthepensis</i> pozitivní	Celkem
DPI 2	26	30
DPI 3	28	30
DPB 2	18	30
DPB 8	23	30

Na přítomnost *A. siamensis* bylo stejně jako pro *A. krungthepensis* otestováno 120 samic. Druhý den po infekci byla *A. siamensis* nalezena u poloviny samic (15 z 30). Další den (DPI 3) počet *A. siamensis* pozitivních samic stejně jako v případě *A. krungthepensis* vzrostl a bakterie byla detekována u 67% samic. Po sání krve počty *A. siamensis* pozitivních samic klesly a v druhý i osmý den (DPB 2, DPB 8) byla bakterie detekována pouze u 40% u testovaných samic, viz graf 3.3 a tabulka 3.2. Z výsledků vyplývá, že i když *A. siamensis* roste v médiu rychleji ve flebotomech naopak lépe přežívá *A. krungthepensis*.

Tabulka 3.2: Počet pozitivních samic *Ph. duboscqi* na *A. siamensis*. **DPI**–day post infection, **DPB**–day post blood-meal

	<i>A. siamensis</i> pozitivní	Celkem
DPI 2	15	30
DPI 3	20	30
DPB 2	12	30
DPB 8	12	30



Graf 3.3: Výsledky experimentálních infekcí *A. krungthepensis* a *A. siamensis* ve střevech samic *Ph. duboscqi*; **DPI**–day post infection, **DPB**–day post blood-meal

3.3 Transovariální přenos

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda se *A. krungthepensis* a *A. siamensis* mohou u *Ph. duboscqi* přenášet i transovariální cestou. Pokus probíhal ve dvou opakováních a výsledky byly sloučeny. U samic infikovaných *A. krungthepensis* došlo k vykladení snůšky u 77 ze 128 (60%) samic. Ze skupiny samic, které byly nakaženy *A. siamensis*, se vykladlo 68 ze 128 (53%).

Jako pozitivní byl považován vzorek, který splňoval následující kritéria:

1. v samici byla detekována *Asaia* sp. pomocí PCR metody,

2. ve snůšce byla detekována *Asaia* sp. pomocí PCR metody,
3. byla potvrzena životaschopnost bakterií na agarových plotnách.

Celkový počet vykladených samic infikovaných *A. krungthepensis* za 9 dnů (DPB 6–DPB 14) byl 69 a z toho celkem 41 (59 %) vzorků splňovalo všechna tři kritéria a bylo vyhodnoceno jako pozitivní.

Samice začaly klást vajíčka šestý den po sání krve, kde bylo potvrzeno pět *A. krungthepensis* pozitivních vzorků ze sedmi (71 %). Sedmý den po sání se vykladlo 13 samic, z nichž bylo pozitivně vyhodnoceno 53 % (7 z 13) vzorků. Osmý den byla *A. krungthepensis* detekována u 71 % (5 z 7) vzorků. Devátý den (42 % pozitivních, 5 ze 12) a desátý den (43 % pozitivních, 3 ze 7) byla pozitivita snůšek a samiček nižší. Naopak den 11 dosáhla pozitivita 71 % (5 z 7) a další dny byla nadále vysoká (DPB 12 – 60 %; 3 z 5, DPB 13 – 80 %, 4 z 5). Poslední vykladené samice a snůšky byly odebrány čtrnáctý den po sání a jako pozitivní na bakterii bylo vyhodnoceno 67 % vzorků (4 z 6), viz graf 3.4, tabulka 3.3.

Tabulka 3.3: Počet pozitivních i negativních samic a snůšek *Ph. duboscqi* na *A. krungthepensis*. DPB–day post blood-meal

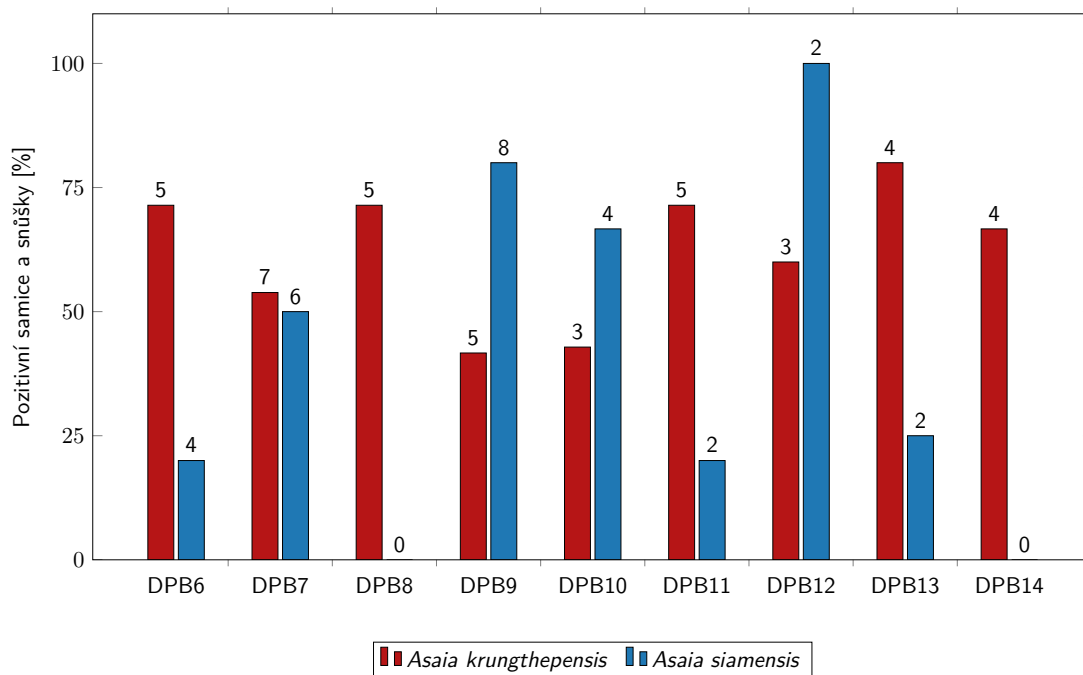
	DPB	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Asaia krungthepensis</i>	pozitivní	5	7	5	5	3	5	3	4	4
	negativní	2	6	2	7	4	2	2	1	2

Výsledný počet vzorků samic a snůšek vajíček infikovaných *A. siamensis* za 9 dnů (DPB 6 – DPB 14) bylo 78 z toho bylo pozitivních 36 % samic a snůšek *P. duboscqi* (28 ze 78).

Stejně jako u *A. krungthepensis* začaly první samice klást vajíčka šestý den po sání krve, kdy bylo otestováno celkem 20 vzorků, z čehož byly 4 pozitivní (20 %). Sedmý den byla přítomnost *A. siamensis* potvrzena u 6 samic a snůšek ze 12 (50 %), zatímco osmý u žádné samice a snůšky. Den devátý (80 %, 8 z 10) a desátý (66 %, 4 z 6) byla *A. siamensis* detekována mnohem častěji než *A. krungthepensis*. Další den pozitivita rapidně klesla (DPB 11 – 20 % 2 z 10 pozitivních samic). Den dvanáctý se vykladly jen dvě samice, ale pozitivita byla potvrzena u obou z nich. Den třináctý a čtrnáctý přítomnost bakterie opět klesala, což byl rozdíl proti *A. krungthepensis*, viz graf 3.4, tabulka 3.4. Čtrnáctý den se nepodařilo detekovat *A. siamensis* u žádné samice a snůšky.

Tabulka 3.4: Počet pozitivních i negativních samic a snůšek *Ph. duboscqi* na *A. siamensis*. DPB–day post blood-meal

	DPB	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Asaia siamensis</i>	pozitivní	4	6	0	8	4	2	2	2	0
	negativní	16	6	6	2	2	8	0	6	4



Graf 3.4: Procentuální zastoupení pozitivních samic *Ph. duboscqi* a snůšek na bakterie *A. krungthepensis* a *A. siamensis*. DPB–day post blood-meal

3.4 Transtadiální přenos

Pro prokázání přenosu mezi jednotlivými larválními stádii byl proveden pokus, kdy byly larvy všech instarů vylíhnutých z infikovaných snůšek testovány na přítomnost bakterie *Asaia* sp. ve střevech pomocí metody PCR a agarových ploten. Stejně byli testováni i dospělci po vylíhnutí z kulek.

Když došlo k odstranění vykladených samic z kelímku, *A. siamensis* ani *A. krungthepensis* nebyla prokázána u žádného larválního stádia ani dospělé *Ph. duboscqi* a to ani v jednom ze dvou opakování experimentu, viz tabulka 3.5.

Tabulka 3.5: Počet pozitivních a negativních larválních instarů a dospělců *Ph. duboscqi* z další generace na bakterie na *A. krungthepensis* a *A. siamensis* při odebrání mrtvých samic. L–larvální stádium, **ndef**–nedefekované, **def**–defekované

		L1	L2	L4ndef	L4def	Dospělci
<i>Asaia krungthepensis</i>	pozitivní	0	0	0	0	0
	negativní	40	40	40	40	40
<i>Asaia siamensis</i>	pozitivní	0	0	0	0	0
	negativní	40	40	40	40	40

Ve skupině, kde byly samice v kelímku ponechány, díky čemuž také sloužily jako první potrava pro larvy byl transstadiální přenos bakterií potvrzen. V prvním larválním stádiu byla *A. krungthepensis* detekována u 25 % larev. V druhém instaru byla nalezena u 20 %. U nedefekovaných larev čtvrtého instaru počet pozitivních jedinců viditelně vzrostl na 40 % ovšem po jejich defekaci klesl na 15 %. Z vylíhnutých dospělců nebyl pozitivní ani jeden, viz tabulka 3.6, graf 3.5.

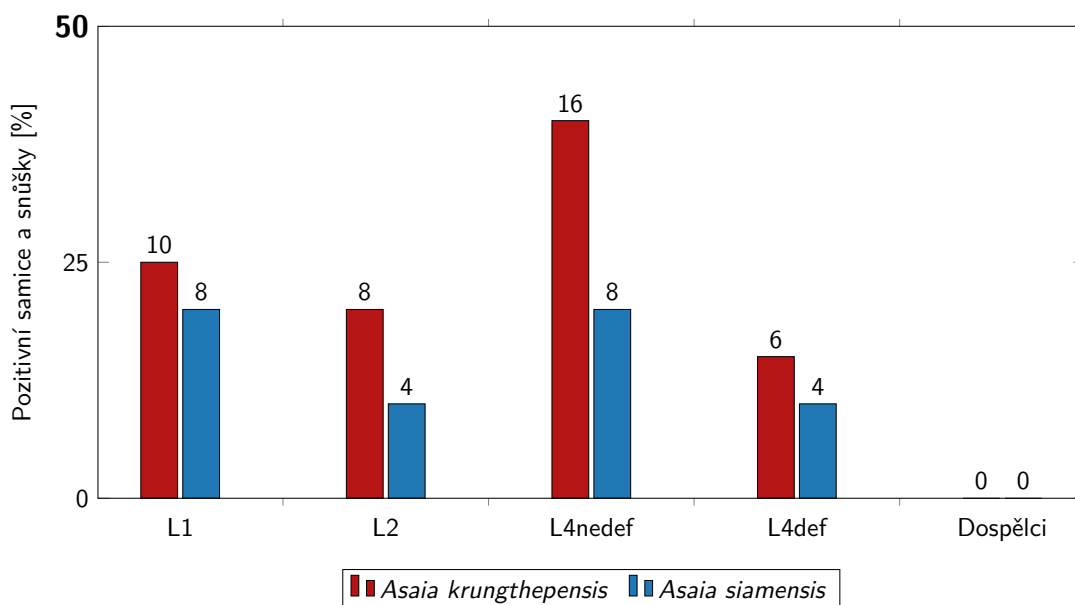
Tabulka 3.6: Počet pozitivních a negativních larválních instarů a dospělců *Ph. duboscqi* z další generace na bakterie *A. krungthepensis* a *A. siamensis* při ponechání mrtvých samic. **L**–larvální stádium, **nedef**–nedefekované, **def**–defekované

		L1	L2	L4nedef	L4def	Dospělci
<i>Asaia krungthepensis</i>	pozitivní	10	8	16	6	0
	negativní	30	32	24	34	40

Larvy vylíhnuté z vajíček od *A. siamensis* pozitivních samic vykazovaly podobný trend pozitivity jako larvy vylíhnuté ze snůšky *A. krungthepensis* pozitivních samic v prvních dvou instarech (L1 – 20 % , L2 – 10 %). Larvy čtvrtého instaru před defekací měly nižší zastoupení pozitivních larev než u *A. krungthepensis*, ale přesto zde přítomnost *A. siamensis* vzrostla na 20 %. Po defekaci počet pozitivních larev na *A. siamensis* klesl na 10 % podobně jako u *A. krungthepensis*. Ani v této skupině nebyl žádný vylíhnutý dospělec pozitivní, což naznačuje, že *A. krungthepensis* ani *A. siamensis* nepřežije kuklení, viz tabulka 3.7, obrázek 3.5.

