

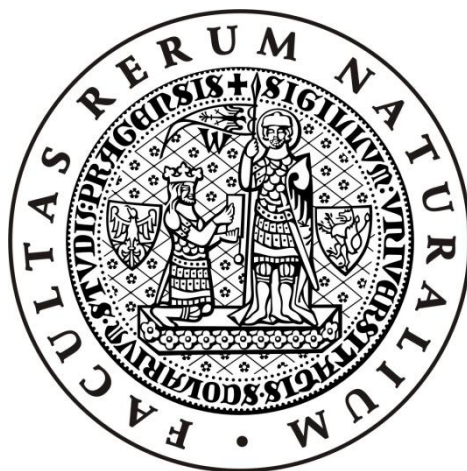
UNIVERZITA KARLOVA V PRAHE

Prírodovedecká fakulta

Katedra parazitológie

Študijní program Biológia

Študijní obor Parazitológia



Bc. Tatiana Košťálová

**Protilátky proti slinám flebotomov u domácich zvierat
z endemických oblastí viscerálnej leishmaniózy**

Antibodies against sand flies saliva in domestic animals from endemic
areas of visceral leishmaniasis

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Školiteľ: Prof. RNDr. Petr Volf, CSc.

Školiteľ špecialista: RNDr. Iva Kolářová, Ph.D.

Praha 2012

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne, a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe dňa 17. 8. 2012

Tatiana Košťálová

PodĎakovanie:

Ako prvému by som chcela poĎakovať svojmu školiteľovi prof. RNDr. Petrovi Volfovi, CSc. za čas, ktorý si vždy našiel na moje otázky a za cenné rady a pomoc nielen pri vypracovávaní tejto práce. Veľká vĎaka patrí mojej školiteľke špecialistke RNDr. Ive Kolářovej, Ph.D., ktorá pri mne stála počas celého magisterského štúdia, vždy ochotná mi pomôcť, poradiť a hlavne podporiť v období experimentálnych nezdarov. Ďalej by som chcela poĎakovať všetkým, ktorí v rámci projektu „Ecology and transmission dynamics of visceral leishmaniasis in Ethiopia“ zabezpečili odbery sér zvierat, bez čoho by táto práca nemohla nikdy vzniknúť. Zároveň chcem poĎakovať všetkým členom nášho laboratória za priateľské prostredie a ochotu kedykoľvek pomôcť a poradiť.

V neposlednej rade chcem veľmi poĎakovať svojej rodine a Igorovi, ktorí sú mojou neustálou oporou.

ABSTRAKT

Hlavným cieľom tejto práce bolo testovať séra domácich zvierat z endemických oblastí viscerálnej leishmaniózy v severnej a severozápadnej Etiópii na prítomnosť protilátok proti slinným žľazám predpokladaného vektora *P. orientalis* a tak objasniť správanie tohto flebotoma a úlohu domácich zvierat v prenose viscerálnej leishmaniózy.

Špecifické IgG protilátky proti slinám *P. orientalis* boli testované u psov, hovädzieho dobytku, kôz, oviec a somárov. Cut-off hodnotu u psov presahovalo 76 % vzoriek, u hovädzieho dobytku 15 %, u kôz 26 %, u oviec 60 % a u somárov 45 % vzoriek. V porovnaní s kontrolnými sérami boli signifikantne vyššie hladiny protilátok proti slinám *P. orientalis* u etiópskych sér pozorované u psov, hovädzieho dobytku, kôz, oviec a somárov. V prípade kráv, kôz a somárov boli ale hladiny cut-off neobvykle vysoké a je preto otázne nakoľko sú získané výsledky relevantné. U psov boli tiež merané anti-*P. orientalis* IgG2 protilátky, u 88 % etiópskych sér sme pozorovali signifikantne vyššie hladiny IgG2 v porovnaní s kontrolnými sérami.

Ďalším cieľom bolo zistiť pomocou imunoblotingu, či etiópske psie séra s anti-*P. orientalis* protilátkami reagujú s proteínmi slinných žliaz iného krvsajúceho hmyzu. V slinách flebotoma *Sergentomyia schwetzi* s častým dominantným zastúpením v Etiópii psy rozpoznávali najmä 36, 37 a 51 kDa proteíny. V prípade kosmopolitne rozšíreného komára *Culex quinquefasciatus* psy výrazne rozpoznávali 22 a 58 kDa proteíny. Etiópske psie séra tiež skrížene reagovali s 50 kDa proteínom slinných žliaz novosvetkého flebotoma *Lutzomyia longipalpis*. Naproti tomu u experimentálne pobodaných myší nebola pozorovaná žiadna skrížená reakcia medzi *P. orientalis* a *S. schwetzi* a medzi *P. orientalis* a *C. quinquefasciatus*, skrížená reakcia bola viditeľná iba v prípade myši s protilátkami proti *P. orientalis* s antigénmi *L. longipalpis*.

V tretej časti sme pomocou MALDI TOF/TOF analyzéri skúmali proteínový profil slinných žliaz dvoch kolónií *P. orientalis* pochádzajúcich z rôznych lokalít a zistili sme, že proteínové zloženie ich slín sa nelíši. Zaznamenali sme 12 proteínov patriacich do 7 rodín: yellow-related, apyráza, D7-related, PpSP15-like, Ag5-related, ParSP25-like a PpSP32-like. Etiópske psy pri imunoblotingu so slinnými žľazami *P. orientalis* rozpoznávali najmä proteíny patriace do rodín ParSP25-like (32 kDa), apyráz (37, 38, 40 kDa) a yellow-related (42, 44 kDa).

Kľúčové slová: Etiópia, *Phlebotomus orientalis*, domáce zvieratá, protilátková odpoveď, proteínový profil, skrížené reakcie

ABSTRACT

The main aim of this thesis was to test sera of domestic animals from endemic areas of visceral leishmaniasis in north and northwest Ethiopia for antibodies against presumed vector *P. orientalis* salivary glands and to clarify behavior of the sand fly and the role of domestic animals in transmission of visceral leishmaniasis.

Specific IgG antibodies against *P. orientalis* saliva were tested in dogs, cattle, goats, sheep and donkeys. Above the cut-off value there was 76 % analyzed dogs, 15 % cattle, 26 % goats, 60 % sheep and 45 % donkeys. Dogs, goats and donkeys revealed significantly higher anti-*P. orientalis* antibodies compared to control animals. In the case of cattle, goats and donkeys cut-off levels were very high and is questionable if observed results are relevant. Canine sera were screened also for anti-*P. orientalis* IgG2 and 88% of Ethiopian sera revealed significantly higher IgG2 than control sera.

The next aim was to detect if canine sera from Ethiopia with anti-*P. orientalis* antibodies react with other bloodsucking insect saliva by using immunoblotting method. In saliva of sand fly *Sergentomyia schwetzi*, which is abundant in Ethiopia, canine sera reacted mostly with 36, 37 and 51 kDa proteins. Mosquito *Culex quinquefasciatus* is cosmopolitan species and canine sera most intensely recognized 22 and 58 kDa proteins. Ethiopian canine sera also cross-reacted with the 50 kDa protein band in New World sand fly *Lutzomyia longipalpis* saliva. Mouse experimentally bitten by *P. orientalis* cross-reacted with *L. longipalpis* saliva but no cross-reaction was observed with *S. schwetzi* and *C. quinquefasciatus* salivary antigens.

In the third part salivary glands protein profile from two colonies of *P. orientalis*, which come from different areas was analyzed by using MALDI TOF/TOF analyzer. It was found out that the salivary proteins did not differ. We recorded 12 proteins belonging to the 7 families: yellow-related, apyrase, D7-related, PpSP15-like, Ag5-related, ParSP25-like a PpSP32-like. Canine sera from Ethiopia recognised on immunoblot mostly proteins from ParSP25-like (32kDa), apyrase (37, 38, 40 kDa) and yellow- related (42, 44 kDa) families.

Key words: Ethiopia, *Phlebotomus orientalis*, domestic animals, antibody response, protein profile, cross-reactions

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 LITERÁRNY PREHĽAD.....	10
2.1 Viscerálna leishmanióza	10
2.2 Viscerálna leishmanióza v krajinách východnej Afriky	10
2.3 Úloha <i>Phlebotomus orientalis</i> v prenose VL.....	14
2.3.1 <i>Phlebotomus orientalis</i> ako prenášač VL.....	15
2.3.2 Habitat <i>Phlebotomus orientalis</i>	16
2.3.3 Sezonálnosť <i>Phlebotomus orientalis</i>	17
2.3.4 Správanie a vývoj <i>Phlebotomus orientalis</i>	18
2.3.5 Rizikové mapy výskytu <i>Phlebotomus orientalis</i>	18
2.3.6 Kontrola <i>Phlebotomus orientalis</i> a ochrana osôb	19
2.4 Úloha zvierat v prenose <i>Leishmania donovani</i>	21
2.5 Využitie protilátkovej odpovede proti slinám flebotomov a iných krvsajúcich článkonožcov	23
3 METODIKA	27
3.1 Chov flebotomov	27
3.2 Pitvanie slinných žliaz	27
3.3 Odoberanie sér	28
3.4 ELISA	29
3.5 Elektroforéza (SDS – PAGE)	31
3.6 Imunoblot.....	32
3.7 Farbenie gélu striebrom	33
3.8 Hmotnostná spektrometria	34
3.9 Štatistika a použité programy.....	34
4 VÝSLEDKY	36
4.1 Protilátková odpoveď domácich zvierat na pobodanie <i>Phlebotomus orientalis</i>	36
4.1.1 Protilátková odpoveď u psích sér.....	36
4.1.2 Protilátková odpoveď u sér z hovädzieho dobytku	39
4.1.3 Protilátková odpoveď u kozích sér.....	40
4.1.4 Protilátková odpoveď u ovčích sér.....	41
4.1.5 Protilátková odpoveď u somárích sér.....	42
4.2 Imunobloting proteínov slinných žliaz flebotomov so psími sérami.....	44
4.3 Proteínový profil <i>Phlebotomus orientalis</i>	48

5 DISKUSIA.....	50
6 ZÁVEREČNÉ ZHRNUTIE.....	59
7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	60

1 ÚVOD

Viscerálna leishmanióza je ochorenie vyskytujúce sa vo viac ako 60 krajinách sveta, jej pôvodcami sú leishmánie z komplexu *Leishmania donovani*. Vo východnej Afrike je viscerálna leishmanióza pomerne rozšírená, k najviac postihnutým krajinám patrí i Etiópia. Za posledné roky sa tu okrem známych endemických oblastí objavili nové lokality s hlásenými prípadmi viscerálnej leishmaniózy na severe a severozápade krajiny. Predpokladaným vektorom *L. donovani* v Etiópii je *Phlebotomus orientalis* (podrod *Larroussius*). Doteraz tu nie je stále vyjasnený spôsob prenosu ochorenia, môže sa teda jednať o antroponózu alebo zoonózu, poprípade môžu byť oba typy prenosu prepojené. Predpokladá sa, že počas epidémií je prenos antroponotický, ale v obdobiach medzi epidémiami koluje ochorenie v rámci rezervoárových hostiteľov, ktorí nie sú doteraz známi. Zároveň nie je známe na akých hostiteľoch *P. orientalis* saje a akú úlohu majú v prenose viscerálnej leishmaniózy domáce zvieratá.

Počas satia na hostiteľovi injikuje flebotomus do rany sliny, ktoré stimulujú protilátkovú a bunecnú imunitu. O protilátkach proti zložkám slinných žliaz flebotomov sa uvažuje ako o možnom ukazovateli expozície flebotomom hlavne z dôvodu, že protilátková odpoveď je druhovo špecifická. Protilátky by sa dali využiť aj ako ukazovatele rizika prenosu leishmaniózy na hostiteľa.

Phlebotomus orientalis je vo východnej Afrike druhom pomerne rozšíreným. V našej práci sme protilátkovú odpoveď využili k tomu, aby sme zistili či domáce zvieratá z endemických oblastí severnej a severozápadnej Etiópie prichádzajú do styku s *P. orientalis*. Chceli sme tak objasniť správanie tohto flebotoma a tiež úlohu domácich zvierat v cykle leishmaniózy. Ďalej sme ako prví skúmali proteínové zloženie jeho slinných žliaz a možné skrížené reakcie s inými druhmi krvsajúceho hmyzu. Analýza proteínového profilu slín je prínosná hlavne z hľadiska identifikácie imunodominantných proteínov a ich následnej produkcie v podobe rekombinantov. Rekombinantné proteíny by sa dali využiť ako vhodné ukazovatele expozície, čím by sa vyriešil problém získavania slinných žliaz pitvaním, keďže tento postup je časovo náročný a pracný. Ďalšou dôležitou výhodou by bolo zvýšenie špecificity reakcií, keďže by sa znížilo riziko možných skrížených reakcií medzi jednotlivými druhmi krvsajúceho hmyzu.

Hlavné ciele tejto diplomovej práce preto boli:

- zistiť, či domáce zvieratá z Etiópie z endemických oblastí VL majú protilátky proti *P. orientalis*
- zistiť, ktoré proteíny *P. orientalis* sú najviac rozpoznávané protilátkami v sérach a či dochádza k skríženým reakciám s inými druhmi krvsajúceho hmyzu
- analyzovať proteínový profil *P. orientalis* pomocou MALDI TOF/TOF analyzéra a porovnať proteínový profil dvoch kolónii *P. orientalis* z rôznych lokalít

2 LITERÁRNY PREHĽAD

2.1 Viscerálna leishmanióza

Leishmanióza je ochorenie prenášané flebotomami na ľudí a zvieratá. Pôvodcom sú obligátne intracelulárne protozoa z rodu *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatida) parazitujúce v makrofágoch. Endemicky sa toto ochorenie vyskytuje v oblastiach trópov a subtrópov. Je spôsobné viac ako 20 druhmi leishmanií a na ľudí je prenášané viac ako 30 druhmi flebotomov. V životnom cykle strieda leishmania dve odlišné formy: flagelárnu promastigotnú formu v čreve vektora a amastigotnú formu, ktorá sa vyvíja intracelulárne v cicavčom hostiteľovi. Iba samice flebotomov sú schopné preniesť ochorenie inokuláciou promastigotov do kože hostiteľa. Parazity sú následne internalizované dendritickými bunkami a makrofágmi v koži a dochádza k ich transformácií na amastigoty. Nákaza je ďalej diseminovaná cez lymfatický a vaskulárny systém (zhrnuté v Chappuis a kol., 2007).

Leishmanióza sa môže prejavovať v podobe 3 hlavných klinických foriem ako viscerálna, kožná a muko-kutánná leishmanióza. Viscerálna leishmanióza (VL, kala-azar) je systémové ochorenie, ktoré ak nie je liečené, má fatálne následky. Pôvodcom sú leishmanie z *Leishmania donovani* complex: sú to *L. donovani* sensu stricto vo východnej Afrike a Indickom subkontinente a *Leishmania infantum* v oblasti Mediteránu, Blízkeho východu a Strednej Ázie po Pakistan, Číny, Strednej a Južnej Amerike (zhrnuté v Gramiccia a Gradoni, 2005). Prenos VL môže mať charakter:

- zoonózy – prenos zo zvieratá na človeka prostredníctvom flebotoma; charakteristické pre *L. infantum*, kde hlavným rezervoárovým zvieratkom sú psy
- antroponózy – prenos z človeka na človek prostredníctvom flebotoma; charakteristické pre *L. donovani* v Indii (zhrnuté v Chappuis a kol., 2007)

Inkubačná doba ochorenia trvá 2 – 6 mesiacov a hlavnými symptómami je horúčka, strata váhy, hepato/splenomegália, lymfadenopatia a anémia (zhrnuté v Chappuis a kol., 2007). Výskyt VL je hlásený v 65 krajinách, ročne sa objavuje asi 500 000 nových prípadov, 90 % prípadov je z chudobných vidieckych a suburbánnych oblastí Bangladéšu, Indii, Nepálu, Sudánu a Brazílie (Desjeux, 2004).

2.2 Viscerálna leishmanióza v krajinách východnej Afriky

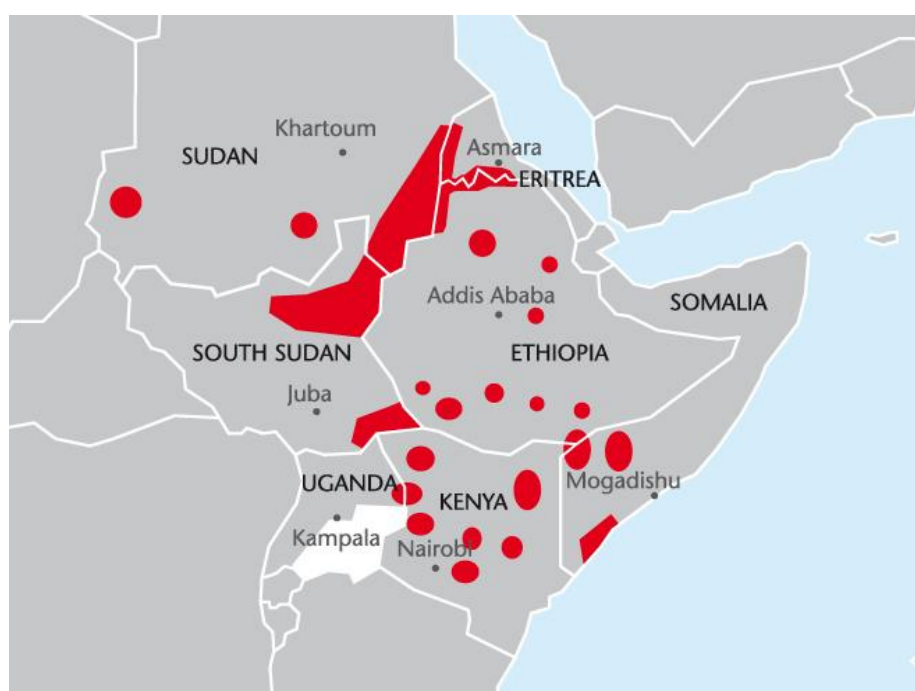
Najviac postihnutými krajinami východnej Afriky sú Sudán, Keňa, Uganda, Somálsko a Etiópia. V Sudáne je hlavným endemickým regiónom s výskytom viscerálnej leishmaniózy oblasť východu krajiny pozdĺž hraníc s Etiópiou (El-Safi a kol., 2002; Dereure a kol., 2003) a oblasť západného Horného Nílu v Južnom Sudáne (Seaman a kol., 1996; Collin a kol.,

2004) (Obrázok 1). Jedna z najhorších zaznamenaných epidémií, ktorá sa odohrala v oblasti západného Horného Nílu, zabila v rokoch 1984 – 1994 približne 100 000 ľudí, teda jednu tretinu obyvateľstva tejto oblasti. Od roku 1984, kedy epidémia začala, bola hlásená 38 – 57% úmrtnosť. Pritom v oblasti západného Horného Nílu nebol do roku 1984 zaznamenaný žiaden prípad VL. Hlavnými faktormi vzniku tejto epidémie bol začiatok vojnového konfliktu v tejto oblasti s následným sťahovaním obyvateľstva (pravdepodobné zavlečenie infekcie z endemických oblastí), narušením infraštruktúry, zdravotníckej starostlivosti a nedostatkom potravy (Seaman a kol., 1996).

V Keni je VL endemická v polopúštnych oblastiach zahrňujúcich kraje západnej a severozápadnej provincie Rift Valley a kraje centrálnej a južnej Východnej provincie. Nové prípady VL boli hlásené v rokoch 2000 – 2001 z predtým neendemickej oblasti Severovýchodnej provincie (zhrnuté v Tonui, 2006) (Obrázok 1).

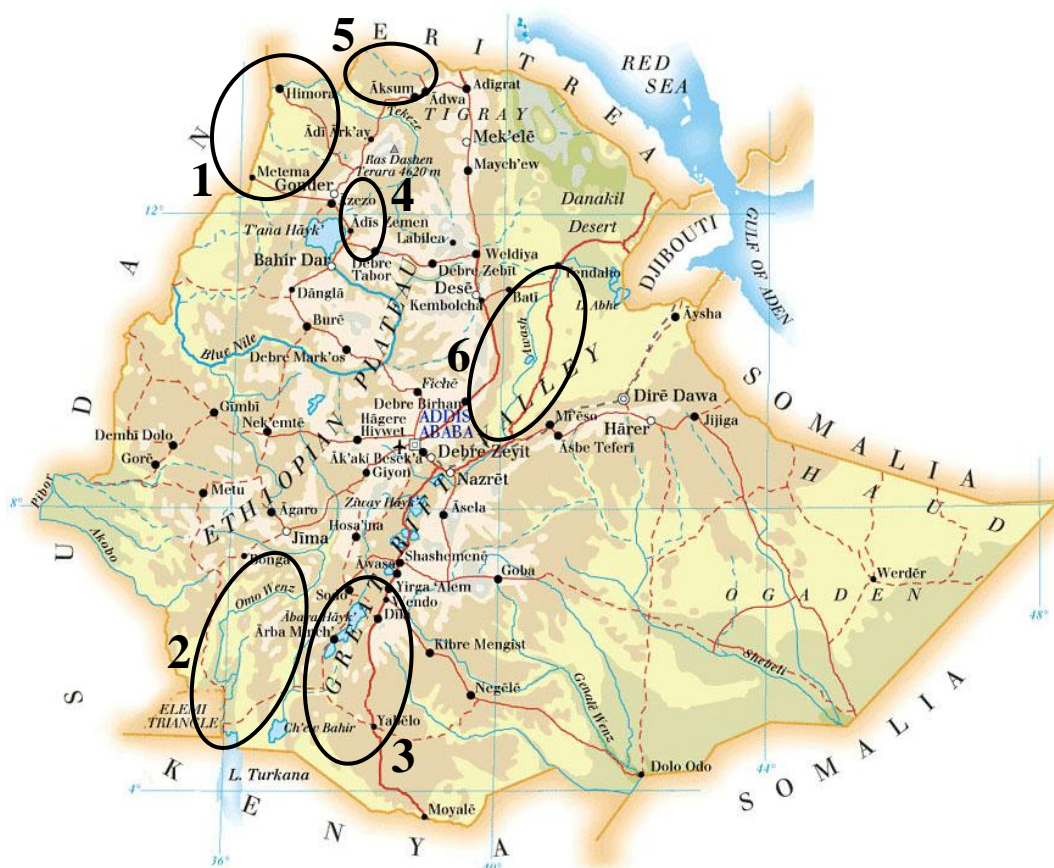
V Ugande je výskyt ochorenia obmedzený na polopúštne nížiny v oblasti Pokot na východe krajiny. Jedná sa o pokračovanie endemickej oblasti Západný Pokot (provincia Rift Valley) v Keni (zhrnuté v Ngure a kol., 2009) (Obrázok 1).

V Somálsku je VL hlásená z oblastí na juhu krajiny zahrňujúcich pobrežné lokality, oblasť popri rieke Shebelle a región Dolná Juba a z mesta Baidoa v regióne Bay v centrálnej časti juhu krajiny (zhrnuté v Ngure a kol., 2009) (Obrázok 1). Situácia v Somálsku je ale veľmi neprehľadná hlavne z dôvodu pretrvávajúcich politických a vojnových konfliktov.



Obrázok 1. Endemické oblasti s VL v krajinách východnej Afriky (situácia v roku 2011) (upravené podľa <http://endtheneglect.org>)

V Etiópii bol prvý prípad VL dokumentovaný v roku 1942 v južnej časti krajiny. V súčasnosti je odhadovaný počet prípadov 2000 až 4500 za rok. Endemické oblasti sa nachádzajú v nížinách severozápadu krajiny, v centrálnej, južnej a juhozápadnej časti krajiny (WHO) (Obrázok 2). Situácia v Etiópii bude rozobraná podrobnejšie, pretože naše testované séra i kolónie flebotomov *Phlebotomus orientalis* a *Sergentomyia schwetzi* pochádzajú práve z Etiópie.



Obrázok 2. Lokality s hláseným a predpokladaným výskytom VL v Etiópii (situácia v roku 2011): 1 nížiny severozápadu; 2 nížiny Omo (juhozápad krajiny); 3 roviny Aba Roba (juh krajiny); 4 vysočiny severozápadu; 5 oblasť Sheraro (sever krajiny); 6 dolina Awash (severovýchod krajiny) (upravené podľa <http://www.worldmapfinder.com>)

Nížiny severozápadu (Obrázok 2, oblasť [1]) (500 – 700 m.n.m.) v okolí Humery (región Tigray) a Metemy (región Amhara) popri hraniciach so Sudánom majú incidenciu 1000 – 2000 prípadov za rok (zhrnuté v Ngure a kol., 2009). V tejto oblasti je hlásená i vysoká proporcia pacientov s VL, ktorí sú zároveň infikovaný s HIV. Medzi rokmi 1998 až 2006 vzrástlo percento koinfikovaných pacientov z 18,5 % na 40 % (zhrnuté v Alvar a kol., 2008). Lyons a kol. (2003) vo svojej štúdií, ktorá prebiehala v regióne Tigray (severná Etiópie) zistili, že VL-HIV koinfikovaný pacienti majú 4x vyššie riziko úmrtia ako pacienti s VL ale HIV negatívny.

Ďalším dlhodobo známym endemickým ohniskom VL je oblasť juhozápadnej a južnej Etiópie, ktorá zahrňuje nížiny okolo rieky Omo a roviny Aba Roba (Obrázok 2, oblasť [2, 3]). Väčšina oblasti sa nachádza v nadmorskej výške 375 – 1000 m.n.m. (Fuller a kol., 1979; Ayle a Ali, 1984).

