

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra parazitologie



Metody chemického a biologického boje s flebotomy

Chemical and biological control of phlebotominae sand flies

Bakalářská práce

Kateřina Pružinová

Školitel: Prof. RNDr. Petr Volf, CSc.

2010

Na tomto místě bych především chtěla poděkovat panu profesorovi Petru Volfovi za trpělivost, pomoc a cenné rady při psaní této práce. Mé poděkování patří také celému kolektivu naší laboratoře za velmi přátelský přístup. Děkuji Lucce Ječné a Veronice Šeblové za pomoc při mých prvních zkušenostech s prací v laboratoři. Velmi děkuji také mamince a příteli Jirkovi, kteří mě při studii podporují.

Obsah

1	Abstrakt	4
2	Úvod	5
3	Chemický boj	7
3.1	Impregnované psí obojky a „spot-on“ aplikace insekticidů.....	7
3.2	Insekticidní postřiky domů a přístřešků domácích zvířat	9
3.3	Insekticidní postřiky v terénu.....	10
3.4	Individuální ochrana	12
3.5	Vnímavost flebotomů k insekticidům	13
3.6	Kontrola larev prostřednictvím hlodavců krmených insekticidem	14
4	Biologický boj	15
4.1	<i>Bacillus sphaericus</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
4.2	<i>Beauveria bassiana</i>	17
4.3	„Trypsin modulating oostatic factor“ (TMOF).....	19
4.3.1	Syntéza, sekrece a struktura TMOF	19
4.3.2	Metabolismus a mechanismus působení na larvy a dospělé komárů	20
4.3.3	Efekt TMOF na jiné druhy hmyzu	22
4.3.4	Využití TMOF v biologickém boj	23
4.4	Další možnosti biologického boje	24
5	Závěr	26
6	Seznam použité literatury	27

1 Abstrakt

Flebotomové (Diptera: Phlebotominae) jsou důležití z hlediska humánní i veterinární medicíny jako přenašeči nemocí, zejména leishmaniózy. Boj s flebotomy ztěžuje skutečnost, že jejich líhniště a odpočívací místa jsou často neznámá nebo obtížně přístupná. Chemický způsob kontroly flebotomů zahrnuje zejména užívání insekticidů k impregnování sítí, moskytiér nebo závěsů, reziduální postřiky domů, případně bariérové postřiky. U psů, kteří jsou rezervoárovými zvířaty viscerální leishmaniózy, se užívají insekticidní obojky nebo aplikace insekticidu formou „spot on“. Chemické látky mohou být ale toxické pro necílové organismy a zároveň je u populací flebotomů možný vznik rezistence. Proto je nutné testovat nové metody, například využití entomopatogenních mikroorganismů (*Bacillus sphaericus*, *B. thuringiensis*, *Beauveria bassiana*), feromonových pastí nebo toxických rostlin. U komárů je úspěšně testován hormon TMOF, inhibitor biosyntézy trypsinu. Na základě podobnosti flebotomů a komárů testujeme účinek tohoto peptidu na trávení krve a vývoj vajec i u zástupců rodů *Phlebotomus* a *Lutzomyia*.

Klíčová slova: *Phlebotomus*, *Lutzomyia*, chemický boj, insekticidy, biologický boj, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*

Abstract

Phlebotominae sand flies (Diptera: Phlebotominae) are important vectors of leishmaniasis. Control measures are complicated by the fact that sand fly breeding sites and resting places are generally hard to find. Measures used to control adult sand flies include the use of chemical insecticides for insecticide-treated bednets or curtains, residual spraying of dwellings, eventually the space-spraying. Domestic dogs as reservoir host of visceral leishmaniasis can be protected by dog-collars impregnated with insecticides or by spot on application of insecticides. Chemical insecticides may be toxic for non-target organisms and the increase of insecticide-resistance of some sand flies populations is possible. Therefore, new methods of biological control should be tested; entomopathogenic organisms (*Bacillus sphaericus*, *B. thuringiensis*, *Beauveria bassiana*), pheromone-baited traps and noxious plants could be used. Hormone TMOF, inhibitor of trypsin biosynthesis, was successfully tested in mosquitos. Based on similarity of mosquitos and sand flies, the effect of this peptide on blood digestion and egg development is tested in *Phlebotomus* and *Lutzomyia* species.

Key words: *Phlebotomus*, *Lutzomyia*, chemical control, insecticides, biological control, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*

2 Úvod

Flebotomové (řád Diptera, čeleď Psychodidae, podčeleď Phlebotominae) patří mezi dvoukřídle krevsající hmyz, jehož velikost zřídka přesahuje 3 mm. Vyskytují se na rozmanitých biotopech tropů a subtropů především Asie, Afriky a Střední a Jižní Ameriky. Některé druhy mohou být rozšířeny i v mírném pásu, například v jižní Evropě. Nenalezneme je však na Novém Zélandě a Tichomořských ostrovech.

Flebotomové jsou aktivní ve večerních a nočních hodinách, ačkoli několik druhů vykazuje denní aktivitu. Obě pohlaví se živí sáním cukerných šťáv, samičky jsou zároveň ektoparazitě, pro které je krev obratlovců zdrojem energie pro tvorbu vajíček. Samičky většiny druhů jsou exofágní a exofilní (sají i odpočívají mimo lidská obydlí), ale existují i endofilní druhy.

Přibližně 70 druhů flebotomů ze 700 popsaných je důležitých z hlediska přenosu infekčních onemocnění na člověka. Radíme je do dvou rodů: *Phlebotomus* vyskytující se ve Starém Světě a *Lutzomyia* žijící v Novém Světě. Jedinci rodu *Sergentomyia*, kteří sají převážně na plazech, mohou v ojedinělých případech pobodat i člověka. Není ale prokázáno, že by byli schopni přenášet lidské infekce.

Flebotomové jsou známí především jako přenašeči prvoků rodu *Leishmania*, kteří způsobují leishmaniózu, onemocnění, které ohrožuje obyvatelstvo ve 22 zemích Nového světa a v 66 státech Starého světa (<http://apps.who.int/tdr/svc/disease/leishmaniasis>). Může být ve formě kutánní (kožní), muko-kutánní (kožně-slizniční) nebo viscerální (útrobní). Lidské leishmaniózy jsou převážně zoonózy, výjimečně antroponózy. V případě neléčení může mít viscerální forma vážné až smrtelné následky, u kožních vředů je riziko sekundárních infekcí. Leishmanióza je Světovou zdravotnickou organizací řazena mezi sedm nejvýznamnějších parazitárních onemocnění. Flebotomové mohou ale přenášet také různá bakteriální a virová onemocnění, například bartonelózu, jejímž původcem je bakterie *Bartonella bacilliformis*, nebo horečku papatači, kterou způsobuje virus ze skupiny flebovirů (čeleď Bunyviridae).

Flebotomové se v přírodě obtížně studují, jsou malí a odpočívací místa dospělců nebo líhniště larev jsou těžko k nalezení a špatně přístupná. Boj s leishmaniózou a jejím hmyzím přenašečem je tedy velmi obtížný ale nezbytný. Dřívější pokusy zaměřené na rezervoárová zvířata, například zabíjení infikovaných psů jakožto rezervoáru viscerální leishmaniózy, se ukázaly jako velmi nepopulární a málo efektivní strategie. Dnešní programy na kontrolu leishmaniózy zahrnují především různé insekticidní zákroky proti dospělcům flebotomů.

Užívání chemických insekticidů je nezbytné, přestože se stále více úsilí vynakládá i na vývoj nových biologických metod, které nebudou zatěžovat životní prostředí a necílové organismy.

Ve své bakalářské práci bych chtěla shrnout dosavadní znalosti o možnostech chemického a biologického boje s flebotomy. Zvláštní pozornost věnuji hmyzímu hormonu, jehož účinek experimentálně studuji. Je možné, že „Trypsin modulating oostatic factor“, který inhibuje biosyntézu trypsinu u komárů, by mohl být případně využit i v biologickém boji s flebotomy.

3 Chemický boj

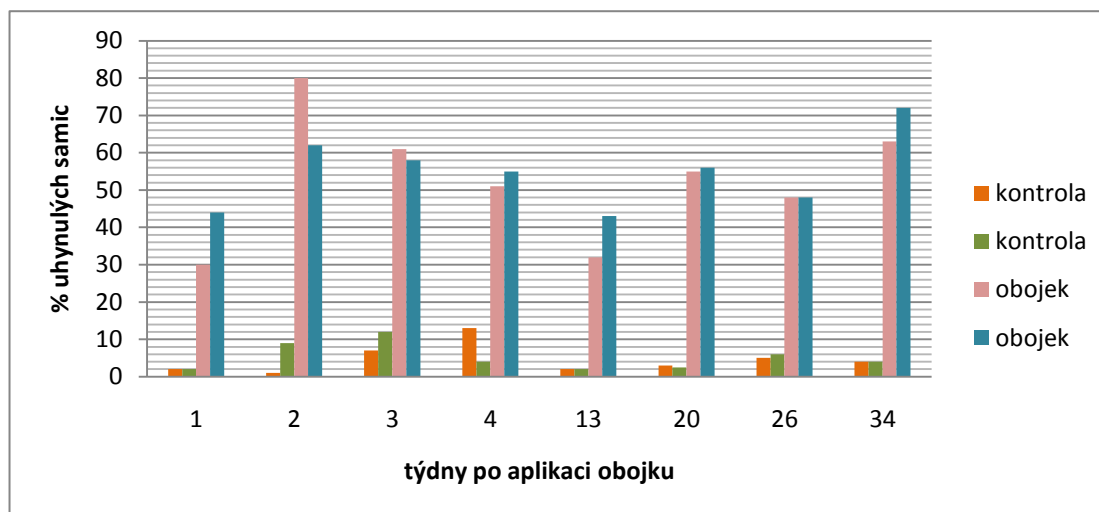
Krevsající členovci přenášejí řadu infekčních onemocnění, která postihují lidi i hospodářská zvířata. Chemický boj s přenašeči je nejlevnější a nejefektivnější cestou, jak tato onemocnění omezit a eradikovat. Z toho důvodu je i v dnešní době, kdy se upřednostňují v boji se škůdci metody biologické, chemický boj stále nezbytný. V následujících kapitolách uvádím přehled možností a metod, jak lze chemické látky, zejména syntetické pyretroidy, případně organofosfáty nebo DDT (Dichlorodifenyltrichloroetan), využít v boji s flebotomy a tedy přenosem leishmaniózy. Pyretroidy nemají velký toxický vliv na savce, naproti tomu mohou významně poškozovat např. plankton v řekách a jezerech. DDT může negativně působit na necílové organismy a prostředí tím, že se hromadí v potravních řetězcích.

3.1 Insekticidní psí obojky a „spot-on“ aplikace insekticidů

Psí leishmanióza způsobena infekcí *Leishmania infantum* je velmi rozšířena a způsobuje problémy v zemích Mediteránu a v mnoha státech Jižní Ameriky. Hlavním zvířecím rezervoárem této viscerální leishmaniózy jsou domácí a toulaví psi.