Tabulka 3.7: Počet pozitivních a negativních larválních instarů a dospělců *Ph. duboscqi* z další generace na bakterie *A. siamensis* při ponechání mrtvých samic. **L**–larvální stádium, **nedef**–nedefekované, **def**–defekované

		L1	L2	L4nedef	L4def	Dospělci
<i>Asaia siamensis</i>	pozitivní	8	4	8	4	0
	negativní	32	36	32	36	40



Graf 3.5: Procentuální zastoupení pozitivních larválních instarů a dospělců *Ph. duboscqi* z další generace na bakterie *A. krungthepensis* a *A. siamensis*. **pozn.:** horní hranici grafu tvoří 50 % vzorků. **L**–larvální stádium, **nedef**–nedefekované, **def**–defekované

3.5 Možnost kontaminativního přenosu

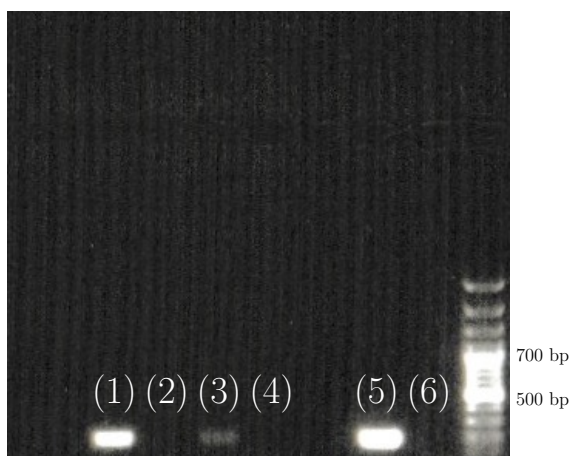
Vzhledem k dosud získaným výsledkům pokusů na transstadiální přenos jsme rozhodli otestovat možnosti kontaminativního přenosu. Abychom potvrdili, že se opravdu jedná o transvariální přenos a zároveň vyvrátili možnost uvíznutí bakterií na povrchu vajec, provedli jsme pokus s omýváním povrchu snůšek. Snůška vajec od nakažených samic byla rozdělena do 4 skupin:

1. snůška omytá homogenizovaná,
2. snůška neomytá homogenizovaná,
3. snůška neomytá homogenizovaná,
4. snůška neomytá a nehomogenizovaná.

Skupiny byly testovány na přítomnost bakterií. Tento pokus byl proveden zvláště jak pro *A. krungthepensis* tak pro *A. siamensis* ve dvou opakováních a výsledná data byla sloučena.

Ukázalo se, že skupiny homogenizované i nehomogenizované u nichž došlo k omýtí povrchu vajec byly negativní v případě *A. siamensis* i *A. krungthepensis*, což bylo potvrzeno pomocí agarových ploten a PCR. Naopak u skupin neomývaných, bez ohledu na homogenizaci, byla prokázána přítomnost *A. siamensis* i *A. krungthepensis* a to jak pomocí PCR, viz obrázek 3.6, tak přítomností bakterií na agarových plotnách. Tento experiment

prokázal přítomnost bakterií *Asaia* sp. na povrchu snůšek, ale vyvrátil jejich přítomnost uvnitř vajíčka.



Obrázek 3.6: Detekce *Asaia* sp. u *Ph. duboscqi*. (1) neumyté nehomogenizované, (2) umyté homogenizované, (3) neumyté homogenizované, (4) umyté nehomogenizované, (5) pozitivní kontrola, (6) negativní kontrola. Autor: Stejskalová

3.6 Experimentální superinfekce *Leishmania major* a *Asaia* sp. ve *Ph. duboscqi*

Cílem experimentu bylo otestovat vliv bakterií z rodu *Asaia* na vývoj *L. major* v *Ph. duboscqi*. Samice *Ph. duboscqi* ze tří skupin byly vždy pitvány druhý, pátý a osmý den po sání na krvi s promastigoty *L. major*. Druhý den v pokusu figuroval jako kontrola úspěšného sání a přenosu leishmanií. Experiment byl proveden ve dvou opakováních a výsledky byly sloučeny.

3.6.1 Vliv *Asaia* sp. na intenzitu infekce *L. major* v *Ph. duboscqi*

Mezi skupinou samic infikovanými a *A. siamensis* a skupinou kontrolní bez *Asaia* sp. nebyl pátý den po sání na krvi prokázán signifikantní rozdíl v intenzitě infekce *L. major* ($p = 0,145$). Signifikantní rozdíl nebyl pozorován ani při porovnání superinfekce *L. major* a *A. krungthepensis* a kontrolní skupiny bez *Asaia* sp. ($p = 0,061$).

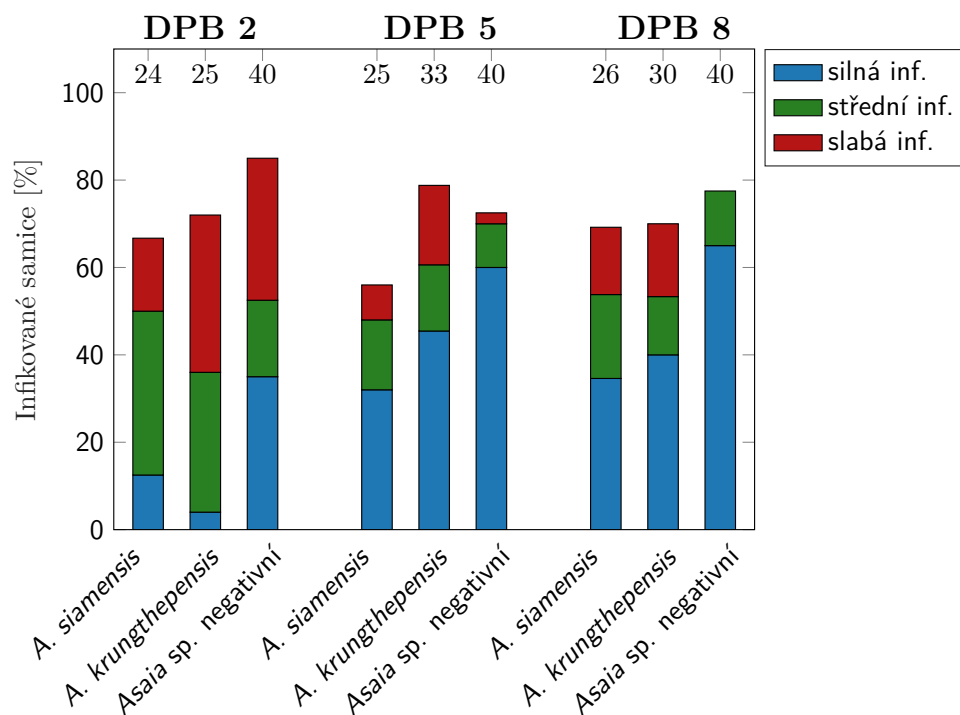
Na druhou stranu, statistické vyhodnocení ukázalo signifikantní rozdíly v intenzitě infekce *L. major* mezi skupinami infikovanými bakteriemi *Asaia* sp. a *Asaia* sp. negativními (*A. siamensis*: $p = 0,009$; *A. krungthepensis*: $p = 0,011$) osmý den po sání.

V obou případech se ve skupině *Asaia* sp. negativní vyskytovala silná infekce *L. major* častěji než u skupin nakažených *A. siamensis* nebo *A. krungthepensis*. U *Asaia* sp. negativních samic byla silná infekce *L. major* prokázána u 83 % samic, zatímco ve skupinách infikovaných *Asaia* sp. se silné infekce *L. major* pohybovaly okolo 50 %, viz tabulka 3.8, graf 3.7.

Signifikantní rozdíl nebyl zaznamenán v intenzitě infekce *L. major* mezi skupinami infikovanými *A. krungthepensis* a *A. siamensis* a to pátý ($p = 0,818$) ani osmý den ($p = 0,910$) po infekci.

Tabulka 3.8: Absolutní hodnoty intenzity infekce *L. major* u skupin samic *Ph. duboscqi* se superinfekcí s *A. siamensis* a *A. krungthepensis* a bez infekce *Asaia* sp. druhý, pátý a osmý den po podání krve. **DPB**–day post blood-meal