V roku 2005 bol pozorovaný nárast prípadov VL v kraji (wereda) Libo Kemkem (región Amhara) vo vysočinách (2000 m.n.m.) severozápadnej Etiópie (Obrázok 2, oblasť [4]). V tejto oblasti bolo predtým zaznamenaných iba niekoľko prípadov, ktoré boli pravdepodobne do tejto oblasti zanesené robotníkmi vracajúcimi sa zo sezónnych prác v nížinách na hraniciach so Sudánom. Epidémia začala v subkraji (kebele) Bura v kraji Libo Kemkem v roku 2003, následne bol v roku 2004 zaznamenaný výrazný nárast ďalších prípadov a úmrtí. Podobný trend bol aj v roku 2005, kedy od mája do júna bolo diagnostikovaných 201 nových VL prípadov a 7 úmrtí. Nárast prípadov bol pozorovaný aj v ďalších subkrajoch kraja Libo Kemkem a susediaceho kraja Fogera. V poslednej tretine roku 2005 počty prípadov VL kulminovali. V priebehu rokov 2006 – 2007 síce došlo k znižovaniu počtu prípadov, ale bez náznaku vymiznutia ochorenia z oblasti, dá sa teda predpokladať, že sa jedná o novú endemickú oblasť VL v Etiópii (Alvar a kol., 2007; Herrero a kol. 2009). Celkovo bolo do decembra 2007 ošetrovaných 2450 pacientov s VL (Bashaye a kol., 2009). Predpokladá sa, že počet ohlásených prípadov VL tvorilo iba menej ako polovicu z celkového množstva, veľké percento pacientov pravdepodobne zomrelo ešte pred nasadením liečby (Alvar a kol., 2007).

Za spúšťajúcu udalosť vzniku epidémie v kraji Libo Kemkem sa považovala introdukcia parazita prostredníctvom sezónnych robotníkov vracajúcich sa domov z oblasti nížin pri hraniciach so Sudánom (Alvar a kol., 2007; Bashaye a kol., 2009). Muži, ktorí pracovali v blízkosti hraníc so Sudánom (oblasť Humera-Metema) vykazovali vyššiu pozitivitu v leishmaniovom kožnom teste (intradermálne injikované promastigoty *L. major*; následne sa po 48 – 72 hodinách sleduje prítomnosť kožnej zdureniny ako následok imunitnej reakcie oneskoreného typu) ako muži, ktorí zostali doma. Do styku s ochorením prišli pravdepodobne v mieste sezónnych prác. U týchto mužov, ale nebola vyššia incidencia VL v porovnaní s mužmi, ktorí necestovali a preto hypotézu zavlečenia VL do neendemických oblastí sezónnymi robotníkmi nie je možné považovať za potvrdenú (Alvar a kol., 2007).

V roku 2010 bolo zaznamenaných 30 prípadov VL v predtým neendemickú oblasti Sheraro nachádzajúcej sa v severnej Etiópii (Obrázok 2, oblasť [5]) (1200 m.n.m., región Tigray). Je možné, že sa jedná o novú endemickú lokalitu VL (WHO).

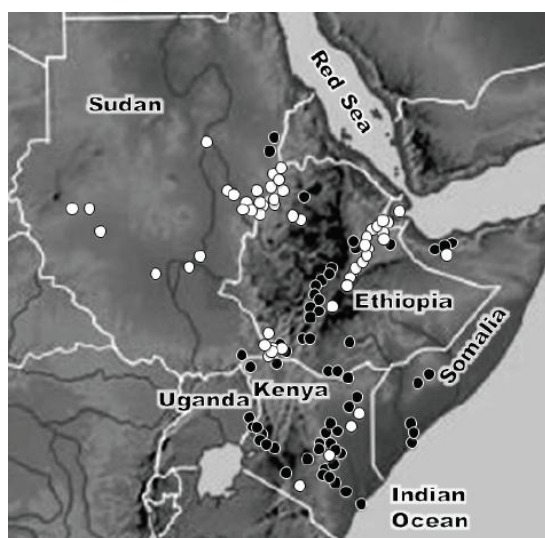
Jednou z ďalších možných endemických oblastí VL by mohla byť oblasť strednej časti doliny Awash na severovýchode krajiny (Obrázok 2, oblasť [6]) (región Afar). Jedná sa

o nížiny (700 – 850 m.n.m.) s vysokými teplotami a priaznivými mikro-habitatmi pre vývoj vektorov leishmaniózy. Ali a kol. (2002) testovali v rokoch 1994 – 1996 pozitívitu ľudí z tejto oblasti na leishmaniový kožný test. Najvyššia prevalencia 63 % bola dosiahnutá v lokalite Melka Werer. Aj napriek vysokej pozitivite kožných testov tu nebol potvrdený žiaden prípad VL. Podobné výsledky boli získané aj v oblasti dolnej časti doliny Awash, ktorá má zhodné prírodné podmienky so strednou časťou. Testovanie ľudí na leishmaniový kožný test prebiehalo v rokoch 1996 – 1997, pozitívna odpoveď na test bola v rozmedzí 19 – 85 %, ale rovnako ako v strednej časti doliny Awash, nebol zaznamenaný žiaden prípad VL (Ali a kol., 2004). Ali a kol. (2002, 2004) vysvetľujú tento stav tým, že sa jedná pravdepodobne o subklinické prejavy ochorenia alebo o nákazu neinfekčnými druhmi leishmanií.

2.3 Úloha *Phlebotomus orientalis* v prenose VL

Phlebotomus orientalis (Parrot) patrí do podrodu *Larroussius*, ktorý sa nachádza hlavne v Palearktickej oblasti a zahrňuje väčšinu vektorov VL v Starom svete (Lewis a kol., 1974). Je prítomný v rozľahlých areáloch väčšiny krajín východnej Afriky (Obrázok 3):

- Etiópia – nížiny severozápadu (Humera-Metema) (Gebre-Michael a kol., 2010); vysočiny severozápadu (Libo Kemkem) (Gebre-Michael a kol., 2007); roviny Omo na juhozápade (Hailu a kol., 1995, Balkew a kol., 1999); severovýchodná oblasť (dolina Awash) (Gebre-Michael a kol., 2004a)
- Sudán – východná časť krajiny (Elnaiem a kol., 1997; Elnaiem a kol., 1998, Lambert a kol., 2002; Hassan a kol., 2004), oblasť západného Horného Nílu v Južnom Sudáne (Schorscher a Goris, 1992)
- Keňa – kraj Isiolo v centrálnej časti (Východná provincia) (Ngumbi a kol., 2010)



○ *P. orientalis* ● *P. martini*

Obrázok 3. Výskyt *P. orientalis* a *P. martini* (upravené podľa Elnaiem, 2011)

2.3.1 *Phlebotomus orientalis* ako prenášač VL

Phlebotomus orientalis je potvrdeným vektorom VL v Sudáne, jedná sa hlavne o regióny východného Sudánu s lesnými i rurálnymi oblasťami (Elnaiem a Osman, 1998; Elnaiem a kol., 2001; Hassan a kol., 2004; Hassan a kol., 2008) a Južného Sudánu v oblasti západného Horného Nílu (Schorscher a Goris, 1992). Aktívny prenos VL v rurálnom prostredí východného Sudánu bol prvýkrát zaznamenaný v dedine Umsalala (Elnaiem a Osman, 1998). Výsledky Elnaiema a Osmana (1998) potvrdil Hassan a kol. (2004), ktorí vyšetrovali flebotomov na prítomnosť promastigotov *L. donovani* v dedinách s endemickým výskytom VL vo východnom Sudáne (vrátane dediny Umsalala). Percento infikovaných flebotomov sa nachádzalo v rozhraní 1,8 – 3,7 %.

V Etiópii je *P. orientalis* považovaný za pravdepodobného vektora VL. Doteraz ale nebol vo väčšine ohnísk zaznamenaný žiaden nález flebotoma infikovaného *L. donovani*, a to ani v oblasti nížin (Humera-Metema), ani v oblasti vysočín (Libo Kemkem) (Gebre-Michael a kol., 2007; Gebre-Michael a kol., 2010). Možným vysvetlením týchto výsledkov je malý počet vyšetrovaných flebotomov alebo nevhodná doba a miesto zberu (nízka pravdepodobnosť prenosu v obdobiach sucha a v miestach s preliečenými prípadmi VL vo vysočinách). Hypotéza o úlohe *P. orientalis* ako vektora je ale podporená jeho hojným výskytom v lokalitách nížin a vysočín s VL (Gebre-Michael a kol., 2007; Gebre-Michael a kol., 2010) a potvrdeným prenosom VL v Sudáne (Elnaiem a Osman, 1998; Elnaiem a kol., 2001; Hassan a kol., 2004; Hassan a kol., 2008). Vo výskume, ktorý prebiehal v oblasti rovín Omo v juhozápadnej Etiópii bolo medzi 70 samicami flebotomov nájdená i jedna infikovaná *L. donovani*. *Phlebotomus orientalis* je v tejto lokalite zastúpený v pomerne veľkom množstve, čiže sa dá predpokladať, že úvahy o prenose VL *P. orientalis* sú správne (Hailu a kol., 1995). *Phlebotomus orientalis* bol nájdený vo vysokom množstve v oblasti doliny Awash, ale aj napriek tomu, že je táto lokalita predpokladanou endemickou oblasťou s VL, nebol nájdený žiaden flebotomus infikovaný promastigotmi *L. donovani* (Gebre-Michael a kol., 2004a).

Na juhu Etiópie v oblasti Aba Roba je potvrdeným primárnym vektorom VL *P. martini* a sekundárnym *P. celiae*. (zhrnuté v Elnaiem, 2011). *Phlebotomus martini* je primárnym vektorom VL aj v Keni, kde je jeho vývoj asociovaný s termitiskami. Možným sekundárnym vektorom by v Keni mohol byť *P. orientalis*, ktorý bol nájdený v centrálnej časti krajiny s hláseným výskytom VL (kraj Isiolo). Túto domnienku podporuje aj to, že v tejto oblasti nie je *P. martini* prítomný (Ngumbi a kol., 2010). *Phlebotomus martini* je i predpokladaným vektorom VL v Ugande a Somálsku (zhrnuté v Elnaiem, 2011).

2.3.2 Habitat *Phlebotomus orientalis*

Výskyt *P. orientalis* vo východnom Sudáne je výrazne ovplyvnený typom prítomnej vegetácie. Výrazná asociácia flebotoma s akáciou egyptskou (*Acacia seyal*) kontrastuje s jeho relatívne malým výskytom v habitatoch charakteristických kulanom egyptským (*Balanites aegyptiaca*), *Combretum kordofanum* (Obrázok 4) alebo riečnou vegetáciou (Elnaiem a kol., 1997; Elnaiem a kol., 1999b). Tento jav môže byť zapríčinený viacerými spolu pôsobiacimi alebo individuálnymi faktormi zabezpečujúcimi vhodné prostredie pre flebotoma. Oblasti s akáciou egyptskou sú hustejšie porastené stromami ako oblasti s kulanom egyptským a zabezpečujú tak flebotomovi nižšie teploty a vyššiu vlhkosť. Jedným z ďalších faktorov vysvetľujúcich túto špecifickú asociáciu by mohlo byť využívanie akácií ako zdrojov cukrov (Elnaiem a kol., 1997; Elnaiem a kol., 1999b). Porovnaním cukrov prítomných v čreve flebotomov s cukrami v extraktoch listov, ovocia a exudátov rastlín zo skúmanej oblasti bolo zistené, že ako zdroj ovocných cukrov slúžia pre flebotomov stromy kulan egyptský a *C. kordofanum* a tiež medovina vošiek (*Aphididae*) a puklíc (*Coccidae*) (Hamilton a Elnaiem, 2000).



Obrázok 4. **Habitat *P. orientalis* vo východnom Sudáne: A.** les tvorený akáciou egyptskou; **B.** dedina s endemickým výskytom VL a s riedkym porastom kulana egyptského (upravené podľa Elnaiem, 2011)

Na základe asociácie flebotomov s akáciami a vysokými percentom výskytu flebotomov v lesných habitatoch a nízkym percentom výskytu v ľudských sídlach sa predpokladalo, že *P. orientalis* je takmer výhradne lesný druh a k nákaze ľudí VL dochádza hlavne počas pobytu v lesoch (Schorscher a Goris, 1992; Elnaiem a kol., 1997; Elnaiem a kol., 1999b). Tento predpoklad však spochybnil Lambert a kol. (2002), ktorí počas niekoľkoročných zberov (1997 – 2000, január, apríl, máj) zaznamenali pomerne vysokú prítomnosť *P. orientalis* v ľudských sídlach východného Sudánu a zároveň pozorovali jasnú sezonalitu vo výskyte flebotomov. Výsledky Lamberta a kol. (2002) potvrdili i Hassan a kol. (2004) s predpokladom, že za fluktuáciou výskytu *P. orientalis* v rurálnych lokalitách je ich

nestabilné prostredie. Autori presne nedefinovali, čo je treba chápať pod pojmom nestabilné prostredie, ale dá sa predpokladať, že vplyvom väčších odlesnených plôch v rurálnom prostredí dochádza k výkyvom teploty a vlhkosti.

Asociácia *P. orientalis* s akáciovými lesmi bola pozorovaná i v Etiópií, konkrétne v doline Awash a v oblastiach s hustými lesmi s prevahou akácií. Nižší počet flebotomov bol nájdený v oblastiach s riedkymi lesmi alebo v oblastiach upravených pre poľnohospodárske účely na severozápade krajiny (Gebre-Michael a kol., 2004b).

2.3.3 Sezonalita *Phlebotomus orientalis*

Na základe výsledkov výskumu, ktorý mapoval výskyt flebotomov v centrálnom Sudáne v oblasti Horného Nílu (oblasť Paloich) sa zistilo, že sa flebotomia v tejto lokalite delia na nesezónne druhy (prítomné počas celého roku) a sezónne. *Phlebotomus orientalis* patrí k druhej skupine, je teda sezónnym druhom. V malých množstvách sa objavuje na začiatku obdobia sucha (január – február), výrazný nárast populácie nastáva počas druhej polovice obdobia sucha (apríl) a k vymiznutiu dochádza na začiatku obdobia dažďov (jún) (Quate, 1964).

K iným záverom ale prišla štúdia z východného Sudánu, ktorá zaznamenala najvyššie počty flebotomov na začiatku obdobia dažďov (jún). Jednalo sa o lokalitu Národného parku Dinder, kde sezónna fluktuácia v počtoch *P. orientalis* korelovala s teplotou a vlhkosťou. Najvyššie počty boli dosiahnuté keď priemerná teplota bola <30 °C a relatívna vlhkosť bola >30 % (podmienky charakteristické pre zimné obdobie od novembra do februára a začiatok sezóny dažďov v júny). Suché teplé obdobie od marca do mája strávi flebotomus pravdepodobne ako dormantná larva, dormancia je prerušená až obdobím dažďov v júny (Elnaiem a kol., 1997). Tento rozdiel v sezónnom výskyte medzi oblasťami centrálného a východného Sudánu je pravdepodobne spôsobený rozdielnymi environmentálnymi podmienkami týchto lokalít (Elnaiem a kol., 1997).

Elnaiem a kol. (1997) skúmali zároveň aj sezónnu distribúciu flebotoma mimo oblasti národného parku, konkrétne sa jednalo o dedinu Umsalala, v ktorej bol detekovaný prenos *L. donovani* *P. orientalis* (Elnaiem a Osman, 1998). Umsalala je oddelená od Národného parku Dinder riekou Rahad. Klíma je podobná národnému parku, rozdiel je hlavne v malom množstve vegetácie (dominancia kulmanov), ktorá bola odstránená pre poľnohospodárske účely. V tejto lokalite nebola pozorovaná žiadna sezonalita vo výskyte *P. orientalis*, flebotomy tu boli prítomné v malých množstvách každý mesiac počas celého roku (Elnaiem a kol., 1997).

2.3.4 Správanie a vývoj *Phlebotomus orientalis*

Nočná aktivita *P. orientalis* bola študovaná viacerými autormi, ktorí ale prišli k odlišným záverom, keďže štúdie prebiehali v rôznych lokalitách. Podľa Quate (1964) začínali flebotomovia v oblasti Paloich (centrálny Sudán) bodat' pred zotmením, od 18:30 do 21:00, s postupne klesajúcou intenzitou. Ak boli flebotomovia prítomní vo väčšom množstve, ich aktivita trvala až do 22:00. Podobnú nočnú aktivitu mali aj flebotomovia v oblasti východného Sudánu (Elnaiem a kol., 1999b). Naproti tomu v lokalite západného Horného Nílu sali flebotomovia na ľudoch počas celej noci a ich aktivita prichádzala vo vlnách (Schorscher a Goris, 1992).

Je len veľmi málo informácií o miestach, kde dochádza k vývoji *P. orientalis* a miestach odpočinku. Predpokladá sa, že larválny vývoj *P. orientalis* prebieha v hlbokých prasklinách vertisolov (pôda s vysokým podielom ílu, rýchlo schne a vytvára tak trhliny) (Elnaiem a kol., 1998), ale táto hypotéza nebola doteraz potvrdená.

Elnaiem a kol. (1997) odchytili vo východnom Sudáne flebotomov na čiastočne erodovaných termitiskách *Macrotermes herus*. Tieto termitiská predstavujú pravdepodobne vhodné miesto k odpočinku, z dôvodu relatívne nízkej a stabilnej teploty a vysokej vlhkosti počas dňa. Žiadne jedince neboli nájdené v ľudských obydliach, kurníkoch, dutinách stromov a v prasklinách v pôde (Elnaiem a kol., 1997). V juhozápadnej Etiópií bol *P. orientalis* nájdený v termitiskách, prasklinách v pôde, zvieracích norách a skalných stenách (Balkew a kol., 1999).

V juhozápadnej Etiópií a v Južnom Sudáne nebol žiaden flebotomus odchytený v ľudských obydliach (Schorscher a Goris, 1992; Balkew a kol., 1999). Odlišné výsledky získali ale Lambert a kol. (2002), ktorí počas zberov prebiehajúcich vo východnom Sudáne v suchom teplom období (apríl, máj) a zimnom období (január) našli až 75 % zástupcov druhu *P. orientalis* vo vnútri obydlií. Rozdiely flebotomov v ich endofilnom správaní môžu byť spôsobené rôznou mierou adaptácie na život vnútri budov, použitými materiálmi na stavbu domov alebo odlišnými mikroklimatickými podmienkami (zhrnuté v Elnaiem, 2011).

2.3.5 Rizikové mapy výskytu *Phlebotomus orientalis*

Tvorba rizikových máp je dôležitá nielen pri určovaní súčasnej geografickej distribúcie *P. orientalis* ale aj pri predpovedaní výskytu tohto flebotoma v meniacich sa klimatických a environmentálnych podmienkach (Elnaiem a kol., 1998; Thomson a kol., 1999; Gebre-Michael a kol., 2004b). Existuje niekoľko typov rizikových máp výskytu *P. orientalis*, každá analyzovala získané dáta iným spôsobom a získala tak odlišné výsledky.

Elnaiem a kol. (1998) použili pri mapovaní dáta zo zberov flebotomov, z popisov

lokalít a zo satelitného výskumu zo 44 lesných lokalít zo savanovej oblasti Sudánu (zahrňujúc územia od etiópskych hraníc na východe po Darfur na západe). *Phlebotomus orientalis* bol chytený na 17 lokalitách hlavne z východnej časti Sudánu, lokality bez *P. orientalis* sa nachádzali prevažne na západe. Na základe získaných výsledkov bola nájdená významná asociácia medzi *P. orientalis* a prítomnosťou akácie egyptskej, kulanom egyptským a vertisolmi. Vertisoly môžu mať nepriamy vplyv na lokálnu mikroklimu, vegetáciu a faunu. Miesta s pozitívnym výskytom *P. orientalis* mali oproti negatívnym miestam významne vyššiu ročnú priemernú maximálnu (36 °C) a minimálnu dennú teplotu (20 °C) a ročné priemerné maximum normalizačného diferenciačného vegetačného indexu (NDVI, grafický indikátor, ktorý určuje či pozorované miesto má živú zelenú vegetáciu alebo nie) (Elnaiem a kol., 1998).

Thomson a kol. (1999) použili dáta získané z vyššie spomenutej štúdie Elnaiem a kol. (1998) na analýzu pomocou modelu logistickej regresie. Zistili, že ročná priemerná maximálna denná teplota a typ pôdy sú dôležitými prvkami ovplyvňujúcimi distribúciu *P. orientalis*. Na základe tejto analýzy sa *P. orientalis* vyskytuje v oblastiach s priemernými zrážkami 400 – 1200 mm a ročnou priemernou maximálnou dennou teplotou v rozmedzí 34 – 38 °C. V rámci tejto lokality je prítomnosť vektora determinovaná typom pôdy a výskytom akácií a kulanov.

Gebre-Michael a kol. (2004b) analyzovali distribúciu *P. orientalis* použitím geografického informačného systému (GIS). Dáta použité na analýzu boli získané z predchádzajúcich zberov flebotomov hlavne z Etiópie, Keni a Somálska. Jediným dôležitým determinantom pre výskyt *P. orientalis* bola povrchová teplota krajiny v rozmedzí 23 – 36 °C (Land surface temperature, LST). Na rozdiel od Elnaiema a kol. (1998) a Thomsona a kol. (1999) nepredstavuje typ pôdy vhodný determinant pre výskyt *P. orientalis* (Gebre-Michael a kol., 2004b).

2.3.6 Kontrola *Phlebotomus orientalis* a ochrana osôb

Doteraz nie sú k dispozícii žiadne vhodné metódy kontroly *P. orientalis*. Inklinácia flebotoma k lesnému habitatu výrazne eliminuje možnosti kontroly vektora pomocou sprejovania reziduálnymi insekticídmi. Nedostatok znalostí o miestach vývoja a odpočinku flebotomov obmedzuje akékoľvek plány na elimináciu dospelcov alebo larválnych štádií vo vonkajších priestoroch. Jednou z možností kontroly *P. orientalis* v hustých porastoch akácií bolo aplikovanie insekticídov v podobe hmly. Týmto spôsobom však došlo iba k prechodnej redukcii v hustote flebotomov s následnou reinváziou zo susedných oblastí (zhrnuté v Elnaiem, 2011).

Schopnosť moskytiér (polyester, 100 DEN) impregnovaných pyretroidmi (lambda-cyhalothrin) zabrániť pobodaniu *P. orientalis* skúmal Elnaiem a kol. (1999a). Zistili, že ľudia spiaci pod takto ošetrovanými sieťami mali kompletnú ochranu proti pobodaniu na rozdiel od ľudí spiacich bez moskytiér alebo s moskytiérami, ale neošetrovaných insekticídmi. V prípade neošetrovaných moskytiér boli flebotomovia schopný prejsť cez jej oká. Používanie moskytiér ošetrovaných insekticídmi (deltamethrin) v oblastiach s endemickým výskytom VL v Indii, Nepále a Bangladéši viedlo k zníženiu hustoty výskytu *P. argentipes* v obydliach (Mondal a kol., 2010; Picado a kol., 2010; Chowdhury a kol., 2011). Insekticídmi ošetrované moskytiéry majú zároveň aj vplyv na prenos VL. V oblasti vysočín severovýchodnej Etiópie bolo vlastníctvo ošetrenej moskytiéry spojené s nižším rizikom prenosu, ale tento faktor nebol štatisticky významný v porovnaní s kontrolnou skupinou (Bashaye a kol., 2009). Výsledky analýzy z východného Sudánu indikujú potenciálne silnú redukciu v incidencii VL používaním insekticídmi (deltamethrin) ošetrovaných moskytiér (75 DEN alebo 47 dier/cm²) v dedinách s výskytom VL (Ritmeijer a kol., 2007). Znížené percento infekcie *P. orientalis* *L. donovani* bol pozorované v dedine, kde používali ošetrované moskytiéry v porovnaní s dedinami, kde moskytiéry použité neboli (Hassan a kol., 2004).

Jedným z dôležitých spôsobov kontroly zoonotickej VL patrí aj aplikovanie insekticídov na zvieratá buď v podobe pour-on alebo obojkov. Dôležité je nielen zníženie počtu flebotomov sajúcich na zvieratách ale aj zníženie prežívania samíc po satí a tak zabránenie prenosu leishmaniózy na ďalšieho hostiteľa. Laboratórne psy s obojkami ošetrovanými insekticídmi (deltamethrin) boli ochránené pred 96 % poštípání *P. perniciosus* a táto ochrana trvala po dobu 34 týždňov. Mortalita flebotomov bola <16 % u psov bez obojku a >45 % u psov z obojkom (Killick-Kendrick a kol., 1997). Maroli a kol. (2001) testovali deltamethrinom ošetrované obojky pre psov v teréne v oblasti s výskytom *L. infantum* a s vektorom *P. perniciosus* na juhu Talianska (región Campania). Zistili, že používanie obojkov má zanedbateľný vplyv na incidenciu psej leishmaniózy počas obdobia s minimálnym prenosom ochorenia alebo v oblastiach s malým endemickým výskytom. V opačných podmienkach zabezpečoval obojok pre psov vysokú protekciu. V Iráne zabezpečili insekticídmi ošetrované obojky (deltamethrin) nielen protekciu psov pred *L. infantum* ale zároveň aj znížili riziko infekcie týmto patogénom u detí (Mazloumi Gavvani a kol., 2002). Vzhľadom k zoofágnyim preferenciám *P. orientalis* je možné uvažovať o možnosti ošetrovania hovädzieho dobytku insekticídmi pomocou sprejovania alebo použitím obojkov ako v prípade psov (Gebre-Michael a kol., 2010).

2.4 Úloha zvierat v prenose *Leishmania donovani*

VL môže mať charakter zoonózy alebo antroponózy. Domáci pes je hlavným rezervoárom *L. infantum* v oblasti Mediteránu, Blízkeho východu a Strednej Ázie po Pakistan, Číny, Strednej a Južnej Ameriky (zhrnuté v [Gramiccia a Gradoni, 2005; Baneth a kol., 2008]). Vo východnom Sudáne bola izoenzymatickou analýzou identifikovaná u domácich psov prítomnosť troch druhov leishmanií, a to *L. infantum*, *L. archibaldi* a *L. donovani*, s dominantným zastúpením *L. infantum* (Dereure a kol., 2000; Dereure a kol., 2003). Validita *L. archibaldi* bola spochybnená molekulárnymi štúdiami Jamjoom a kol. (2004) a Lukeš a kol. (2007). Z nich vyplýva, že *L. infantum* a *L. donovani* sú jediné rozpoznávané druhy v *L. donovani* komplex. Na základe týchto výsledkov by sa tiež mali všetky východoafrické kmene leishmanií zahrňujúce pôvodne *L. archibaldi* a *L. infantum* klasifikovať ako druh *Leishmania donovani* sensu stricto.