V posledních letech se vynakládá značné úsilí na výzkum psí očkovací látky (Borja-Cabrera a kol. 2002, Saraiva a kol. 2006), ale jiná možnost, a to jednodušší a levnější, je ochrana psů pomocí obojků impregnovaných pyretroidy. Ty by měly zamezit pobodání od flebotomů a tedy přenosu leishmaniózy mezi psími rezervoáry a člověkem.

Killick-Kendrick a kol. (1997) demonstrovali účinnost insekticidních obojků na laboratorních psech. Použili 20 g vážící plastové obojky z PVC impregnované pyretroidem deltamethrinem v koncentraci 40 mg/g a během 34 týdnů po aplikaci zjišťovali protektivní účinek a mortalitu *Phlebotomus perniciosus* po dvouhodinové expozici. Zjistili, že obojky chránily psy před pobodáním z 96 %, a 21-60 % flebotomů uhynulo po kontaktu s ošetřenými psy. Naproti tomu u kontrolních psů bylo po dvou hodinách nalezeno pouze 0-12 % mrtvých flebotomů. Podrobnější výsledky ohledně další úmrtnosti uvádím v Obr 1. Ochranný efekt byl pozorován nejméně 34 týdnů od druhého týdne po aplikaci obojků. První týden po aplikaci je ochrana nedostatečná; k účinnému rozšíření lipofilního pyretroidu z obojku po srsti a kůži psa je zapotřebí několika dní (Killick-Kendrick a kol. 1997).



Obr. 1: Úmrtnost samic *Phlebotomus perniciosus* po dvouhodinové expozici na kontrolních psech a psech s obojkem (podle Killick-Kendrick a kol. 1997, upraveno)

Insekticidní obojky byly v laboratorních testech použity i proti jiným druhům flebotomů. Halbig a kol. (2000) provedli experiment se stejným typem obojků (800 mg deltamethrinu na 20 g plasty), ale efekt byl testován pouze 8. den po aplikaci. Pobodání od *Phlebotomus papatasi* bylo oproti kontrolnímu testování redukováno v průměru z 80 %, ale rozdíl v úmrtnosti nebyl signifikantní. Obojky mají tedy především repelentní účinek (Halbig a kol. 2000). Deltamethrinem impregnované obojky účinně chrání psy i proti brazilským flebotomům (*Lutzomyia longipalpis*, *Lu. mogonei*) po dobu osmi měsíců. Proto se plánuje jejich využití v programech na kontrolu lidské a psí viscerální leishmaniózy v Brazílii (David a kol. 2001).

Na základě povzbudivých výsledků z laboratoře byl studován efekt hromadné aplikace těchto obojků v městském prostředí v jižní Itálii během dvou následných sezón. Po vyhodnocení seroprevalence (v kontrolních městech a ve městě po intervenci) byl po první sezóně efekt ochrany 50 % ($P = 0,15$). Po druhé sezóně bylo ale prokázáno, že účinnost ochrany proti *Le. infantum* zprostředkovaná impregnovanými obojkami byla 86 % ($P < 0,001$) (Maroli a kol. 2001). Obdobnou terénní studii provedli i Foglia Manzillo a kol. (2006). Po první sezóně byla zjištěna ochrana proti infekci leishmaniózou 72,3 % ($P < 0,005$), po druhé ale klesla pouze na 45,1% ($P = 0,15$). Souhrnný efekt ochrany na konci studie byl však signifikantní, 50,8 % ($P = 0,005$).

Alternativní možností, jak použít pyretroidy k ochraně psů, je „spot-on“ aplikace. Jedná se nejčastěji o topickou aplikaci insekticidu na hřbetní stranu krku psa. Reithinger a kol. (2001) demonstrovali, že topické použití permethrinu a fenthioninu chrání psy před

poštípáním po dobu dvou měsíců. Studie Mencke a kol. (2003) ukázala, že kombinace pyretroidu permethrinu a nikotinoиду imidaclorpidu poskytuje psům ochranu jeden měsíc. Dnes je tento přípravek komerčně dostupný pod názvem Advantix. Nevýhodou je, že se aplikace „spot-on“ musí opakovat několikrát za sezonu, zatímco obojek chrání psa celé transmisní období. „Spot-on“ je ale vhodnějším řešením v případech, kdy je pes v blízkém kontaktu s rodinou, zejména s malými dětmi, a může tak docházet k nechtěnému a nežádoucímu kontaktu s impregnovaným obojkem.

Impregnované psí obojky a případně „spot-on“ aplikace jsou v současnosti komerčně používány jako účinná ochrana psů před flebotomy a tedy i před přenosem viscerální leishmaniózy na člověka.

3.2 Insekticidní postřiky domů a přístřešků domácích zvířat

Aplikace insekticidů na zdi lidských obydlí nebo přístřešků domácích zvířat závisí na dostupnosti odpovídajícího veřejného zdravotnictví a infrastruktury. To zahrnuje především zásobování insekticidem a jeho přiměřené dávkování, dále pak vybavení a vyškolení odborných pracovníků a samozřejmě bezpečnost aplikace (Alexander a Maroli 2003). Nicméně, insekticidní postřiky vnějších i vnitřních zdí pyretroidy jsou často používány v programech na kontrolu leishmanióz. V této souvislosti je potřeba studovat, jaký skutečný entomologický dopad a reziduální efekt tato insekticidní ošetření mají. Aplikace insekticidů na zdi je efektivní pro redukci denzity flebotomů uvnitř domů, tedy pro kontrolu endofágních druhů, zatímco při redukci exofágních druhů není účelná (Falcao a kol. 1991, De Silans a kol. 1998).

Davies a kol. (2000) publikovali efekt postřiku vnitřních zdí lambda-cyhalothrinem na přenos *Leishmania peruviana* v Peru. Při koncentraci insekticidu 25 mg/m² byl letální účinek po kontaktu hmyzu s ošetřenou zdí 100%. Pokles efektu nebyl pozorován 6 měsíců po aplikaci látky. Postřiky signifikantně redukovaly počty *Lutzomyia verrucarum* a *Lu. peruensis* uvnitř ošetřených domů o 78 %, respektive 83 %. A, co je významnější, riziko infekce leishmaniózou bylo u obyvatel domů redukováno o 54 % (Davies a kol 2000). Reziduální efekt je však silně závislý na povrchu zdí a materiálu, ze kterého jsou domy postaveny. U zděných domů z nepálených cihel klesal efekt postřiku zdí cypermethrinem (125 mg/m²) již od třetího měsíce po ošetření a byl nedostatečný po čtvrtém měsíci. Naproti tomu u dřevěného povrchu byl efekt reziduální aktivity s mortalitou 100 % *Lu. longipalpis* prodloužen až do pátého měsíce (De Silans a kol. 1998).

Postřik vnitřních zdí domů v kolumbijské vesnici obklopené lesem pomocí 1% deltamethrinu (500 mg/m²) neměl patrný efekt na vnikání *Lu. youngi* a *Lu. columbiana* do obydlí, i přestože se insekticidní aktivita ošetřeného povrchu během studie (čtyř měsíců) nezměnila. Byla ale pozorována změna aktivity a chování flebotomů pronikajících do ošetřených domů ve srovnání s kontrolními. Počet jedinců odchycených do lepových pastí uvnitř domů byl signifikantně nižší ($P = 0,004$) u kontrolních příbytků než u ošetřených deltamethrinem. To by mohlo být vysvětleno poklesem mobility a létací schopnosti po kontaktu s insekticidem aplikovaným na zdi (Alexander a kol. 1995a).

Laciným a účinným insekticidem je DDT. V rozvojových zemích je jeho použití povoleno k reziduálnímu postřiku obydlí. Kaul a kol. (1994) zjistili, že dvojitý postřik vnitřních částí domů pomocí DDT poskytuje vesnici účinnou ochranu proti *Phlebotomus argentipes* během celé sezony. V neošetřené vesnici (východní Uttar Pradesh, Indie) byla populace *P. argentipes* vysoce reprodukčně aktivní, zatímco ve vesnici, kde bylo aplikováno DDT, se vyskytlo pouze několik jedinců tohoto přenašeče viscerální leishmaniózy (Kaul a kol. 1994).

Efektivita reziduálních postřiků souvisí se stupněm, jakým jsou populace flebotomů adaptovány na prostředí vytvořené člověkem a stejně tak i na velikosti ošetřeného území. Tedy tento způsob kontroly flebotomů bude více účelný v městských zástavbách, kde budou postřikem ošetřeny všechny domy a zvířecí přístřešky (Alexander a Maroli 2003).

3.3 Insekticidní postřiky v terénu

Další způsob, jak redukovat počty flebotomů, jsou bariérové postřiky vegetace, postřiky kmenů stromů a odpočívacích míst nebo líhnišť. Úspěšný výsledek postřiku lesní vegetace je určen čtyřmi základními předpoklady: 1) cílená populace flebotomů musí být aktivní nebo mít odpočívací místa v lesních porostech, 2) insekticid musí mít dlouho trvající reziduální efekt, 3) flebotomové musí být v kontaktu s insekticidem dostatečnou dobu, aby byl vyvolán toxický efekt, a 4) protektivní ošetřená zóna musí být dostatečně široká, aby ji hmyz nemohl překonat bez přistání (Perich a kol. 1995).

První bariérový postřik s cílem redukovat riziko nakažení leishmaniózou v deštném pralese provedli Chanotis a kol. (1982) na vojenské základně v Panamě. Při aplikaci organofosfátu malathionu mlžným postřikem dvakrát měsíčně byla redukce v počtu flebotomů pouhých 30 % po dobu 9 měsíců (Chanotis a kol. 1982). Lepší účinek byl získán v Amazonském pralese použitím DDT k postřiku kmenů, které slouží jako odpočívací místa

Lu. umbratilis. V ošetřeném území byl insekticidní efekt pozorován po dobu 11 měsíců (Ready a kol. 1985).

Perich a kol. (1995) demonstrovali redukci populace flebotomů v Guatemale za použití pyretroidu cyfluthrinu smíchaného s palmovým olejem (3 g aktivní látky/90 m²). Prokázali, že 100 m široká bariéra utvořená postřikem vegetace poskytla signifikantní potlačení populace flebotomů v ošetřeném území na 3 měsíce.

Robert a Perich (1995) využili cyfluthrinu (500 ml 24% cyfluthrinu v 7,5 l kukuřičného oleje) k redukci *P. martini* v tropické Africe. Po aplikaci v termištích a zvířecích norách, kde flebotomové často žijí, byla populace flebotomů uvnitř termišť a zvířecích nor redukována po dobu následných 12 týdnů. Dva týdny po ošetření byly počty hmyzu chyceného ve světelných pastech sníženy o 90 %. Tyto výsledky ukazují, že takto aplikovaný cyfluthrin poskytuje krátkodobou redukci populace *P. martini* v ošetřeném území (Robert a Perich 1995).