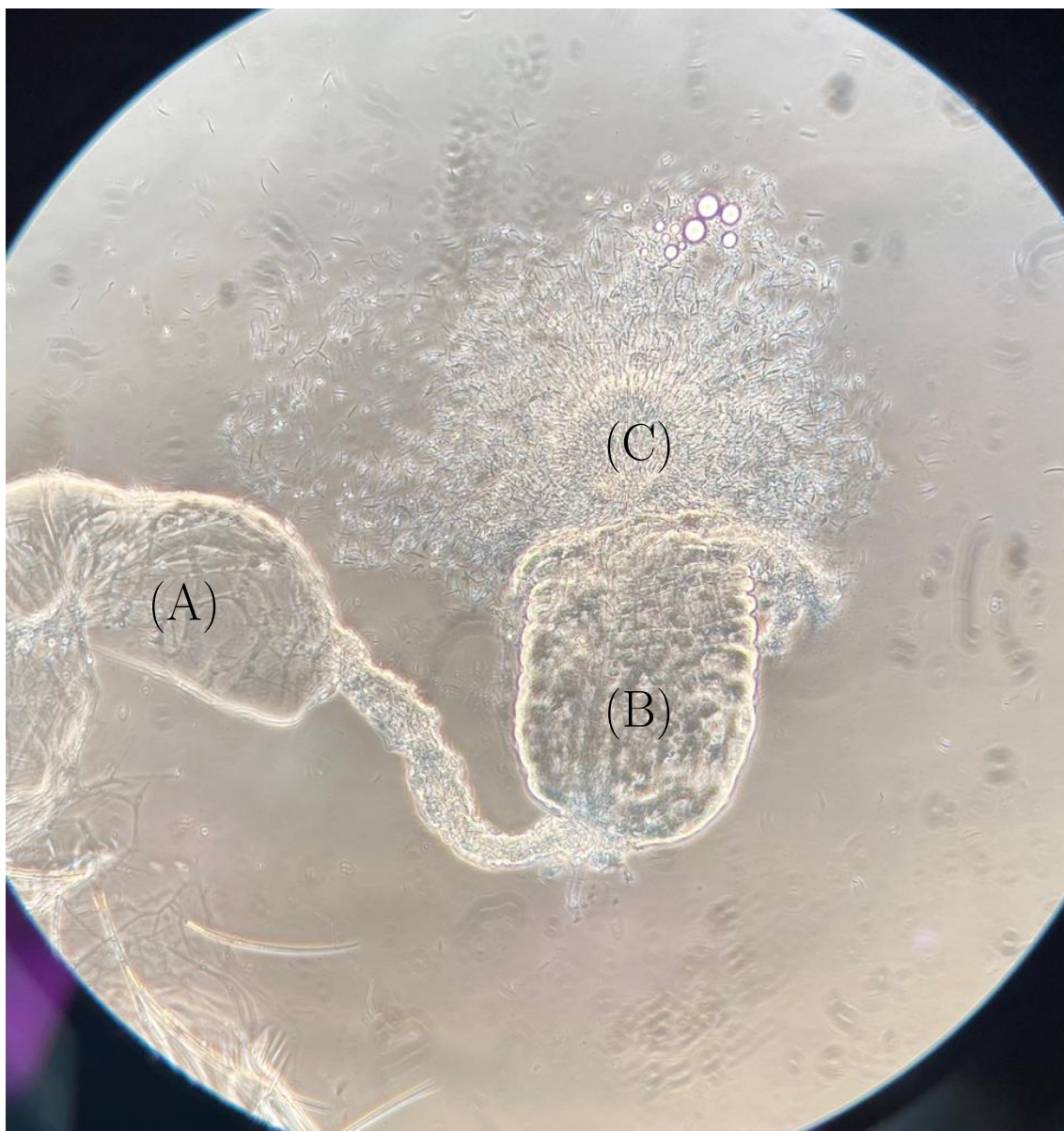
		<i>Asaia</i> sp. poz.	silná	střední	slabá	neg.	celkem
DPB 2	<i>A. siamensis</i>	24	3	9	4	8	40
	<i>A. krungthepensis</i>	25	1	8	9	7	40
	<i>Asaia</i> sp. negativní	–	14	7	13	6	40
DPB 5	<i>A. siamensis</i>	25	8	4	2	11	40
	<i>A. krungthepensis</i>	33	15	5	6	7	40
	<i>Asaia</i> sp. negativní	–	24	4	1	11	40
DPB 8	<i>A. siamensis</i>	26	9	5	4	8	40
	<i>A. krungthepensis</i>	30	12	4	5	9	40
	<i>Asaia</i> sp. negativní	–	26	5	0	9	40



Graf 3.7: Intenzita infekce *L. major* u skupin samic *Ph. duboscqi* se superinfekcí s *A. siamensis* a *A. krungthepensis* a bez infekce *Asaia* sp. druhý, pátý a osmý den po podání krve. Počty nad sloupci značí počty vypitvaných střev. **DPB**–day post blood-meal.

3.6.2 Vliv *Asaia* sp. na lokalizaci infekce *L. major* v *Ph. duboscqi*

Mikroskopickým pozorováním střev samic *P. duboscqi* byla sledována také lokalizace promastigotů *L. major*. Druhý den po sání krve byly *L. major* u všech skupin lokalizovány v endoperitrofickém prostoru (uvnitř peritrofické matrix). Pátý a osmý den po sání krve se promastigoti nacházeli už v abdominálním a thorakálním mesenteronu a u většiny samic byla kolonizována stomodeální valva, viz obrázek 3.8.



Obrázek 3.8: Kolonizovaná stomodeální valva flebotoma *P. duboscqi* leishmanií *L. major*, **A** - vole, **B** - přední část thoraxu **C** - kolonizovaná stomodeální valva, 400x zvětšení (světelný mikroskop Olympus CX31), Autor: Stejskalová

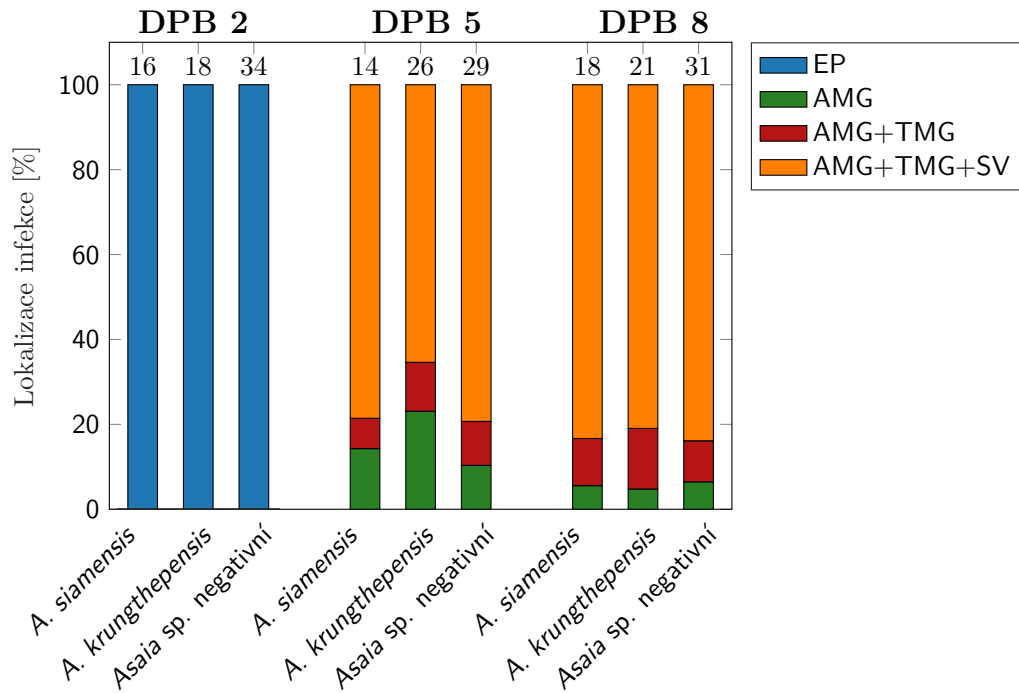
Mezi skupinami s infekcí *A. siamensis*, *A. krungthepensis* a *Asaia* sp. negativní nebyly v lokalizaci promastigotů *L. major* pozorovány žádné signifikantní rozdíly pátý (*A. siamensis* : $p = 1$; *A. krungthepensis* $p = 0,42$) ani osmý (*A. siamensis* : $p = 1$; *A. krungthepensis*

$p = 0,86$) den po sání krve, viz tabulka 3.9, graf 3.9.

Tabulka 3.9: Absolutní hodnoty lokalizace infekce *L. major* u skupin samic *Ph. duboscqi* se superinfekcí s *A. siamensis* a *A. krungthepensis* a bez infekce *Asaia* sp.

EP–endoperitroficičný prostor, **AMG**–abdominální mesenteron, **TMG**–thorakální mesenteron, **SV**–stomodeální valva, **DPB**–day post blood-meal

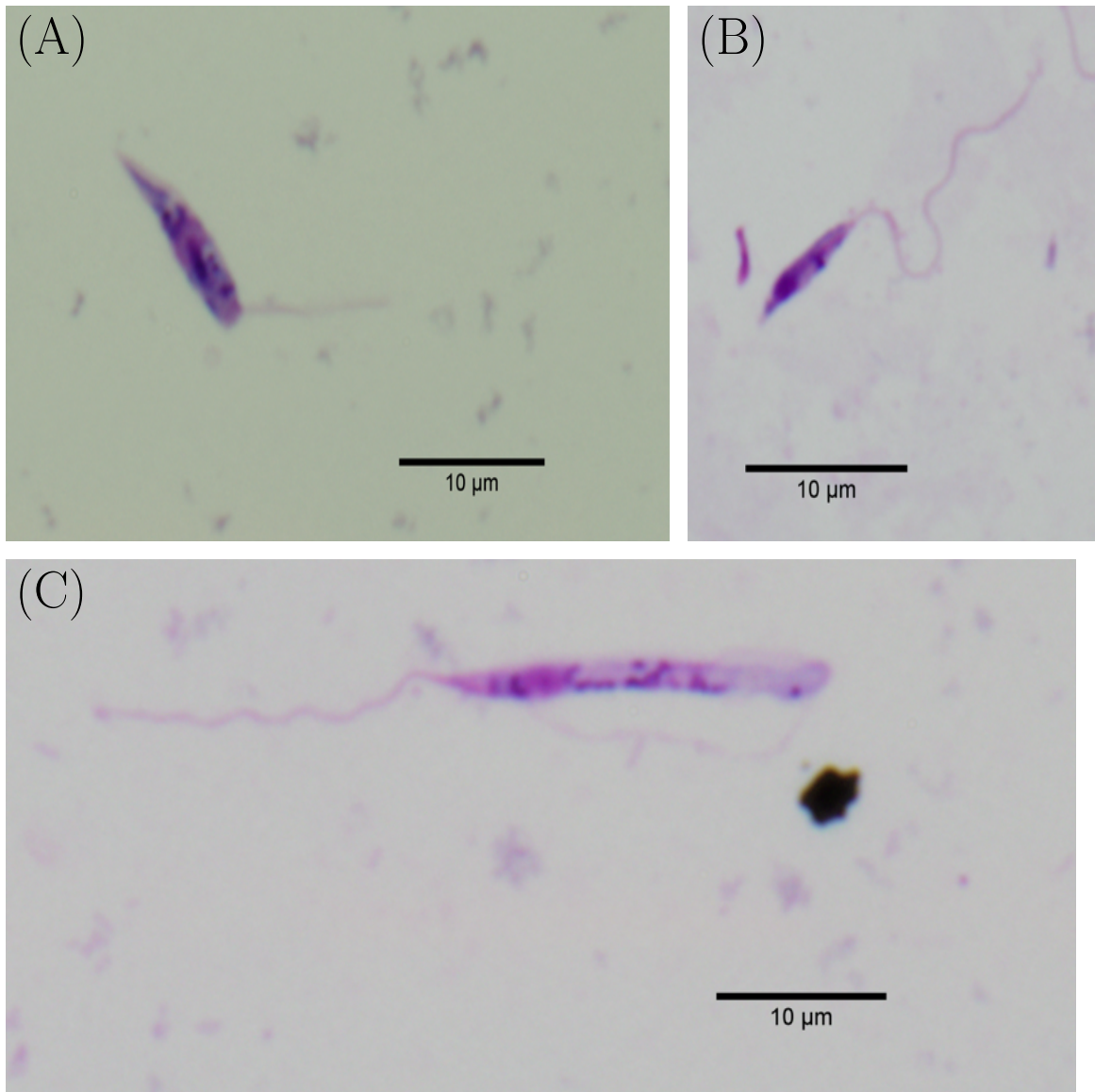
		Bez infekce	EP	AMG	AMG +TMG	AMG +TMG +SV
DPB 2	<i>A. siamensis</i>	24	16	0	0	0
	<i>A. krungthepensis</i>	22	18	0	0	0
	<i>Asaia</i> sp. negativní	6	34	0	0	0
DPB 5	<i>A. siamensis</i>	26	0	2	1	11
	<i>A. krungthepensis</i>	14	0	6	3	17
	<i>Asaia</i> sp. negativní	11	0	3	3	23
DPB 8	<i>A. siamensis</i>	22	0	1	2	15
	<i>A. krungthepensis</i>	19	0	1	3	17
	<i>Asaia</i> sp. negativní	9	0	2	3	26



Graf 3.9: Lokalizace infekce *L. major* u skupin samic *Ph. duboscqi* se superinfekcí s *A. siamensis* a *A. krungthepensis* a bez infekce *Asaia* sp., nad sloupci jsou uvedeny počty vypitvaných střev. **EP**–endoperitrofický prostor, **AMG**–abdominální mesenteron, **TMG**–thorakální mesenteron, **SV**–stomodeální valva

3.6.3 Vliv *Asaia* sp. na zastoupení morfologických forem *L. major* v *Ph. duboscqi*

Pátý a osmý den bylo pozorováno zastoupení jednotlivých morfologických forem *L. major*, viz obrázek 3.10, jak při superinfekci s *A. siamensis* a *A. krungthepensis*, tak i bez superinfekce. Ve všech skupinách se objevovaly formy krátkých promastigotů, metacyklických promastigotů i dlouhých nektomonád, viz tabulka 3.10.