Vo východnej Afrike sa prenos *L. donovani* môže uplatňovať oboma spôsobmi, doteraz tu nebol ešte potvrdený žiaden rezervoárový hositeľ (zhrnuté v [Chappuis a kol., 2007; Elnaiem, 2011]). Predpokladá sa, že počas epidémií dochádza k antroponotickému prenosu bez intervencie rezervoárového hositeľa. Epidémie majú ale krátkodobý charakter a musia tak vznikáť z reziduálnych ohnísk, ktoré je nutné do budúcnosti podrobne popísať (zhrnuté v Ashford, 1996).

V oblasti vysočín severozápadnej Etiópie bolo v dedinách s hláseným výskytom VL nájdených iba 3,8 % psov pozitívnych v imunoflorescenčnom protilátkovom teste (IFAT - Immunofluorescent antibody test) a zároveň aj v ELISA teste (Enzyme linked immunosorbent assay). Leishmaniová DNA bola nájdená iba u 2,8 % psov. Táto nízka prevalencia infikovaných psov bola veľmi prekvapivá, je ale možné, že bola spôsobená vysokou mortalitou infikovaných psov počas epidémie VL v tejto oblasti. Zároveň bola nájdená i silná asociácia medzi vlastníctvom psa a rizikom infekcie človeka VL, žiadna asociácia nebola nájdená v prípade vlastníctva hovädzieho dobytku, somárov a kôz (Bashaye a kol., 2009). Hassan a kol. (2009) v oblasti východného Sudánu našli 6,9 % psov sérologicky pozitívnych na *L. donovani*. Výsledky získané zo skúmania hositeľských preferencií *P. orientalis* indikovali, že pes je pre flebotoma veľmi atraktívnym hositeľom. Druhým najviac atraktívnym hositeľom pre flebotoma bola promyka ichneumon (*Herpestes ichneumon*) (Hassan a kol., 2009), ktorá je pravdepodobným sylvatickým rezervoárom *L. donovani* (Elnaiem a kol., 2001).

Úloha divo žijúcich zvierat ako sylvatického rezervoára je predpokladaná i v prenose *L. infantum*. V Južnej Amerike vhodného rezervoárového hositeľa predstavuje líška maikong (*Cerdocyon thous*) a vačica opossum (*Didelphis marsupialis*) (Lainson a kol., 1990;

Travi a kol., 1998; Gomes a kol., 2007), v Iráne bola infekcia *L. infantum* nájdená u vlka, líšky a šakala (Mohebalí a kol., 2005).

Pri prenose *L. donovani* môžu hrať významnú úlohu aj domáce zvieratá. Vo východnom Sudáne bolo u kráv zaznamenané vysoké percento reaktivity (21,4 %) s *L. donovani* antigénom v priamom aglutinačnom teste (DAT – Direct Agglutination Test). Tie isté séra boli použité aj v ELISA teste, kde protilátky proti *L. donovani* malo 47,6 % kráv. Dá sa teda predpokladať, že tieto zvieratá prišli do styku s leishmániovou infekciou (Mukhtar a kol., 2000). V severozápadnej Etiópii (Humera-Metema) bolo na základe analýzy krvi nasatej samicami *P. orientalis* zistené, že 92 % flebotomov salo na hovädzom dobytku, 2 % na ľuďoch a 2,6 % salo na hovädzom dobytku aj na ľuďoch. Autori si tieto výsledky vysvetľujú exofágny správaním *P. orientalis*, keďže minimum flebotomov bolo chytených vnútri domov (je možné, že pri vstupe do obydľia im bráni prítomnosť dymu z ohniska). Ďalším vysvetlením môže byť i to, že i keď ľudia prespávajú vonku v prípade stráženia hovädzieho dobytku alebo horúceho počasia, sú prikrýti prikrývkami a tak redukujú kontakt s flebotomami. Žiaden z chytených flebotomov ale nebol infikovaný *L. donovani* (Gebre-Michael a kol., 2010). V endemickej oblasti Pokot v Keni a Ugande s vektorom *P. martini* bolo zistené na základe dotazníkového prieskumu, že ošetrovanie hovädzieho dobytku insekticídmi súvisí s vyšším rizikom vzniku ochorenia u ľudí, naopak spanie blízko hovädzieho dobytku toto riziko znižuje. Z toho vyplýva, že aplikované insekticídy majú na flebotomov pravdepodobne repelentný účinok. Flebotomovia sú tak nútení vyhľadávať iných hostiteľov, ako napríklad človeka (Kolaczinski a kol., 2008).

Analýza pôvodu nasatej krvi v čreve flebotomov bola použitá aj na určenie hostiteľských preferencií *P. argentipes* (Dinesh a kol., 2001; Palit a kol., 2005), ktorý je vektorom *L. donovani* na Indickom subkontinente s antroponotickým charakterom prenosu (zhrnuté v Bora, 1999). Bolo zistené, že *P. argentipes* preferuje viac satie na hovädzom dobytku ako na ľuďoch (Dinesh a kol., 2001; Palit a kol., 2005). Úloha hovädzieho dobytku v epidemiológii VL na Indickom subkontinente nie je stále jasne definovaná. Podľa niektorých štúdií je vlastníctvo hovädzieho dobytku pre ľudí rizikovým faktorom infekcie *L. donovani* (Saha a kol., 2009; zhrnuté v Bern a kol., 2010), podľa iných hovädzí dobytok môže mať protektívnu úlohu a chrániť ľudí tak pred VL (zhrnuté v Bern a kol., 2010). Iná štúdia zas popísala, že hovädzí dobytok nemá na vznik ochorenia žiaden vplyv a dôležité sú podmienky bývania (Singh a kol., 2010). Na základe týchto poznatkov Alam a kol. (2011) skúmali úlohu hovädzieho dobytku v prenose VL v endemickej lokalite v Bangladéši. Pomocou ELISA testu zistili, že 9,4 % zvierat malo vytvorené protilátky proti *L. donovani*. Z týchto zvierat bolo ale iba 30,8 % pozitívnych v DAT. DNA parazita nebola nájdená

u žiadneho z testovaných_zvierat. Pravdepodobne nebol parazit schopný prežiť alebo sa množiť v hostiteľovi. Do úvahy spadá aj možnosť skríženej reakcie s iným ochorením. Bhattarai a kol. (2010) našli leishmaniovú DNA u 5 % kráv z endemickej oblasti s VL v Nepále.

Aj u ďalších domácich zvierat, ako napríklad u kôz a somárov vo východnom Sudáne bola pozorovaná prítomnosť protilátok proti *L. donovani*. U somárov vykazovalo v DAT teste až 68,7 % vzoriek vysokú aglutinačnú aktivitu, u kôz to bolo 8,5 %. Kozie séra boli analyzované aj pomocou ELISA testu, kde pozitívnych bolo 13,6 % sér (Mukhtar a kol., 2000). Vysoké percento kôz infikovaných *L. donovani* (16 %) bolo nájdené v Nepále. Predpokladá sa, že kozy môžu byť zapojené do dynamiky VL ale nemusí to ešte znamenať, že sú rezervoárom tohto patogénu (Bhattarai a kol., 2010).

Anjili a kol. (1998) intradermálne infikovali ovce kultúrou promastigotov *L. donovani*. Odoberanie aspirátov z miesta inokulácie, pečene a sleziny po dobu 244 dní ukázalo, že paraziti sú schopný prežívať v koži 28 dní po infekcii, zatiaľ čo kultúry aspirátov z pečene a sleziny boli po celú dobu negatívne. Jediným pozorovateľným symptómom bola pyrexia. Na základe týchto výsledkov sa dá predpokladať, že ovce nie sú vnímavé na infekciu *L. donovani* a nepredstavujú preto vhodný rezervoár tohto ochorenia.

2.5 Využitie protilátkovej odpovede proti slinám flebotomov a iných krvsajúcich článkonožcov

Počas satia krvi flebotomus injikuje do rany sliny obsahujúce farmakologicky aktívne látky s rôznorodými účinkami na hostiteľovu hemostatickú odpoveď. Komponenty slín hrajú dôležitú úlohu vo vnímavosti hostiteľa na infekciu leishmániami a v závažnosti prejavov ochorenia (zhrnuté v [Kamhawi, 2000; Rohoušová a Volf, 2006; Gomes a Oliveira, 2012]).

U hostiteľa vystaveného opakovanému pobodaniu neinfikovaných flebotomov vzniká protilátková i bunčná imunita. K tvorbe protilátok proti slinným žľazám flebotomov dochádza u zvierat i u ľudí. U myši sa tvoria najmä protilátky typu IgG1, u ľudí sú to okrem IgG1 protilátok aj IgG2, IgG4 a IgE protilátky. Bunčná imunita je taktiež ovplyvnená preexpozíciou slinným žľazám flebotomov. Slinné žľazy indukujú infiltráciu zápalových buniek do miesta poranenia, jedná sa napríklad o CD4⁺ lymfocyty, neutrofilny, eosinofily, monocyty/makrofágy a dendritické bunky (zhrnuté v [Rohoušová a Volf, 2006; Andrade a Teixeira, 2012]).

Protilátková odpoveď hostiteľa na antigény slín flebotomov je druhovo špecifická. Napríklad séra z myši pobodaných *P. papatasi* nereagovali s antigénmi slinných žliaz *P.*

perniciosus a *P. halepensis* (Volf a Rohoušová, 2001). Slabá skřížená reakcia bola ale zaznamenaná medzi *P. papatasi* a *P. sergenti*, no takmer žiadna reakcia nebola pozorovaná s antigénmi slín *Lutzomyia longipalpis* (Rohoušová a kol., 2005).

U ľudí sa uvažuje o využití protilátok proti slinám flebotomov ako ukazovateľov expozície a aj ako ukazovateľov rizika prenosu leishmání, čo znamená, že vyššie hladiny protilátok v sére odkazujú na vyššiu expozíciu a tým aj na zvýšenú pravdepodobnosť prenosu patogéna na hostiteľa. V lokalite Sanliurfa v Turecku s endemickým výskytom *L. tropica* (pôvodca kožnej leishmaniózy) sú *P. sergenti* a *P. papatasi* druhmi s početným zastúpením. Vektorom tohto ochorenia je *P. sergenti*. Zistilo sa, že pacienti s aktívnymi léziami spôsobenými *L. tropica* mali signifikantne vyššie hodnoty protilátok proti slinným žľazám *P. sergenti* ako zdraví jedinci z tej istej lokality, zatiaľ čo hodnoty protilátok proti slinám *P. papatasi* boli u oboch skupín rovnaké (Rohoušová a kol., 2005). Podobne to bolo i v prípade detí žijúcich v endemickej oblasti VL v Brazílii. Signifikantná korelácia bola nájdená medzi protilátkami proti slinným žľazám *L. longipalpis* a DTH odpoveďou na leishmaniový antigén (Barral a kol., 2000). Clements a kol. (2010) zistili, že ľudia žijúci v endemickej oblasti s výskytom VL v Indii majú vyššie hladiny protilátok proti slinám *P. argentipes* ako ľudia z neendemickej oblasti. Prostredníctvom predabsorbcie sér proti konkurenčnému, ale VL neprenášajúcemu druhu *P. papatasi* signifikantne zlepšili špecificitu ELISA testu s antigénom *P. argentipes*. Bez predabsorbcie nebol zaznamenaný signifikantný rozdiel medzi hladinami IgG protilátok proti *P. argentipes* u sér z endemickej a neendemickej oblasti výskytu VL, opačne tomu bolo pri použití predabsorbcie, kde signifikantný rozdiel bol výrazný.

Rovnako ako protilátky proti slinám flebotomov by sa dali využiť aj protilátky proti slinám iného krvsajúceho hmyzu. Využitie protilátok ako ukazovateľa rizika prenosu malárie bolo skúmané v štúdií zo Senegalu z oblasti so sezónnym prenosom *Plasmodium falciparum*. Špecifické IgG protilátky proti slinám *Anopheles gambiae* boli vyššie u detí, u ktorých sa vyvinula klinická malária počas nasledujúcich troch mesiacov ako u detí bez vyvinutej klinickej malárie (Remoue a kol., 2006). Protilátková odpoveď proti slinám komárov by sa mohla taktiež využívať ako imuno-epidemiologický nástroj na stanovenie miery expozície (Fontaine a kol., 2011; Doucoure a kol., 2012). Fontaine a kol. (2011) skúmali v juhovýchodnom Francúzsku protilátkovú odpoveď na pobodanie *Aedes caspius* u ľudí žijúcich v troch odlišných ekologických prostrediach s odlišnými hustotami výskytu *A. caspius*. Zistili, že špecifická IgG odpoveď proti slinám *A. caspius* súvisí so sezónnymi a geografickými variáciami v hustote tohto komára. Zároveň zistili, že priemerná hladina IgG protilátok sa zvyšovala počas obdobia s najväčším výskytom *A. caspius* a po štyroch

mesiacoch, kedy bola expozícia minimálna sa vrátila na bazálnu hladinu, čo pravdepodobne znamená krátku životnosť IgG protilátok proti slinným antigénom. K rovnakému záveru prišli i Remoue a kol. (2006), keďže hladiny IgG protilátok proti *A. gambiae* sa znížili počas troch mesiacov (intenzita expozície počas tohto obdobia klesala) u detí s nízkou alebo strednou hladinou expozície.

V Brazílii bola u pacientov s Chagasovou chorobou a jedincov žijúcich v oblastiach s výskytom *Triatoma infestans* hladina IgG protilátok proti slinám tejto plošnice výrazne vyššia ako u jedincov žijúcich v prostredí bez výskytu tohto druhu. Najčastejšie sa vyskytujúcim typom protilátok u jedincov z oblasti s *T. infestans* boli protilátky typu IgG1, druhým najčastejšie sa vyskytujúcim typom boli IgG4 protilátky (Nascimento a kol., 2001). Zvýšené hladiny IgG protilátok boli pozorované i u myší a kurčiat vystavených pobodaniu *T. infestans* (Volf a kol., 1993; Hecht a kol., 2006). Protilátková odpoveď domácich zvierat (sliedky, morčatá) proti slinným antigénom triatom by sa dala využiť ako monitoring expozície znovu sa objavujúcich druhov triatom z dôvodu obmedzenia kontrolných kampaní (Schwarz a kol., 2009a; Schwarz a kol., 2009b). Vhodný epidemiologický ukazovateľ expozície predstavuje rekombinantný proteín zo slinných žliaz *T. infestans*, pomocou ktorého je možné zaznamenať IgG protilátky proti odlišným druhom triatom pri minimálnej expozícii (Schwarz a kol., 2009a). Nevýhodou IgG protilátok ale je ich dlhodobé pretrvávanie v sérach, znemožňuje to totiž kontrolu fungovania kontrolných programov na eradikáciu triatom (Schwarz a kol., 2009a; Schwarz a kol., 2009b). Schwarz a kol. (2010) zistili, že IgM protilátky u kurčiat proti rekombinantnému proteínu ale i proti celým slinným žľazám sú detekovateľné už po jednom dni po expozícii malým množstvom triatom a sú merateľné iba do 18 dní po expozícii. IgM protilátky sú tak javia byť vhodným typom na detekciu recentnej expozície.

Ak už bolo spomenuté v kapitole 2.4, zvieratá hrajú dôležitú úlohu v cykle leishmaniózy, preto je meranie protilátok proti slinám flebotomov nielen dôležitým ukazovateľom expozície a rizika prenosu leishmanií ale umožňuje aj vyhodnocovanie efektivity anti-vektorových kampaní (Gomes a kol., 2007; Hostomská a kol., 2008, Vlková a kol., 2011).

V laboratórnych pokusoch so psami experimentálne pobodanými *P. perniciosus* a *L. longipalpis* bol sledovaný signifikantný nárast IgG, IgG1 a IgG2 protilátok proti slinám týchto flebotomov. Špecifické IgG, IgG1 a IgG2 protilátky korelovali s množstvom nasatých samíc *L. longipalpis* a *P. perniciosus*. Na základe týchto výsledkov je možné považovať IgG a jeho podtriedy za vhodné ukazovatele expozície (Hostomská a kol., 2008; Vlková a kol., 2011). Špecifická IgE odpoveď sa vyvinula iba u niektorých psov a nebol pozorovaný žiaden

súvis medzi hladinou IgE protilátok a intenzitou expozície, čo znamená, že IgE nepredstavujú vhodný ukazovateľ expozície (Hostomská a kol., 2008). Dynamika IgG a IgG2 protilátok mala v priebehu niekoľkých týždňov veľmi podobný priebeh (Hostomská a kol., 2008; Vlková a kol., 2011). Hladiny IgG2 protilátok v sérach experimentálne pobodaných psov prevyšovali hodnoty IgG1 protilátok (Hostomská a kol., 2008; Vlková a kol., 2011), rovnako to bolo i u psov experimentálne imunizovaných rekombinantnými proteínmi *L. longipalpis* (Collin a kol., 2009). Rozdiel v produkcii IgG1 a IgG2 protilátok je pravdepodobne spôsobený ich odlišnou reguláciou (Hostomská a kol., 2008). Mazza a kol. (1994) zistili, že hladiny IgG1 a IgG2 protilátok u zdravých psov majú rovnaké hodnoty, ale u psov so zápalovými alebo imunitnými chorobami boli hladiny IgG2 protilátok už výrazné zvýšené.

U psov prirodzene vystavených pobodaniu *P. perniciosus* z lokality s endemickým výskytom *L. infantum* (provincia Bari, južné Taliansko) bol pozorovaný nárast špecifických IgG, IgG1 a IgG2 protilátok počas sezóny flebotomov. Psi s diagnostikovanou leishmaniózou a zdraví psi sa štatisticky nelíšili v produkcii IgG a IgG1 protilátok ale líšili sa v produkcii IgG2 protilátok. Psi s leishmaniózou mali nižšie IgG2 protilátky proti *P. perniciosus* na začiatku a konci sezóny flebotomov. Bola nájdená negatívna korelácia medzi hladinami IgG2 protilátok a rizikom prenosu leishmaniózy. Dá sa teda predpokladať, že psy s nízkou hladinou IgG2 protilátok mali vyššie riziko infekcie leishmaniózou alebo leishmaniová infekcia znížila produkciu IgG2 protilátok u pobodaných psov. Prvá hypotéza sa zdá byť pravdepodobnejšia, keďže psy s VL mali nižšie hladiny INF- γ (dôležitá úloha v Th1 imunitnej odpovedi, eliminuje leishmaniovú infekciu) v porovnaní so zdravými psami aj keď tento rozdiel nebol signifikantný (Vlková a kol., 2011).

Gomes a kol. (2007) použili ako jedny medzi prvými metódu stanovenia protilátok ako ukazovateľa miery expozície u divo žijúcich zvierat. Testovali líšky z endemických oblastí VL v Brazílii na prítomnosť protilátok proti slinám *L. longipalpis*. U všetkých testovaných líšok boli pozorované vyššie hladiny protilátok ako u psov a ľudí z tej istej oblasti. U žiadnej z líšok neboli pozorované protilátky proti *L. infantum*, no u troch bola diagnostikovaná prítomnosť *Leishmania* sp. Autori na základe týchto dát predpokladajú, že divo žijúce zvieratá prichádzajú častejšie do kontaktu s *L. longipalpis* ako domáce zvieratá a že prirodzené ohnisko prenosu leishmaniózy existuje nezávisle na prenose medzi psami a ľuďmi.

3 METODIKA

3.1 Chov flebotomov

V laboratórnych podmienkach máme zavedený chov dvoch kolónií druhu *P. orientalis*, ktoré sú pôvodom z Etiópie:

- kolónia Addis Zemen – vysočiny severozápadnej Etiópie (región Amhara, 2000 m.n.m.); jedná sa o lokalitu s endemickým výskytom VL
- kolónia Melka Werer – nížiny východnej Etiópie, ktoré sú súčasťou Veľkej priekopovej prepadliny (región Afar, 800 m.n.m.); v tejto lokalite nebol doteraz hlásený žiaden prípad VL

Starostlivosť o kolónie prebieha štandardným postupom (Volf a Volfová, 2011). Dospelce i larvy sú udržiavané pri teplote 26 °C a pri vlhkosti 70 – 95 %. Dospelce sú umiestnené v monofilových sieťach natiiahnutých na kovových konštrukciách a zabalených v igelitových vreciach, vlhkosť je udržiavaná pomocou navlhčenej vaty. Larvy sa vyvíjajú v plastových kelímkoch pokrytých na stenách a dne navlhčenou sadrou. Kelímky sú umiestnené v plastových uzavierateľných dózach, na dne ktorých je vlhký piesok.

Samice sajú 1 – 2x do týždňa na Balb/c myšiach (chov katedry parazitológie) alebo králikovi (Chinchilla Bastard, AnLab). Nasaté samice sú následne vytriedené pomocou exhaustoru do malej siete a po týždni (samice sú už vydefekované) sú premiestnené do navlhčených kelímkov. Po 8 – 9 dňoch od satia nakladú vajíčka, z ktorých sa po týždni vyľiahnu larvy. Larválny vývoj trvá približne mesiac. Dospelce, ktoré začínajú vyletovať po 10 dňoch od zakuklenia sú vypúšťané do novej siete. Ako potrava im slúži vata navlhčená 50% roztokom cukru s penicilínom (Biotika) v pomere 100 µl penicilínu (1000 U/µl) na 20 ml roztoku cukru, potravou pre larvy je zmes fermentovaných králičích bobkov a králičích peliet.

3.2 Pitvanie slinných žliaz

Na pitvy slinných žliaz boli použité minimálne tri dni staré samice. Samiciam uspaným na ľade boli odtrhnuté končatiny a následne boli vložené do kvapky 10-krát zriedeného Tris pufru (pH 7,6) na podložnom sklíčku umiestnenom pod binokulárnou lupou. Pomocou pinzety a pitvacích nástrojov (špajdľa s napichnutou minunciou) bola najprv oddelená hlavička od tela. Na hlavičke zostali dva páry slinných žliaz, ktoré boli odobraté pomocou pitvacích nástrojov a umiestnené do mikroskúmvky s 10x zriedeným Tris pufrom a skladované pri teplote -20 °C. Na naše pokusy boli používané množstvá 20 slinných žliaz v 20 µl 10x zriedeného Tris pufru. Na ELISA testy a imunobloting sme používali slinné žľazy

z kolónie *P. orientalis* Melka Werer z dôvodu lepšieho stavu kolónie.

Použitie roztoky:

zásobný Tris pufor

- 200 mM Tris (Sigma); 1500 mM NaCl; pH 7,6

3.3 Odoberanie sér

- **odoberanie sér z domácich zvierat z oblasti endemickej VL**

V spolupráci so Školou veterinárnej medicíny Hebrejskej univerzity v Izraeli (Prof. Gad Baneth) a Fakultou medicíny Univerzity v Addis Abebe v Etiópii (Prof. Asrat Hailu) bol v roku 2010 zabezpečený odber sér z domácich zvierat z troch endemických lokalít VL v severnej a severozápadnej Etiópii. Na začiatku októbra (6. – 9. 10. 2010) bolo v lokalite Addis Zemen zozbieraných 111 sér a v lokalite Sheraro 155 sér. Na konci novembra (27. – 30. 11. 2010) bolo v lokalite Humera získaných 280 sér. Séra boli odoberané z 5 druhov domácich zvierat (Tabuľka 1). Každý vzorke bolo priradené identifikačné číslo a podľa možností boli zaznamenané nasledujúce informácie: pohlavie, približný vek (mláďa, dospelý, starý), prípadné známky klinického ochorenia, meno vlastníka farmy a GPS súradnice.

Odber krvi prebiehal vždy za prítomnosti veterinára alebo jeho asistenta a po získaní súhlasu majiteľa zvierat. Imobilizovanému zvieratú bolo z vena jugularis pomocou jednorazovej injekčnej ihly (21G) odobraných asi 5 ml krvi, časť bola odobraná do plastovej skúmavky s protizrážanlivou úpravou (BD Vacutainer® K2E) na následnú determináciu leishmaniovej DNA (Gad Baneth a Dalit Talmi-Frank, Škola veterinárnej medicíny Hebrejskej univerzity v Izraeli), druhá časť určená k serologickému vyšetreniu bola prenesená do sklenenej skúmavky bez protizrážanlivej úpravy. Zviera, ktorému bola odobraná krv bolo označené na hlave liehovým fixom, aby nedošlo k zámene. U psov prebiehal odber krvi z bezpečnostných dôvodov z vena saphena.

Vzorky boli spracované hneď v deň odberu. Sérum zo zrazenej krvi určené na detekciu anti-*P.orientalis* protilátok bolo ošetrené 1% roztokom azidu sodného a až do leteckého transportu uchovávané pri teplote -20 °C. Po prevoze do Českej republiky boli vzorky uskladnené pri teplote -70 °C. Zo zásobných sér boli následne urobené aliquoty po 150 µl a uskladnené pri teplote -20 °C.

Ako negatívne kontroly slúžili séra z domácich zvierat z rôznych oblastí Českej republiky (Fakulta veterinárneho lekárstva v Brne, Štátny veterinárny ústav v Prahe), spolu 110 sér (Tabuľka 1). Negatívne kontroly k psím séram pochádzali z Rumunska (Fakulta veterinárneho lekárstva v Brne) (15 sér) a z laboratórnych chovov (Bayer, Nemecko) (20 sér).