Další možností, jak omezit kontakt flebotomů s lidmi, je zamezení jejich pronikání do měst a vesnic z okolních oblastí, kde mají svá odpočívací místa. K tomuto účelu mohou sloužit vhodně umístěné insekticidní vertikální sítě, viz Obr. 2. Faiman a kol. (2009) demonstrovali, že hromadné použití vertikálních sítí napuštěných insekticidem, by mohlo významně redukovat počty flebotomů v okolí lidských sídel.



Obr. 2: Bariéra umístěná pod ulicí Sheizaf v Ma'ale Adumin (Izrael) je tvořena vzájemně se překrývajícími 150 cm širokými pruhy (převzato z Faiman a kol. 2009).

3.4 Individuální ochrana

Osobní ochranu před kontaktem a pobodáním flebotomy poskytují různé insekticidní a repelentní prostředky. Jednou z možností je používat moskytiéry impregnované pyretroidy, které mají repelentní i insekticidní efekt a v době spánku tak účinně chrání obyvatelstvo před pobodáním (Alexander a kol. 1995b, Elnaiem a kol. 1999a, Courtenay a kol. 2007, Jalouk a kol. 2007). K impregnaci moskytiér se nejčastěji využívá deltamethrin (Alexander a kol. 1995b, Courtenay a kol. 2007), ale užít může být například i lambda-cyhalothrin (Elnaiem a kol. 1999a). Dobrým prostředkem na ochranu před endofágními druhy mohou být i závěsy impregnované insekticidy, které uvnitř ošetřených místností znatelně redukuje počty hmyzu. Při širším použití by impregnované závěsy a moskytiéry mohly mít reduktivní efekt na lokální populace flebotomů (Elnaiem a kol. 1999a,b)

Ochranu mohou poskytnout také různé difuzibilní repelenty/insekticidy šířené elektrickými rozptylovači nebo olejovými svíčkami. Sirak-Wizeman a kol. (2008) testovali efekt geraniolu, přírodního rostlinného derivátu, a pyretroidu prallethrinu. Prallethrin byl vysoce efektivní a redukoval počty *P. papatasi* v místnosti o 95 %, zatímco geraniol se prokázal jako neúčinný. Tento výsledek je ovšem v kontrastu se studií Muller a kol. (2008a), kde zapálené 5% geraniolové svíčky poskytovaly uvnitř místnosti ochranu 79,7 % a dokonce do vzdálenosti 1 m chránily dobrovolníky z 62 % i ve venkovním prostředí (Muller a kol. 2008b). Rozdíl mohl být způsoben tím, že Muller a kol. (2008a,b) použili k difuzi zapálené svíčky a teplo tedy mohlo zlepšit rozptyl a repelentní efekt geraniolu, zatímco Sirak-Wizeman (2008) využili k rozšíření „studený“ elektrický rozptylovač.

K osobní ochraně slouží samozřejmě i různé repelenty (např.: diethyltoluamid - DEET) aplikované na oblečení nebo přímo na kůži. Použití těchto repelentů je důležité hlavně v oblastech, kde dochází k přenosu leishmaniózy exofágními druhy flebotomů (Alexander a Maroli 2003).

V boji s flebotomy a tak předcházení infekci leishmaniózou je nezbytné kombinovat různé metody a prostředky jednak k redukci populací a jednak k osobní ochraně před pobodáním.

3.5 Vnímavost flebotomů k insekticidům

Zvýšené a opakované používání insekticidů v zemědělství a v boji s hmyzími přenašeči nemocí může přispět k vývoji rezistence v populacích flebotomů. V několika studiích byla již prokázána snížená citlivost k určitým látkám, např.: DDT, permethrinu, deltamethrinu (Amalraj a kol. 1999, Kishore a kol. 2004). Z těchto důvodů je potřeba studovat vnímavost jednotlivých druhů flebotomů k různým druhům insekticidů, aby mohly být úspěšně použity v kontrolních programech.

Tetreault a kol. (2001) stanovili základní vnímavost 4 druhů flebotomů Severní Afriky a Středního Východu (*P. bergeroti*, *P. langeroni*, *P. papatasi* a *P. sergenti*) k několika druhům insekticidů. Nejvíce toxickým byl shledán resmethrin, cyfluthrin a bendiocarb a nejvyšší účinné koncentrace byly naopak zapotřebí u DDT. Autory naměřené hodnoty pro *P. papatasi* uvádím v Tab. 1.

insekticid	LD ₅₀ mg/ml	LD ₉₀ mg/ml	LD ₉₉ mg/ml
bendiocarb	0.053	0.103	0.175
cyfluthrin	0.038	0.200	0.774
DDT	0.943	2.130	4.139
malathion	0.548	1.231	2.383
permethrin	0.363	0.630	0.988
resmethrin	0.039	0.130	0.342

Tab. 1: Vnímavost *Phlebotomus papatasi* k jednotlivým druhům insekticidů (podle Tetreault a kol. 2001)

Maroli a kol. (2002) studovali vnímavost nově založených laboratorních kolonií *P. perniciosus* a *P. papatasi* k DDT, lambda-cyhalothrinu a permethrinu v koncentracích 2 %, 0,06 % a 0,2 %. Jako nejvíce toxický se projevil lambda-cyhalothrin a nejméně toxické opět DDT.

Vnímavost k různým insekticidům byla hodnocena i přímo v přírodních podmínkách na dvou geograficky oddělených populacích *Lu. longipalpis*. Populace z Montes Claros byla v minulosti vystavena působení pyretroidů a organofosfátů, zatímco u populace z jeskyně Lapinha nebyla žádná takováto expozice v minulosti evidována. Výsledky prokázaly, že populace z Lapinha byla daleko více citlivá na působení pyretroidů než populace z Montes Claros. Vnímavost k organofosfátu malathionu byla ale u obou populací stejně vysoká. Tyto výsledky dokazují, jak důležité je ohodnocení citlivosti flebotomů k insekticidům před a i během chemických zásahů (Alexander a kol. 2009).

3.6 Kontrola larev prostřednictvím hlodavců krmených insekticidem

Zdá se, že jednou z nových možností, jak účinně redukovat počty flebotomů, by mohlo být hubení jejich larev v norách hlodavců. Larvy některých druhů totiž žijí ve zvířecích norách a živí se hlodavčími výkaly. Několik studií prokázalo, že přidání insekticidu do potravy křečků nebo potkanů má významný efekt na mortalitu larev, které jsou krmeny výkaly z těchto zvířat (Mascari a kol. 2007a, 2007b, 2008, Wasserberg a kol. 2009).

U larev *P. papatasi*, které byly krmeny bobky z křečků krmených diflubenzuronem (inhibitor syntézy chitinu), byly v období kuklení kontrolních skupin pozorovány morfologické abnormality (křehký a průsvitný exoskeleton). Žádná z larev krmených výkaly takto ošetřených zvířat se nedokázala úspěšně zakuklit. Výsledky naznačují, že diflubenzuron působí specifický efekt v průběhu kuklení (Mascari a kol. 2007a). Obdobným způsobem byly použity i další insekticidy, novaluron (inhibitor syntézy chitinu a regulátor růstu) a ivermectin (produkt *Streptomyces avermitilis*, blokátor nervosvalových receptorů). Zatímco novaluron měl účinek na svlékání larev z druhého do třetího instaru (Mascari a kol. 2007b), ivermectin působí na larvy akutně a ty umíraly rychle, nezávisle na fázi vývoje (Mascari a kol. 2008).

Wasserberg a kol. (2009) provedli tento experiment s potkany, kterým byl podán nikotinoidní insekticid imidacloprid, a efekt byl pozorován na larvách *P. papatasi* a *Lu. longipalpis*. Výsledky ukázaly, že první instary byly daleko vnímavější k působení této látky ve výkalech, než starší stadia.

V žádné z těchto studií nebylo zjištěno, že by použitý insekticid měl jakýkoli negativní efekt na experimentální zvířata. Tyto povzbudivé výsledky dávají podnět k rozvoji nové kontrolní metody, která bude šetrná k životnímu prostředí. Pokud se tato metoda, založená na těsném ekologickém spojení mezi zvířecím rezervoárem a hmyzím vektorem, prokáže jako účinná i v přírodním prostředí, mohla by v budoucnu být efektivně využita v kontrolních programech na potlačení přenosu leishmanióz v oblastech, kde hlodavci hrají úlohu rezervoárového zvířete. Ve Starém světě se jedná například o druh *Leishmania major*, způsobující kožní vředy.

4 Biologický boj

Chemické insekticidy s sebou přináší řadu problémů jako je toxický efekt na necílové organismy a možný vznik rezistence u cílových organismů. Z těchto důvodů je zapotřebí hledat nové biologické metody, které nebudou mít vedlejší účinky na prostředí a ostatní organismy. V této kapitole bych chtěla shrnout jednotlivé možnosti biologického boje. U flebotomů jsou tyto metody zatím málo používány a na toto téma bylo publikováno jen omezené množství prací. Proto budu čerpat i z publikací týkajících se jiného dvoukřídleho hmyzu, zejména komárů, kteří jsou flebotomům fyziologicky a morfologicky podobní.

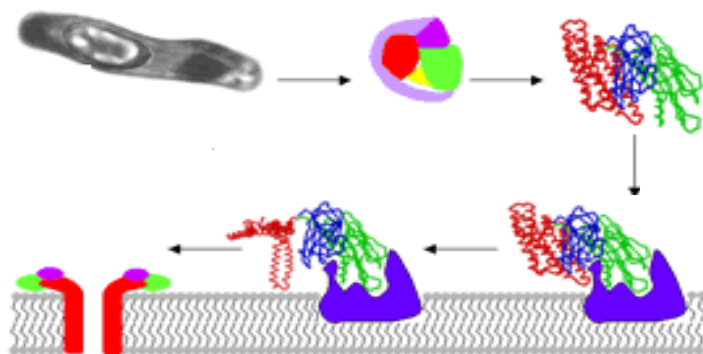
Jednou z možností, jak nahradit chemické insekticidy, jsou toxiny entomopatogenních bakterií *Bacillus sphaericus* a *Bacillus thuringiensis*, entomopatogenní houby nebo hlístice. Možné využití entomopatogenních hlístic navrhuje práce Secundino a kol. (2002). Nematoda z čeledi Tylenchidae napadají nového hostitele penetrací kutikuly a vyvíjí se v samičím abdomenu a způsobují jeho zduření. Zjištění, že tento parazit napadl laboratorní kolonii *Lu. longipalpis*, vedlo k úvahám o jeho budoucím potenciálním využití v biologickém boji (Secundino a kol. 2002).