Obrázek 3.10: Morfologické formy *Leishmania major*. **A**–Krátký promastigot, **B**–Metacyklický promastigot, **C**–Dlouhá nektomonáda; barvení Giemsa a zvětšení 1000× (světelný mikroskop Olympus BX51). Autor: Stejskalová

Tabulka 3.10: Absolutní hodnoty v zastoupení morfologických forem *L. major* u skupin se superinfekcí s *A. krungthepensis* a *A. siamensis* a bez superinfekce u flebotomů *Ph. duboscqi* pátý a osmý den po podání krve. **DPB** - day post blood-meal

		<i>A. siamensis</i>	<i>A. krungthepensis</i>	<i>Asaia</i> sp. negativní
DPB 5	Krátký promastigot	42	50	30
	Metacyklický promastigot	11	6	38
	Dlouhá nektomonáda	75	65	52
	celkem	122	141	121
DPB 8	Krátký promastigot	48	45	65
	Metacyklický promastigot	19	17	14
	Dlouhá nektomonáda	55	79	42
	celkem	128	121	120

3.6.4 Vliv *L. major* na intenzitu infekce *Asaia* sp. v *Ph. duboscqi*

Přítomnost *L. major* neovlivnila výskyt *Asaia* sp. u *Ph. duboscqi*, v žádném sledovaném dni po sání krve nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi *A. siamensis* s/bez *L. major* ($\chi^2=0,011$, $df = 1$, $p = 0,918$) a *A. krungthepensis* s/bez *L. major* ($\chi^2=0$, $df = 1$, $p = 1$), viz tabulka 3.11.

A. siamensis se vyskytovala v 51 % samic *Ph. duboscqi* se superinfekcí s *L. major*, zatímco *A. krungthepensis* u 65 %.

Tabulka 3.11: Počet pozitivních i negativních samic na *A. krungthepensis* a *A. siamensis* při superinfekci s *L. major*. **DPB** - day post blood-meal

		DPB 2	DPB 5	DPB 8
<i>Asaia krungthepensis</i>	pozitivní	18	26	21
	negativní	15	7	10
<i>Asaia siamensis</i>	pozitivní	16	14	18
	negativní	16	15	14

4. Diskuze

V poslední době roste zájem o studium střevního mikrobiomu flebotomů a také o interakci ať už se samotným flebotomem nebo s jím přenášenými patogeny. Studium těchto vztahů a vzájemného působení v rámci téhož hostitele může být mimo jiné nápomocné pro vývoj nových strategií v boji proti onemocněním přenášených vektory (Rossi a kol., 2015). Výsledky těchto studií mohou být využity například při paratransgenezi, kdy je symbiotickými bakteriemi geneticky manipulováno, tak aby vylučovaly molekuly, které budou při zpětném podání přenašeči, zabraňovat přenosu patogenů. Zároveň nebude mít nepříznivý vliv na fitness vektora (Hurwitz a kol., 2011). Bakterie rodu *Asaia* jsou díky svým vlastnostem považovány za vhodného kandidáta pro tyto účely, jak se ostatně ukazuje v experimentech zaměřujících se na využití *Asaia* sp. v boji s *Plasmodium* sp. (Shane a kol., 2018; Grogan a kol., 2021). Proto se také tato diplomová práce zabývá bakteriemi rodu *Asaia*, jejich vývojem ve flebotomech a také vlivem na přenášené leishmanie.

Tato práce byla zaměřena na dva druhy bakterie rodu *Asaia*, a to konkrétně na *A. siamensis* a *A. krungthepensis*, přičemž se ukázalo, že byt jde o blízkce příbuzné druhy, liší se ve svém vývoji a to jak *in vivo*, tak *in vitro*. Při kultivaci v médiu měla *A. siamensis* mnohem rychlejší růstový potenciál a stanovené infekční dávky dosáhla za méně jak polovinu doby než *A. krungthepensis*. Tento rozdíl může být způsoben například složením použitého média, které je využíváno obecně na kultivaci bakterií octového kvašení. Ve studii Sekse a kol. (2012) také poukázali na rozdíly v růstu mezi 13 kmeny *Escherichia coli* mimo jiné i v důsledku složení média. Dalším možným vysvětlením je, že *A. krungthepensis* má ve srovnání s *A. siamensis* při růstu v médiu delší lag fázi, což je interval kdy si buňky zvykají na nové prostředí a ještě se nemnoží, zatímco ty mrtvé klesají na dno, takže se množství buněk dočasně snižuje (Bertrand, 2019). Tato teorie je navíc podpořena i naším měřením, kdy na začátku každého experimentu došlo právě k takovému propadu u *A. krungthepensis*.

Oproti tomu v experimentech *in vivo* se jevila *A. krungthepensis* jako úspěšnější, jelikož infikovala více samic flebotomů než *A. siamensis*. V těchto experimentech byla testována jen přítomnost životaschopných *Asaia* sp. bakterií, nikoli intenzita infekce. Jedním z možných vysvětlení může být, že pokud si *A. siamensis* zachovala rychlost růstu i ve střevě mohla tak aktivovat imunitní systém a být častěji eliminována (Saraiva a kol., 2016; Telleria a kol., 2018). Další možností rozdílného chování těchto druhů bakterií *in vivo* a *in vitro* mohou být jejich odlišné metabolické dráhy (Rami a kol., 2018).

Když byla samicím *Ph. duboscqi* nakaženým ať už *A. siamensis* nebo *A. krungthepensis* podána krev, signifikantně klesl počet nakažených samic bakteriemi a to u obou skupin. Sáním krve dochází k výrazným metabolickým změnám ve střevech flebotomů; ze střev, která obsahují velké množství cukrů, se stane prostředí bohaté na proteiny (Volf a kol., 2002b; Akhoundi a kol., 2012; Kelly a kol., 2017).

Při trávení krve dochází mimo jiné k uvolňování kyslíkových radikálů s čímž se jednotlivé skupiny bakterií vypořádají s rozdílnou úspěšností. Některé další bakterie, které jsou součástí střevního mikrobiomu flebotomů např. *Enterobacteriaceae* sp., se umí lépe vyrovnávat s oxidativním stresem, který nastává při trávení krve (Kelly a kol., 2017). Je tedy možné, že *Asaia* sp. tuto schopnost nemají a jsou po sání krve utlačovány ať už změněnými podmínkami či jinými mikroorganismy.

Po defekaci zbytku potravy počet nálezů *A. krungthepensis* pozitivních samic *Ph. duboscqi* narostl na podobný počet jako před sáním. Je tedy možné, že po sání krve klesá množství *Asaia* sp. pod detekovatelné množství molekulárními i kultivačními metodami a po defekaci krve se opět začne množství *A. krungthepensis* ve střevech *Ph. duboscqi* navyšovat, což je v souladu s Volf a kol. (2002a) a Monteiro a kol. (2016), kteří ve svých studiích potvrdili, že se množství mikroorganismů po defekaci krve vrací do stavu jako před sáním. U samic infikovaných *A. siamensis* po defekaci nedošlo k navýšení počtu nakažených samic. Tímto pokusem byla prokázána pouze životaschopnost a přítomnost bakterií, ale pro určení přesného množství bakterií *Asaia* sp. ve střevech by bylo potřeba provést kvantifikační metody.

Dalším testovaným parametrem byl vertikální přenos *Asaia* sp., jelikož byl prokázán u komárů *An. stephensi* (Favia a kol., 2007; Favia a kol., 2008). Oba druhy *Asaia* sp. se přenesly na vajíčka a nebyl pozorován vliv na kladení samic nebo na velikost snůšky. Pokud byla vajíčka po naklazení umyta, žádná *Asaia* sp. nebyly ve snůšce detekovány, což vedlo k myšlence kontaminativního přenosu. Ten byl již u flebotomů prokázán ve spojitosti s jiným mikroorganismem; Votýpka a kol. (2009) popsali, že samice flebotomů během kladení vajíček přichytí obsah přídatných žláz společně s oocystami gregarin na chorion, který dále slouží jako zdroj infekce pro vylíhnuté larvy. K něčemu obdobnému zřejmě dochází i v souvislosti *A. siamensis* a *A. krungthepensis* u *Ph. duboscqi* a larvy se nakazí pozřením bakterií během líhnutí či krátce po něm. I u komárů bylo popsáno, že se *Asaia* sp. nenachází v embryu, ale na povrchu vajec (Favia a kol., 2007; Damiani a kol., 2010).

Je zde možnost, že by k transovariálnímu přenosu došlo až při druhém gonotrofickém cyklu, což bylo u flebotomů prokázáno u Toscana viru (Maroli a kol., 1993). Nicméně tento fenomén je poněkud problematické otestovat, protože flebotomové při experimentálních infekcích v laboratořích často odmítají podruhé sát (Jancarova, osobní sdělení).

U komárů *An. stephensi* *Asaia* sp. kolonizují i samčí reprodukční orgány (Favia a kol., 2007; Damiani a kol., 2008), a proto by bylo vhodné v budoucí práci provést lokalizaci bakterií *Asaia* sp. u flebotomů a následně vyzkoušet a případně otestovat sexuální přenos. Získali bychom ucelený pohled na přenosy bakterií *Asaia* sp. u flebotomů.

Transstadiální přenos ze snůšek infikovaných samic na larvy *Asaia* sp. byl nejdříve dokazován metodikou stanovenou Volf a Volfova (2011), kde byly vykladené samice po smrti odstraněny. U žádného larválního instaru ani dospělců nebyla *Asaia* sp. nalezena,

přestože snůšky vajec byly pozitivně testovány na přítomnost *Asaia* sp. Při ponechání mrtvých samic *Ph. duboscqi*, které larvy prvního instaru použily jako potravu se přenos *Asaia* sp. povedl, jelikož ve všech testovaných larválních instarech byly bakterie detekovány. Zdá se, že přítomnost bakterií pouze na povrchu vajec není pro přenos *Asaia* sp. dostatečný a je nutné infekci zesílit i pozřením infikovaných samic, což je v přírodě v místech líhniště možné. Bakterie *Asaia* sp. jsou tedy za určitých podmínek přenášeny i transstadiálně mezi larválními stádii, nicméně bez ohledu na přítomnost samic při líhnutí larev, nedochází k přenosu skrz stádium kukly, jelikož se nám nepodařilo objevit ani jednoho pozitivního dospělce. Podle Volf a kol. (2002b) se část mikrobiomu larev během kuklení úplně vytratí nebo sníží své počty. Ve střevech larev flebotomů dochází před zakuklení k procesům eliminace mikroorganismů způsobené fyziologickými změnami a pravděpodobně i zvýšené antibakteriální aktivitě (Dillon a kol., 1996). Podobná redukce bakteriálního mikrobiomu byla pozorována i u komárů *Culex pipiens*, *Aedes aegypti* a *An. punctipennis* ve studii (Moll a kol., 2001).