Tabuľka 1. Počty odobratých sér u jednotlivých zvierat z Etiópie a Českej republiky

LOKALITA ZVIERA	ADDIS ZEMEN	SHERARO	HUMERA	SUMA	ČR
PES	19	7	8	34	
HOVÄDZÍ DOBYTOK	62	26	16	104	33
KOZA		106	133	239	21
OVCA	27	5	117	149	32
SOMÁR	3	11	6	20	16 kôň 8 somár
SUMA	111	155	280	546	110

- **odoberanie sér z myši z laboratórnych chovov**

Séra boli získané z laboratórnych chovov Balb/c myši (chov katedry parazitológie) používaných na satie pre kolónie flebotomov a pre kolóniu komárov. Použité myši boli minimálne 2x saté väčším počtom flebotomov alebo komárov (100 a viac). Krv bola odobraná z nastrihutej špičky chvostíka do $\frac{3}{4}$ výšky heparinizovanej kapiláry (odobrané maximálne 2 kapiláry z každej myši). Kapilára bola následne zatavená na čistom konci a centrifugovaná (MPW 310, rotor CM 304) pri 6000 otáčkach/min po dobu 5 minút. Pomocou diamantovej ceruzky bola kapilára narezaná na rozhraní krviniek a séra a balónikom bolo sérum vyfúknuté do mikroskúmavky. Séra boli skladované pri teplote -20°C .

3.4 ELISA

Na stanovenie protilátkovej odpovede proti slinám *P. orientalis* Melka Werer u domácich zvierat z endemických oblastí VL bola použitá metóda ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). U všetkých zvierat boli merané IgG protilátky, u psov boli merané i IgG2 protilátky.

Slinné žľazy zhomogenizované dvojnásobným rozmrazením a zmrazením v tekutom dusíku, boli nariadené do naväzovacieho roztoku (20 mM karbonát-bikarbonát, pH 9) v množstve 1/5 žľazy na 100 μl naväzovacieho roztoku (40 ng proteínov na jamku) a nanesené do jamiek 96 jamkovej mikrotitračnej doštičky (CovaLink™ NUNC). Inkubácia prebiehla cez noc pri teplote 4°C .

Druhý deň boli jamky 2x premyté PBS-Tween (pH 7,2) a inkubované 6% blokovacím sérom riedeným v PBS-Tween (Tabuľka 2) po dobu 60 minút pri teplote 37°C . Po skončení inkubácie boli jamky znovu 3x premyté. Do jamiek boli v duplikátoch nanesené séra testovaných zvierat riedené v 2% blokovacom sére v PBS-Tween (Tabuľka 2). Nasledovala 90

minútová inkubácia pri teplote 37 °C. V ďalšom kroku boli jamky 6x premyté a inkubované 45 minút pri teplote 37 °C s konjugátom s naviazanou sekundárnou protilátkou s peroxidázou (riedený v PBS-Tween, Tabuľka 2). Po opätovnom šesťnásobnom premytí bol do jamiek nanesený substrátový roztok (McIlweina fosfát-citrát, pH 5,5) s peroxidom vodíka a orto-fenyléndiamínom. Mikrotitračná doštička bola zakrytá hliníkovou fóliou a po dobu 6 – 10 minút sa pri izbovej teplote v tme vyvolávala farebná reakcia. Po ukončení vyvolávania bola reakcia zastavená 10% roztokom kyseliny sírovej. Absorbancia bola meraná fluorometrom (Tecan Infinite M200) pri 492 nm.

Všetky roztoky boli nanášané do mikrotitračnej doštičky v objeme 100 µl na jamku. V priebežných pokusoch boli vytitrované optimálne koncentrácie sér a konjugátov a najvhodnejšie druhy blokovacích sér viz Tabuľka 2.

Tabuľka 2. Riedenia sér, konjugátov a použité blokovacie séra

ZVIERA	RIEDENIE			BLOKOVANIE, RIEDENIE VZORIEK
	SÉRA	KONJUGÁT		
PES	1:200	1:3000	Sheep Anti Dog IgG (Bethyl)	nízkotučné mlieko (Bio-Rad)
	1:200	1:3000	Goat Anti Dog IgG2 (Bethyl)	nízkotučné mlieko (Bio-Rad)
KRAVA	1:200	1:10 000	Goat Anti Bovine IgG (JIR)	slepačie sérum (Vector)
KOZA	1:50	1:5000	Rabbit Anti Goat IgG (Novus Biological)	králičie sérum (Vector)
OVCA	1:50	1:10 000	Rabbit Anti Sheep IgG (Novus Biological)	koňské sérum (Invitrogen)
SOMÁR	1:50	1:5000	Rabbit Anti Donkey IgG (Novus Biological)	králičie sérum (Vector)

Použité roztoky:

naväzovací roztok

- 20 mM Na₂CO₃ – NaHCO₃; pH 9,0

PBS

- 150 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄.12H₂O; 1 mM KH₂PO₄; pH 7,2

PBS-Tween

- 10x zriedený PBS; 0,05% Tween 20 (Serva); pH 7,2

substrátový roztok (McIlweina fosfát-citrát)

- 0,11 M Na₂HPO₄.12H₂O; 0,5 M kyselina citrónová; pH 5,5; tesne pred použitím pridať do 10 ml fosfát-citrátového pufru 5 mg OPD (o-fenyléndiamin, Sigma) a 10 µl H₂O₂

3.5 Elektroforéza (SDS – PAGE)

Na separáciu proteínov prítomných v slinných žľazách *P. orientalis*, *L. longipalpis*, *Sergentomyia schwetzi* a *Culex quinquefasciatus* bola využitá metóda vertikálnej elektroforézy (SDS-PAGE) za neredukujúcich podmienok. Tieto druhy boli zvolené, pretože sme chceli zistiť či dochádza k skríženým reakciám etiópskych psích sér s *L. longipalpis*, ktorá sa v Starom svete nenachádza a či okrem toho etiópske psie séra rozpoznávajú proteíny slinných žliaz *S. schwetzi* a *C. quinquefasciatus*, ktoré sú vo východnej Afrike početne zastúpené. Separácia prebiehala na 0,75 mm hrubých polyakrylamidových géloch pozostávajúcich z vrchného 4% štartovacieho a spodného 12,5% separačného gélu.

Pred nanesením na gél, bol k slinným žľazám pridaný neredukujúci vzorkový pufor v pomere 2:1 (2 diely vzorky:1 diel pufu). Mikroskúmavky so slinnými žľazami a pufrom boli následne povarené 3 minúty. Do spojených dvoch jamiek 10 jamkového hrebeňa bolo nanášaných po 30 žľazách v 30 μ l Tris pufu (6 – 12 μ g proteínov), do nespojených jamiek 10 jamkového hrebeňa 10 žliaz v 10 μ l Tris pufu (2 – 4 μ g proteínov). Štandard (Invitroge BenchMark, cat.no. 10747-012) bol nanášaný po 4 μ l do jednej jamky 10 jamkového hrebeňa. Separácia prebiehala v prostredí SDS pufu, pri limitnom napätí 200 V v Mini-PROTEAN 3 aparátúre (Bio-Rad). Gél bol po ukončení separácie preblotovaný na nitrocelulózovú membránu (imunoblot) a následne bol farbený striebrom (viz kapitola 3.7).

Použité roztoky:

neredukujúci vzorkový pufor

- 0,6 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8); 5 ml 50% glycerolu; 2 ml 10% SDS; 1 ml 1% brómfenolovej modrej; 1,4 ml dH₂O; pri redukovajúcom vzorkovom pufri nahradíme 50 μ l dH₂O 50 μ l 2-merkaptotetanolu (rozrušenie S-S mostíkov)

roztok A

- 40% akrylamid, bis-akrylamid (Bio-Rad)

roztok B

- 75 ml 2 M Tris-HCl (pH 8,8); 4 ml 10% SDS; 21 ml dH₂O

roztok C

- 50 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8); 4 ml 10% SDS; 46 ml dH₂O

roztok G

- 10% ammonium persulfát

štartovací gél (4%)

- 0,4 ml roztoku A; 1 ml roztoku C; 2,6 ml dH₂O; 5 μ l TEMED (AppliChem); 40 μ l roztoku G

separačný gél (12,5%)

- 2,5 ml roztoku A; 2 ml roztoku B; 3,5 ml dH₂O; 5 µl TEMED (AppliChem); 50 µl roztoku G

SDS pufor

- Tris/Glycin/SDS pufor (Bio-Rad); 25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS; pH 8,3

3.6 Imunoblot

Pomocou imunoblotu sme detekovali proteíny slinných žliaz flebotomov o určitej molekulovej veľkosti rozpoznávané špecifickými protilátkami v psích sérach z Etiópie a laboratórnych myší.

Gél bol po ukončení separácie proteínov preblotovaný na nitrocelulózovú membránu pomocou iBLOT aparatury (Invitrogen, komponenty potrebné k blotovaniu tiež od firmy Invitrogen). Na zviditeľnenie preblotovaných proteínov bola membrána reverzibilne farbená pomocou červenej farbičky Ponceau S po dobu 6 – 10 minút. Po ukončení farbenia bola membrána premytá destilovanou vodou a narezaná na prúžky. Časť membrány so štandardom a proteínovými profilmi použitých slinných žliaz bola ireverzibilne zafarbená amidočerňou po dobu 1 minúty. Prebytočná farbička bola odstránená pomocou odfarbovacieho roztoku (35 minút), membrána bola premytá destilovanou vodou a následne vysušená.

Prúžky umiestnené v doštičke s vyfrézovanými pozdĺžnymi jamkami boli cez noc pri teplote 4 °C blokované 5% nízkotučným mliekom (Bio-Rad) riedeným v Tris-Tween. Na druhý deň boli premyté 3 x 5 minút s Tris-Tween a inkubované v Tris-Tween riedenými psími (1:25) alebo myšími (1:100) sérami 60 minút pri izbovej teplote na trepačke. Po skončení inkubácie boli prúžky membrány znovu premyté (3 x 5 minút) a inkubované v Tris-Tween riedenom konjugáte s naviazanou sekundárnou protilátkou, pre psov v pomere 1:3000 (Sheep Anti-Dog IgG, Bethyl) a pre myši v pomere 1:1000 (Goat Anti-Mouse IgG, AbD Serotec). Inkubácia prebiehala po dobu 60 minút na trepačke pri izbovej teplote. Po premytí (2 x 5 minút v Tris-Tween, 1 x 5 minút v 10x riedenom Tris pufre) bol k prúžkom pridaný substrátový roztok a vzniknutá farebná reakcia bola zastavená destilovanou vodou. Prúžky boli následne premyté destilovanou vodou a po vysušení sa nalepili na kancelársky papier spolu s membránou farbenou amidočerňou a oskenovali.

Všetky použité roztoky boli pipetované v množstve 700 µl na jeden žliabok v blotítke.

Použité roztoky:

Ponceau S

- 0,2% Ponceau S (Sigma); 3% kyselina octová

amidočern

- 0,1% amidočern (Merck); 25% isopropanol; 10% kyselina octová

odfarbovací roztok

- 25% isopropanol; 10% kyselina octová

Tris-Tween

- 20 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20 (Serva)

Tris pufo

- 200 mM Tris (Sigma); 1,5 M NaCl; pH 7,6

substrátový roztok

- 20 ml Tris pufru; 0,01 g DAB (3,3'-diaminobenzidín tetrahydrochlorid hydrát, Sigma); 6 μ l H₂O₂ pridať tesne pred použitím

3.7 Farbenie gélu striebrom

Striebenie umožňuje vizualizáciu elektroforeticky rozdelených proteínov na akrylamidovom géle. Farbené boli gély po ukončení separácie proteínov i gély po ukončení blotovania (kontrola blotovacieho procesu).

Gél bol fixovaný vo fixačnom roztoku cez noc pri izbovej teplote na trepačke. Na druhý deň bol niekoľkokrát premytý destilovanou vodou (približne 2 – 3 hodiny), následne bol inkubovaný 1 minútu s 0,02% Na₂S₂O₃ a znovu premytý destilovanou vodou (20 sekúnd). Nádobka s gélom bola obalená hliníkovou fóliou a gél bol po dobu 10 minút vystavený pôsobeniu 0,1% roztoku AgNO₃. Nasledoval oplach destilovanou vodou a vyvíjacím roztokom s 50 μ l 37% formaldehydu. Vo vyvíjacom roztoku s formaldehydom bol gél nechaný do objavenia proteínových pruhov. Reakcia bola zastavená 2,3 M kyselinou citrónovou (10 minút). Gél bol ešte 10 minút preplachovaný v destilovanej vode, po skončení bol vložený do čírej priesvitnej fólie a naskenovaný.

Použité roztoky:

fixačný roztok

- 50 μ l 37% formaldehydu; 100 ml 40% metanolu

vyvíjací roztok

- 200 ml 3% Na₂CO₃; 400 μ l 0,2% Na₂S₂O₃

3.8 Hmotnostná spektrometria

V spolupráci s Laboratóriom hmotnostnej spektrometrie (Prírodovedecká fakulta Univerzity Karlovy) bolo možné analyzovať proteínový profil slinných žliaz *P. orientalis* Melka Werer a Addis Zemen. Použité boli žľazy z minimálne tri dni starých samíc.

Proteíny boli separované v 12,5% SDS-PAGE géle (4% štartovací SDS-PAGE gél), na jednu jamku 10 jamkového hrebeňa pripadlo 10 žliaz v 10 μ l Tris pufru (2 μ g proteínov) za redukujúcich i za neredukujúcich podmienok. Gél bol farbený pomocou Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva), vizualizované separované proteíny v podobe prúžkov boli vyrezané z gélu (1 mm hrubé prúžky) a prenesené do mikroskúmaviek. Vzorky boli redukované (Dithiothreitol, Sigma) a alkylované (Iodoacetamide, Sigma) a následne štiepené trypsínom (Promega). Vzniknuté natrávené peptidy boli separované kvapalinovou chromatografiou pomocou Ultimate 3000 HPLC system (Dionex). Vzorky rozpustené v 0,3% TCA (kyselina trichlóroctová) s 10% ACN (acetonitril) boli nanosené do PepMapp 100 C18 RP kolóny (Dionex). Peptidy boli vystavené 45 minút lineárnemu gradientu 5 – 51% ACN s 0,1% TCA, frakcie boli zberané po dobu 20 minút (45 frakcií po 60 nl). Eluát bol zmiešaný v pomere 1:3 s matricou [20 mg/ml α -cyano-4-hydroxyškorícová kyselina (Sigma) v 80% ACN (Merck)] a nanosený na MALDI cieľové platničky pomocou Probot microfraction collector (Dionex).

Vzorky boli spracované použitím 4800 Plus MALDI TOF/TOF analyzéra (AB SCIEX) (vybaveného s Nd:YAG laser – 355 nm, rýchlosť paľby 200 Hz). Tandemové hmotnostné spektrá (mass spectrum /MS) boli spracované pomocou 4000 Series Explorer (AB SCIEX).

Spektrá boli hľadané a porovnávané s databázou proteínových sekvencií získaných z cDNA knižnice *Phlebotomus orientalis* Melka Werer a Addis Zemen (v spolupráci s NIH, USA) pomocou software Mascot v 2.1 (Matrix Science). (Kritéria pre hľadanie v databáze boli: enzyme - trypsin; taxonomy - none; fixed modification - carbamidomethylation; variable modification - methionine oxidation; peptide tolerance - 100 ppm, allowing one missed cleavage; and MS/MS tolerance - 0.3 Da.)

Použité roztoky: [viď roztoky v časti 3.5 Elektroforéza (SDS-PAGE)]

3.9 Štatistika a použité programy

Získané dáta z ELISA testov sme vyhodnocovali pomocou programu NCSS 6.0. Na analýzu výsledkov sme použili dvojvýberový a párový T-test. Cut-off hodnoty boli stanovené pripočítaním dvojnásobku smerodajných odchýliek z absorbancií negatívnych kontrol k priemernej hodnote absorbancií negatívnych kontrol.

Použitím anotačného softvéru dCAS a programu BIOEDIT sme upravovali sekvencie mRNA pochádzajúce z cDNA knižnice *P. orientalis* Addis Zemen a Melka Werer (neprebehla ešte ručná anotácia sekvencií).

Pri priradovaní najlepšie sa hodiacich proteínov k aminokyselinovým sekvenciám získaných z hmotnostnej spektrometrie sme využili program SignalP 4.0 a NCBI Blast.

4 VÝSLEDKY

4.1 Protilátková odpoveď domácich zvierat na pobodanie *Phlebotomus orientalis*

Séra domácich zvierat z Etiópie sme porovnávali s kontrolnými sérami zo zvierat z Českej republiky a určovali tak štatisticky významné rozdiely v hladinách IgG protilátok proti slinám *P. orientalis*. Medzi lokalitami sme určovali štatisticky významný rozdiel iba pri lokalitách Addis Zemen a Sheraro, pretože odbery sér v týchto oblastiach prebiehali v rovnakú dobu na začiatku mesiaca október. V lokalite Humera boli séra odoberané až na konci novembra toho istého roku.

4.1.1 Protilátková odpoveď u psích sér

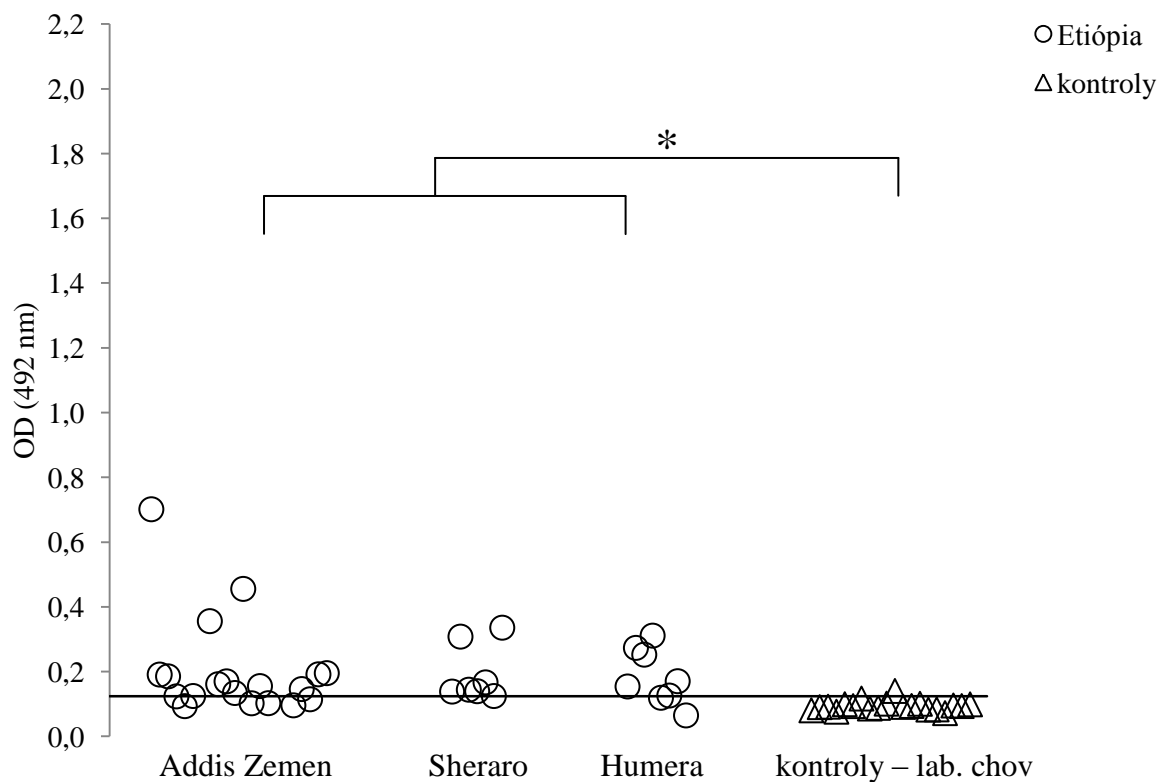
Porovnaním hladín IgG protilátok proti slinám *P. orientalis* v psích sérach z Etiópie a v sérach z kontrolnej skupiny sme preukázali štatisticky významný rozdiel ($p < 0,01$) (Graf 1). Nad cut-off hodnotou, ktorá bola relatívne nízka, sa nachádzalo 76 % (26/34) vzoriek zo všetkých analyzovaných etiópskych vzoriek. Najviac pozitívnych vzoriek bolo z oblasti Sheraro, nad cut-off sa nachádzali všetky vzorky (7/7), z oblasti Humera to bolo 75 % vzoriek (6/8) a z oblasti Addis Zemen 68 % (13/19) vzoriek. Pri porovnaní lokalít Addis Zemen a Sheraro nebol zistený žiaden štatisticky významný rozdiel v hladinách protilátok proti slinám *P. orientalis* ($p = 0,686$). Nad cut-off hodnotou sa nachádzala i jedna vzorka z kontrolnej skupiny.

Keďže sme ako kontroly použili psie séra z laboratórnych chovov, ktoré sú chované v kontrolovaných podmienkach, chceli sme zistiť aké budú v porovnaní k nim hladiny IgG protilátok v sérach domácich psov pôvodom z Rumunska, kde sa *P. orientalis* nevyskytuje, ale môžu sa tu vyskytovať flebotómia zo spoločného podrodu *Larroussius*. Ako pozitívne kontroly sme použili vybrané vzorky psích sér z Etiópie, ktoré mali najvyššie hodnoty protilátok. Hladina IgG protilátok proti slinám *P. orientalis* bola u vzoriek z Rumunska štatisticky vyššia ako u vzoriek z laboratórnych chovov ($p < 0,01$) (Graf 2). Nad hodnotou cut-off sa nachádzalo 80 % (12/15) vzoriek zo všetkých analyzovaných vzoriek z Rumunska.

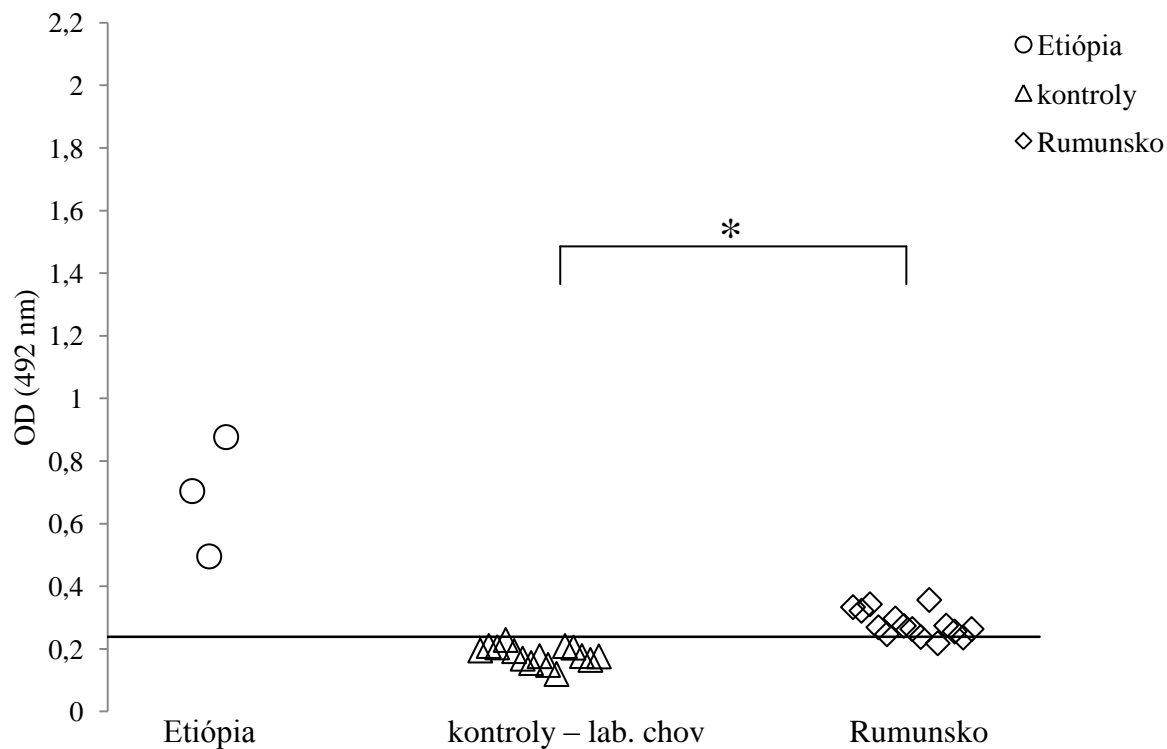
Pri porovnaní hladín IgG a IgG2 protilátok medzi etiópskymi, rumunskými sérami a sérami z laboratórnych chovov sme zaznamenali štatisticky významný rozdiel ($p < 0,01$). Vzorky, ktoré dosahovali najvyššie hladiny IgG2 protilátok (OD = 2,22; OD = 0,92; OD = 0,9) dosahovali zároveň aj najvyššie hladiny IgG protilátok (OD = 0,7; OD = 0,36; OD = 0,47).

Pri analyzovaní hladín IgG2 protilátok v psích sérach z Etiópie, z Rumunska a laboratórnych chovov, sme medzi nimi pozorovali vzájomné štatisticky signifikantné rozdiely (Graf 3). Nad cut-off hodnotou (cut-off = 0,168) sa nachádzalo 88 % (30/34) vzoriek z etiópskej skupiny, z rumunskej skupiny to bolo 67 % vzoriek (10/15) s jednou vzorkou výrazne presahujúcou hodnotu cut-off (OD = 0,56).