4.1 *Bacillus sphaericus*, *Bacillus thuringiensis*

Bacillus sphaericus je aerobní tyčinkovitá bakterie vytvářející endospory, je široce rozšířena v půdním a vodním prostředí. Během sporulace vytvářejí některé druhy krystalový protein Btx a během vegetativního růstu toxin Mtx, který je asociovaný s buněčnou membránou. Oba tyto proteiny jsou toxické pro hmyz a mohou tedy být využívány jako biopesticidy (shrnutí v Baumann a kol. 1991, el-Bendary 2006).

Bacillus thuringiensis je fakultativně anaerobní bakterie žijící v půdě, vodě nebo na povrchu rostlin. I tato bakterie sporuluje a během sporulace vytváří krystalové toxiny Cry (δ -endotoxin) a Cyt, které jsou toxické pro různé druhy hmyzu, nematod a protozoí (shrnutí v Schnepf a kol. 1998, el-Bendary 2006).

Několik studií prokázalo, že mechanismus působení těchto toxinů zahrnuje následující kroky: 1) příjem spory v potravě, 2) solubilizaci krystalových proteinů v alkalickém pH v mesenteronu, 3) zpracování protoxinů proteázami a tím aktivování toxicity, 4) navázání toxických proteinů na receptory střevních buněk a změna konformace, 5) včlenění části toxinu do lipidové dvojvrstvy a tvorbu iontových kanálů a nescifický pórů v cílové membráně, které naruší osmotickou rovnováhu buňky, viz Obr. 3 (shrnutí v Baumann a kol. 1991, Schnepf a kol. 1998, el-Bendary 2006).



Obr. 3: Mechanismus působení toxinu *B. thuringiensis* (podle Knowles and Dow 1993, upraveno)

Projev toxického účinku se u *B. thuringiensis* a *B. sphaericus* poněkud liší. Cry toxiny (produkty *B. thuringiensis*) způsobují drastičtější cytologické změny, které způsobí bobtnání buňky, tvorbu lytického póru a zrušení membránového potenciálu, často pak dochází k lyzy epitelální buňky. Btx toxin (produkt *B. sphaericus*) způsobuje ve střevních buňkách tvorbu velkých vakuol a bobtnání mitochondrií (shrnuje v Baumann a kol. 1991, Schnepf a kol. 1998, el-Bendary 2006).

Insekticidní produkty založené na toxinech z *B. thuringiensis* a *B. sphaericus* jsou testovány po celém světě u komárů nebo jiného hmyzu a bývají zařazeny do kontrolních programů (Matanmi a kol. 1990, Becker a Rettich 1994, Su a Mulla 1999, Amalraj a kol. 2000). To usnadňuje jejich možné využití v boji s flebotomy.

De Barjac a kol. (1981) publikovali, že δ -endotoxin produkovaný *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* způsobuje vysokou mortalitu larev *Phlebotomus papatasi* a *Lutzomyia longipalpis*. Larvy ovšem musí pozřít dostatečné množství toxinu. Yuval a Warburg (1989) demonstrovali, že *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* je po orálním podání toxický i pro dospělé flebotomy. Dospělci byli krměni 30% roztokem glukózy, ve kterém byly různé koncentrace toxinu (4.4×10^{-2} , 4.4×10^{-3} a 4.4×10^{-4}). Zjistili, že toxin v koncentraci 4.4×10^{-2} způsobil 100% úmrtnost u dospělců *P. papatasi*, 4.4×10^{-3} u *P. argentipes* a 4.4×10^{-4} u *Lu. longipalpis*. Autoři navrhli, že by v aridních oblastech (kde je nedostatek cukerných šťáv z rostlin) mohl být cukerný roztok s toxinem rozstříkovaný na substrát a tak použit proti dospělé části populace (Yuval a Warburg 1989).

Pener a Wilamowski (1996) zjišťovali vnímavost larev *P. papatasi* k *Bacillus sphaericus* a publikovali, že larvy staré 13 a 20 dní byly vysoce vnímavé k toxickému působení, zatímco na larvách starých 30 dní nebyl efekt pozorován. Signifikantní mortalitu larev ($P < 0.01$) prokázali i Robert a kol. (1997), když dospělcům podávali cukerný roztok obsahující *B. sphaericus* a poté mrtvými jedinci krmili larvy.

Efekt *B. sphaericus* na populace flebotomů (*Phlebotomus duboscqi*, *Sergatomyia schwetzi*) byl studován i v přírodním prostředí. V blízkosti zvířecích nor a poškozených termišť, kde se tyto flebotomové líhnou a odpočívají, byl na vegetaci stříkán cukerný roztok obsahující tyto bakterie. Ve zvířecích norách vzdálených 10-30 m od postříkané vegetace byla po dobu 2-12 týdnů pozorována signifikantně vyšší mortalita larev a zároveň byla redukována i populace dospělců. Efekt ovšem nebyl zaznamenán u populací líhnoucích se a odpočívajících v narušených termišťích, což může být vysvětleno tím, že tato termišť jsou tvořena velkou sítí podzemních chodeb, a proto se toxin nejspíše nedostal všude v dostatečném množství (Robert a kol. 1997).

Na základě předchozích studií byl studován účinek vodní suspenze s toxinem *B. sphaericus* na líhnutí larev a dospělců *P. duboscqi* a *S. schwetzi*. Bylo prokázáno, že i při nízkých koncentracích (0.05, respektive 0.11 mg/cm²) je líhnutí larev efektivně inhibováno (o 95 %). *B. sphaericus* ale neovlivnil líhnutí dospělců z kukel, což naznačuje, že při topickém kontaktu nemá tato bakterie na dospělé letální efekt (Robert a kol. 1998).

4.2 *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana je entomopatogenní houba, která byla nalezena u nejrůznějších druhů hmyzu. Charakterizují ji bílé, později nažloutlé nebo příležitostně načervenalé kolonie. Konidiogenní buňky jsou tvořeny kulovitou bazální částí a 20 µm dlouhým stonkem. Konidie jsou hyalinní a formují se ve shluky. Houba se vyskytuje po celém světě v mírném a tropickém pásu. Její široký habitat rozšíření zahrnuje vysokohorské půdy, vřesoviště a rašeliniště, lesy, ale i savany, písčité duny a pouště. Tuto houbu lze izolovat z půdy, vody i vzduchu, ale i z povrchových a vnitřních částí rostlin (shrnutí v Meyling a Eilenberg 2007, Zimmermann 2007).

Průběh infekce zahrnuje následující kroky: vazbu spory na kutikulu hmyzu, klíčení spory, penetraci kutikuly (mechanicky a s pomocí enzymů), překonání imunitního systému hostitele, proliferaci a tvorbu hyf uvnitř hostitele, smrt hostitele a produkci nových konidií. Germinace a úspěšnost infekce závisí na vnímavosti a aktuálním stavu hostitele a abiotických podmínkách prostředí jako je teplota a vlhkost. Germinace je ovlivněna kutikulárními lipidy, aldehydy a ketony, které mohou mít antimikrobiální účinky. Po úspěšné penetraci houba začne produkovat hyfy, které jsou pasivně distribuovány v hemolymfě. Rozsáhlý vegetativní růst a produkce toxinů a proteolytických enzymů umožňují houbě napadat další tkáň. Hostitel se snaží bránit pomocí fungicidních sloučenin, inhibitorů proteáz a detoxifikačních

proteinů. Inkubační doba se může velmi lišit od několika dní až po několik týdnů v závislosti na vnějších podmínkách, druhu hostitele a virulenci patogenu. Po smrti hostitele začne houba svou saprofytickou fází, objevuje se na vnější straně hostitele a produkuje konidie. Pokud se ale nachází ve velmi suchém prostředí, může přetrvávat v hyfálním stadiu a produkovat konidie uvnitř mrtvého těla (shrnutí v Meyling a Eilenberg 2007, Zimmermann 2007).

Warburg (1991) studoval vliv spor *B. bassiana* na dospělé flebotomy. Krmení dospělců cukrem s přidanými spory nemělo signifikantní účinek na mortalitu. Nicméně spory rozptýlené na filtrační papír indukovaly u *P. papatasi* a *L. longipalpis* během 4-5 dní 100% mortalitu. V ošetřených skupinách se tak významně snížil počet vajec, jelikož brzká mortalita gravidních samic zabránila jejich vykladení (Warburg 1991).

V jiných experimentech byl testován vliv *B. bassiana* na vejce, larvy i dospělé. Líhnutí z vajec bylo redukováno o 59% a délka života infikovaného dospělého byla zkrácena ze 7 na 5 dní. Větší efekt byl ovšem pozorován u larev; při nejvyšší koncentraci (10^8 konidií/ml) byla u larev exponovaných konidii mortalita 100% a u larev vylíhnutých z exponovaných vajec 88% (Amora a kol. 2009).

Reithinger a kol. (1997) hodnotili použití *B. bassiana* jako potenciálního způsobu kontroly flebotomů na kávových plantážích v Kolumbii, kde se komerční preparáty z této houby využívají k boji s broukem *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolitidae). Zároveň na těchto plantážích dochází k přenosu leishmaniózy flebotomy (Montoya a kol. 1990, Warburg a kol. 1991, Alexander a kol. 1992). Ačkoli Warburg (1991) v laboratorních podmínkách prokázal, že *B. bassiana* flebotomy infikuje a zabíjí, Reithinger a kol. (1997) zjistili, že komerční preparát této houby není schopen v přírodních podmínkách flebotomy *Lu. longipalpis* infikovat. Nicméně, Reithinger a kol. (1997) se domnívají, že na kávových plantážích by aplikace směsi kmenů patogenních pro *H. hampei* a *Lu. longipalpis* mohla být praktickou, bezpečnou a ekonomickou metodou pro redukcii přenosu leishmaniózy.

4.3 „Trypsin modulating oostatic factor“ (TMOF)

Hormon „trypsin modulating oostatic factor“ je komáří deka-peptid, který ve střevních epiteliálních buňkách ovlivňuje syntézu proteolytických enzymů. Je syntetizován ve folikulárních buňkách vaječníků po sání krve a uvolňuje se do hemolymfy. Specificky se váže na receptory střevních epiteliálních buněk a modulací translace trypsinové mRNA ukončuje syntézu trypsinu. Pokud se komářím samicím podá TMOF v potravě nebo rektém přímo do střeva, dochází k inhibici biosyntézy trypsinu a je tak potlačena vitelogeneze a vývoj vajíček (Borovsky 1985, 1988, Borovsky a kol. 1990, 1996). Na základě těchto poznatků se uvažuje o využití tohoto hormonu v biologickém boji s komáry (Borovsky a kol. 1998). Vlivem TMOF na flebotomy se zabývám při svých pokusech v laboratoři, a proto jsem se rozhodla věnovat se tomuto peptidu více i v jedné z kapitol mé bakalářské práce. U flebotomů tento hormon dosud testován nebyl, proto čerpám z publikací týkajících se komárů, kteří jsou flebotomů velmi podobní.