V druhé části se práce zabývala superinfekcí *Asaia* sp. a *L. major* ve flebotomech *Ph. duboscqi*. Pátý den po sání na krvi nebyl pozorován žádný rozdíl v intenzitě infekce *L. major* mezi skupinou *A. siamensis*, *A. krungthepensis* a skupinou bez bakterií. Osmý den po podání krve byl rozdíl mezi skupinami sledován. Kontrolní skupina, která nebyla infikována bakteriemi *Asaia* sp. vykazovala silnější infekcemi *L. major* ve srovnání se skupinami superinfikovanými. Přítomnost *Asaia* sp. snižovala intenzitu infekce *L. major*. Obdobný efekt byl sledován u *Ae. Aegypti*, kde byla intenzita infekce oocyst *Plasmodium* sp. slabší při přítomnosti bakterie rodu *Wolbachia* (Moreira a kol., 2009). Snižování infekce *Trypanosoma* sp. při superinfekci s bakterií *Wigglesworthia* sp. bylo zaznamenáno i u glossin (Pais a kol., 2008). Jedním z možných vysvětlení je, že bakterie svým množením vyvolala mnohem silnější imunitní odpověď hostitele (Dong a kol., 2009). Je zde také možnost kompetice leishmanií a bakterie o místo a živiny. Navíc, mohou bakterie produkovat antiparazitární molekuly a bránit tak kolonizaci střeva (Pumpuni a kol., 1996; Volf a kol., 2002a).

Mimo intenzity infekce bylo posuzováno, zda přítomnost bakterií *Asaia* sp. nezpůsobuje změnu šíření *L. major* v těle flebotoma. Zde jsme prokázali, že u infikovaných flebotomů *Ph. duboscqi* má *L. major* stejný vzorec lokalizace jako při nepřítomnosti *Asaia* sp. Pátý ani osmý den nebyl detekován signifikantní rozdíl v lokalizaci promastigotů *L. major* v rámci trávicího traktu *Ph. duboscqi* mezi skupinami se superinfekcí s *A. siamensis* nebo *A. krungthepensis* a skupinou bez superinfekce.

Dalším studovaným fenoménem bylo zastoupení morfologických forem leishmanií. Ve střevech *Ph. duboscqi* byly u všech skupin nalezeny tři morfologické formy promastigotů: dlouhé nektomonády, metacykličtí promastigoti a krátkí promastigoti. Výsledné zastoupení morfologických forem je nejasné a pro definitivní potvrzení bude nutné tento pokus opakovat. Při opačném pohledu na tuto problematiku, ani přítomnost leishmanií neměla

na výskyt *Asaia* sp. ve střevech žádný vliv. Stejně tomu bylo ve střevech komárů *An. stephensi* při nákaze *Plasmodium berghei*, které přítomnost *Asaia* sp. nijak neovlivnilo a zdá se, že tyto bakterie jsou rezistentní vůči imunitním reakcím komárů vyvolávané přítomností plasmodií (Capone a kol., 2013). Stejný efekt je možný u flebotomů a leishmanií. Další faktor, který může hrát roli v přežívání *Asaia* sp. je ten, že si *Asaia* sp. vytváří extracelulární polysacharidovou matrix (Favia a kol., 2007), která ji ochraňuje před kyselým pH a vysokou osmolaritou prostředí (Crotti a kol., 2009) a pravděpodobně i patogeny. Bakterie *Asaia* sp. se jeví jako poměrně odolný organismus, který je při náhodnému vystavení nízkým teplotám na pár hodin schopný obnovit svůj růst. Je tedy možné, že v přírodě mohou přežít i kritické podmínky, což dokazuje i fakt že některé druhy *Asaia* (*A. astilbis*, *A. platycodi* a *A. prunellae*) byly původně izolovány v místech mírného klimatu (Suzuki a kol., 2010).

Shrnutí

- Byla prokázána rozdílná dynamika růstu bakterií *A. siamensis* a *A. krungthepensis* v *in vivo* a *in vitro* pokusech.
- Experimentální infekce *A. siamensis* a *A. krungthepensis* byla úspěšně provedená u *Ph. duboscqi*. Bakterie rodu *Asaia* ve střevech flebotomů přežily do 15. dne od nakažení.
- Byl potvrzen transstadiální přenos bakterií *A. siamensis* a *A. krungthepensis* mezi larvami prvního až čtvrtého instaru *Ph. duboscqi*.
- Transovariální přenos nebyl potvrzen. Zjistila se ovšem možnost kontaminativního přenosu bakterií *Asaia* sp.
- Byla úspěšně provedena experimentální superinfekce *L. major* a *A. siamensis* i *A. krungthepensis* u *Ph. duboscqi*. *A. siamensis* ani *A. krungthepensis* nemá vliv na lokalizaci promastigotů *L. major* ve střevech *Ph. duboscqi*. Osmý den po sání krve s promastigoty *L. major* u skupin nakažených také *Asaia* sp. dochází méně často k silnějším infekcím než u skupiny bez bakterie.

Seznam použité literatury

- AKHOUNDI, M., BAKHTIARI, R., GUILLARD, T., BAGHAEI, A., TOLOUEI, R., SERENO, D., TOUBAS, D., DEPAQUIT, J. a ABYANEH, M. R. (2012). Diversity of the bacterial and fungal microflora from the midgut and cuticle of phlebotomine sand flies collected in North-Western Iran. *PloS one*, **7**(11), e50259.
- ALEXANDRE, J., SADLOVA, J., LESTINOVA, T., VOJTKOVA, B., JANCAROVA, M., PODESVOVA, L., YURCHENKO, V., DANTAS-TORRES, F., BRANDÃO-FILHO, S. P. a VOLF, P. (2020). Experimental infections and co-infections with *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* in two sand fly species, *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*. *Scientific Reports*, **10**(1), 1–8.
- ALVES, V. R., FREITAS, R. A. D., SANTOS, F. L. a BARRETT, T. V. (2011). Diversity of sandflies (Psychodidae: *Phlebotominae*) captured in sandstone caves from Central Amazonia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **106**, 353–359.
- ANO, Y., TOYAMA, H., ADACHI, O. a MATSUSHITA, K. (2008). Energy metabolism of a unique acetic acid bacterium, *Asaia bogorensis*, that lacks ethanol oxidation activity. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, pages 0803040814–0803040814.
- ANTOLAK, H., KREGIEL, D. a CZYZOWSKA, A. (2015). Adhesion of *Asaia bogorensis* to glass and polystyrene in the presence of cranberry juice. *Journal of Food Protection*, **78**(6), 1186–1190.
- ASAI, T., IIZUKA, H. a KOMAGATA, K. (1964). The flagellation and taxonomy of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter* with reference to the existence of intermediate strains. *The Journal of General and Applied Microbiology*, **10**(2), 95–126.
- BARBOSA, A. F., OLIVEIRA, S. M., BERTHO, Á. L., FRANCO, A. M. a RANGEL, E. F. (2006). Single and concomitant experimental infections by *Endotrypanum* spp. and *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the Neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **101**, 851–856.
- BASSENE, H., EL, H. A. N., FLORENCE, F., SOULEYMANE, D., BADARA, S., OUSMANE, F., DIDIER, R., CHEIKH, S. a OLEG, M. (2019). A pilot study on isolation of *Asaia* and detecting its co-presence with *Plasmodium falciparum* in two major malaria vectors in Senegal. *Journal of Parasitology and Vector Biology*, **11**(1), 1–9.
- BASSENE, H., NIANG, E. H. A., FENOLLAR, F., DOUCOURE, S., FAYE, O., RAOULT, D., SOKHNA, C. a MEDIANNIKOV, O. (2020). Role of plants in the transmission of *Asaia*

- sp., which potentially inhibit the *Plasmodium* sporogonic cycle in *Anopheles* mosquitoes. *Scientific Reports*, **10**(1), 1–10.
- BECVAR, T., VOJTKOVA, B., SIRIYASATIEN, P., VOTYPKA, J., MODRY, D., JAHN, P., BATES, P., CARPENTER, S., VOLF, P. a SADLOVA, J. (2021). Experimental transmission of *Leishmania (Mundinia)* parasites by biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *PLoS pathogens*, **17**(6), e1009654.
- BENALLAL, K. E., GARNI, R., HARRAT, Z., VOLF, P. a DVORAK, V. (2022). Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Maghreb region: A systematic review of distribution, morphology, and role in the transmission of the pathogens. *PLoS neglected tropical diseases*, **16**(1), e0009952.
- BERG, G., RYBAKOVA, D., FISCHER, D., CERNAVA, T., VERGÈS, M.-C. C., CHARLES, T., CHEN, X., COCOLIN, L., EVERSOLE, K., CORRAL, G. H. A KOL. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, **8**(1), 1–22.
- BERTRAND, R. L. (2019). Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division. *Journal of bacteriology*, **201**(7), e00697–18.
- BICHAUD, L., SOURIS, M., MARY, C., NINOVE, L., THIRION, L., PIARROUX, R. P., PIARROUX, R., DE LAMBALLERIE, X. a CHARREL, R. N. (2011). Epidemiologic relationship between Toscana virus infection and *Leishmania infantum* due to common exposure to *Phlebotomus perniciosus* sandfly vector. *PLoS neglected tropical diseases*, **5**(9), e1328.
- BILLINGSLEY, P. a LEHANE, M. (1996). Structure and ultrastructure of the insect midgut. In *Biology of the insect midgut*, pages 3–30. Springer.
- BRAZIL, R. a OLIVEIRA, S. (1999). Parthenogenesis in the sandfly *Lutzomyia mamedei* (Diptera: Psychodidae). *Medical and veterinary entomology*.
- BROWN, J. J., MIHALJEVIC, J. R., DES MARTEAUX, L. a HRČEK, J. (2020). Metacommunity theory for transmission of heritable symbionts within insect communities. *Ecology and evolution*, **10**(3), 1703–1721.
- CAPONE, A., RICCI, I., DAMIANI, C., MOSCA, M., ROSSI, P., SCUPPA, P., CROTTI, E., EPIS, S., ANGELETTI, M., VALZANO, M. A KOL. (2013). Interactions between *Asaia*, *Plasmodium* and *Anopheles*: new insights into mosquito symbiosis and implications in malaria symbiotic control. *Parasites & vectors*, **6**(1), 1–13.