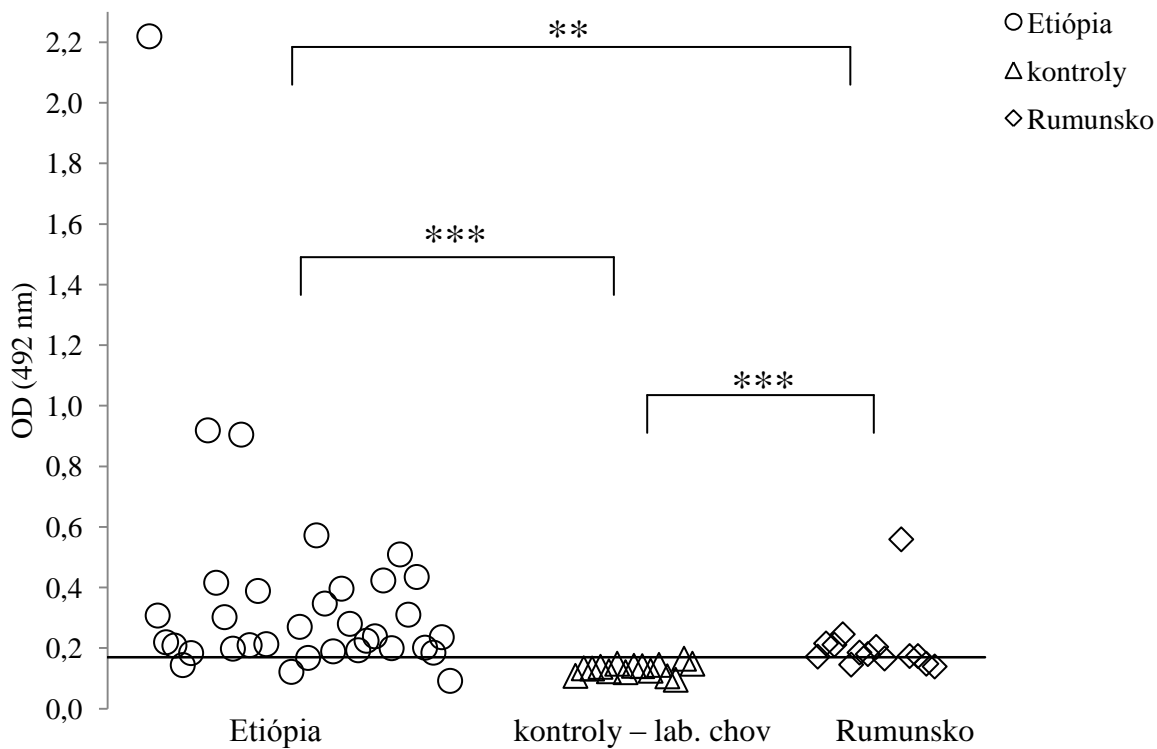
Graf 1. Protilátková odpoveď typu IgG proti slinám *P. orientalis* u psích sér. (čiara predstavuje hodnotu cut-off)



Graf 2. Porovnanie hladín IgG protilátok proti slinám *P. orientalis* medzi kontrolnými a rumunskými psími sérami. (čiara predstavuje hodnotu cut-off)



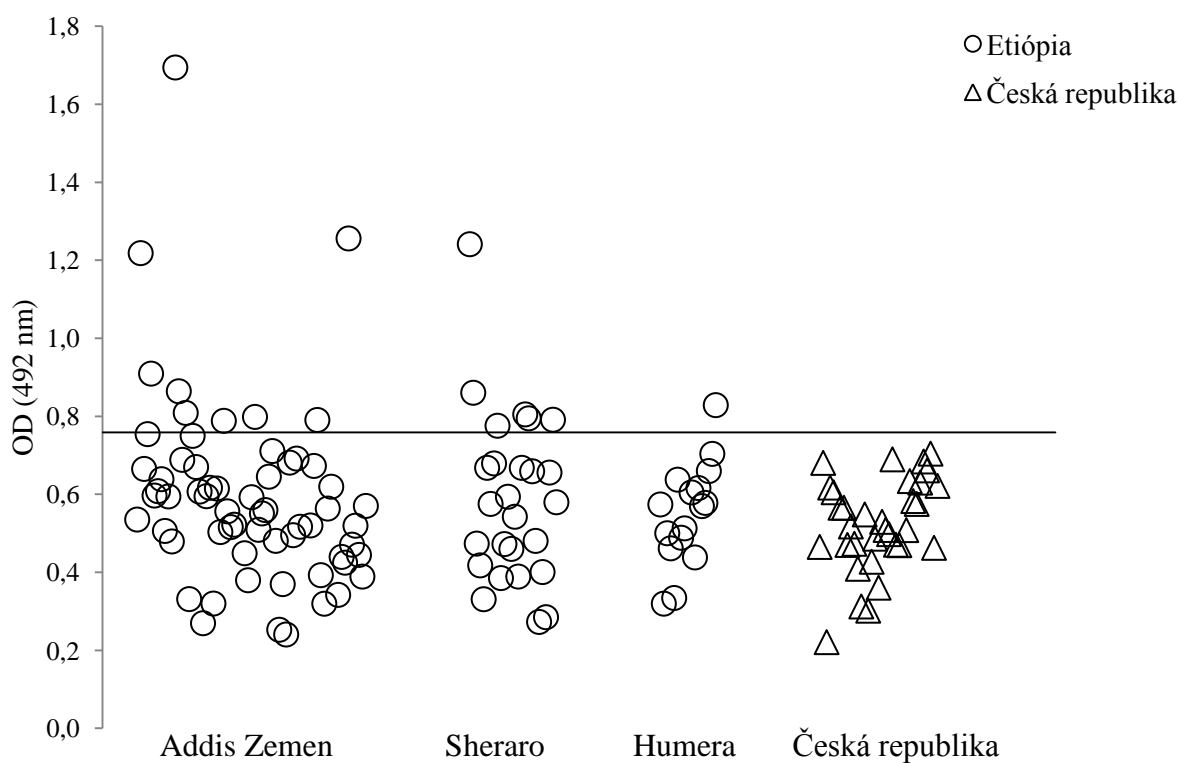
Graf 3. Protilátková odpoveď typu IgG2 proti slinám *P. orientalis* u psích sér. (čiara predstavuje hodnotu cut-off)



4.1.2 Protilátková odpoveď u sér z hovädzieho dobytká

Medzi sérami z Etiópie a kontrolami z Českej republiky nebol zaznamenaný žiaden štatisticky signifikantný rozdiel ($p = 0,199$) v hladine IgG protilátok proti slinám *P. orientalis* (Graf 4). V rámci etiópskych sér bolo 15 % (16/104) vzoriek nad hodnotou cut-off (cut-off = 0,759). Hodnota cut-off bola neobvykle vysoká a aj napriek rôznym úpravám podmienok pokusu sa nám ju nepodarilo znížiť. Najvyšší počet pozitívnych vzoriek bolo z oblasti Sheraro a to 23 % (6/26). V oblasti Addis Zemen sa nachádzalo 15 % (9/62) vzoriek nad hodnotou cut-off a v Humere 6 % vzoriek (1/16). Pri porovnaní hladiny IgG protilátok medzi lokalitami Addis Zemen a Sheraro nebol zaznamenaný žiaden signifikantný rozdiel ($p = 0,993$).

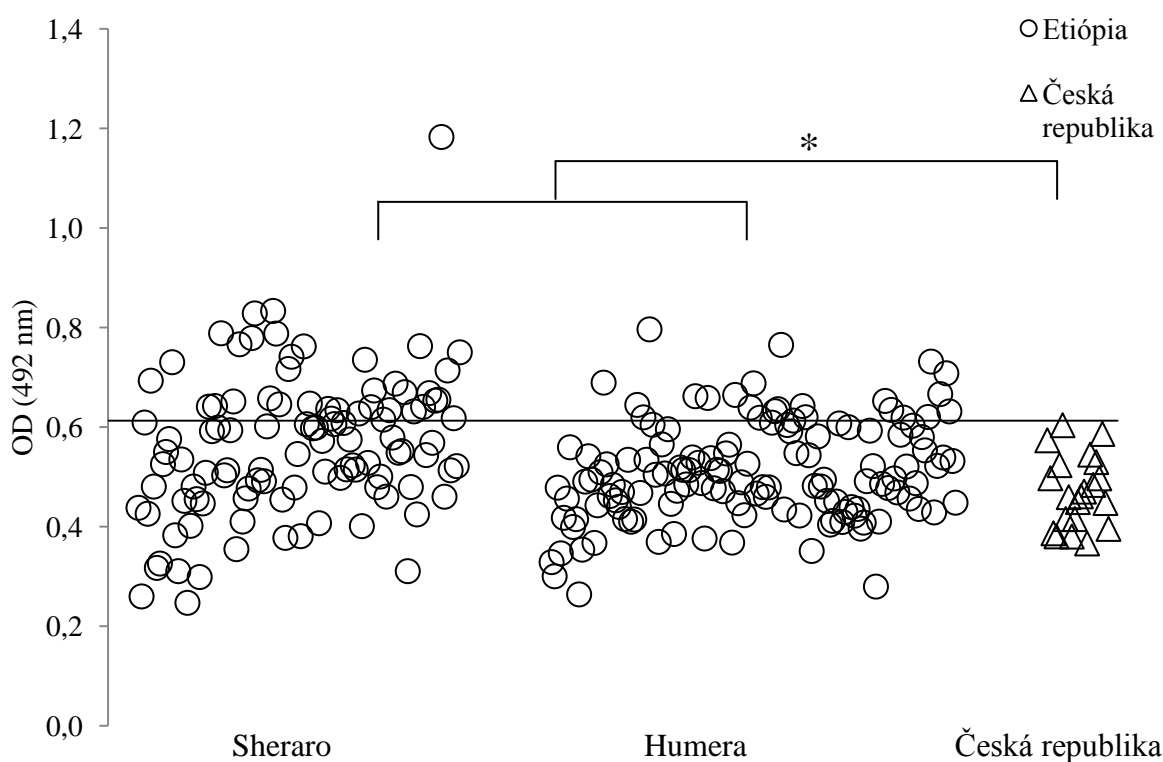
Graf 4. Protilátková odpoveď typu IgG proti slinám *P. orientalis* u sér z hovädzieho dobytká. (čiara predstavuje hodnotu cut-off)



4.1.3 Protilátková odpoveď u kozích sér

Hladiny IgG protilátok proti slinám *P. orientalis* boli u etiópskych sér signifikantne vyššie ($p < 0,05$) ako u kontrolných sér. Signifikantný rozdiel bol dosiahnutý aj napriek vysokým hodnotám u kontrolných sér, je preto otázne nakoľko bol tento rozdiel relevantný (Graf 5). Z celkového počtu etiópskych vzoriek bolo nad hodnotou cut-off (cut-off = 0,613) 26 % (61/239). Hodnota cut-off mala veľmi vysokú hodnotu, ktorú sa nám rovnako ako u sér z hovädzieho dobytku nepodarilo znížiť. Najviac pozitívnych vzoriek bolo z lokality Sheraro, nad cut-off hodnotou sa nachádzalo 36 % vzoriek (38/106), z Humery to bolo 17 % (23/133) vzoriek.

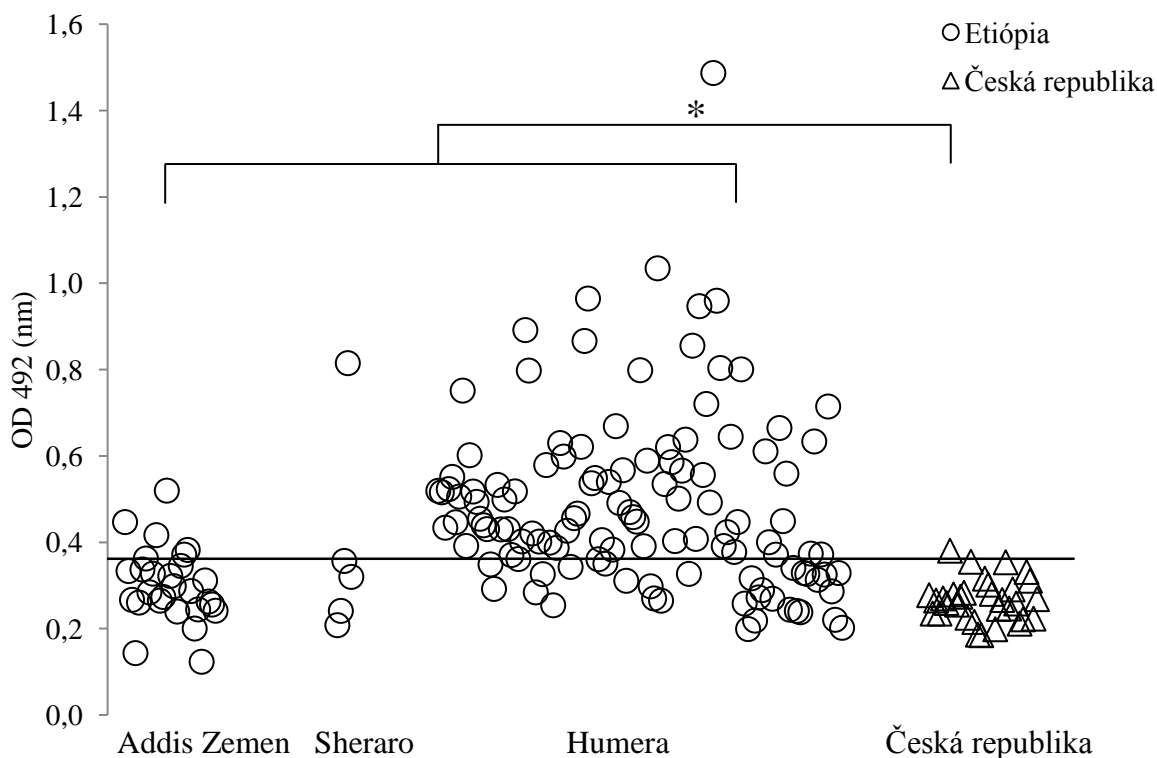
Graf 5. Protilátková odpoveď typu IgG proti slinám *P. orientalis* u kozích sér. (čiara predstavuje hodnotu cut-off)



4.1.4 Protilátková odpoveď u ovčích sér

Medzi etiópskymi a českými sérami bol preukázaný štatisticky významný rozdiel ($p < 0,01$) v hladinách IgG protilátok proti slinám *P. orientalis* (Graf 6). U etiópskych vzoriek dosahovalo vyššie hodnoty ako mala hodnota cut-off (cut-off = 0,362) 60 % (90/149) vzoriek. Cut-off mal v prípade ovčích sér očakávanú hodnotu. Najviac pozitívnych vzoriek pochádzalo z oblasti Humera, kde hodnotu cut-off presahovalo 72 % (84/117) vzoriek. V oblasti Sheraro malo vyššiu hodnotu ako cut-off 20 % (1/5) vzoriek, v oblasti Addis Zemen 19 % (5/27). Porovnaním hladín protilátok medzi oblasťami Addis Zemen a Sheraro nebol preukázaný žiaden signifikantný rozdiel ($p = 0,836$). Nad cut-off hodnotou sa nachádzala i jedna vzorka z kontrolnej skupiny.

Graf 6. Protilátková odpoveď typu IgG proti slinám *P. orientalis* u ovčích sér. (čiara predstavuje hodnotu cut-off)



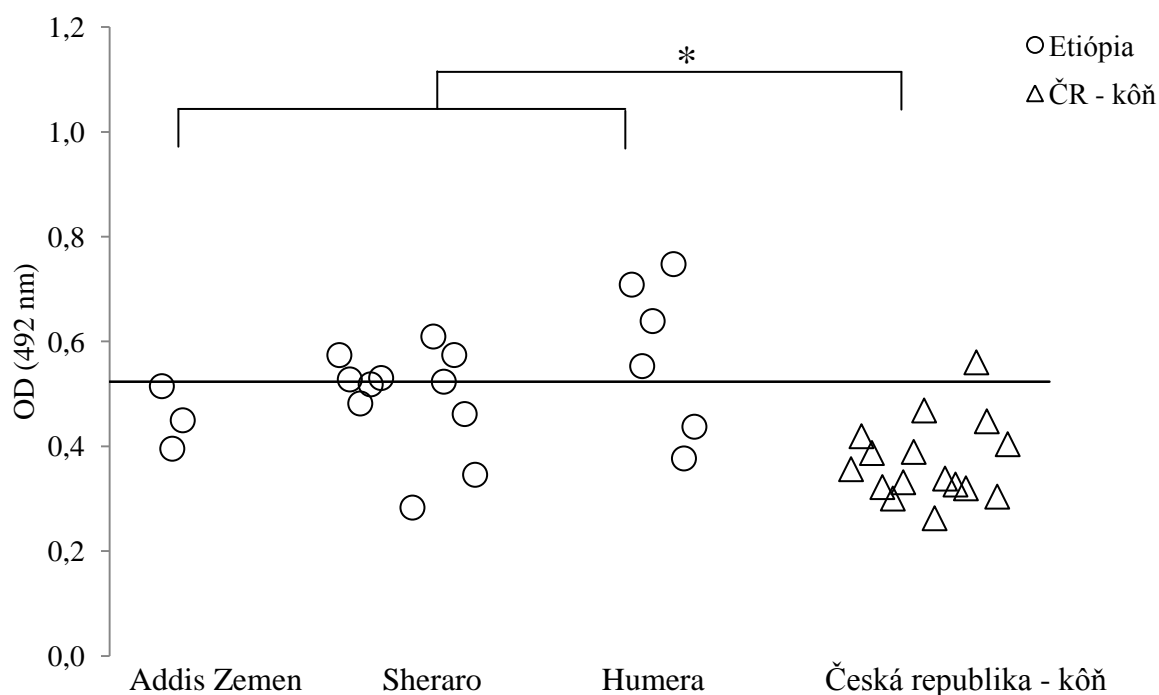
4.1.5 Protilátková odpoveď u somárich sér

Hladiny IgG protilátok proti slinám *P. orientalis* v etiópskych sérach boli signifikantne vyššie v porovnaní s kontrolami z Českej republiky ($p < 0,01$) (Graf 7). Z celkového množstva analyzovaných vzoriek z Etiópie bolo nad hodnotou cut-off 45 % (9/20) vzoriek. V rámci lokalít bolo najviac pozitívnych vzoriek v Humere, a to 67 % (4/6), v Sherare to bolo 45 % (5/11) a v lokalite Addis Zemen nepresiahla žiadna vzorka hodnotu cut-off. Pri porovnaní lokalít Addis Zemen a Sheraro nebol zaznamenaný žiaden signifikantný rozdiel v hladinách protilátok proti slinám *P. orientalis* ($p = 0,185$).

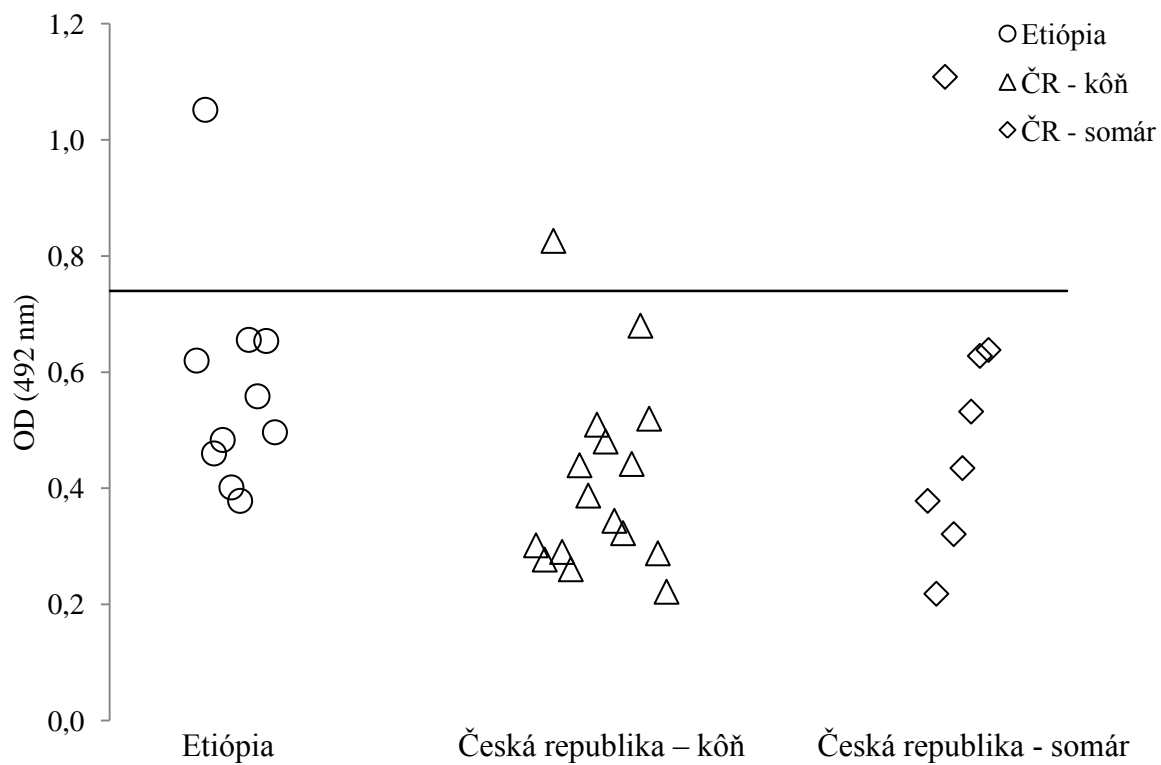
K etiópskym séram sme mali k dispozícii najskôr iba kontrolné séra z koní z Českej republiky, neskôr sa nám podarilo získať i niekoľko sér zo somárov taktiež z Českej republiky. Ich porovnaním sme chceli zistiť nakoľko sa od seba líšia v hladinách protilátok proti slinám *P. orientalis* a či bolo použitie konských sér ako kontrol k somárim séram z Etiópie vhodné. Porovnaním hladiny IgG protilátok medzi sérami z koní a somárov sme nedetekovali žiaden štatisticky signifikantný rozdiel ($p = 0,298$) (Graf 8). U sér z koní i somárov bol pozorovaný výrazný rozptyl hodnôt protilátok (OD = 0,22 – 1,11). Hodnotu vyššiu ako cut-off dosahovali dve vzorky, jedna patrila do skupiny koní a druhá do skupiny somárov z Českej republiky. Ako pozitívne kontroly sme použili 10 vybraných vzoriek z Etiópie.

Graf 7. Protilátková odpoveď typu IgG proti slinám *P. orientalis* u somárich sér.

(čiara predstavuje hodnotu cut-off)



Graf 8. Porovnanie hladín IgG protilátok proti slinám *P. orientalis* medzi konskými a somárími sérami. (čiara predstavuje hodnotu cut-off)



4.2 Imunobloting proteínov slinných žliaz flebotomov so psími sérami

Proteíny slinných žliaz boli rozdelené elektroforetickou separáciou za neredukujúcich podmienok, preblotované na nitrocelulóзовú membránu a následne inkubované so psími a myšiami sérami. Cieľom bolo zistiť, či etiópske psie séra u ktorých boli zistené vysoké hladiny IgG protilátok proti slinám *P. orientalis* Melka Werer (MW) skrížene reagujú so slinným žľazami *L. longipalpis*, *S. schwetzi* a *C. quinquefasciatus*.

Proteínové profily *P. orientalis* MW, *L. longipalpis*, *S. schwetzi* a *C. quinquefasciatus* farbené amidočernov sa od seba signifikantne odlišovali.

Proteíny *P. orientalis* MW rozpoznávali rôznou intenzitou vybrané psie séra z Etiópie, majoritne sa jednalo o proteíny s molekulovou hmotnosťou 32, 37, 38, 40, 42 a 44 kDa. Podobný výsledok bol i v prípade séra z laboratórneho psa pobodaného *P. perniciosus* (použitý ako pozitívna kontrola, keďže *P. perniciosus* je blízkym príbuzným *P. orientalis*, rovnako patrí do podrodu *Larrousius*) a Balb/c myši pobodaných *P. orientalis* MW. Psie séra z Rumunska, preimúnne psie séra a preimúnne myšie sérum nerozpoznávali vôbec alebo veľmi slabo 3 – 6 proteínov v rozmedzí 32 – 44 kDa. Viditeľná bola i veľmi slabá skrížená reakcia laboratórneho psa pobodaného *L. longipalpis* viažuceho 42 a 44 kDa proteíny. U myších sér s protilátkami proti *S. schwetzi* a *C. quinquefasciatus* nebola viditeľná žiadna skrížená reakcia s proteínmi *P. orientalis* MW (Obrázok 5, 6, 7).

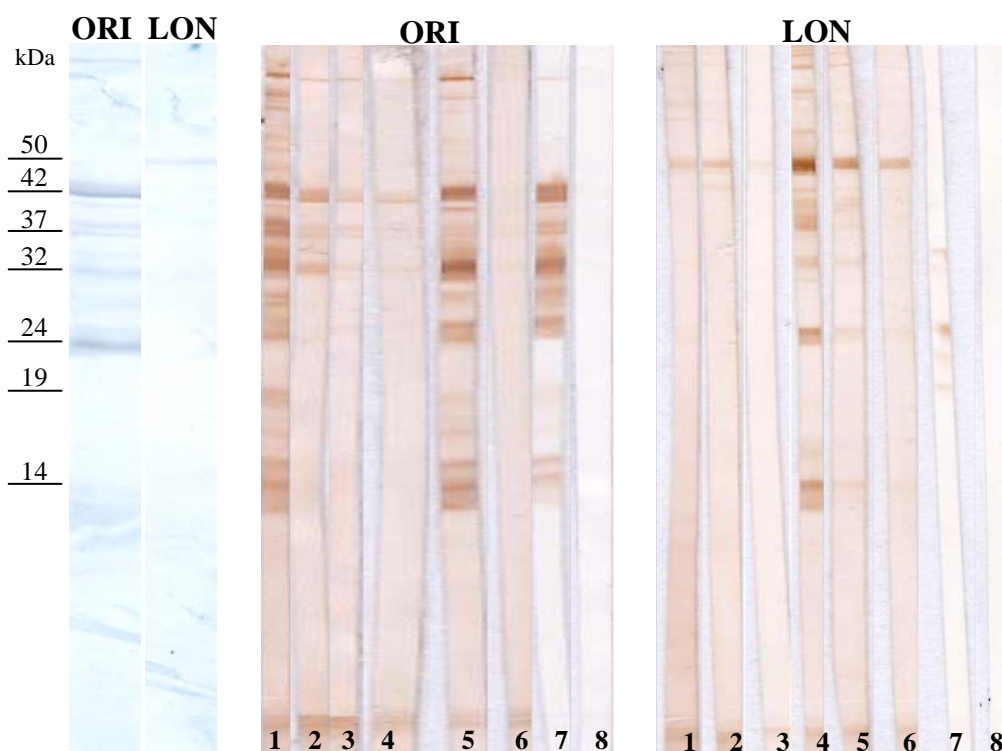
Pri imunoblotingu so slinnými žľazami *L. longipalpis* etiópske psie séra slabo skrížene reagovali s proteínom s molekulovou hmotnosťou 50 kDa, reakcia s týmto proteínom bola i u laboratórneho psa pobodaného *P. perniciosus* i u preimúnneho psieho séra. Pes pobodaný *L. longipalpis* viazal silne homológne proteíny. Balb/c myš pobodaná *P. orientalis* MW slabo rozpoznávala 4 proteíny v rozmedzí 19–32 kDa, u preimúnneho myšieho séra nedošlo k žiadnej reakcii (Obrázok 5).