4.3.1 Syntéza, sekrece a struktura TMOF

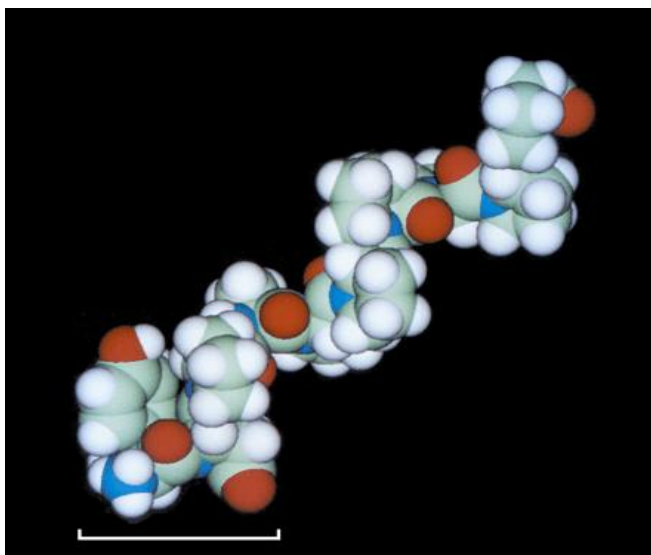
Borovsky (1985, 1988) injikoval částečně purifikovaný hormon do samic komárů a prokázal, že moduluje syntézu serinových proteáz a inhibuje syntézu vitelogeninu a ukládání žloutku. Tento hormon pojmenoval „trypsin modulating oostatic factor“ (TMOF).

Imunocytochemické metody identifikovaly jako místo syntézy TMOF folikulární buňky vaječníků. Samice *Aedes aegypti* s odstraněnými vaječníky syntetizovaly trypsin kontinuálně 64 h po sání, zatímco u kontrolních samic byla syntéza zastavena po 40 h. Tyto výsledky ukazují, že faktor z vaječníků reguluje syntézu trypsinu. TMOF u *A. aegypti* se začíná syntetizovat 18 h po sání krve a je rychle sekretován do hemolymfy. Maximální sekrece je po 33 h a po té začíná rychle klesat, minimálních hodnot dosahuje 48 h po sání. Syntéza TMOF vaječníky koreluje s inhibicí syntézou trypsinu ve střevech samic (Borovsky a kol. 1994b).

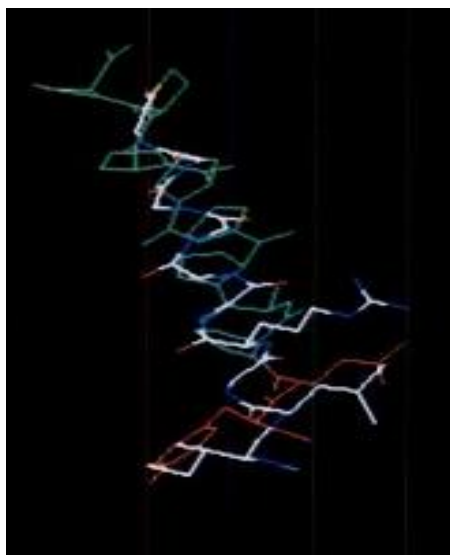
TMOF nebyl nalezen v mozkových gangliích dospělců, což naznačuje, že hormon není neuropeptid (Borovsky a kol. 1994b). Pozdější výsledky ale ukázaly, že u larev a u dospělců *A. aegypti* krměných cukrem je TMOF syntetizován též centrálním nervovým systémem (Borovsky a Meola 2004).

Pomocí hmotnostní spektrometrie byl hormon charakterizován jako deka-peptid. TMOF se v roztoku vyskytuje jako levotočivý α helix a jeho primární aminokyselinová sekvence je $\text{NH}_2\text{-Tyr-Asp-Pro-Ala-(Pro)}_6\text{-COOH}$, viz Obr. 4, 5 (Borovsky a kol. 1990, 1993, Curto a kol. 1993). Aktivita hormonu je redukována pokud jsou na N-konci spolu vyměněny

aminokyseliny Tyr a Asp nebo pokud je na C-konci vyjmuto dva až pět prolinů. To ukazuje, že N- i C- konec jsou pro aktivitu peptidu důležité (Borovsky a kol. 1993). Experimenty s dvaceti devíti TMOF syntetickými analogy ukázaly, že biologická aktivita hormonu je obsažena v tetrapeptidu Tyr-Asp-Pro-Ala (Borovsky a Meola 2004).



Obr. 4: 3D NMR model - „*Aedes aegypti* trypsin modulating oostatic factor“ (*Aea*-TMOF). Na N-konci je podtržena aminokyselinová sekvence prvních čtyř aminokyselin (Tyr-Asp-Pro-Ala), které jsou důležité pro vazbu TMOF na membránový receptor (podle Borovsky 2003).



Obr. 5: TMOF „stick model“, superponovaný stereopohled. Hydrofilní aminokyseliny (Tyr¹ a Asp²) jsou znázorněny červeně, zatímco hydrofobní aminokyseliny (Pro³, Ala⁴, Pro⁵⁻¹⁰) jsou zelené. NH₂ konec je dole a COOH konec nahoře (podle Borovsky a kol. 1994a, upraveno).

4.3.2 Metabolismus a mechanismus působení na larvy a dospělé komárů

Označený a purifikovaný TMOF byl injikován do samic *Aedes aegypti* a byl sledován jeho metabolismus v hemolymfě. Ukázalo se, že pokud je hormon injikován po sání krve, je poměrně rychle metabolizován (poločas rozpadu 1.6 h). Pravděpodobně je metabolizován endopeptidázami a aminopeptidázami na pentapeptid a tripeptid. Inhibice syntézy trypsinu byla tak sledován v abdomenu, který syntetizuje trypsin, ale nemetabolizuje TMOF. Při injikování TMOF do abdomenu v koncentracích 3×10^{-9} M a 6.8×10^{-6} M způsobil hormon inhibici syntézy enzymů typu trypsinu o 50 a 90 % (Borovsky a kol. 1993).

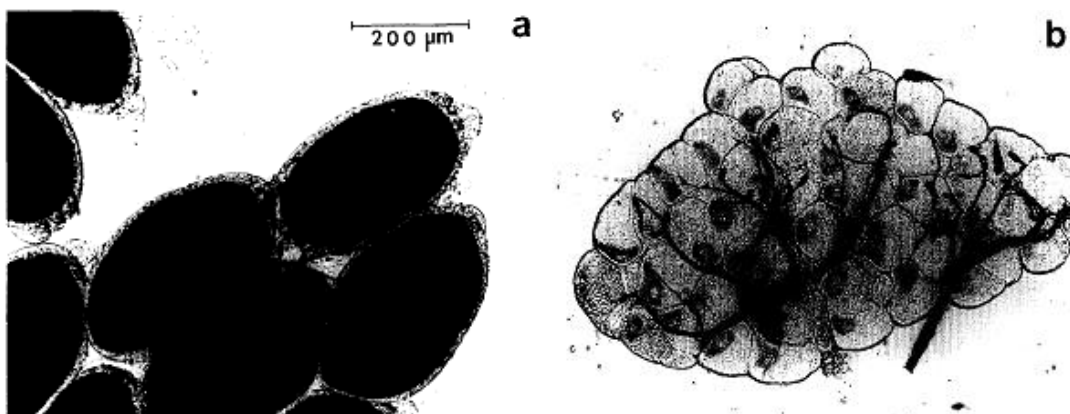
Limitujícím faktorem využití TMOF v biologickém boji je jeho degradace střevními proteázami. Shen a kol. (2009) publikovali, jak zvýšit stabilitu peptidu a usnadnit jeho

přechod do hemolymfy; konjugovali TMOF s alifatickým polymerem polyetylglykolu. K degradaci takto pozměněného TMOF poté nedocházelo (Shen a kol. 2009).

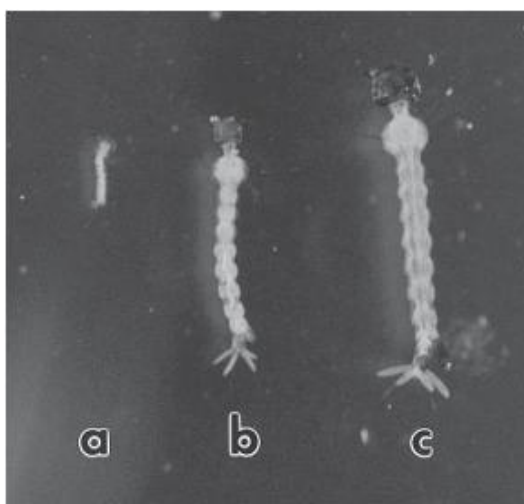
TMOF nepůsobí jako klasické inhibitory trypsinu [např.: TLCK (p-tosyl-L-lysin-chlormetylketon), TPCK (p-tosyl-L-fenylalaninchlormetylketon) a soybean inhibitor trypsinu], které se váží do aktivního místa serinových proteáz a brání hydrolyze. TMOF se váže na specifické receptory nacházející se na střevních epiteliálních buňkách, kontroluje translaci trypsinové mRNA a blokuje biosyntézu trypsinu (Borovsky a kol. 1990, 1994a, 1996).

Borovsky a Mahmood (1995) studovali vliv TMOF na biosyntézu trypsinu a vývoj vajec u samic *Aedes aegypti*, které byly krmeny krví s přidaným *Aedes aegypti* TMOF (*Aea*-TMOF). U samic, kterým byla rektem do střeva injikována krev obsahující *Aea*-TMOF (20 μ g TMOF/3 μ l krve), byla inhibována syntéza trypsinu (o 80 %) i vývoj vajec, zatímco u kontrolních samic (kterým byla podána pouze krev) probíhalo trávení a vývoj vajec standardním způsobem, viz Obr. 6. Stejně výsledky byly získány i v experimentu, kde byl samicím podán *Aea*-TMOF sáním krve přes membránu. TMOF byl tedy transportován skrz stěnu střeva do hemolymfy, kde se navázal na receptory střevních epiteliálních buněk (Borovsky a Mahmood 1995). Tyto výsledky naznačují, že by orálně podávaný TMOF mohl být efektivně využit jako insekticid. Jako slibnější a praktičtější se však ukazují kontrolní metody orientované na larvy, viz dále.

U larev *Aedes aegypti* a *Culex quinquefasciatus* krmených pivními kvasinkami s adsorbovaným *Aea*-TMOF byla pozorována inhibice biosyntézy trypsinu, zpomalení růstu a vývoje a signifikantní mortalita. Změny v růstu larev zobrazuje Obr. 7. TMOF *A. aegypti* indukoval mortalitu larev téhož druhu, ale i larev jiných komárů, konkrétně *Culex quinquefasciatus*, *C. nigripalpus*, *Anopheles quadrimaculatus* a *Aedes taeniorhynchus*. To naznačuje, že mnoho druhů komárů má hormon typu TMOF. Určité rozdíly v účinnosti TMOF na jednotlivé druhy ale naznačují, že analogy u ostatních druhů jsou obdobné, ale mohou se lišit v aminokyselinové sekvenci nebo mohou být rozdílně transportovány ze střeva do hemolymfy (Borovsky a Meola 2004).