- CASE, T. J. (1990). Invasion resistance arises in strongly interacting species-rich model competition communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **87**(24), 9610–9614.
- CECÍLIO, P., CORDEIRO-DA SILVA, A. a OLIVEIRA, F. (2022). Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites. *Communications biology*, **5**(1), 1–12.
- CHAJBULLINOVA, A., VOTYPKA, J., SADLOVA, J., KVAPILOVA, K., SEBLOVA, V., KREISINGER, J., JIRKU, M., SANJOBA, C., GANTUYA, S., MATSUMOTO, Y. A KOL. (2012). The development of *Leishmania turanica* in sand flies and competition with *L. major*. *Parasites & vectors*, **5**(1), 1–8.
- CHEN, S., YU, T., TERRAPON, N., HENRISSAT, B. a WALKER, E. D. (2021). Genome features of *Asaia* sp. W12 isolated from the mosquito *Anopheles stephensi* reveal symbiotic traits. *Genes*, **12**(5), 752.
- CHOUAIA, B., ROSSI, P., EPIS, S., MOSCA, M., RICCI, I., DAMIANI, C., ULISSI, U., CROTTI, E., DAFFONCHIO, D., BANDI, C. A KOL. (2012). Delayed larval development in *Anopheles* mosquitoes deprived of *Asaia* bacterial symbionts. *BMC microbiology*, **12**(1), 1–8.
- CIRIMOTICH, C. M., RAMIREZ, J. L. a DIMOPOULOS, G. (2011). Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell host & microbe*, **10**(4), 307–310.
- COMANDATORE, F., DAMIANI, C., CAPPELLI, A., RIBOLLA, P. E. M., GASPERI, G., GRADONI, F., CAPELLI, G., PIAZZA, A., MONTARSI, F., MANCINI, M. V. A KOL. (2021). Phylogenomics reveals that *Asaia* symbionts from insects underwent convergent genome reduction, preserving an insecticide-degrading gene. *MBio*, **12**(2), e00106–21.
- COUTINHO-ABREU, I. V., SHARMA, N. K., ROBLES-MURGUIA, M. a RAMALHO-ORTIGAO, M. (2010). Targeting the midgut secreted ppchit1 reduces *Leishmania major* development in its natural vector, the sand fly *Phlebotomus papatasi*. *PLoS neglected tropical diseases*, **4**(11), e901.
- CROTTI, E., DAMIANI, C., PAJORO, M., GONELLA, E., RIZZI, A., RICCI, I., NEGRI, I., SCUPPA, P., ROSSI, P., BALLARINI, P. A KOL. (2009). *Asaia*, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insects of phylogenetically distant genera and orders. *Environmental microbiology*, **11**(12), 3252–3264.
- CRUAUD, A., LEHRTER, V., GENSON, G., RASPLUS, J.-Y. a DEPAQUIT, J. (2021). Evolution, systematics and historical biogeography of sand flies of the subgenus *Paraphle-*

- botomus* (Diptera, Psychodidae, *Phlebotomus*) inferred using restriction-site associated DNA markers. *PLoS neglected tropical diseases*, **15**(7), e0009479.
- DAMIANI, C., RICCI, I., CROTTI, E., ROSSI, P., RIZZI, A., SCUPPA, P., ESPOSITO, F., BANDI, C., DAFFONCHIO, D. a FAVIA, G. (2008). Paternal transmission of symbiotic bacteria in malaria vectors. *Current Biology*, **18**(23), R1087–R1088.
- DAMIANI, C., RICCI, I., CROTTI, E., ROSSI, P., RIZZI, A., SCUPPA, P., CAPONE, A., ULISSI, U., EPIS, S., GENCHI, M. A KOL. (2010). Mosquito-bacteria symbiosis: the case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*. *Microbial ecology*, **60**(3), 644–654.
- DAOUDI, M., CALZOLARI, M., BOUSSAA, S., BONILAURI, P., TORRI, D., ROMEO, G., LELLI, D., LAVAZZA, A., HAFIDI, M., DOTTORI, M. A KOL. (2022). Identification of Toscana virus in natural population of sand flies (Diptera: Psychodidae) from Moroccan leishmaniasis foci. *Journal of Infection and Public Health*, **15**(4), 406–411.
- DILLON, R., KORDY, E. E., SHEHATA, M. a LANE, R. (1996). The prevalence of a microbiota in the digestive tract of *Phlebotomus papatasi*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, **90**(6), 669–673.
- DONG, Y., MANFREDINI, F. a DIMOPOULOS, G. (2009). Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS pathogens*, **5**(5), e1000423.
- DOSTÁLOVÁ, A. a VOLF, P. (2012). Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & vectors*, **5**(1), 1–12.
- DOUGLAS, A. E. (2015). Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annual review of entomology*, **60**, 17.
- EICHLER, S. a SCHAUB, G. (2002). Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Experimental parasitology*, **100**(1), 17–27.
- ENGEL, P. a MORAN, N. A. (2013). The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS microbiology reviews*, **37**(5), 699–735.
- ERGUNAY, K., KASAP, O. E., ORSTEN, S., OTER, K., GUNAY, F., YOLDAR, A. Z. A., DINCER, E., ALTEN, B. a OZKUL, A. (2014). *Phlebovirus* and *Leishmania* detection in sandflies from eastern Thrace and northern Cyprus. *Parasites & vectors*, **7**(1), 1–13.
- ESPINOSA, O., SERRANO, M. G., CAMARGO, E., TEIXEIRA, M. M. G. a SHAW, J. J. (2018). An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*, **145**(4), 430–442.

- FARES, W., DACHRAOUI, K., BARHOUMI, W., CHERNI, S., CHELBI, I. a ZHIOUA, E. (2020). Co-circulation of Toscana virus and *Leishmania infantum* in a focus of zoonotic visceral leishmaniasis from Central Tunisia. *Acta tropica*, **204**, 105342.
- FAUCHER, B., PIARROUX, R., MARY, C., BICHAUD, L., CHARREL, R., IZRI, A. a DE LAMBALLERIE, X. (2014). Presence of sandflies infected with *Leishmania infantum* and Massilia virus in the Marseille urban area. *Clinical Microbiology and Infection*, **20** (5), O340–O343.
- FAVIA, G., RICCI, I., DAMIANI, C., RADDADI, N., CROTTI, E., MARZORATI, M., RIZZI, A., URSO, R., BRUSETTI, L., BORIN, S. A KOL. (2007). Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**(21), 9047–9051.
- FAVIA, G., RICCI, I., MARZORATI, M., NEGRI, I., ALMA, A., SACCHI, L., BANDI, C. a DAFFONCHIO, D. (2008). Bacteria of the genus *Asaia*: a potential paratransgenic weapon against malaria. *Transgenesis and the management of vector-borne disease*, pages 49–59.
- FELICIANGELI, M. (2004). Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Medical and veterinary entomology*, **18**(1), 71–80.
- FIERER, N., FERRENBURG, S., FLORES, G. E., GONZÁLEZ, A., KUENEMAN, J., LEGG, T., LYNCH, R. C., McDONALD, D., MIHALJEVIC, J. R., O'NEILL, S. P. A KOL. (2012). From animalcules to an ecosystem: application of ecological concepts to the human microbiome. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **43**(137), 2012.
- FRAIHI, W., FARES, W., PERRIN, P., DORKELD, F., SERENO, D., BARHOUMI, W., SBISSI, I., CHERNI, S., CHELBI, I., DURVASULA, R. A KOL. (2017). An integrated overview of the midgut bacterial flora composition of *Phlebotomus perniciosus*, a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in the Western Mediterranean Basin. *PLoS neglected tropical diseases*, **11**(3), e0005484.
- FRANCO, A. M. R., TESH, R. B., GUZMAN, H., DEANE, M. P. a GRIMALDI JR, G. (1997). Development of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in experimentally infected phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*, **34**(2), 189–192.
- GARCIA-QUINTANILLA, M., DICHTER, A. A., GUERRA, H. a KEMPF, V. A. (2019). Carrion's disease: more than a neglected disease. *Parasites & vectors*, **12**(1), 1–12.
- GOUVEIA, C., ASENSI, M. D., ZAHNER, V., RANGEL, E. F. a DE OLIVEIRA, S. M. (2008). Study on the bacterial midgut microbiota associated to different Brazilian po-

- pulations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva)(Diptera: Psychodidae). *Neotropical entomology*, **37**, 597–601.
- GROGAN, C., BENNETT, M., MOORE, S. a LAMPE, D. (2021). Novel *Asaia bogorensis* signal sequences for *Plasmodium* inhibition in *Anopheles stephensi*. *Frontiers in microbiology*, **12**, 633667.
- HUGHES, G. L., DODSON, B. L., JOHNSON, R. M., MURDOCK, C. C., TSUJIMOTO, H., SUZUKI, Y., PATT, A. A., CUI, L., NOSSA, C. W., BARRY, R. M., SAKAMOTO, J. M., HORNETT, E. A. a RASGON, J. L. (2014). Native microbiome impedes vertical transmission of *Wolbachia* in *Anopheles* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**(34), 12498–12503.
- HURWITZ, I., FIECK, A., READ, A., HILLESLAND, H., KLEIN, N., KANG, A. a DURVASULA, R. (2011). Paratransgenic control of vector borne diseases. *International Journal of Biological Sciences*, **7**(9), 1334.
- JANCAROVA, M., HLAVACOVA, J. a VOLF, P. (2015). The development of *Leishmania tropica* in sand flies (Diptera: Psychodidae): a comparison of colonies differing in geographical origin and a gregarine coinfection. *Journal of medical entomology*, **52**(6), 1378–1380.
- JIRKU, M., YURCHENKO, V. Y., LUKEŠ, J. a MASLOV, D. A. (2012). New Species of Insect Trypanosomatids from Costa Rica and the Proposal for a New Subfamily within the *Trypanosomatidae*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **59**(6), 537–547.
- KAMHAWI, S. (2006). *Phlebotomine* sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in parasitology*, **22**(9), 439–445.
- KARIMIAN, F., KOOSHA, M., CHOUBDAR, N. a OSHAGHI, M. A. (2022). Comparative analysis of the gut microbiota of sand fly vectors of zoonotic visceral leishmaniasis (ZVL) in Iran; host-environment interplay shapes diversity. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **16**(7), e0010609.
- KATSURA, K., KAWASAKI, H., POTACHAROEN, W., SAONO, S., SEKI, T., YAMADA, Y., UCHIMURA, T. a KOMAGATA, K. (2001). *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **51**(2), 559–563.
- KELLY, P. H., BAHR, S. M., SERAFIM, T. D., AJAMI, N. J., PETROSINO, J. F., MENESES, C., KIRBY, J. R., VALENZUELA, J. G., KAMHAWI, S. a WILSON, M. E. (2017). The gut microbiome of the vector *Lutzomyia longipalpis* is essential for survival of *Leishmania infantum*. *MBio*, **8**(1), e01121–16.

- KERSTERS, K., LISDIYANTI, P., KOMAGATA, K. a SWINGS, J. (2006). The family acetobacteraceae: the genera acetobacter, acidomonas, asaia, gluconacetobacter, gluconobacter, and kozakia. *The prokaryotes*, **5**, 163–200.
- KILLICK-KENDRICK, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in dermatology*, **17**(3), 279–289.
- KOMMANEE, J., TANASUPAWAT, S., YUKPHAN, P., MALIMAS, T., MURAMATSU, Y., NAKAGAWA, Y. a YAMADA, Y. (2010). *Asaia spathodeae* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of general and applied microbiology*, **56**(1), 81–87.
- KWON, W. J., LI, G., ZHENG, M., KAUR, H., MAGBUAL, N. a DALAI, S. (2020). Superinfections and coinfections in COVID-19—separating the signal from the noise. *Medpage Today April*, **28**.
- LANE, R. P. (1993). Sandflies (*Phlebotominae*). In *Medical Insects and Arachnids*, pages 78–119. Springer.
- LEHANE, M. (1991). Ingestion of the blood meal. In *Biology of Blood-Sucking Insects*, pages 52–78. Springer.
- LEWIS, D. (1975). Functional morphology of the mouth parts in new world phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, **126**(Pt 4), 497–532.
- LOURADOUR, I., MONTEIRO, C. C., INBAR, E., GHOSH, K., MERKHOFFER, R., LAWYER, P., PAUN, A., SMELKINSON, M., SECUNDINO, N., LEWIS, M. a KOL. (2017). The midgut microbiota plays an essential role in sand fly vector competence for *Leishmania major*. *Cellular microbiology*, **19**(10), e12755.
- MAIA, C. a DEPAQUIT, J. (2016). Can *Sergentomyia* (Diptera: Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? *Parasite*, **23**.
- MALIMAS, T., YUKPHAN, P., TAKAHASHI, M., KANEYASU, M., POTACHAROEN, W., TANASUPAWAT, S., NAKAGAWA, Y., TANTICHAROEN, M. a YAMADA, Y. (2008). *Asaia lannaensis* sp. nov., a new acetic acid bacterium in the Alphaproteobacteria. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **72**(3), 666–671.
- MANCINI, M. V., DAMIANI, C., SHORT, S. M., CAPPELLI, A., ULISSI, U., CAPONE, A., SERRAO, A., ROSSI, P., AMICI, A., KALOGRI, C. a KOL. (2020). Inhibition of *Asaia* in adult mosquitoes causes male-specific mortality and diverse transcriptome changes. *Pathogens*, **9**(5), 380.