U slinných žliaz *S. schwetzi* rozpoznávali etiópske, rumunské séra a preimúnne sérum s variabilnou intenzitou majoritne proteíny s molekulovou hmotnosťou 36 – 37 kDa. V prípade dvoch etiópskych sér a jedného rumunského séra bol viditeľný pruh o veľkosti približne 51 kDa, jedna etiópska vzorka rozpoznávala i proteín s molekulovou hmotnosťou 30 kDa. Nebola pozorovaná žiadna skrížená reakcia u myších sér (Obrázok 6).

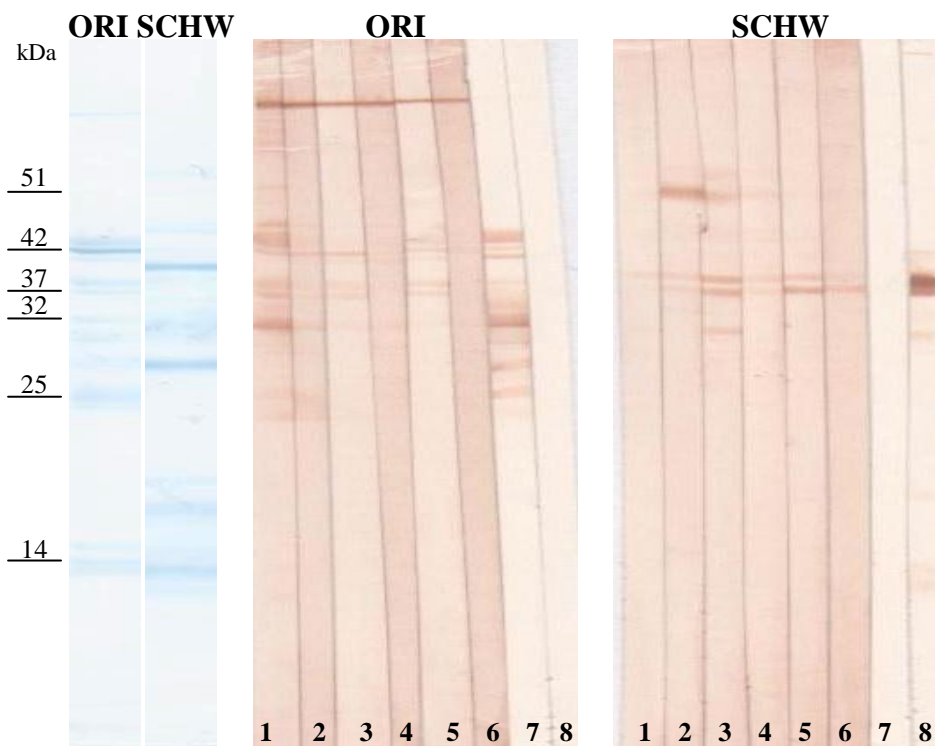
V slinných žľazách *C. quinquefasciatus* sa etiópske a rumunské psie séra silne viazali na 2 proteíny s molekulovou hmotnosťou 22 a 58 kDa. Proteín s veľkosťou 58 kDa bol slabo rozpoznávaný preimúnnym sérom, podobne je to i u myši poštipanej *P. orientalis* MW. Myš poštipaná *C. quinquefasciatus* reagovala silne s homológnymi proteínmi (Obrázok 7).

V tomto prípade bola zaznamenaná slabá skrížená reakcia u myších sér, kde sa protilátky voči

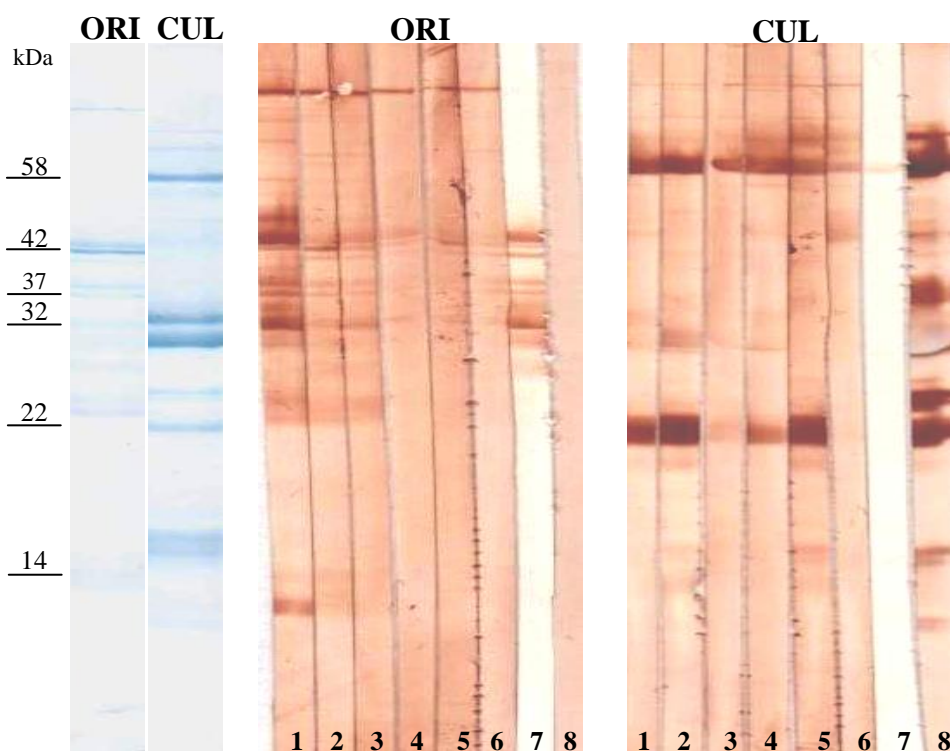
proteínom *P. orientalis* MW slabo viazali na proteíny *C. quinquefasciatus*. Na imunoblote, kde boli použité iba séra myši poštípaných *P. orientalis* MW a *C. quinquefasciatus* nedošlo k žiadnej skríženej reakcii (Obrázok 8).



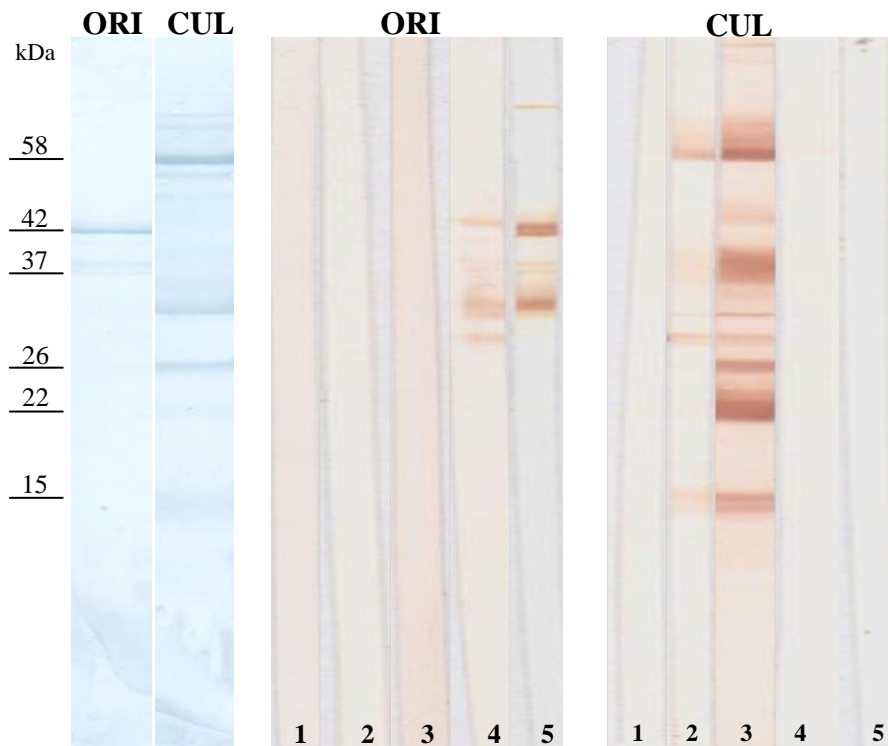
Obrázok 5. Imunoblot s psími sérami a antigénmi *P. orientalis* MW (ORI) a *L. longipalpis* (LON): 1 - 3 psie séra z Etiópie; 4 pes poštípaný *L. longipalpis*; 5 pes poštípaný *P. perniciosus*; 6 preimúnne psie sérum; 7 myš poštípaná *P. orientalis* MW; 8 preimúnne myšie sérum



Obrázok 6. Imunoblot s psími sérami a antigénmi *P. orientalis* MW (ORI) a *S. schwetzi* (SCHW): 1 – 3 psie séra z Etiópie; 4 – 5 psie séra z Rumunska; 6 preimúnne psie sérum; 7 myš poštípaná *P. orientalis* MW; 8 myš poštípaná *S. schwetzi*



Obrázok 7. Imunoblot s psími sérami a antigénmi *P. orientalis* MW (ORI) a *C. quinquefasciatus* (CUL): 1 – 3 psie séra z Etiópie; 4 – 5 psie séra z Rumunska; 6 preimúnne psie sérum; 7 myš poštípaná *P. orientalis* MW; 8 myš poštípaná *C. quinquefasciatus*

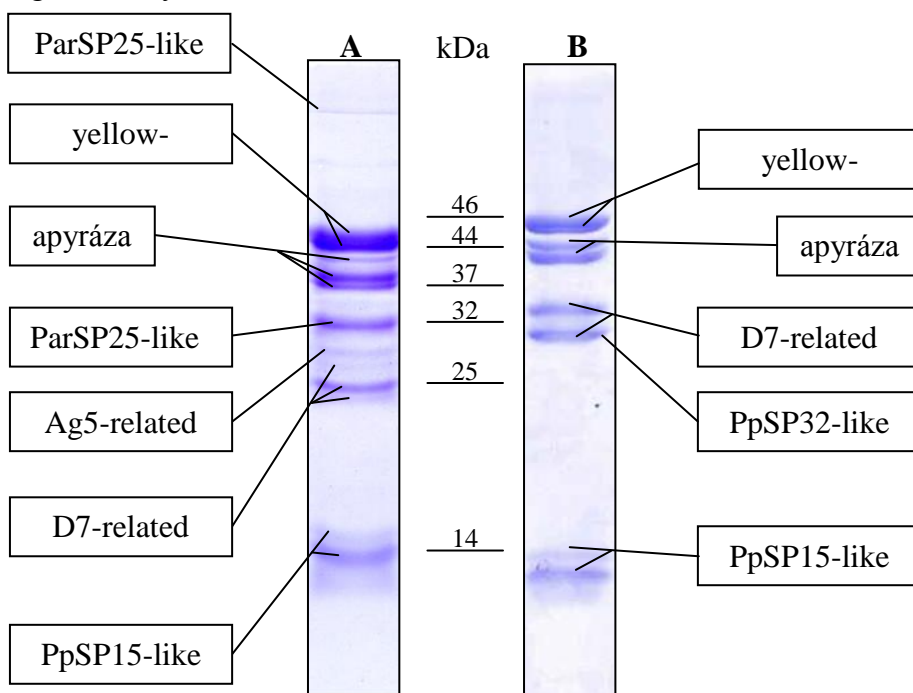


Obrázok 8. **Imunoblot s myšími sérami a antigénmi *P. orientalis* MW (ORI) a *C. quinquefasciatus* (CUL):** 1 preimúnne sérum; 2 – 3 myš poštípaná *C. quinquefasciatus*; 4 – 5 myš poštípaná *P. orientalis* MW.

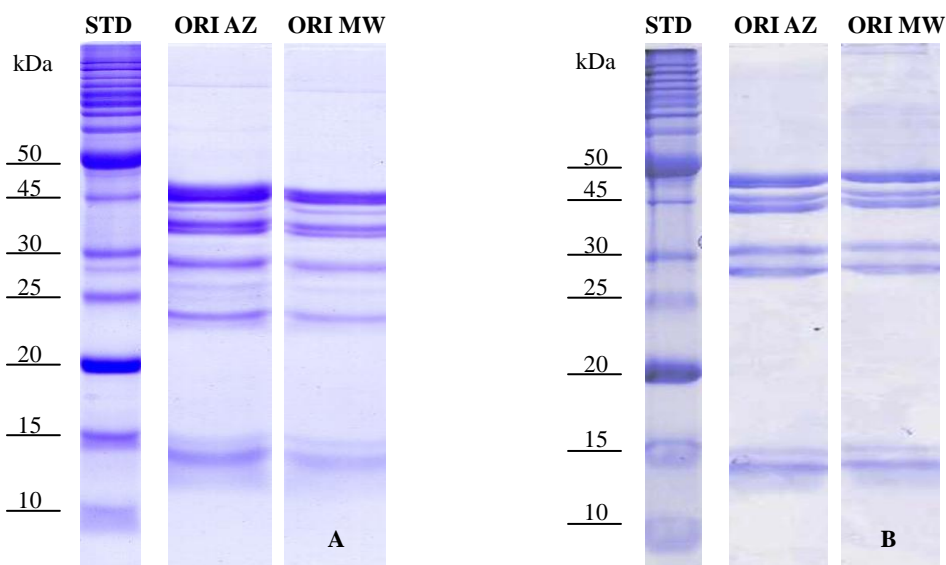
Najintenzívnejšie reakcie boli vždy získané s homológnyimi sérami. Etiópske psie séra sa dobre viazali na proteíny *P. orientalis*, najvýraznejšia väzba bola ale pozorovaná s proteínmi *C. quinquefasciatus*, podobne to bolo i u rumunských psích sér. Preimúnne psie séra na rozdiel od myších preimúnnych sér v niektorých prípadoch slabo viazali proteíny slinných žliaz flebotomov. U myších sér nebola pozorovaná žiadna skrížená reakcia, výnimku tvorilo myšie sérum s protilátkami proti *P. orientalis*, ktoré rozpoznávalo proteíny *L. longipalpis*. U etiópskych psích sér bola viditeľná jasná skrížená reakcia so slinnými žľazami *L. longipalpis*.

4.3 Proteínový profil *Phlebotomus orientalis*

Porovnaním výsledkov z hmotnostnej spektrometrie s cDNA knižnicami kolónií *P. orientalis* Melka Werer (MW) a Addis Zemen (AZ) sme získali 12 proteínov slinných žliaz patriacich do 7 rodín: yellow related, apyráza, D7-related, PpSP15-like, Ag5-related, ParSP25-like a PpSP32-like (Obrázok 9). Za neredukujúcich podmienok (Obrázok 10A) bolo identifikovaných pre kolóniu *P. orientalis* Addis Zemen 10 proteínov patriacich do 6 rodín (Tabuľka 3), za redukujúcich podmienok (Obrázok 10B) bolo identifikovaných pre obe kolónie 8 proteínov patriacich do 5 proteínových rodín (Tabuľka 4). Nebol nájdený žiaden signifikantný rozdiel medzi knižnicami *P. orientalis* MW a AZ.



Obrázok 9. Proteínový profil *P. orientalis* za neredukujúcich (A) a redukujúcich podmienok (B)



Obrázok 10. Proteínové profily *P. orientalis* AZ a MW za neredukujúcich (A) a redukujúcich podmienok (B)

Tabuľka 3. Proteínový profil *P. orientalis* AZ za neredukujúcich podmienok

MH (kDa)	PROTEÍNOVÁ RODINA	NCBI BEST MATCH	NCBI PRÍSTUPOVÉ ČÍSLO
42	yellow-related	42 kDa yellow-related salivary protein SP03 (<i>Phlebotomus perniciosus</i>)	ABA43049
44		42,6 kDa salivary yellow-related protein (<i>Phlebotomus tobbi</i>)	ADJ54080
38/37	apyrázová rodina	35,2 kDa salivary apyrase (<i>Phlebotomus tobbi</i>)	ADJ54077
40		35,5 kDa salivary apyrase (<i>Phlebotomus perniciosus</i>)	ABB00906
27	D7-related	27 kDa D7-related salivary protein SP10 (<i>Phlebotomus perniciosus</i>)	ABA43058
25/24		27,1 kDa salivary D7-related protein (<i>Phlebotomus tobbi</i>)	ADJ54095
14	PpSP15-like	13,8 kDa salivary PpSP15-like protein (<i>Phlebotomus tobbi</i>)	ADJ54086
13		14,9 kDa salivary PpSP15-like protein (<i>Phlebotomus tobbi</i>)	ADJ54084
71/32	ParSP25-like	38,8 kDa salivary protein (<i>Phlebotomus tobbi</i>)	ADJ54098
28	Ag5-related	30 kDa antigen 5-related salivary protein SP07 (<i>Phlebotomus perniciosus</i>)	ABA43055

Tabuľka 4. Proteínový profil *P. orientalis* AZ, MW za redukujúcich podmienok

kolónia	MH (kDa)	PROTEÍNOVÁ RODINA	NCBI BEST MATCH	NCBI PRÍSTUPOVÉ ČÍSLO
AZ	46	yellow-related	41,5 kDa salivary yellow-related protein (<i>Phlebotomus tobbi</i>)	ADJ54079
AZ/MW	46/44		42,6 kDa salivary yellow-related protein (<i>Phlebotomus tobbi</i>)	ADJ54080
AZ/MW	42/40	apyrázová rodina	35,2 kDa salivary apyrase (<i>Phlebotomus tobbi</i>)	ADJ54077
AZ/MW	33	D7-related	27 kDa D7-related salivary protein SP10 (<i>Phlebotomus perniciosus</i>)	ABA43058
AZ	31		27,1 kDa salivary D7-related protein (<i>Phlebotomus tobbi</i>)	ADJ54095
MW	14	PpSP15-like	13,8 kDa salivary PpSP15-like protein (<i>Phlebotomus tobbi</i>)	ADJ54086
AZ/MW	13		14,9 kDa salivary PpSP15-like protein (<i>Phlebotomus tobbi</i>)	ADJ54084
MW	31	PpSP32-like	28 kDa salivary protein SP05 (<i>Phlebotomus perniciosus</i>)	ABA43053

5 DISKUSIA

Protilátky proti slinám flebotomov majú predpoklad na využitie ako ukazovatele expozície alebo ukazovatele rizika prenosu leishmaniózy na hostiteľa (zhrnuté v [Volf a kol., 2008; Andrade a Teixeira, 2012]). V našich pokusoch sme sledovali výskyt protilátok proti slinám *P. orientalis* u domácich zvierat z endemických oblastí VL v severnej a severozápadnej Etiópií.

Z piatich druhov analyzovaných zvierat bol signifikantný rozdiel v hladinách IgG protilátok medzi etiópskymi a kontrolnými sérami zaznamenaný u psov, kôz, oviec a somárov. U psov priniesla táto metóda očakávané výsledky. Potvrdili sme, že využívanie protilátok proti slinám flebotomov ako ukazovateľov expozície u psích sér je vhodná, tak ako to už bolo preukázané i u psov prirodzene pobodaných *P. perniciosus* a *L. longipalpis* (Gomes a kol., 2007; Vlková a kol., 2011).

V prípade kôz, somárov a hovädzieho dobytku sme zaznamenali vysoké hodnoty cut-off (vyrátané pripočítaním dvojnásobku smerodajných odchýliek z absorbancií negatívnych kontrol k priemernej hodnote absorbancií negatívnych kontrol), je preto diskutabilné či dosiahnutý signifikantný rozdiel môžeme považovať za relevantný. Vysoké hodnoty IgG protilátok proti slinám *P. orientalis* u kontrolných sér z Českej republiky by mohli byť zapríčinené skríženými reakciami s protilátkami proti iným druhom krvsajúceho hmyzu.

Prác, ktoré sa zaoberajú skríženými reakciami medzi flebotomami a inými druhmi krvsajúceho hmyzu je len veľmi málo. Wahba a kol. (2005) zaznamenali možnú skríženú reakciu medzi flebotomami a komármi, konkrétne sa jednalo o *P. papatasi* a *C. pipiens*. Zistili, že počet komárov sajúcich na škrečkovi, na ktorom predtým opakovane sal *P. papatasi*, sa signifikantne znižoval so stúpajúcim počtom nasatých flebotomov, čo by podľa autorov mohlo byť dôsledkom protilátkovej reakcie proti zhodným antigénom slinných žliaz flebotomov a komárov. Skrížená reaktivita bola pozorovaná i medzi plošticami a flebotomami, kde sérum zo sličky imunizovanej *T. infestans* skrížene rozpoznávalo na immunoblote tri proteíny slinných žliaz *P. duboscqi* (Schwarz a kol., 2009b). Čo sa týka iných skupín krvsajúceho hmyzu, skrížené reakcie boli zaznamenané medzi komármi a plošticami podčeľade Triatominae (Nascimento a kol., 2001; Schwarz a kol., 2009b) a medzi muškami (čeľaď Simuliidae) a pakomárikmi (čeľaď Ceratopogonidae) (Hellberg a kol., 2009; Schaffartzik a kol., 2010).

Skrížené reakcie medzi jednotlivými druhmi flebotomov je nutné brať do úvahy aj v rámci etiópskych sér. Aj keď je protilátková odpoveď na antigény slín flebotomov väčšinou hosťiteľsky špecifická, medzi niektorými druhmi boli pozorované slabšie alebo silnejšie

skřížené reakcie (Volf a Rohoušová, 2001; Rohoušová a kol., 2005; Teixeira a kol., 2010). Okrem *P. orientalis* sa v endemických oblastiach VL vo východnej Afrike vyskytujú aj iné druhy flebotomov. Veľmi početným zastúpením často prevyšujúcim výskyt *P. orientalis* sa vyznačuje rod *Sergentomyia* (Quate, 1964; Elnaiem a kol., 1997; Gebre-Michael a kol., 2007; Ngumbi a kol., 2010). *Sergentomyia* spp. sú prítomné v lesnom poraste, ale vo veľkom množstve boli zaznamenané i v rurálnom prostredí (Quate, 1964; Elnaiem a kol., 1997; Lambert a kol., 2002; Ngumbi a kol., 2010) s vysokým percentom zastúpenia vnútri obydlí a sýpok (Lambert a kol., 2002). Zástupcovia tohto rodu sajú na studenokrvných i teplokrvných cicavcoch, niektoré druhy sajú i na ľuďoch (Quate, 1964). Na základe týchto informácií je teda pravdepodobné, že môžu využívať domáce zvieratá ako zdroj krvi, čo podporujú naše výsledky z imunoblotingu, kde etiópske psy rozpoznávali rôznou mierou proteíny *S. schwetzi*. U myši s protilátkami proti týmto flebotomom sme ale žiadnu skříženú reakciu medzi *P. orientalis* a *S. schwetzi* nepozorovali (imunoblot detailnejšie opísaný nižšie).

Séra domácich zvierat pochádzala z troch lokalít v Etiópii. Najviac pozitívnych vzoriek u psov (100 %), hovädzieho dobytká (23 %) a kôz (36 %) bolo z lokality Sheraro a u oviec (72 %) a somárov (67 %) z lokality Humera. Najmenej pozitívnych vzoriek u psov (68 %), oviec (19 %) a somárov (0 %) bolo z lokality Addis Zemen a u hovädzieho dobytká (6 %) z lokality Humera. Pri porovnaní lokalít Addis Zemen a Sheraro nebol pozorovaný žiaden signifikantný rozdiel. V oblastiach nížin (Humera) a vysočín severozápadu (Addis Zemen) má *P. orientalis* dominantné zastúpenie (Gebre-Michael a kol., 2007; Gebre-Michael a kol., 2010). V oblasti Sheraro nebol doteraz výskyt *P. orientalis* publikovaný, ale jeho prítomnosť v tejto lokalite je pravdepodobná na základe predbežných výsledkov výskumu nášho laboratória. Tento predpoklad potvrdzuje aj to, že máme v laboratórnych podmienkach k dispozícii kolóniu *P. orientalis* pochádzajúcu z tejto lokality.

Interpretácia získaných výsledkov je pomerne náročná z dôvodu už vyššie spomenutých vysokých hodnôt cut-off u kôz, somárov a hovädzieho dobytká. Dôležitú úlohu tu hrá aj neznámy zdravotný stav analyzovaných zvierat. Jedine v prípade psov a oviec bola hodnota cut-off prijateľná a získaný signifikantný rozdiel sme mohli považovať za relevantný. Výrazne nízka hodnota cut-off bola u psov spôsobená použitím sér z laboratórnych zvierat, ktoré sú chované v kontrolovaných podmienkach a sú tak menej vystavené krvsajúcemu hmyzu, čo eliminuje možnosť skřížených reakcií. Na porovnanie sme k psom z laboratórnych chovov pridali psov z rurálneho prostredia Rumunska, kde sa môžu vyskytovať flebotomia z podrodu *Larrousius* (*P. neglectus*, *P. perfiliewi*) (Dancesco, 2008). Medzi týmito dvoma skupinami bol pozorovaný signifikantný rozdiel, ale i tak boli hodnoty IgG protilátok nízke

vzhľadom k etiópskym séram, z čoho vyplýva, že by sa dali použiť ako vhodné kontrolné séra.