Obr. 6: Fotografie oocytů vyjmutých ze samic *A. aegypti* po 48h po podání krve, rektum byla injikována krev obsahující: (a) vodu nebo (b) 20µg TMOF (podle Borovsky a Mahmood 1995).



Obr. 6: Efekt *Aea*-TMOF na larvální růst a vývoj. Komáří larvy byly krmeny pivními kvasinkami (200 µg) s adsorbovaným *Aea*-TMOF v různých koncentracích (a) 188 µg, (b) 45 µg a (c) bez přidaného TMOF (podle Borovsky a Meola 2004).

4.3.3 Efekt TMOF na jiné druhy hmyzu

Borovsky a kol. (1993) studovali vliv TMOF (H-YDPAPPPPPP-OH) a jeho analogu TMOF(B) (H-DYPAPPPPPP-OH) i na jiné druhy parazitických členovců: bodalku *Stomoxys calcitrans*, tiplíka *Culicoides variipennis*, blechu *Cenocephalides felis* a flebotomu *Lutzomyia anthophora*. Dospělce krmili krví a poté jim v oblasti abdomenu injikovali do hemolymfy TMOF nebo jeho analog v různých koncentracích ($2,3 \times 10^{-4}$ - 1×10^{-3} M v 0,25-0,5 µl). Prokázali, že TMOF a TMOF(B) mají určitý vliv i na ostatní druhy hmyzu (Borovsky a kol. 1993). V Tab. 2 uvádím výsledky inhibice biosyntézy proteolytických enzymů u testovaných druhů hmyzu.

Druh	inhibitor	koncentrace inhibitoru (M)	inhibice biosyntézy proteolytických enzymů (%)
<i>Lutzomyia anthophora</i>	TMOF + TMOF(B)	4×10^{-4}	30
<i>Culicoides variipennis</i>	TMOF(B)	$2,9 \times 10^{-4}$	61
<i>Stomoxys calcitrans</i>	TMOF	$8,2 \times 10^{-4}$	46
<i>Cenocephalides felis</i>	TMOF(B)	$4,8 \times 10^{-4}$	41

Tab. 2: Efekt injikovaného TMOF/TMOF(B) do hemolymfy na biosyntézu proteolytických enzymů (podle Borovsky a kol. 1993).

Nauen a kol. (2001) publikovali, že u housenek můry *Heliothis virescens* je syntéza trypsinu modulována obdobným hormonem jako je *Aea*-TMOF. Injikování do hemolymfy nebo orální podání *Aea*-TMOF způsobilo u housenek (4. instary) inhibici trypsinové biosyntézy a růstu (Nauen a kol. 2001).

Z vaječníků masařky *Neobellieria bullata* byl izolován hexapeptid *Neb*-TMOF. Tento hormon, stejně jako *Aea*-TMOF u komárů, ukončuje u masařek syntézu trypsinu a vývoj vajec. Injikovaný hormon do hemolymfy dospělců masařek inhibuje syntézu trávicích enzymů a způsobuje redukci koncentrace vitelogeninu v hemolymfě a tím redukuje vývoj vajec. Komáří hormon ovšem nemá efekt na biosyntézu trypsinu u masařky a hormon z masařek nemá vliv na biosyntézu trypsinu u komárů (Bylemans a kol. 1994).

4.3.4 Využití TMOF v biologickém boji

TMOF by mohl být využit v programech biologického boje ke kontrole škodlivých druhů hmyzu, které jako své hlavní trávicí enzymy využívají serinové proteázy. Je ale potřeba zajistit účinný komerční produkt. V důsledku toho jsou testovány metody produkce TMOF. Hormon byl inkorporován do obalového proteinu (CP) viru tabákové mozaiky (TMV). Rostliny, do kterých byla injikována hybridní virová RNA, akumulovaly TMOF ve svých listech. Infikovanými tabákovými listy byly krmeny housenky *Heliothis virescens*. TMOF obsažený v listech způsobil zpomalení růstu housenek a inhibici trypsinové a chymotrypsinové aktivity v jejich střevech (Borovsky a kol. 2006).

Krmení larev komárů pivními kvasinkami s adsorbovanými CP-TMOF viriony opět způsobilo inhibici trypsinové aktivity (o 90 %), zpomalení růstu a následnou smrt. Tyto výsledky potvrdily dřívější studii Borovsky a Meola (2004), kde TMOF adsorbovaný na kvasinkách inhiboval trypsinovou aktivitu u larev *Aedes aegypti* a *Culex quinquefasciatus*. Virus tabákové mozaiky má široký hostitelský rozsah, a tudíž by exprese TMV-TMOF v rostlinách mohla být využita k ochraně rostlin před škůdci a ke kontrole vektorů (Borovsky

a kol. 2006). Borovsky úspěšně exprimoval TMOF i v řasách rodu *Chlorella*, krmení rekombinantními řasami způsobilo smrt larev do 72 h (Borovsky a kol. 1998).

Tyto experimenty ukazují, že by genetické inženýrství a posléze komerční produkce TMOF kvasinkami nebo rostlinami mohlo být úspěšně využíváno ve vývoji biologických insekticidů, které by mohly vyřešit problém užívání špatně odbouratelných a toxických chemických látek.

4.4 Další možnosti biologického boje

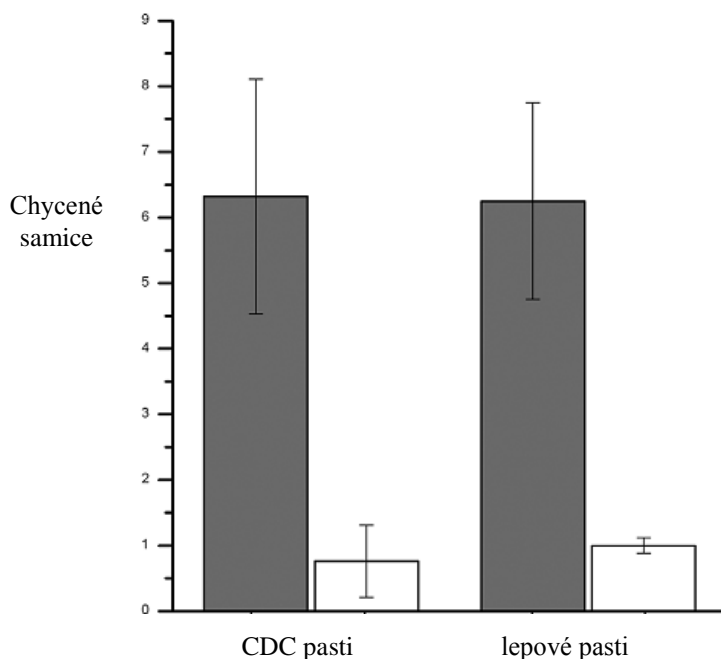
Sání krve je sice důležitou součástí životního cyklu flebotomů, avšak jejich hlavním zdrojem energie jsou cukerné šťávy z rostlin. Při hledání nových možností jak omezit přenos leishmaniózy bylo objeveno, že určité druhy rostlin jsou toxické jednak pro leishmanie vyvíjející se v přenašeči (Schlein a Jacobson 1994, Jacobson a Schlein 1999) a jednak mohou výrazně zkracovat délku života flebotomů (Schlein a kol. 2001). Sání infikovaných *P. papatasi* na rostlinách *Ricinus communis*, *Capparis spinosa* a *Solanum luteum* způsobilo u *Le. major* výraznou mortalitu (> 50 %) a většina promastigotů (46-88 %) byla deformována (Schlein a Jacobson 1994). Pokusy s rostlinami *Ricinus communis* a *Boungavillea glabra* prokázaly, že tyto rostliny mohou zkrátit dobu života *P. papatasi* v průměru ze 48 na 14 dní (Schlein a kol. 2001). Z těchto výsledků vyplývá, že by tyto okrasné rostliny mohly být využívány v lokální ochraně před poštípáním flebotomy a infikováním leishmaniózou.

Luitgards-Moura a kol. (2002) zjišťovali efekt extraktů z ichtyotoxických rostlin *Antonia ovata* a *Derris amazonica*, které jsou používané amazonskými domorodci k rybolovu, na vývoj *Lu. longipalpis*. Ze suchých listů *A. ovata* a kořenů *D. amazonica* připravili extrakty, které poté nechali vyluhovat ve vodě, přefiltrovali a vysušili při teplotě 50 °C. Takto získaný pevný extrakt byl zředěn ve vodě v koncentracích 150, 200 a 250 mg/ml a roztok byl aplikován na filtrační papír. Jedinci *Lu. longipalpis* byli umístěni do skleněných trubic se dnem pokrytým ošetřeným filtračním papírem. Během expozice (72 h) byla každé 2 hodiny zjišťována mortalita. Po 72 h byla mortalita flebotomů vysoká u obou druhů rostlin; 80 % u *A. ovata* (LD₅₀ = 233 mg/ml) a 100 % u *D. amazonica* (LD₅₀ = 212 mg/ml). Zatímco mortalita v kontrolních skupinách nikdy nepřesáhla 13 %. Deriváty z těchto rostlin by tedy mohly být součástí nových insekticidů (Luitgards-Moura a kol. 2002)

Jednou z dalších možností ke kontrole flebotomů je využití synteticky vyráběných samčích feromonů. Samci *Lu. longipalpis* produkují pohlavní feromony, které jsou velmi důležité při páření k agregaci a lákání samic (Morton a Ward 1989, Jones a Hamilton 1998).

Tyto feromony (terpeny) jsou produkovány žlázami nacházejícími se v abdomenu samců. Před i během páření jsou sekretovány abdominálními póry a poté jsou rozptylovány rychlým pohybem křídel (Lane a Ward 1984). Užití insekticidů a pastí v kombinaci se syntetickými feromony a hostitelskými kairomony by mohlo být užito k lákání a zabíjení samic v ošetřeném území (Morton a Ward 1990, Kelly a Dye 1997).

Bray a kol. (2009) prokázali, že synteticky připravený feromon 9-metylgermacrene-B láká samice a má stejnou biologickou aktivitu jako přírodní feromon, který je produkován jedinci *Lu. longipalpis*. Feromon 9-metylgermacrene-B je vyráběn z derivátu izolovaného z rostliny *Geranium macrorrhizum*. Efekt tohoto syntetického feromonu v kombinaci s CDC a leповými pastmi a kuřecími kairomony byl studován v přírodním prostředí. Jedinci obou pohlaví byli lákáni do pastí pomocí dávkovače, který uvolňoval do prostředí feromon ve stejné koncentraci, jako produkují agregovaní samci. Výsledky ukázaly signifikantní rozdíl v počtu samic i samců chycených do kontrolních pastí a do pastí s rozptylovačem feromonu. V kontrolních pastech bylo nalezeno přibližně šestkrát méně jedinců *Lu. longipalpis*, výsledky týkající se samic uvádím v Obr. 8. Tato studie ukazuje potenciální využití pohlavních feromonů flebotomů v kontrolních programech, kdy by při vhodném rozmístění feromonových pastí mohly být účinně redukovány populace *Lu. longipalpis* (Bray a kol. 2009).