- MAROLI, M., CIUFOLINI, M. a VERANI, P. (1993). Vertical transmission of Toscana virus in the sandfly, *Phlebotomus perniciosus*, via the second gonotrophic cycle. *Medical and veterinary entomology*, **7**(3), 283–286.
- MAROLI, M., FELICIANGELI, M., BICHAUD, L., CHARREL, R. a 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.
- MARZORATI, M., ALMA, A., SACCHI, L., PAJORO, M., PALERMO, S., BRUSETTI, L., RADDADI, N., BALLOI, A., TEDESCHI, R., CLEMENTI, E. a KOL. (2006). A novel Bacteroidetes symbiont is localized in *Scaphoideus titanus*, the insect vector of flavescence dorée in *Vitis vinifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(2), 1467–1475.
- MATALON, Y., KATZIR, N., GOTTLIEB, Y., PORTNOY, V. a ZCHORI-FEIN, E. (2007). *Cardinium* in *Plagiomerus diaspidis* (hymenoptera: Encyrtidae). *Journal of invertebrate pathology*, **96**(2), 106–108.
- MCCARTHY, C. B., DIAMBRA, L. A. a RIVERA POMAR, R. V. (2011). Metagenomic analysis of taxa associated with *Lutzomyia longipalpis*, vector of visceral leishmaniasis, using an unbiased high-throughput approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **5**(9), e1304.
- MITRAKA, E., STATHOPOULOS, S., SIDEN-KIAMOS, I., CHRISTOPHIDES, G. K. a LOUIS, C. (2013). Asaia accelerates larval development of *Anopheles gambiae*. *Pathogens and global health*, **107**(6), 305–311.
- MOLL, R. M., ROMOSER, W. S., MODRAKOWSKI, M. C., MONCAYO, A. C. a LERDT-HUSNEE, K. (2001). Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis. *Journal of medical entomology*, **38**(1), 29–32.
- MONTEIRO, C. C., VILLEGAS, L. E. M., CAMPOLINA, T. B., PIRES, A. C. M. A., MIRANDA, J. C., PIMENTA, P. F. P. a SECUNDINO, N. F. C. (2016). Bacterial diversity of the American sand fly *Lutzomyia intermedia* using high-throughput metagenomic sequencing. *Parasites & vectors*, **9**(1), 1–6.
- MORAES, C. S., SEABRA, S. H., CASTRO, D. P., BRAZIL, R. P., DE SOUZA, W., GARCIA, E. S. a AZAMBUJA, P. (2008). *Leishmania (Leishmania) chagasi* interactions with *Serratia marcescens*: ultrastructural studies, lysis and carbohydrate effects. *Experimental parasitology*, **118**(4), 561–568.
- MOREIRA, L. A., ITURBE-ORMAETXE, I., JEFFERY, J. A., LU, G., PYKE, A. T., HEDGES, L. M., ROCHA, B. C., HALL-MENDELIN, S., DAY, A., RIEGLER, M. a KOL.

- (2009). A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell*, **139**(7), 1268–1278.
- MORICONI, M., RUGNA, G., CALZOLARI, M., BELLINI, R., ALBIERI, A., ANGELINI, P., CAGARELLI, R., LANDINI, M. P., CHARREL, R. N. a VARANI, S. (2017). Phlebotomine sand fly–borne pathogens in the Mediterranean Basin: Human leishmaniasis and phlebovirus infections. *PLoS neglected tropical diseases*, **11**(8), e0005660.
- MUKHOPADHYAY, J., BRAIG, H. R., ROWTON, E. D. a GHOSH, K. (2012). Naturally occurring culturable aerobic gut flora of adult *Phlebotomus papatasi*, vector of *Leishmania major* in the Old World. *PloS one*, **7**(5), e35748.
- MYSKOVA, J., VOTYPKA, J. a VOLF, P. (2008). *Leishmania* in sand flies: comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. *Journal of medical entomology*, **45**(1), 133–138.
- ÖZBEL, Y., OĞUZ, G., ARSERIM, S., ERIŞÖZ KASAP, Ö., KARAOĞLU, B., YILMAZ, A., EMANET, N., GÜNAY, F., HACIOĞLU, S., DEMİROK, M. a KOL. (2020). The initial detection of Toscana virus in phlebotomine sandflies from Turkey. *Medical and Veterinary Entomology*, **34**(4), 402–410.
- PAIS, R., LOHS, C., WU, Y., WANG, J. a AKSOY, S. (2008). The obligate mutualist *Wigglesworthia* glossinidia influences reproduction, digestion, and immunity processes of its host, the tsetse fly. *Applied and environmental microbiology*, **74**(19), 5965–5974.
- PETERKOVA-KOCI, K., ROBLES-MURGUIA, M., RAMALHO-ORTIGAO, M. a ZUREK, L. (2012). Significance of bacteria in oviposition and larval development of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasites & Vectors*, **5**(1), 1–8.
- POINAR, G. O. a THOMAS, G. M. (1984). Bacteria. In *Laboratory guide to insect pathogens and parasites*, pages 79–103. Springer.
- PRUZINOVA, K., SADLOVA, J., SEBLOVA, V., HOMOLA, M., VOTYPKA, J. a VOLF, P. (2015). Comparison of bloodmeal digestion and the peritrophic matrix in four sand fly species differing in susceptibility to *Leishmania donovani*. *PLoS One*, **10**(6), e0128203.
- PUMPUNI, C. B., DEMAIO, J., KENT, M., DAVIS, J. R. a BEIER, J. C. (1996). Bacterial population dynamics in three anopheline species: the impact on *Plasmodium* sporogonic development. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **54**(2), 214–218.
- RAMALHO-ORTIGÃO, J., KAMHAWI, S., JOSHI, M., REYNOSO, D., LAWYER, P., DWYER, D., SACKS, D. a VALENZUELA, J. (2005). Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Insect molecular biology*, **14**(6), 703–712.

- RAMI, A., RAZ, A., ZAKERI, S. a DINPARAST DJADID, N. (2018). Isolation and identification of *Asaia* sp. in *Anopheles* spp. mosquitoes collected from iranian malaria settings: steps toward applying paratransgenic tools against malaria. *Parasites & vectors*, **11**(1), 1–8.
- RIBEIRO, J., KATZ, O., PANNELL, L. K., WAITUMBI, J. a WARBURG, A. (1999). Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5-amp. *Journal of Experimental Biology*, **202**(11), 1551–1559.
- RICCI, I., DAMIANI, C., CAPONE, A., DEFREECE, C., ROSSI, P. a FAVIA, G. (2012). Mosquito/microbiota interactions: from complex relationships to biotechnological perspectives. *Current opinion in microbiology*, **15**(3), 278–284.
- ROBINSON, C. J., SCHLOSS, P., RAMOS, Y., RAFFA, K. a HANDELSMAN, J. (2010). Robustness of the bacterial community in the cabbage white butterfly larval midgut. *Microbial ecology*, **59**(2), 199–211.
- ROGERS, M. E., CHANCE, M. a BATES, P. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, **124**(5), 495–507.
- ROGERS, M. E., ILG, T., NIKOLAEV, A. V., FERGUSON, M. A. a BATES, P. A. (2004). Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fppg. *Nature*, **430**(6998), 463–467.
- ROGERS, M. E., HAJMOVÁ, M., JOSHI, M. B., SÁDLOVÁ, J., DWYER, D. M., VOLF, P. a BATES, P. A. (2008). *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cellular microbiology*, **10**(6), 1363–1372.
- ROSSI, P., RICCI, I., CAPPELLI, A., DAMIANI, C., ULISSI, U., MANCINI, M. V., VALZANO, M., CAPONE, A., EPIS, S., CROTTI, E. a KOL. (2015). Mutual exclusion of *Asaia* and *Wolbachia* in the reproductive organs of mosquito vectors. *Parasites & vectors*, **8**(1), 1–10.
- SÁDLOVÁ, J., PRICE, H., VOTÝPKA, J., VOLF, P. a SMITH, D. (2010). The stage-regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*. *Cell Microbiol*, **12**, 1765–79.
- SÁDLOVÁ, J. a VOLF, P. (2009). Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. *Cell and tissue research*, **337**(2), 313–325.

- SADLOVA, J., DVORAK, V., SEBLOVA, V., WARBURG, A., VOTYPKA, J. a VOLF, P. (2013). *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to humans. *Parasites & Vectors*, **6**(1), 1–10.
- SADLOVA, J., HOMOLA, M., MYSKOVA, J., JANCAROVA, M. a VOLF, P. (2018). Refractoriness of *Sergentomyia schwetzi* to *Leishmania* spp. is mediated by the peritrophic matrix. *PLoS neglected tropical diseases*, **12**(4), e0006382.
- SAMADDAR, N., PAUL, A., CHAKRAVORTY, S., CHAKRABORTY, W., MUKHERJEE, J., CHOWDHURI, D. a GACHHUI, R. (2011). Nitrogen fixation in *Asaia* sp.(family Acetobacteraceae). *Current microbiology*, **63**(2), 226–231.
- SANT’ANNA, M. R., DIAZ-ALBITER, H., AGUIAR-MARTINS, K., AL SALEM, W. S., CAVALCANTE, R. R., DILLON, V. M., BATES, P. A., GENTA, F. A. a DILLON, R. J. (2014). Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. *Parasites & vectors*, **7**(1), 1–10.
- SARAIVA, R. G., KANG, S., SIMOES, M. L., ANGLERO-RODRIGUEZ, Y. I. a DIMOPOULOS, G. (2016). Mosquito gut antiparasitic and antiviral immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, **64**, 53–64.
- SCHLEIN, Y., JACOBSON, R. L. a SHLOMAI, J. (1991). Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **245**(1313), 121–126.
- SEBASTIÁN-DOMINGO, J. J. a SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, C. (2018). From the intestinal flora to the microbiome. *Rev. esp. enferm. dig.*, (ART-2018-104369).
- SEKSE, C., BOHLIN, J., SKJERVE, E. a VEGARUD, G. E. (2012). Growth comparison of several *Escherichia coli* strains exposed to various concentrations of lactoferrin using linear spline regression. *Microbial informatics and experimentation*, **2**(1), 1–12.
- SHANE, J. L., GROGAN, C. L., CWALINA, C. a LAMPE, D. J. (2018). Blood meal-induced inhibition of vector-borne disease by transgenic microbiota. *Nature communications*, **9**(1), 1–10.
- SHAW, J. (1992). *Endotrypanum*, a unique intraerythrocytic flagellate of New World tree sloths. an evolutionary link or an evolutionary backwater? *Ciência e Cultura*, **44**, 107–107.
- SNYDER, R. W., RUHE, J., KOBRIN, S., WASSERSTEIN, A., DOLINE, C., NACHAMKIN, I. a LIPSCHUTZ, J. H. (2004). *Asaia bogorensis* peritonitis identified by 16s ribosomal RNA sequence analysis in a patient receiving peritoneal dialysis. *American Journal of Kidney Diseases*, **44**(2), e15–e17.