Pri meraní hladín IgG2 protilátok proti slinám *P. orientalis* u psích sér sme pozorovali signifikantne vyššie hladiny IgG2 protilátok u etiópskych sér v porovnaní s rumunskými sérami a sérami z laboratórnych chovov. Zvýšené hladiny IgG2 protilátok proti slinám flebotomov *P. perniciosus* a *L. longipalpis* boli pozorované i u psov v prírodných alebo laboratórnych podmienkach alebo u psov imunizovaných rekombinantnými proteínmi *L. longipalpis* (Hostomská a kol., 2008; Collin a kol., 2009; Vlková a kol., 2011). U psov prirodzene vystavených pobudaniu *P. perniciosus* bola pozorovaná negatívna korelácia medzi IgG2 protilátkami proti *P. perniciosus* a rizikom prenosu leishmaniózy (Vlková a kol., 2011).

Signifikantný rozdiel bol nameraný i pri porovnaní hladín IgG a IgG2 protilátok u psích sér z Etiópie, Rumunska a laboratórnych chovov. Zaujímavou informáciou bolo, že etiópske vzorky s troma najvyššími hodnotami IgG2 protilátok mali zároveň aj najvyššie hladiny IgG protilátok. Tieto zistenia korešpondujú s predošlými výsledkami, že vývoj protilátok typu IgG a IgG2 má rovnakú dynamiku (Hostomská a kol., 2008; Vlková a kol., 2011). Medzi rumunskými sérami sa nachádzala jedna vzorka, ktorá niekoľkonásobne presahovala svojou hodnotou IgG2 protilátok hranicu cut-off. Zároveň mala i najvyššiu hladinu IgG protilátok medzi rumunskými sérami, ale hodnotu cut-off presahovala minimálne.

Z našich výsledkov môžeme teda všeobecne predpokladať, že domáce zvieratá z oblastí severnej a severozápadnej Etiópie prichádzajú do styku s *P. orientalis* a predstavujú tak vhodný zdroj potravy. Zoofágne správanie tohto flebotoma bolo potvrdené u psov z východného Sudánu a hovädzieho dobytku zo severozápadnej Etiópie (Hassan a kol., 2009; Gebre-Michael a kol., 2010). To, že *P. orientalis* saje na domácich zvieratách naznačuje jeho možný výskyt v blízkosti ľudských obydli. Túto hypotézu podporujú štúdie o výskyte flebotomov v rurálnych oblastiach východného Sudánu (Lambert a kol., 2002; Hassan a kol., 2004). Je otázne nakoľko sa domáce zvieratá zapájajú do cyklu VL v severnej a severozápadnej Etiópii, keďže tu nebol doteraz nájdený žiaden flebotomus infikovaný *L. donovani* (Gebre-Michael a kol., 2007; Gebre-Michael a kol., 2010) a bolo nájdených minimum infikovaných zvierat (Bashaye a kol., 2009), na rozdiel od zistení z východného Sudánu (Elnaiem a kol., 1997; Elnaiem a kol., 1998; Dereure a kol., 2000; Mukhtar a kol., 2000; Lambert a kol., 2002; Hassan a kol., 2004; Hassan a kol., 2009).

Na základe získaných výsledkov sme usúdili, že používanie celých slinných žliaz ako ukazovateľa expozície nie je u väčšiny druhov domácich zvierat vhodné z hľadiska špecificity reakcie, keďže je nutné rátať s rizikom skřížených reakcií s antigénmi iných druhov

krvsajúceho hmyzu. Používanie rekombinantných proteínov slinných žliaz ako ukazovateľov expozície sa zdá byť vhodnejšou metódou. Zvyšuje sa tak špecificita reakcie eliminovaním skřížených reakcií ako to bolo potvrdené v prípade flebotoma *L. longipalpis* (Souza a kol., 2010; Teixeira a kol., 2010) a ploštice *T. infestans* (Schwarz a kol., 2009a).

V našich chovoch máme k dispozícii dve etiópske kolónie *P. orientalis*, jedna pochádza z oblasti s výskytom VL (Addis Zemen) a druhá z oblasti bez hláseného prípadu VL (Melka Werer). Ich porovnaním sme chceli zistiť, či je proteínové zloženie slín u kolónií zhodné. Na základe analýzy proteínových profilov oboch kolónií za redukujúcich podmienok pomocou MALDI TOF/TOF analyzériu sme zistili, že kolónie sa nelíšia. I v prípade dvoch kolónií *P. duboscqi* z geograficky odlišných oblastí Keni a Mali bolo zistené takmer identické zloženie proteínov slinných žliaz (Kato a kol., 2006). K rovnakým záverom sa prišlo i v prípade skúmania variability SP15 proteínu slinných žliaz kolónií *P. papatasi* pochádzajúcich z prirodzenej populácie zo Sudánu a z laboratórnych kolónií z Egypta, Jordánska, Izraela a Saudskej Arábie (Elnaiem a kol., 2005). Podobne to bolo i v prípade apyrázy zo slinných žliaz 20 rôznych kolónií *P. ariasi* zo severovýchodného Španielska a južného Francúzska (Mahamdallie a Ready, 2012). V prípade *L. longipalpis* bola zase zistená vysoká variabilita proteína slinných žliaz, maxadilana, medzi populáciami toho istého druhu z Brazílie, Kolumbie a Kostariky (Lanzaro a kol., 1999).

Za redukujúcich a neredukujúcich podmienok sa u oboch kolónií našli štyri proteínové rodiny: yellow related, apyrázová rodina, D7-related a PpSP15-like. Rodiny ParSp25-like a Ag5-related boli nájdené iba za neredukujúcich podmienok a rodina PpSP32-like iba za redukujúcich podmienok. Nájdené proteínové sekvencie boli najviac podobné k proteínovým sekvenciám *P. perniciosus* a *P. tobbi*, čo potvrdzuje blízke taxonomické postavenie *P. orientalis*, *P. perniciosus* a *P. tobbi* v podrode *Larrousius*. Vyššie spomenuté proteínové rodiny boli nájdené aj u všetkých študovaných druhov flebotomov, a to u *P. papatasi*, *L. longipalpis*, *P. perniciosus*, *P. argentipes*, *P. duboscqi*, *P. ariasi*, *P. arabicus*, *P. tobbi* a *P. sergenti* (Valenzuela a kol., 2001; Valenzuela a kol., 2004; Anderson a kol., 2006, Kato a kol., 2006; Oliveira a kol., 2006; Hostomská a kol., 2009, Rohoušová a kol., 2012).

Yellow related proteíny sú charakteristické pre hmyz. Pomenovanie tejto rodiny proteínov vzniklo na základe mutácie génu u *Drosophila* sp., ktorý tak produkoval žltý fenotyp indikujúci poruchu melanizačného procesu. Súčasťou tejto rodiny je i proteín materskej kašičky včiel (zhrnuté v Ribeiro a kol., 2010). Úloha yellow proteínov u flebotomov nie je zatiaľ známa. Volf a kol. (2002) zistili, že lektín zo samíc *P. duboscqi* vykazuje vysokú podobnosť k yellow proteínom blízko príbuzného druhu *P. papatasi* a *L.*

longipalpis. Rekombinantné yellow proteíny *L. longipalpis* (LJM11, LJM111, LJM17) viažu prohemostatické a prozápalové biogénne amíny, najmä serotonin, catecholamíny a histamín. Myši imunizované proteínom LJM11 mali protektívnu imunitu proti infekcii *L. major* (Xu a kol., 2011), naopak u myši imunizovaných yellow proteínmi *P. papatasi* sa následky infekcie *L. major* zhoršili (Oliveira a kol., 2008). U *P. orientalis* boli za neredukujúcich podmienok nájdené dva yellow proteíny s molekulovými hmotnosťami 42 a 44 kDa a za redukujúcich podmienok boli nájdené taktiež dva yellow proteíny s molekulovými hmotnosťami 44 a 46 kDa. Yellow proteíny boli jednými z majoritne rozpoznávaných proteínov etiópskymi psími sérami. Podobne to bolo i u psov a líšok pobodaných *L. longipalpis* (Bahia a kol. 2007; Gomes a kol., 2007; Hostomská a kol., 2008) a *P. perniciosus* (Vlková a kol., 2011). Yellow proteíny boli silne rozpoznávané aj sérami ľudí vystavených pobodaniu *L. longipalpis* s vyvinutou bunečnou imunitou proti *L. infantum* (Gomes a kol., 2002), rovnako to bolo i u ľudí vystavených pobodaniu *P. papatasi* (Rohoušová a kol., 2005). Rekombinantné yellow proteíny *L. longipalpis* LJM11 a LJM17 predstavujú u ľudí a psov vhodné ukazovatele expozície (Teixeira a kol., 2010).

Apyrázová rodina proteínov hydrolyzuje ATP a ADP, ktoré sú dôležitými hemostatickými a zápalovými agonistami uvoľnenými krvnými doštičkami a poškodenými tkanivovými bunkami. Apyrázy flebotomov patria do rodiny typu *Cimex* (zhrnuté v [Ribeiro a Arcà, 2009; Ribeiro a kol., 2010]). Pri analýze proteomu *P. orientalis* sme detekovali za neredukujúcich podmienok tri apyrázy s molekulovými hmotnosťami 37, 38 a 40 kDa a za redukujúcich podmienok dve apyrázy s molekulovými hmotnosťami 40 a 42 kDa. Na imunoblote boli etiópskymi psími sérami jednými z najvýraznejšie rozpoznávaných proteínov. To, že apyrázy patria k majoritne rozpoznávaným proteínom ľudskými a psími sérami, bolo dokázané i v prípade *P. perniciosus*, *P. papatasi* a *L. longipalpis* (Gomes a kol., 2002; Rohoušová a kol., 2005; Hostomská a kol., 2008; Vlková a kol., 2011). Rekombinantná apyráza *L. longipalpis* (LJL23) bola označená ako potencionálny marker expozície u psov (Teixeira a kol., 2010).

D7-related rodina má pomenovanie podľa D7 proteínu, ktorý bol nájdený v cDNA knižnici proteínov slinných žliaz *Aedes aegypti*. Neskôr sa zistilo, že patrí do superrodiny Odorant binding proteins (OBP). U komárov bolo zistené, že sa jedná o kratagonistov silne viažucich biogénne amíny a leukotriény, ktoré využívajú na potlačanie zápalových a hemostatických agonistov. U flebotomov nie je ich funkcia známa (zhrnuté v [Ribeiro a Arcà, 2009; Ribeiro a kol., 2010]). V proteome *P. orientalis* sme zaznamenali za neredukujúcich podmienok tri D7 proteíny s molekulovými hmotnosťami 24, 25 a 27 kDa a za redukujúcich podmienok dva D7 proteíny s molekulovými hmotnosťami 31 a 33 kDa.

D7 proteíny boli etiópskymi psími sérami rozpoznávané veľmi slabo, silnejšia väzba bola viditeľná u jedného séra zo šiestich sér, ktoré malo vysoké hodnoty protilátok proti *P. orientalis*. Inak to bolo u ľudí s protilátkami proti *P. papatasi*, kde bola viditeľná silná väzba na D7 proteín (Rohoušová a kol., 2005), rovnako to bolo i u psov v prípade *L. longipalpis* (Bahia a kol., 2007; Hostomská a kol., 2008). Podobne ako rekombinantný yellow proteín a apyráza, predstavuje i D7 proteín *L. longipalpis* (LJL13) vhodný marker expozície u psov (Teixeira a kol., 2010).

PpSP15-like proteíny sú pomenované podľa 15 kDa proteínu patriaceho *P. papatasi* (Valenzuela a kol., 2001, Oliveira a kol., 2008) a sú príbuzné s OBP, kam patrí aj D7 proteíny (Anderson a kol., 2006). Ich úloha nie je známa ale pri imunizácií myši PpSP15 proteínom bola získaná imunita voči *L. major*, ktorej vektorom je práve *P. papatasi* (Valenzuela a kol., 2001; Oliveira a kol., 2008). Za redukujúcich a neredukujúcich podmienok boli u *P. orientalis* nájdené dva PpSP15-like proteíny s molekulovými hmotnosťami 13 a 14 kDa. Tieto antigény boli podobne ako pri D7 proteínoch rozpoznávané iba u jedného zo šiestich etiópskych sér.

ParSP25-like rodina bola pomenovaná podľa proteínu SP25 nájdeného u *P. ariasi*. Ich funkcia nie je známa. Myši imunizované ParSp25 proteínom mali vysoké hladiny IgG1 protilátok a silnú DTH reakciu po pobodaní *P. ariasi* (Oliveira a kol., 2006). V proteome *P. orientalis* je tento proteín viditeľný iba za neredukujúcich podmienok a má molekulovú hmotnosťou 32 a 71 kDa. ParSP25-like proteín s molekulovou hmotnosťou 32 kDa patril k jedným z majoritne rozpoznávaných proteínov etiópskymi psími sérami, skrížene ho rozpoznávalo i sérum psa pobodaného *P. perniciosus*. Vlková a kol. (2011) zaznamenali, že psie séra s anti-*P. perniciosus* protilátkami silne rozpoznávali neznámy proteín s molekulovou hmotnosťou 33 kDa charakterizovaný ako PpeSP08. Tento proteín je podľa Andersen a kol. (2006) príbuzný k SP25 proteínu *P. ariasi*. ParSP25-like proteíny boli doteraz nájdené iba u podrodu *Adlerius* (*P. arabicus*) a u podrodu *Larrousius* (*P. ariasi*, *P. perniciosus*, *P. tobbi*) (Rohoušová a kol., 2012).

Proteínová rodina **Ag5-related** bola pôvodne opísaná z jedu mravcov a ôs. U tabanidov členovia tejto rodiny pravdepodobne plnia úlohu inhibítorov agregácie krvných doštičiek (zhrnuté v [Ribeiro a Arcà, 2009; Ribeiro a kol., 2010]), u bodavky stajňovej (*Stomoxys calcitrans*) Ag5 proteín viaže silne imunoglobulíny, hlavne ich Fc fragment (Ameri a kol., 2008). Je veľmi ťažké určiť vlastnosti týchto proteínov v slinách krvsajúceho hmyzu z dôvodu odlišných funkcií jednotlivých členov proteínovej rodiny (zhrnuté v Ribeiro a Arcà, 2009). Ag5 proteín bol u *P. orientalis* zaznamenaný iba za neredukujúcich podmienok s molekulovou hmotnosťou 28 kDa. Tento proteín bol veľmi slabo rozpoznávaný etiópskymi sérami, na rozdiel od Ag5 proteínu *P. perniciosus*, ktorý bol silne rozpoznávaný psími sérami

s protilátkami proti *P. perniciosus* (Vlková a kol., 2011).

PpSP32-like rodina je pomenovaná podľa SP32 proteínu *P. papatasi*, ktorý je podobný hodvábnemu proteínu pavúka *Nephila claviceps* (Valenzuela a kol., 2001). Funkcia tejto proteínovej rodiny nie je známa, ale u *P. perniciosus* a *L. longipalpis* vykazujú PpSP32 proteíny podobnosť s kolagén viažucimi proteínmi (Valenzuela a kol., 2004; Anderson a kol., 2006). V proteome *P. orientalis* bol nájdený proteín z rodiny PpSP32-like iba za redukujúcich podmienok s molekulovou hmotnosťou 31 kDa. Keďže imunoblotty boli robené iba za neredukujúcich podmienok, nevieme či by tento proteín bol rozpoznávaný psími sérami a nemáme tak žiadne informácie o jeho imunogénnych vlastnostiach.

Pri imunoblotingu so slinnými žľazami *P. orientalis* rozpoznávali etiópske psie séra najmä proteíny s molekulovou hmotnosťou 32, 37, 38, 40, 42 a 44 kDa, ktoré patria do rodín ParSP25-like, apyráz a yellow-related. Na základe týchto výsledkov by sa dali tieto imunodominantné proteíny využiť v podobe rekombinantov ako ukazovatele expozície flebotomom, podobne ako v prípade *L. longipalpis* (Souza a kol., 2010; Teixeira a kol., 2010). Tieto proteíny veľmi slabo rozpoznávali aj psie séra z Rumunska. Pravdepodobne sa jednalo o skrížené reakcie medzi flebotomami z podrodu *Larroussius* vyskytujúcich sa v Etiópii a v Rumunsku. Táto slabá skrížená reakcia koreluje s výsledkami z ELISA testu. Blízka príbuznosť flebotomov v tomto podrode bola preukázaná i v prípade, keď pes pobodaný *P. perniciosus* skrížene rozpoznával väčšinu proteínov slinných žliaz *P. orientalis*.

Lutzomyia longipalpis je novosvetským druhom flebotoma s výskytom v oblastiach Strednej a Južnej Ameriky, kde je vektorom *L. infantum* (Killick-Kendrick, 1999). Nevyskytuje sa vôbec v Starom svete a preto sme neočakávali skrížené reakcie s *P. orientalis*. U etiópskych psích sér s protilátkami proti *P. orientalis* bola viditeľná skrížená reakcia s 50 kDa proteínom slinných žliaz *L. longipalpis*. Tento proteín bol výrazne okrem iných rozpoznávaný aj homológny sérom. Proteín s 50 kDa molekulovou hmotnosťou bol skrížene rozpoznávaný aj sérom psa pobodaného *P. perniciosus*. Tento proteín bol rozpoznávaný psími a líščími sérami z oblastí výskytu *L. longipalpis* v Brazílii (Teixeira a kol., 2010). V inej štúdií z tej istej oblasti rozpoznávali líščie séra proteín s molekulovou hmotnosťou 44 kDa a psie séra rozpoznávali silne proteíny s molekulovou hmotnosťou 44 a 45 kDa (Gomes a kol., 2007). Séra z laboratórnych psov opakovane poštípaných *L. longipalpis* viazali okrem iných aj antigény s molekulovými hmotnosťami 37 – 39 a 45 kDa, ktoré s najvyššou pravdepodobnosťou patria do rodiny Yellow proteínov (Hostomská a kol., 2008). Psy prirodzene infikované *L. infantum* rozpoznávali na imunoblote dva proteíny slinných žliaz *L. longipalpis* s molekulovou hmotnosťou 28,6 a 47,3 kDa (Bahia a kol., 2007), tieto proteíny boli identifikované ako D7 proteín a yellow proteín (Valenzuela a kol., 2004; Bahia a kol.,

2007). Rekombinanty týchto proteínov boli dobre rozpoznávané psími sérami s protilátkami proti *L. longipalpis* (Teixeira a kol., 2010). Teixeira a kol. (2010) pozorovali skríženú reakciu medzi *P. perniciosus* a *L. longipalpis* u psích sér s anti-*L. longipalpis* protilátkami, ktoré skrížene viazali niekoľko proteínov *P. perniciosus*. V našom pokuse pes pobodaný *L. longipalpis* slabo skrížene rozpoznával niekoľko proteínov *P. orientalis* a myš s protilátkami proti *P. orientalis* slabo skrížene viazala proteíny *L. longipalpis*. Skrížené reakcie medzi *P. perniciosus* a *L. longipalpis* a medzi *P. orientalis* a *L. longipalpis* sú pravdepodobne spôsobené tým, že flebotómovia z podrodu *Larroussius*, ktorí sa vyznačujú blízkou príbuznosťou (ako už bolo spomenuté vyššie), zdieľajú spoločné antigény s *L. longipalpis*.

Sergentomyia schwetzi patrí do rodu *Sergentomyia* s častým predominantným výskytom v oblastiach východnej Afriky (Quate, 1964; Elnaiem a kol., 1997; Balkew a kol., 1999; Lambert a kol., 2002; Gebre-Michael a kol., 2007; Ngumbi a kol., 2010). Podľa Quate (1964) je hlavne lesným druhom, ale je veľmi dobre zastúpený aj na pastvinách a v dedinách, s častým výskytom vnútri budov (Quate, 1964; Elnaiem a kol., 1997; Lambert a kol., 2002). Známymi hosťiteľmi sú studenokrvné a teplotokrvné zvieratá vrátane človeka (Quate, 1964). Na základe týchto informácií sme chceli zistiť, či pri tak vysokom zastúpení v daných lokalitách predstavujú psy vhodného hosťiteľa a či dochádza k skríženým reakciám s antigénmi *P. orientalis*.

Etiópske a zároveň i rumunské psie séra rozpoznávali slabšie či silnejšie 36 a 37 kDa proteíny slinných žliaz *S. schwetzi*. Jedno z troch etiópskych sér navyše silne viazalo proteíny s molekulovou hmotnosťou 30 a 51 kDa. Proteín s molekulovou hmotnosťou 51 kDa silne rozpoznávalo aj ďalšie psie sérum z Etiópie, veľmi slabo ho rozpoznávalo i rumunské sérum. Variabilne rozpoznávané antigény *S. schwetzi* môžu znamenať, že psy prišli do kontaktu s týmto flebotómom a boli vystavené pobodaniu rôznou mierou. To, že psy môžu predstavovať atraktívneho hosťiteľa pre *S. schwetzi* bolo zistené na základe hosťiteľských preferencií tohto flebotoma (Hassan a kol., 2009). Štúdiá zo Senegalu nevyklučuje možný prenos psej leishmaniózy *S. schwetzi* a *S. dubia* (Senghor a kol., 2011). Rozpoznávanie antigénov *S. schwetzi* rumunskými psími sérami mohlo bolo pravdepodobne spôsobené skríženou reakciou medzi *S. schwetzi* a *S. minuta*, ktorá sa nachádza v Rumunsku (Dancesco, 2008). Žiadna skrížená reakcia nebola pozorovaná u myších sér. Myš s protilátkami proti *S. schwetzi* rozpoznávala homológne antigény, majoritne 36 a 37 kDa proteíny, viditeľný bol i proteín s molekulovou hmotnosťou 12 a 30 kDa.

Culex quinquefasciatus je druhom s rozľahlým areálom výskytu v oblasti subtrópov a trópov a principiálne saje na vtákoch. Do našej analýzy bol vybraný, pretože sme chceli

zistiť či etiópske psie séra rozpoznávajú proteíny slinných žliaz tohto druhu a či dochádza k skríženým reakciám medzi antigénmi *Culex* a *Phlebotomus*.

Etiópske a rumunské psie séra silne viazali 22 a 58 kDa proteíny patriace *C. quinquefasciatus*. Na základe výsledkov z imunoblotingu môžeme predpokladať, že ako etiópske, tak aj rumunské psy prišli do kontaktu s *C. quinquefasciatus* vďaka jeho kosmopolitnému rozšíreniu. Zaujímavé je, že v prípade jednej vzorky psa z Etiópie bol výrazne viditeľný iba 58 kDa proteín, čo by mohlo znamenať nižšiu mieru expozície. Žiadna skrížená reakcia nebola spozorovaná u myších sér. Myšie séra na rozdiel od psích sér silne viazali 6 proteínov s molekulovou hmotnosťou od 22 – 64 kDa. Nascimento a kol. (2000) popisali u myši s protilátkami proti *C. quinquefasciatus* reakciu s 28,3 a 35,7 kDa proteínmi. U ľudí so silným alergickými reakciami na pobodanie týmto druhom rozpoznávali IgE protilátky proteíny s molekulovou hmotnosťou 28 a 35 kDa. Tieto proteíny boli identifikované ako D7-proteíny (dos Santos Malafronte a kol., 2003).

Pri imunoblotingu proteínov so slinnými žľazami flebotomov sme pozorovali v niektorých prípadoch veľmi slabé reakcie preimúnnych psích sér s týmito proteínmi. Došlo k tomu pravdepodobne z dôvodu nešpecifických reakcií. Pri interpretovaní našich výsledkov je nutné brať do úvahy, že sme nemali informácie o súčasnom ani minulom zdravotnom stave etiópskych a rumunských psov. Prípadne ochorenia by totiž mohli ovplyvniť reakcie imunitného systému.

Našími pokusmi sme zistili, že používanie protilátok ako ukazovateľov expozície proti celým slinným žľazám flebotomov funguje iba u niektorých druhov domácich zvierat, konkrétne u psov a oviec. U zvyšných zvierat neboli získané výsledky jednoznačné. Je preto vhodné uvažovať o nahradení celých slinných žliaz rekombinantnými proteínmi, čím by sa obmedzili skrížené reakcie. V našom laboratóriu sa pracuje na tvorbe rekombinantných proteínov slinných žliaz *P. orientalis*. Jedným z využití týchto rekombinantov je ich použitie rovnako ako v prípade celých slinných žliaz, na opakované testovanie sér domácich zvierat na prítomnosť protilátok proti slinám *P. orientalis*. Predpokladáme, že by sme mohli tak dosiahnuť vyššiu špecifickosť reakcie a tým pádom lepšie osvetliť správanie *P. orientalis* a úlohu domácich zvierat v prenose VL.

6 ZÁVEREČNÉ ZHRNUTIE

V tejto práci sme detekovali prítomnosť IgG protilátok proti *P. orientalis* u domácich zvierat z endemických oblastí VL v severnej a severozápadnej Etiópii. Z piatich druhov zvierat bol signifikantný rozdiel v hladinách protilátok medzi etiópskymi a kontrolnými sérami zaznamenaný u psov, kôz, oviec a somárov. V prípade kôz, somárov a kráv sme ale pozorovali vysoké hodnoty cut-off a je preto diskutabilné, či bol dosiahnutý signifikantný rozdiel relevantný. Predpokladáme, že vysoké hodnoty IgG protilátok kontrolných sér z Českej republiky sú spôsobené skříženými reakciami s protilátkami proti iným druhom krvsajúceho hmyzu a svoju úlohu tu hrá aj neznámy zdravotný stav zvierat. Na základe našich výsledkov usudzujeme, že používanie celých slinných žliaz ako ukazovateľov expozície nie je vhodné u väčšiny druhov domácich zvierat z hľadiska nízkej špecificity reakcie.

Pri meraní hladín psích IgG2 protilátok proti slinám *P. orientalis* sme zaznamenali signifikantne vyššie hladiny u etiópskych sér v porovnaní s kontrolnými sérami. Zároveň sme pozorovali, že vzorky s vysokými hodnotami IgG2 protilátok mali aj vysoké hodnoty IgG protilátok, čo potvrdzuje predošlé zistenia o rovnakom vývoji dynamiky u IgG a IgG2 protilátok. Zároveň sme potvrdili, že u psov je meranie špecifických IgG a IgG2 proti antigénom slinných žliaz vhodné pre zisťovanie expozície flebotomom.