Obr. 8: Průměrný počet samic *Lu. longipalpis* odchycených do testovaných pastí s rozptylovačem feromonu - tmavé sloupce, a kontrolních pastí bez feromonu - světlé sloupce (podle Bray a kol. 2009, upraveno).

5 Závěr

Ve své práci shrnuji metody a možnosti boje s flebotomy, kteří jsou přenašeči leishmaniózy. Boj s přenosem leishmanióz komplikuje špatná dostupnost a rozmanitost biotopů, ve kterých flebotomové žijí. Zákroky jsou zaměřené zejména na dospělé, ačkoliv v laboratořích je efektivnost nových chemických a biologických insekticidů úspěšně testována i na larválních stádiích.

Současné kontrolní programy využívají především aplikace různých chemických insekticidů. Jednotlivé druhy a populace flebotomů se však mohou lišit v citlivosti na insekticidy nebo se vůči nim mohou stát rezistentními. V rámci kontrolních programů je proto vhodné studovat vnímavost cílové populace flebotomů k jednotlivým druhům insekticidů. Zároveň je nutné testovat nové metody chemického boje, které budou účelné a zároveň nebudou zatěžovat životní prostředí a necílové organismy. Jednou z možností je přidávat insekticidy do krmení hlodavců, jejichž výkaly jsou zdrojem potravy pro larvy flebotomů. Experimenty jsou zatím úspěšné pouze v laboratoři, je tedy nutné zhodnotit efekt této metody v přírodních podmínkách. Hlodavcům by insekticid mohl být podáván v podobě pelet, které by byly distribuovány v okolí hlodavčích nor.

Vývoj a použití biologických kontrolních metod je v úplných počátcích, v boji s flebotomy by mohly být využity entomopatogenní bakterie (*Bacillus sphaericus*, *B. thuringiensis*) nebo entomopatogenní houby (*Beauveria bassiana*). Na toto téma je ale publikováno omezené množství prací a téměř žádné terénní studie, které by prokázaly efektivnost komerčních preparátů vyráběných z těchto mikroorganismů. Dalšími možnostmi biologického boje jsou aplikace feromonových pastí nebo pěstování toxických rostlin. Biologické metody je třeba dále studovat, aby byly levné a efektivní a mohly v budoucnu nahradit používání chemických insekticidů.

Ve své práci zároveň zmiňuji hormon TMOF, o němž se vážně uvažuje jako o biologickém insekticidu ke kontrole komárů. Na základě podobnosti komárů a flebotomů testujeme účinky TMOF na dospělé samice *Lutzomyia longipalpis*. Předběžné pokusy ukázaly, že koncentrace 28 mg/ml snižuje aktivitu trypsinu ve střevě nasátých samic *Lu. longipalpis* o 10 - 40 %. Zároveň dochází u těch samic k inhibici tvorby vajec. Vlivu TMOF na trávení a tvorbu vajec u flebotomů bych se chtěla věnovat i ve své diplomové práci.

6 Seznam použité literatury

- Alexander B., Barros V.C., de Souza S.F., Barros S.S., Teodoro L.P., Soares Z.R., Gontijo N.F. and Reithinger R. (2009).** Susceptibility to chemical insecticides of two Brazilian populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Tropical Medicine and International Health*, 14:1272-1277.
- Alexander B., Ferro C., Young D.G., Morales A., Tesh R.B. (1992).** Ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in northeastern Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87:387-395.
- Alexander B., Jaramillo C., Usma M.C., Quesada B.L., Cadena H., Roa W., Travi B.L. (1995a).** An attempt to control Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by residual spraying with deltamethrin in a Colombian village. *Memórias de Instituto Oswaldo Cruz*, 90:421-424.
- Alexander B. a Maroli M. (2003).** Control of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 17:1-18.
- Alexander B., Usma M.C., Cadena H., Quesada B.L., Solarte Y., Roa W., Travi B.L. (1995b).** Evaluation of deltamethrin-impregnated bednets and curtains against phlebotomine sandflies in Valle del Cauca, Colombia. *Medical and Veterinary Entomology*, 9:279-283.
- Amalraj D.D., Sahu S.S., Jambulingam P., Doss P.S.B., Kalyanasundaram M., Das P.K. (2000).** Efficacy of aqueous suspension and granular formulations of *Bacillus thuringiensis* (Vectobac) against mosquito vectors. *Acta Tropica*, 75:243-246.
- Amalraj D.D., Sivagnaname N., Srinivasan R. (1999).** Susceptibility of *Phlebotomus argentipes* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) to insecticides. *Journal Communicable Disease*, 31:177-180.
- Amora S.S.A., Bevilaqua C.M.L., Feijo F.M.C., Silva M.A., Pereira R., Silva S.C., Alves N.D., Freire F.A.M., Oliveira D.M. (2009).** Evaluation of the fungus *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), a potential biological control agent of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). *Biological Control*, 50:329-335.
- Baumann P., Clark M.A., Baumann L., Broadwell A.H. (1991).** *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins. *Microbiological Reviews*, 55:425-436.
- Becker N. a Rettich F. (1994).** Protocol for the introduction of new *Bacillus thuringiensis israelensis* products into the routine mosquito control program in Germany. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 10:527-533.

- Borja-Cabrera G.P., Correia Pontes N.N., da Silva V.O., Paraguai de Souza E., Santos W.R., Gomes E.M., Luz K.G., Palatnik M., Palatnik de Sousa C.B. (2002).** Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). *Vaccine*, 20:3277-3284.
- Borovsky D. (1985).** Isolation and characterization of highly purified mosquito oostatic hormone. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2:333-349.
- Borovsky D. (1988).** Oostatic hormone inhibits biosynthesis of midgut proteolytic-enzymes and egg development in mosquitos. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 7:187-210.
- Borovsky D. (2003).** Trypsin-modulating oostatic factor: a potential new larvicide for mosquito control. *The Journal of Experimental Biology*, 206:3869-3875.
- Borovsky D., Carlson D.A., Griffin P.R., Shabanowitz J., Hunt D.F. (1990).** Mosquito oostatic factor: a novel decapeptide modulating trypsin-like enzyme biosynthesis in the midgut. *The FASEB Journal*, 4:3015-3020.
- Borovsky D., Carlson D.A., Griffin P.R., Shabanowitz J., Hunt D.F. (1993).** Mass spectrometry and characterization of *Aedes aegypti* trypsin modulating oostatic factor (TMOF) and its analogs. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23:703-712.
- Borovsky D., Janssen I., Vanden Broeck J., Huybrechts R., Verhaert P., De Bondt H.L., Bylemans D. and De Loof A. (1996).** Molecular sequencing and modeling of *Neobellieria bullata* trypsin. Evidence for translational control by *Neobellieria* trypsin-modulating oostatic factor. *European Journal of Biochemistry*, 237:279-287.
- Borovsky D. and Mahmood F. (1995).** Feeding the mosquito *Aedes aegypti* with TMOF and its analogs; effect on trypsin biosynthesis and egg development. *Regulatory Peptides*, 57:273-281.
- Borovsky D. and Meola S.M. (2004).** Biochemical and cytoimmunological evidence for the control of *Aedes aegypti* larval trypsin with *Aea*-TMOF. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 55:124-139.
- Borovsky D., Powell C.A., Nayar J.K., Blalock J.E. and Hayes T.K. (1994a).** Characterization and localization of mosquito-gut receptors for trypsin modulating oostatic factor using a complementary peptide and immunocytochemistry. *The FASEB Journal*, 8:350-355.
- Borovsky D., Powell C.A., Dawson W.O., Shivprasad S., Lewandowski D.J., DeBondt H.L., DeRanter C., DeLoof A. (1998).** Trypsin modulating oostatic factor (TMOF): a new biorational insecticide against mosquitoes. In *Insects, Chemical, Physiological and Environmental Aspects* (ed. D. Konopinska, G. Goldsworthy, R. J. Nachman, J. Nawrot, I. Orchard, G. Rosinski), pp. 131-140. Wroclaw, Poland: University of Wroclaw.

- Borovsky D., Rabindran S., Dawson W.O., Powell C.A., Iannotti D.A., Morris T.J., Shabanowitz J., Hunt D.F., DeBondt H.L. and DeLoof A. (2006).** Expression of *Aedes* trypsin-modulating oostatic factor on the virion of TMV: A potential larvicide. *The Proceedings of the National Academy of Sciences (US)*, 103:18963-18968.
- Borovsky D., Song Q.S., Ma M.C., Carlson D.A. (1994b).** Biosynthesis, secretion, and immunocytochemistry of trypsin modulating oostatic factor of *Aedes aegypti*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 27:27-38.
- Bray D.P., Bandi K.K., Brazil R.P., Oliveira A.G., Hamilton J.G. (2009).** Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to traps in the field. *Journal of Medical Entomology*, 46:428-434.
- Bylemans D., Borovsky D., Hunt D.F., Shabanowitz J., Grauwels L., De Loof A. (1994).** Sequencing and characterization of trypsin modulating oostatic factor (TMOF) from the ovaries of the grey fleshfly, *Neobellieria (Sarcophaga) bullata*. *Regulatory Peptides*, 50:61-72.
- Courtenay O., Gillingwater K., Gomes P.A., Garcez L.M., Davies C.R. (2007).** Deltamethrin-impregnated bednets reduce human landing rates of sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* in Amazon households. *Medical and Veterinary Entomology*, 21:168-176.
- Curto E.V., Jarpe M.A., Blalock J.E., Borovsky D., Krishna N.R. (1993).** Solution structure of trypsin modulating oostatic factor is a left-handed helix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 193:688-693.
- David J.R., Stamm L.M., Bezerra H.S., Souza R.N., Killick-Kendrick R., Lima J.W. (2001).** Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96:839-847.
- Davies C.R., Llanos-Cuentas E.A., Campos P., Monge J., Leon E., Canales J. (2000).** Spraying houses in the Peruvian Andes with lambda-cyhalothrin protects residents against cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94:631-636.
- de Barjac H., Wilamowski A., Killick-Kendrick R. (1981).** Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, serotype H14, pour les larves de phlébotomes vecteurs de leishmanioses. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, 74:485-489.
- De Silans L.N., Dedet J.P., Arias J.R. (1998).** Field monitoring of cypermethrin residual effect on the mortality rates of the Phlebotomine sand fly *Lutzomyia longipalpis* in the state of Paraíba, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93:339-344.
- el-Bendary M.A. (2006).** *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. *Journal of Basic Microbiology*, 46:158-170.