- STECHER, B. a HARDT, W.-D. (2011). Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Current opinion in microbiology*, **14**(1), 82–91.
- SUZUKI, R., ZHANG, Y., IINO, T., KOSAKO, Y., KOMAGATA, K. a UCHIMURA, T. (2010). *Asaia astilbes* sp. nov., *Asaia platycodi* sp. nov., and *Asaia prunellae* sp. nov., novel acetic acid bacteria isolated from flowers in Japan. *The Journal of general and applied microbiology*, **56**(4), 339–346.
- SZKLARZEWICZ, T. a MICHALIK, A. (2017). Transovarial transmission of symbionts in insects. *Oocytes*, pages 43–67.
- TABBABI, A., MIZUSHIMA, D., YAMAMOTO, D. S. a KATO, H. (2022). Sand Flies and Their Microbiota. *Parasitologia*, **2**(2), 71–87.
- TANG, Y. a WARD, R. D. (1998). Sugar feeding and fluid destination control in the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Medical and veterinary entomology*, **12**(1), 13–19.
- TELLERIA, E. L., MARTINS-DA SILVA, A., TEMPONE, A. J. a TRAUB-CSEKÖ, Y. M. (2018). Leishmania, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology*, **145**(10), 1336–1353.
- TORRES-GUERRERO, E., QUINTANILLA-CEDILLO, M. R., RUIZ-ESMENJAUD, J. a ARENAS, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, **6**.
- VIVERO, R. J., RESTREPO, G. E. C., HERRERA, C. X. M., OSPINA, V., URIBE, S. I., ROBLEDO, S. M. a KOL. (2016). Antagonistic effect of bacteria isolated from the digestive tract of *Lutzomyia evansi* against promastigotes of *Leishmania infantum*, antimicrobial activities and susceptibility to antibiotics. *Advances in Microbiology*, **6**(10), 760.
- VIVERO, R. J., MESA, G. B., ROBLEDO, S. M., HERRERA, C. X. M. a CADAVID-RESTREPO, G. (2019a). Enzymatic, antimicrobial, and leishmanicidal bioactivity of gram-negative bacteria strains from the midgut of *Lutzomyia evansi*, an insect vector of leishmaniasis in Colombia. *Biotechnology Reports*, **24**, e00379.
- VIVERO, R. J., VILLEGAS-PLAZAS, M., CADAVID-RESTREPO, G. E., HERRERA, C. X. M., URIBE, S. I. a JUNCA, H. (2019b). Wild specimens of sand fly phlebotomine *Lutzomyia evansi*, vector of leishmaniasis, show high abundance of *Methylobacterium* and natural carriage of *Wolbachia* and *Cardinium* types in the midgut microbiome. *Scientific reports*, **9**(1), 1–12.
- VOLF, P. a VOLFOVA, V. (2011). Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology*, **36**, S1–S9.

- VOLF, P., OZBEL, Y., AKKAFA, F., SVOBODOVA, M., VOTÝPKA, J. a CHANG, K. (2002a). Sand flies (Diptera: Phlebotominae) in Sanliurfa, Turkey: relationship of *Phlebotomus sergenti* with the epidemic of anthroponotic cutaneous leishmaniasis. *Journal of medical entomology*, **39**(1), 12–15.
- VOLF, P., HAJMOVA, M., SADLOVA, J. a VOTÝPKA, J. (2004). Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International journal for parasitology*, **34**(11), 1221–1227.
- VOLF, P., KIEWEGOVÁ, A., NEMEC, A. a KOL. (2002b). Bacterial colonisation in the gut of *Phlebotomus duboscqi* (diptera: Psychodidae): transtadial passage and the role of female diet. *Folia Parasitologica*, **49**(1), 73–77.
- VOTÝPKA, J., LANTOVA, L., GHOSH, K., BRAIG, H. a VOLF, P. (2009). Molecular characterization of gregarines from sand flies (Diptera: Psychodidae) and description of *Psychodiella* ng (Apicomplexa: Gregarinida). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **56**(6), 583–588.
- WHIPPS, J. M., LEWIS, K. a COOKE, R. (1988). Mycoparasitism and plant disease control.
- WILSON, R., BATES, M. D., DOSTALOVA, A., JECNA, L., DILLON, R. J., VOLF, P. a BATES, P. A. (2010). Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay. *PLoS neglected tropical diseases*, **4**(9), e816.
- YAMADA, Y., KATSURA, K., KAWASAKI, H., WIDYASTUTI, Y., SAONO, S., SEKI, T., UCHIMURA, T. a KOMAGATA, K. (2000). *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **50**(2), 823–829.
- YUKPHAN, P., POTACHAROEN, W., TANASUPAWAT, S., TANTICHAROEN, M. a YAMADA, Y. (2004). *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **54**(2), 313–316.

Seznam obrázků

2.1	Schématické znázornění určení infekční dávky bakterií <i>Asaia</i> sp. pomocí měření optické denzity a počítání kolonií z agarových ploten.	18
2.2	Porovnání samic <i>Phlebotomus duboscqi</i> po podání infikovaného nabarveného cukru. (A) – nenasátá samice, (B) – nasátá samice.	19
2.3	Schématické znázornění experimentální infekce <i>Ph. duboscqi</i> bakterií <i>Asaia</i> sp., DPI –day post infection, DPB –day post blood-meal	20
2.4	Schématické znázornění cyklů PCR programu.	22
2.5	Schéma transovariálního pokusu.	23
2.6	Sklenička na separaci samic flebotomů.	23
2.7	Rozdělení <i>Asaia</i> sp. pozitivních snůšek samic <i>Ph. duboscqi</i> do čtyř experimentálních skupin.	24
2.8	Sání jednotlivých skupin flebotomů napojených na vodní cirkulaci A-kontrolní skupina, B- <i>Asaia siamensis</i> pozitivní skupina, B- <i>Asaia krungthepensis</i> pozitivní skupina.	26
3.1	Časový vývoj optické denzity (OD ₆₀₀) bakterií <i>A. siamensis</i> a <i>A. krungthepensis</i> v tekutém médiu, OD ₆₀₀ –optická denzita vzorků měřená při vlnové délce 600 nm	29
3.2	Množení bakterií <i>A. siamensis</i> a <i>A. krungthepensis</i> v tekutém médiu, CFU –Colony Forming Units	29
3.3	Výsledky experimentálních infekcí <i>A. krungthepensis</i> a <i>A. siamensis</i> ve střevch samic <i>Ph. duboscqi</i> ; DPI –day post infection, DPB –day post blood-meal	31
3.4	Procentuální zastoupení pozitivních samic <i>Ph. duboscqi</i> a snůšek na bakterie <i>A. krungthepensis</i> a <i>A. siamensis</i> . DPB –day post blood-meal	33
3.5	Procentuální zastoupení pozitivních larválních instarů a dospělců <i>Ph. duboscqi</i> z další generace na bakterie <i>A. krungthepensis</i> a <i>A. siamensis</i> . pozn.: horní hranici grafu tvoří 50 % vzorků. L –larvální stádium, nedef –nedefekované, def –defekované	35
3.6	Detekce <i>Asaia</i> sp. u <i>Ph. duboscqi</i> . (1) neumyté nehomogenizované, (2) umyté homogenizované, (3) neumyté homogenizované, (4) umyté nehomogenizované, (5) pozitivní kontrola, (6) negativní kontrola. Autor: Stejskalová . . .	36
3.7	Intenzita infekce <i>L. major</i> u skupin samic <i>Ph. duboscqi</i> se superinfekcí s <i>A. siamensis</i> a <i>A. krungthepensis</i> a bez infekce <i>Asaia</i> sp. druhý, pátý a osmý den po podání krve. Počty nad sloupci značí počty vypitvaných střev. DPB –day post blood-meal.	37

3.8	Kolonizovaná stomodeální valva flebotoma <i>P. duboscqi</i> leishmanií <i>L. major</i> , A - vole, B - přední část thoraxu C - kolonizovaná stomodeální valva, 400x zvětšení (světelný mikroskop Olympus CX31), Autor: Stejskalová	38
3.9	Lokalizace infekce <i>L. major</i> u skupin samic <i>Ph. duboscqi</i> se superinfekcí s <i>A. siamensis</i> a <i>A. krungthepensis</i> a bez infekce <i>Asaia</i> sp., nad sloupci jsou uvedeny počty vypitvaných střev. EP –endoperitrofický prostor, AMG – abdominální mesenteron, TMG –thorakální mesenteron, SV –stomodeální valva	40
3.10	Morfologické formy <i>Leishmania major</i> . A –Krátký promastigot, B –Metacyklický promastigot, C –Dlouhá nektomonáda; barvení Giemsa a zvětšení 1000× (světelný mikroskop Olympus BX51). Autor: Stejskalová . .	41

Seznam tabulek

1.1	Zastoupení druhů <i>Asaia</i> sp.	9
2.1	Použité primery.	21
2.2	Kategorie intenzity infekce.	26
2.3	Morfologické formy leishmanií.	27
3.1	Počet pozitivních samic <i>Ph. duboscqi</i> na <i>A. krungthepensis</i> . DPI –day post infection, DPB –day post blood-meal	30
3.2	Počet pozitivních samic <i>Ph. duboscqi</i> na <i>A. siamensis</i> . DPI –day post infection, DPB –day post blood-meal	31
3.3	Počet pozitivních i negativních samic a snůšek <i>Ph. duboscqi</i> na <i>A. krungthepensis</i> . DPB –day post blood-meal	32
3.4	Počet pozitivních i negativních samic a snůšek <i>Ph. duboscqi</i> na <i>A. siamensis</i> . DPB –day post blood-meal	32
3.5	Počet pozitivních a negativních larválních instarů a dospělců <i>Ph. duboscqi</i> z další generace na bakterie na <i>A. krungthepensis</i> a <i>A. siamensis</i> při odebrání mrtvých samic. L –larvální stádium, nedef –nedefekované, def –defekované	33
3.6	Počet pozitivních a negativních larválních instarů a dospělců <i>Ph. duboscqi</i> z další generace na bakterie <i>A. krungthepensis</i> a <i>A. siamensis</i> při ponechání mrtvých samic. L –larvální stádium, nedef –nedefekované, def –defekované	34
3.7	Počet pozitivních a negativních larválních instarů a dospělců <i>Ph. duboscqi</i> z další generace na bakterie <i>A. siamensis</i> při ponechání mrtvých samic. L –larvální stádium, nedef –nedefekované, def –defekované	34
3.8	Absolutní hodnoty intenzity infekce <i>L. major</i> u skupin samic <i>Ph. duboscqi</i> se superinfekcí s <i>A. siamensis</i> a <i>A. krungthepensis</i> a bez infekce <i>Asaia</i> sp. druhý, pátý a osmý den po podání krve. DPB –day post blood-meal	37
3.9	Absolutní hodnoty lokalizace infekce <i>L. major</i> u skupin samic <i>Ph. duboscqi</i> se superinfekcí s <i>A. siamensis</i> a <i>A. krungthepensis</i> a bez infekce <i>Asaia</i> sp. EP –endoperitrofický prostor, AMG –abdominální mesenteron, TMG –thorakální mesenteron, SV –stomodeální valva, DPB –day post blood-meal	39
3.10	Absolutní hodnoty v zastoupení morfologických forem <i>L. major</i> u skupin se superinfekcí s <i>A. krungthepensis</i> a <i>A. siamensis</i> a bez superinfekce u flebotomů <i>Ph. duboscqi</i> pátý a osmý den po podání krve. DPB - day post blood-meal	42
3.11	Počet pozitivních i negativních samic na <i>A. krungthepensis</i> a <i>A. siamensis</i> při superinfekci s <i>L. major</i> . DPB - day post blood-meal	42