- Elnaiem D.A., Elnahas A.M., Aboud M.A. (1999a).** Protective efficacy of lambda-cyhalothrin-impregnated bednets against *Phlebotomus orientalis*, the vector of visceral leishmaniasis in Sudan. *Medical and Veterinary Entomology*, 13:310-314.
- Elnaiem D.A., Aboud M.A., El Mubarek S.G., Hassan H.K., Ward R.D. (1999b).** Impact of pyrethroid-impregnated curtains on *Phlebotomus papatasi* sandflies indoors at Khartoum, Sudan. *Medical and Veterinary Entomology*, 13:191-197.
- Faiman R., Cuno R., Warburg A. (2009).** Control of phlebotomine sand flies with vertical fine-mesh nets. *Journal of Medical Entomology*, 46:820-831.
- Falcao A.L., Falcao A.R., Pinto C.T., Gontijo C.M., Falqueto A. (1991).** Effect of deltamethrin spraying on the sandfly populations in a focus of American cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86:399-404.
- Foglia Manzillo V., Oliva G., Pagano A., Manna L., Maroli M., Gradoni L. (2006).** Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Veterinary Parasitology*, 142:142-145.
- Halbig P., Hodjati M.H., Mazloumi-Gavvani A.S., Mohite H., Davies C.R. (2000).** Further evidence that deltamethrin-impregnated collars protect domestic dogs from sandfly bites. *Medical and Veterinary Entomology*, 14:223-226.
- Chaniotis B.N., Parsons R.E., Harlan H.J., Correa M A. (1982).** A pilot study to control phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a neotropical rain forest. *Journal of Medical Entomology*, 19:1-5.
- Jacobson R.L. a Schlein Y. (1999).** Lectins and toxins in the plant diet of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) can kill *Leishmania major* promastigotes in the sandfly and in culture. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 93:351-356.
- Jalouk L., Al Ahmed M., Gradoni L., Maroli M. (2007).** Insecticide-treated bednets to prevent anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Aleppo Governorate, Syria: results from two trials. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101:360-367.
- Jones T.M. a Hamilton J.G.C. (1998).** A role for pheromones in mate choice in a lekking sandfly. *Animal Behaviour*, 56:891-898.
- Kaul S.M., Sharma R.S., Dey K.P., Rai R.N., Verghese T. (1994).** Impact of DDT indoor residual spraying on *Phlebotomus argentipes* in a kala-azar endemic village in eastern Uttar Pradesh. *Bulletin of the World Health Organization*, 72:79-81.
- Kelly D.W. a Dye C. (1997).** Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Animal Behaviour*, 53:721-731.

- Killick-Kendrick R., Killick-Kendrick M., Focheux C., Dereure J., Puech M.P., Cadiergues M C. (1997).** Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, 11:105-111.
- Kishore K., Kumar V., Kesari S., Bhattacharya S.K., Das P. (2004).** Susceptibility of *Phlebotomus argentipes* against DDT in endemic Districts of North Bihar, India. *The Journal of Communicable Diseases*, 36:41-44.
- Knowles B.H a Dow J.A.T. (1993).** The crystal delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* - Models for their mechanism of action on the gut. *BioEssays*, 15:469-476,
- Lane R. a Ward R.D. (1984).** The morphology and possible function of abdominal patches in males of two forms of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Phlebotominae). *Cahiers d'Office Recherche Scientifique Technique Outre-Mer, Serie Entomologie Médicale et Parasitologie*, 22:245-249.
- Luitgards-Moura J.F., Castellon Bermudez E.G., Rocha A.F., Tsouris P., Rosa-Freitas M.G. (2002).** Preliminary assays indicate that *Antonia ovata* (Loganiaceae) and *Derris amazonica* (Papilionaceae), ichthyotoxic plants used for fishing in Roraima, Brazil, have an insecticide effect on *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97:737-742.
- Maroli M., Cianchi T., Bianchi R., Khoury C. (2002).** Testing insecticide susceptibility of *Phlebotomus perniciosus* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) in Italy. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 38:419-423.
- Maroli M., Mizzon V., Siragusa C., D'Oorazi A., Gradoni L. (2001).** Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Medical and Veterinary Entomology*, 15:358-363.
- Mascari T.M., Mitchell M.A., Rowton E.D., Foil L.D. (2007a).** Laboratory evaluation of diflubenzuron as a feed-through for control of immature sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 44:171-174.
- Mascari T.M., Mitchell M.A., Rowton E.D., Foil L.D. (2007b).** Evaluation of novaluron as a feed-through insecticide for control of immature sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 44:714-717.
- Mascari T.M., Mitchell M.A., Rowton E.D., Foil L.D. (2008).** Ivermectin as a rodent feed-through insecticide for control of immature sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 24:323-326.
- Matanmi B.A., Federici B.A., Mulla M.S. (1990).** Fate and persistence of *Bacillus-sphaericus* used as a mosquito larvicide in dairy waste-water lagoons. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 6:384-389.

- Mencke N., Volf P., Volfova V., Stanneck D. (2003).** Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) in dogs. *Parasitology Research*, 90 Suppl 3:S108-111.
- Meyling N.V. a Eilenberg J. (2007).** Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43:145-155.
- Montoya J., Jaramillo C., Palma G., Gomez T., Segura I., Travi B. (1990).** Report of an epidemic outbreak of tegumentary leishmaniasis in a coffee-growing area of Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85:119-121.
- Morton I.E. a Ward R.D. (1989).** Laboratory response of female *Lutzomyia longipalpis* sandflies to a host and male pheromone source over distance. *Medical and Veterinary Entomology*, 3:219-223.
- Morton I.E. a Ward R.D. (1990).** Response of female sandflies (*Lutzomyia longipalpis*) to pheromone-baited sticky traps in the laboratory. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 84:49-51.
- Muller G.C., Junnila A., Kravchenko V.D., Revay E.E., Butlers J., Schlein Y. (2008a).** Indoor protection against mosquito and sand fly bites: a comparison between citronella, linalool, and geraniol candles. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 24:150-153.
- Muller G.C., Junnila A., Kravchenko V.D., Revay E.E., Butler J., Orlova O.B., Weiss R.W., Schlein Y. (2008b).** Ability of essential oil candles to repel biting insects in high and low biting pressure environments. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 24:154-160.
- Nauen R., Sorge D., Sterner A., Borovsky D. (2001).** TMOF-like factor controls the biosynthesis of serine proteases in the larval gut of *Heliothis virescens*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47:169-180.
- Pener H. a Wilamowski A. (1996).** Susceptibility of larvae of the sandfly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to *Bacillus sphaericus*. *Bulletin of Entomological Research*, 86:173-175.
- Perich M.J., Hoch A.L., Rizzo N., Rowton E.D. (1995).** Insecticide barrier spraying for the control of sand fly vectors of cutaneous leishmaniasis in rural Guatemala. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52:485-488.
- Ready P.D., Arias J.R., Freitas R A. (1985).** A pilot study to control *Lutzomyia umbratilis* (Diptera:Psychodidae), the major vector of *Leishmania braziliensis* guyanensis, in a peri-urban rainforest of Manaus, Amazonas State, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 80:27-36.

- Reithinger R., Davies C.R., Cadena H., Alexander B. (1997).** Evaluation of the fungus *Beauveria bassiana* as a potential biological control agent against phlebotomine sand flies in Colombian coffee plantations. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70:131-135.
- Reithinger R., Teodoro U., Davies C.R. (2001).** Topical insecticide treatments to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis. *Emerging Infectious Disease*, 7:872-876.
- Robert L.L. a Perich M.J. (1995).** Phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) control using a residual pyrethroid insecticide. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 11:195-199.
- Robert L.L., Perich M.J., Schlein Y., Jacobson J.L. (1998).** *Bacillus sphaericus* inhibits hatching of phlebotomine sand fly eggs. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14:351-352.
- Robert L.L., Perich M.J., Schlein Y., Jacobson R.L., Wirtz R.A., Lawyer P.G., Githure J I. (1997).** Phlebotomine sand fly control using bait-fed adults to carry the larvicide *Bacillus sphaericus* to the larval habitat. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 13:140-144.
- Saraiva E.M., de Figueiredo Barbosa A., Santos F.N., Borja-Cabrera G.P., Nico D., Souza L.O., de Oliveira Mendes-Aguiar C., de Souza E.P., Fampa P., Parra L.E., Menz I., Dias J.G. Jr., de Oliveira S.M., Palatnik-de-Sousa C.B. (2006).** The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. *Vaccine*, 24:2423-2431.
- Secundino N.F., Araujo M.S., Oliveira G.H., Massara C.L., Carvalho O.S., Lanfredi R.M., Pimenta P.F. (2002).** Preliminary description of a new entomoparasitic nematode infecting *Lutzomyia longipalpis* sand fly, the vector of visceral leishmaniasis in the New World. *Journal of Invertebrate Pathology*, 80:35-40.
- Shen H.Y., Brandt A., Witting-Bissinger B.E., Gunnoe T.B., Roe R.M. (2009).** Novel insecticide polymer chemistry to reduce the enzymatic digestion of a protein pesticide, trypsin modulating oostatic factor (TMOF). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93:144-152.
- Schlein Y. a Jacobson R.L. (1994).** Mortality of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi* caused by plant feeding of the sand flies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50:20-27.
- Schlein Y., Jacobson R.L., Muller G.C. (2001).** Sand fly feeding on noxious plants: a potential method for the control of leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65:300-303.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler D R and Dean D H. (1998).** *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62:775-806.

- Sirak-Wizeman M., Faiman R., Al-Jawabreh A., Warburg A. (2008).** Control of phlebotomine sandflies in confined spaces using diffusible repellents and insecticides. *Medical and Veterinary Entomology*, 22:405-412.
- Su T. a Mulla M.S. (1999).** Field evaluation of new water-dispersible granular formulations of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* against *Culex* mosquitoes in microcosms. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15:356-365.
- Tetreault G.E., Zayed A.E., Hanafi H.A., Beavers G.M., Zeichner B.C. (2001).** Susceptibility of sand flies to selected insecticides in North Africa and the Middle East. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 17:23-27.
- Warburg A. (1991).** Entomopathogens of phlebotomine sand flies: laboratory experiments and natural infections. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58:189-202.
- Warburg A., Montoya-Lerma J., Jaramillo C., Cruz-Ruiz A.L., Ostrovska K. (1991).** Leishmaniasis vector potential of *Lutzomyia* spp. in Colombian coffee plantations. *Medical and Veterinary Entomology*, 5:9-16.
- Wasserberg G., Poche R., Polyakova L.A., Chenault M.V., Zollner G., Rowton E.D., Miller D. (2009).** Feed-through control for larval sand flies using host-targeted insecticide. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81:1016.
- Yuval B. a Warburg A. (1989).** Susceptibility of adult phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) to *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 83:195-196.
- Zimmermann G. (2007).** Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17:553-596.