Pri imunoblotingu so slinnými žľazami *P. orientalis* etiópske psie séra rozpoznávali najmä proteíny s molekulovou hmotnosťou 32, 37, 38, 40, 42 a 44 kDa, ktoré boli definované ako ParSP25-like, apyrázy a yellow proteíny. Pri testovaní reakcií sér so slinnými žľazami iných druhov krvsajúceho hmyzu, sme pozorovali skříženú reakciu etiópskych psích sér s antigénmi novosvetského flebotoma *L. longipalpis*, rovnako to bolo i v prípade myšieho séra s anti-*P. orientalis* protilátkami. Etiópske psie séra rozpoznávali 36, 37 a 51 kDa proteíny slinných žliaz *S. schwetzi* a 22 a 58 kDa proteíny *C. quinquefasciatus*. Oba tieto druhy sa v Etiópii vyskytujú a je teda pravdepodobné, že testované psy s nimi prišli do kontaktu. U myších sér žiadna skřížená reakcia týchto druhov s *P. orientalis* nebola pozorovaná.

Analyzovaním proteínových profilov slinných žliaz kolónií *P. orientalis* AZ a *P. orientalis* MW pomocou MALDI TOF/TOF analyzéry sme zistili, že proteínové zloženie slín u oboch kolónií sa nelíši. Nájdené proteínové rodiny súhlasili s proteínovými rodinami doteraz popísanými v proteínových profiloch slinných žliaz iných druhov flebotomov.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Alam, M.S., Ghosh, D., Khan, Md.G.M., Islam, M.F., Mondal, D., Itoh, M., Islam, Md.N., Haque, R. (2011).** Survey of domestic cattle for anti-*Leishmania* antibodies and *Leishmania* DNA in visceral leishmaniasis endemic area of Bangladesh. *BMC Veterinary Research*, 7: 27.
- Ali, A., Berhe, N., Mengistu, G., Gebre-Michael, T. (2002).** Leishmaniasis survey in the Awash Valley: The magnitude of positive leishmanin reaction and its pattern in the Middle Awash. *Ethiopian Journal of Health Development*, 18: 157 – 163.
- Ali, A., Gebre-Michael, T., Mengistu, G., Balcha, F. (2004).** A survey on leishmaniasis and the leishmanin skin test profile in Lower Awash Valley, northeast Ethiopia. *Ethiopian Journal of Health Development*, 18: 159 – 163.
- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Boer, M.D., Cañavate, C., Dedet, J.-P., Grandoni, L., Horst, R.T., López –Veléz, R., Moreno, J. (2008).** The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, 21: 334 – 359.
- Alvar, J., Bashaye, S., Argaw, D., Cruz, I., Aparicio, P., Kassa, A., Orfanos, G., Parrenõ, F., Babaniyi, O., Gudeta, N., Cañavate, C., Bern, C. (2007).** Kala-azar outbreak in Libo Kemkem, Ethiopia: Epidemiologic and parasitologic assessment. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 275 – 282.
- Ameri, M., Wang, X., Wilkerson, M.J., Kanost, M.R., Broce, A.B. (2008).** An immunoglobulin binding protein (Antigen 5) of the stable fly (Diptera: Muscidae) salivary gland stimulates bovine immune responses. *Journal of Medical Entomology*, 45: 94 – 101.
- Anderson, J.M., Oliveira, F., Kamhawi, S., Mans, B.J., Reynoso, D., Seitz, A.E., Lawyer, A., Garfield, M., Pham, M., Valenzuela, J.G. (2006).** Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics*, 7:52.
- Andrade, B.B., Teixeira, C.R. (2012).** Biomarkers for exposure to sand flies bites as tools to aid control of leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 3: 1 – 7.
- Anjili, C.O., Ngichabe, C.K., Mbatia, P.A., Lugalia, R.M., Wamwayi, H.M., Githure, J.I. (1998).** Experimental infection of domestic sheep with culture-derived *Leishmania donovani* promastigotes. *Veterinary Parasitology*, 74: 315 – 318.
- Ashford, R.W. (1996).** Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology*, 14: 523 – 532.
- Ayele, T., Ali, A. (1984).** The distribution of visceral leishmaniasis in Ethiopia. *The American*

Society of Tropical Medicine and Hygiene, 33: 548 – 552.

- Bahia, D., Contijo, N.F., León, I.R., Perales, J., Pereira, M.H., Oliveira, G., Corrêa-Oliveira, R., Reis, A.B. (2007).** Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognize two proteins from the saliva of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology Research*, 100: 449 – 454.
- Balkew, M., Hailu, A., Berhe, N., Gemetchu, T. (1999).** Leishmaniasis in the lower Omo plains, south-western Ethiopia: the sandfly fauna. *Ethiopian Medical Journal*, 37: 31 – 40.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L. (2008).** Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, 24: 324 – 330.
- Barral, A., Honda, E., Caldas, A., Costa, J., Vinhas, V., Rowton, E.D., Valenzuela, J.G., Charlab, R., Barral-Neto, M., Ribeiro, J.M.C. (2000).** Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62: 740 – 745.
- Bashaye, S., Nombela, N., Argaw, D., Mulugeta, A., Herrero, M., Nieto, J., Chicharro, C., Cañavate, C., Aparicio, P., Vélez, I.D., Alvar, J., Bern, C. (2009).** Risk factors for visceral leishmaniasis in a new epidemic site in Amhara region, Ethiopia. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 34 – 39.
- Bern, C., Courtenay, O., Alvar, J. (2010).** Of cattle, sand flies and men: a systematic review of risk factors analyses for South Asian visceral leishmaniasis and implications for elimination. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4:e599.
- Bhattarai, N.R., Van der Auwera, G., Rijal, S., Picado, A., Speybroeck, N., Khanal, B., De Doncker, S., Das, M.L., Ostyn, B., Davies, C., Coosemans, M., Berkvens, D., Boelaert, M., Dujardin, J.-C. (2010).** Domestic animals and epidemiology of visceral leishmaniasis, Nepal. *Emerging Infectious Diseases*, 16: 231 – 237.
- Bora, D. (1999).** Epidemiology of visceral leishmaniasis in India. *The National Medical Journal of India*, 12: 62 – 68.
- Clements, M.F., Gidwani, K., Kumar, R., Hostomská, J., Dinesh, D.S., Kumar, V., Das, P., Müller, I., Hamilton, G., Volfová, V., Boelaert, M., Das, M., Rijal, S., Picado, A., Volf, P., Sundar, S., Davies, C.R., Rogers, M.E. (2010).** Measurement of recent exposure to *Phlebotomus argentipes*, the vector of Indian visceral leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82: 801 – 807.
- Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., Cheng, L., Laughinghouse, A., Ward, J.M., Elnaiem,**

- D.A., Fischer, L., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S. (2009).** Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. *PLoS Pathogens*, 5: e1000441.
- Collin, S., Davidson, R., Ritmeijer, K., Keus, K., Melaku, Y., Kipngetich, S., Davies, C. (2004).** Conflict and kala-azar: Determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. *Clinical Infectious Diseases*, 38: 612 – 619.
- Danescu, P. (2008).** Les espres de phlébotomes (Diptera: Psychodidae) de Roumanie, certains aspects de leur écologie et nouvelles stations de capture. *Travaux du Muséum National d'Histoire Naturelle*, 51: 185 – 199.
- Dereure, J., Boni, M., Pratlong, F., El Hadi Osman, M., Bucheton, B., El-Safi, S., Feugier, E., Musa, K., Davoust, B., Dessien, A., Dedet, J.P. (2000).** Visceral leishmaniasis in Sudan: first identifications of *Leishmania* from dogs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94: 154 – 155.
- Dereure, J., El-Safi, S.H., Bucheton, B., Boni, M., Khei, M.M., Davoust, B., Pratlong, F., Feugier, E., Lambert, M., Dessein, A., Dedet, J.-P. (2003).** Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host-parasite relationships. *Microbes and Infection*, 5: 1103 – 1108.
- Desjeux, P. (2004).** Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 27: 305 – 318.
- Dinesh, D.S., Ranjan, A., Palit, A., Kishore, K., Kar, S.K. (2001).** Seasonal and nocturnal landing/biting behavior of *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 95: 197 – 202.
- dos Santos Malafronte, R., Calvo, E., James, A.A., Marinotti, O. (2003).** The major salivary gland antigens of *Culex quinquefasciatus* are D7-related proteins. *Insert Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 63 – 71.
- Doucoure, S., Mouchet, F., Cornelie, S., DeHecq, J.S., Rutee, A.H., Roca, Y., Walter, A., Hervé, J.P., Misse, D., Favier, F., Gasque, P., Remoue, F. (2012).** Evaluation of the human IgG antibody response to *Aedes albopictus* saliva as a new specific biomarker of exposure to vector bites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6: e1487.
- Elnaiem, D.A. (2011).** Ecology and control of the sand fly vectors of *Leishmania donovani* in East Africa, with special emphasis on *Phlebotomus orientalis*. *Journal of Vector Ecology*, 36: S23 – S31.
- Elnaiem, D.A., Connor, S.J., Thomson, M.C., Hassan, M.M., Hassan, H.K., Aboud, M.A., Ashford, R.W. (1998).** Environmental determinants of the distribution of *Phlebotomus orientalis* in Sudan. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 92: 877

- 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., Hassan, H.K., Ward, R.D. (1997).** Phlebotomine sandflies in a focus of visceral leishmaniasis in a border area of eastern Sudan. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 91: 307 – 318.
- Elnaiem, D.A., Hassan, H.K., Ward, R.D. (1999b).** Associations of *Phlebotomus orientalis* and other sandflies with vegetation types in the eastern Sudan focus of kala-azar. *Medical and Veterinary Entomology*, 13: 198 – 203.
- Elnaiem, D.A., Hassan, M.M., Maingon, R., Nureldin, G.H., Mekawi, A.M., Miles, M., Ward, R.D. (2001).** The Egyptian mongoose, *Herpestes ichneumon*, is a possible reservoir host of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Parasitology*, 122: 531 – 536.
- Elnaiem, D.A., Meneses, C., Slotman, M., Lanzaro, G.C. (2005).** Genetic variation in the sand fly salivary protein, SP-15, a potential vaccine candidate against *Leishmania major*. *Insect Molecular Biology*, 14: 145 – 150.
- Elnaiem, D.A., Osman, O.F. (1998).** Evidence for active transmission of visceral leishmaniasis within a village in eastern Sudan. *Acta Tropica*, 71: 305 – 309.
- El-Safi, S.H., Bucheton, B., Kheir, M.M., Abdel, H., Musa, A., El-Obaid, M., Hammad, A., Dessein, A. (2002).** Epidemiology of visceral leishmaniasis in Atbara River area, eastern Sudan: the outbreak of Barbar El Fugara village (1996 – 1997). *Microbes and Infection*, 4: 1439 – 1447.
- Fontaine, A., Pascual, A., Orlandi-Pradines, E., Diouf, I., Remoué, F., Pagès, F., Fusaï, T., Rogier, Ch., Almeras, L. (2011).** Relationship between exposure to vector bites and antibody responses to mosquito salivary gland extracts. *PLoS ONE*, 6: e29107.
- Fuller, G.K., Lemma, A., Haile, T., Gameda, N. (1979).** Kala-azar in Ethiopia: survey of south-west Ethiopia. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 73: 417 – 431.
- Gebre-Michael, T., Balkew, M., Alamirew, T., Gudeta, N., Reta, M. (2007).** Preliminary entomological observations in a highland area of Amhara region, northern Ethiopia, with epidemic visceral leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 4: 367 – 370.
- Gebre-Michael, T., Balkew, M., Ali, A., Ludovisi, A., Gramiccia, M. (2004a).** The isolation of *Leishmania tropica* and *L. aethiopia* from *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) species (Diptera: Psychodidae) in the Awash Valley, northeastern Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98: 64 – 70.

- Gebre-Michael, T., Balkew, M., Berhe, N., Hailu, A., Mekonnen, Y. (2010).** Further studies on the phlebotomine sandflies of the kala-azar endemic lowlands of Humera-Metema (north-west Ethiopia) with observations on their natural blood meal sources. *Parasites & Vectors*, 3: 6.
- Gebre-Michael, T., Malone, J.B., Balkew, M., Ali, A., Berhe, N., Hailu, A., Herzi, A.A. (2004b).** Mapping the potencial distribution of *Phlebotomus martini* and *P. orientalis* (Diptera: Psychodidae), vectors of kala-azar in East Africa by use of geographic information systems. *Acta Tropica*, 90: 73 – 86.
- Gomes, R.B., Brodskyn, C., de Oliveira, C.I., Costa, J., Miranda, J.C., Caldas, J., Valenzuela, J.G., Barral-Neto, M., Barral, A. (2002).** Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed – type hypersensitivity. *The Journal of Infectious Diseases*, 186: 1530 – 1534.
- Gomes, R.B., Mendonça, I.L., Silva, V.C., Ruas, J., Silva, M.B., Cruz, M.S.P., Barral, A., Costa, C.H.N. (2007).** Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101: 127 – 133.
- Gomes, R., Oliveira, F. (2012).** The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on *Leishmania* immunity. *Frontiers in Immunology*, 3: 1 – 8.
- Gramiccia, M., Gradoni, L. (2005).** The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 35: 1169 – 1180.
- Hailu, A., Balkew, M., Berhe, N., Meredith, S.E.O., Gemetchu, T. (1995).** Is *Phlebotomus (Larroussius) orientalis* a vector of visceral leishmaniasis in south-west Ethiopia? *Acta Tropica*, 62: 15 – 20.
- Hamilton, J.G.C., Elnaiem, D.A. (2000).** Sugars in the gut of the sandfly *Phlebotomus orientalis* from Dinder National Park, Eastern Sudan. *Medical and Veterinary Entomology*, 14: 64 – 70.
- Hassan, M.M., Elamin, E.M., Mukhtar, M.M. (2008).** Isolation and identification of *Leishmania donovani* from *Phlebotomus orientalis*, in area of eastern Sudan with endemic visceral leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 102: 553 – 555.
- Hassan, M.M., Elraba'a, F.M.A., Ward, R.D., Maingon, R.D.C., Elnaiem, D.A. (2004).** Detection of high rates of in-village transmission of *Leishmania donovani* in eastern Sudan. *Acta Tropica*, 92: 77 – 82.
- Hassan, M.M., Osman, O.F., El-raba'a, F.M.A., Schallig, H.D.F.H., Elnaiem, D.A. (2009).**

- Role of the domestic dog as a reservoir host of *Leishmania donovani* in eastern Sudan. *Parasites & Vectors*, 2: 26.
- Hecht, M.M., Bussacos, A.C., Lozzi, S.P., Santana, J.M., Teixeira, A.R.L. (2006).** *Triatoma infestans* chooses to feed upon immune prey. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75: 893 – 900.
- Hellberg, W., Mellor, P.S., Torsteinsdóttir, S. (2009).** Insect bite hypersensitivity in the horse: Comparison of IgE-binding proteins in salivary gland extracts from *Simulium vittatum* and *Culicoides nubeculosus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 132: 62 – 67.
- Herrero, M., Orfanos, G., Argaw, D., Mulugeta, A., Aparicio, P., Parreño, F., Bernal, O., Rubens, D., Pedraza, J., Lima, M.A., Flevaud, L., Palma, P.P., Bashaye, S., Alvar, J., Bern, C. (2009).** Natural history of a visceral leishmaniasis outbreak in highland Ethiopia. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 373 – 377.
- Hostomská, J., Rohoušová, I., Volfová, V., Stanneck, D., Mencke, N., Volf, P. (2008).** Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8: 443 – 450.
- Hostomská, J., Volfová, V., Mu, J., Garfield, M., Rohoušová, I., Volf, P., Valenzuela, J.G., Jochim, R.C. (2009).** Analysis of salivary transcripts and antigens of the sand fly *Phlebotomus arabicus*. *BMC Genomics*, 10: 282.
- Chappuis, F., Sundar, S., Haili, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J., Boelaert, M. (2007).** Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature reviews. Microbiology*, 5: 873 – 882.
- Chowdhury, R., Dotson, E., Blackstock, A.J., McClintock, S., Maheswary, N.P., Faria, S., Islam, S., Akter, T., Kroeger, A., Akhter, S., Bern, C. (2011).** Comparison of insecticide-treated nets and indoor residual spraying to control the vector of visceral leishmaniasis in Mymensingh district, Bangladesh. *American Journal of Tropical Medicine*, 84: 662 – 667.
- Jamjoom, M.B., Ashford, R.W., Bates, P.A., Chance, M.L., Kemp, S.J., Watts, P.C., Noyes, H.A. (2004).** *Leishmania donovani* is the only cause of visceral leishmaniasis in East Africa; previous description of *L. infantum* and “*L. archibaldi*” from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data. *Parasitology*, 129: 399 – 409.
- Kamhawi, S. (2000).** The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes and Infection*, 2: 1765 – 1773.

- Kato, H., Anderson, J.M., Kamhawi, S., Oliveira, F., Lawyer, P.G., Pham, V.M., Sangare, C.S., Samake, S., Sissoko, I., Garfield, M., Sigutova, L., Volf, P., Doumbias, S., Valenzuela, J.G. (2006).** High degree of conservancy among secreted salivary gland proteins from two geographically distant *Phlebotomus duboscqi* sandflies (Mali and Kenya). *BMC Genomics*, 7: 226.
- Killick-Kendrick, R. (1999).** The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17: 279 – 289.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Focheux, C., Dereure, J., Puech, M-P., Cadiergues, M.C. (1997).** Protection of dogs from bite of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, 11: 105 – 111.
- Kolaczinski, J.H., Reithinger, R., Worku, D.T., Ocheng, A., Kasimiro, J., Kabatereine, N., Brooker, S. (2008).** Risk factors of visceral leishmaniasis in East Africa: a case-control study in Pokot territory of Kenya and Uganda. *International Journal of Epidemiology*, 37: 344 – 352.
- Lainson, R., Dye, Ch., Shaw, J.J., MacDonald, D.W., Courtenay, O., Souza, A.A.A., Silveira, F.T. (1990).** Amazonian visceral leishmaniasis – distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85: 135 – 137.
- Lambert, M., Dereure, J., El-Safi, S.H., Bucheton, B., Desein, A., Boni, M., Feugier, E., Dedet, J.-P. (2002).** The sandfly fauna in the visceral-leishmaniasis focus of Gedaref, in the Atbara-River area of eastern Sudan. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 96: 631 – 636.
- Lanzaro, G.C., Lopes, A.H.C.S., Ribeiro, J.M.C., Shoemaker, C.B., Warburg, A., Soares, M., Titus, R.G. (1999).** Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Insect Molecular Biology*, 8: 267 – 275.
- Lewis, D.J., Minter, D.M., Ashford, R.W. (1974).** The subgenus *Larroussius* of *Phlebotomus* (Diptera, Psychodidae) in the Ethiopian region. *Bulletin of Entomological Research*, 64: 435 – 442.
- Lukeš, J., Mauricio, I.L., Schönian, G., Dujardin, J.-C., Soteriadou, K., Dedet, J.-P., Kuhls, K., Tintaya, K.W.Q., Jirků, M., Chocholová, E., Haralambous, Ch., Pratlong, F., Oborník, M., Horák, A., Ayala, F.J., Miles, M.A. (2007).** Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *PNAS*, 104: 9375 – 9380.

- Lyons, S., Veeken, H., Long, J. (2003).** Visceral leishmaniasis and HIV in Tigray, Ethiopia. *Tropical Medicine and International Health*, 8: 733 – 739.
- Mahamdallie, S.S., Ready, P.D. (2012).** No recent adaptive selection on the apyrase of Mediterranean *Phlebotomus*: implications for using salivary peptides to vaccinate against canine leishmaniasis. *Evolutionary Applications*, 5: 293 – 305.
- Maroli, M., Mizzoni, V., Siragusa, C., D'orazi, 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.
- Mazloui Gavgani, A.S., Hodjati, M.H., Mohite, H., Davies, C.R. (2002).** Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomized trial. *Lancet*, 360: 374 – 379.
- Mazza, G., Whiting, A.H., Day, M.J., Duffus, W.P.H. (1994).** Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG subclasses in the serum of normal and diseased dogs. *Research in Veterinary Science*, 57: 133 – 139.
- Mohebbali, M., Hajjaran, H., Hamzavi, Y., Mobedi, I., Arshi, S., Zarei, Z., Akhoundi, B., Naeini, K.M., Avizeh, R., Fakhar, M. (2005).** Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. *Veterinary Parasitology*, 129: 243 – 251.
- Mondal, D., Chowdhury, R., Huda, M., Maheswary, N.P., Akther, S., Petzold, M., Kumar, V., Das, M.L., Gurung, Ch.K., Ghosh, D., Kroeger, A. (2010).** Insecticide-treated bed nets in rural Bangladesh: their potential role in the visceral leishmaniasis elimination programme. *Tropical Medicine and International Health*, 15: 1382 – 1389.
- Mukhtar, M.M., Sharief, A.H., El Saffi, S.H., Harith, A.E., Higazzi, T.B., Adam, A.M., Abdalla, H.S. (2000).** Detection of antibodies to *Leishmania donovani* in animals in a kala-azar endemic region in eastern Sudan: a preliminary report. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94: 33 – 36.
- Nascimento, E.P., dos Santos Malafrente, R., Marinotti, O. (2000).** Salivary gland proteins of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 43: 9 – 15.
- Nascimento, R.J., Santana, J.M., Lozzi, S.P., Araújo, C.N., Teixeira, A.R.L. (2001).** Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland proteins. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65: 219 – 226.
- Ngumbi, P.M., Kaburi, J.C., Anjili, Ch.O., Haas, F. (2010).** *Phlebotomus (Larrousius)*

- orientalis* (Diptera: Psychodidae) as a probable secondary vector of visceral leishmaniasis in Kenya. *Journal of Vector Borne Disease*, 47: 58 – 60.
- Ngure, P.K., Kimutai, A., Zipporah, W.N., Rukunga, G., tonui, W.K. (2009).** A review of leishmaniasis in Eastern Africa. *Journal of Nanjing Medical University*, 23: 79 – 86.
- Oliveira, F., Kamhawi, S., Seitz, A.E., Pham, V.M., Guigal, P.M., Fischer, L., Ward, J., Valenzuela, J.G. (2006).** From transcriptome to immunome: Identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine*, 24: 374 – 390.
- Oliveira, F., Lawyer, P.G., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G. (2008).** Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-Leishmania immune response towards protection or exacerbation of disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2: e226.
- Palit, A., Bhattacharya, S.K., Kundu, S.N. (2005).** Host preference of *Phlebotomus argentipes* and *Phlebotomus papatasi* in different biotopes of West Bengal, India. *International Journal of Environmental Health Research*, 15: 449 – 454.
- Picado, A., Das, M.L., Kumar, V., Kesari, S., Dinesh, D.S., Roy, L., Rijal, S., Das, P., Rowland, M., Sundar, S., Cooseman, M., Boelaert, M., Davies, C.R. (2010).** Nets on visceral leishmaniasis vectors in India and Nepal: a cluster randomized trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4: e587.
- Quate, L.W. (1964).** *Phlebotomus* sandflies of the Paloich area in the Sudan. *Journal of Medical Entomology*, 1: 213 – 268.
- Remoue, F., Cisse, B., Ba, F., Sokhna, Ch., Herve, J.-P., Boulanger, D., Simondon, F. (2006).** Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100: 363 – 370.
- Ribeiro, J.M.C., Arca, B. (2009).** From sialomes to the sialoverse: An insight into salivary potion of blood-feeding insects. *Advances in Insect Physiology*, 37: 59–118.
- Ribeiro, J.M.C., Mans, B.J., Arcà, B. (2010).** An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera. *Insect biochemistry and molecular biology*, 40: 767 – 784.
- Ritmeijer, K., Davies, C., van Zorgen, R., Wang, S.-J., Schorscher, J., Dongu'du, S.I., Davidson, R.N. (2007).** Evaluation of a mass distribution programme for fine-mesh impregnated bednets against visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Tropical Medicine and International Health*, 12: 404 – 414.
- Rohoušová, I., Ozensoy, S., Ozbel, Y., Volf, P. (2005).** Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology*, 130: 493 – 499.
- Rohoušová, I., Subrahmanyam, S., Volfová, V., Mu, J., Volf, P., Valenzuela, J.G., Jochim,**

- R.C. (2012).** Salivary gland transcriptomes and proteomes of *Phlebotomus tobbi* and *Phlebotomus sergenti*, vectors of leishmaniasis. *PLoS Neglected tropical Diseases*, 6: e1660.
- Rohoušová, I., Volf, P. (2006).** Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitologica*, 53: 161 – 171.
- Saha, S., Ramachandran, R., Hutin, Y.J.F., Gupte, M.D. (2009).** Visceral leishmaniasis is preventable in a highly endemic village in West Bengal, India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103: 737 – 742.
- Seaman, J., Mercer, A.J., Sondorp, E. (1996).** The epidemic of visceral leishmaniasis in Western Upper Nile, southern Sudan: Course and impact from 1984 to 1994. *International Journal of Epidemiology*, 25: 862 – 871.
- Senghor, M.W., Faye, M.N., Faye, B., Diarra, K., Elguero, E., Gaye, O., Bañuls, A.-L., Niang, A.A. (2011).** Ecology of phlebotomine sand flies in the rural community of Mont Rolland (Thiès region, Senegal): Area of transmission of canine leishmaniasis. *PLoS ONE*, 6: e17773.
- Singh, S.P., Hasker, E., Picado, A., Gidwani, K., Malaviya, P., Singh, R.P., Boelaert, M., Sundar, S. (2010).** Risk factors for visceral leishmaniasis in India; further evidence on the role of domestic animals. *Tropical Medicine & International Health*, 15: 29 – 35.
- Schaffartzik, A., Marti, E., Cramer, R., Rhyner, C. (2010).** Cloning, production and characterization of antigen 5 like proteins from *Simulium vittatum* and *Culicoides nubeculosus*, the first cross-reactive allergen associated with equine insect bite hypersensitivity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 137: 76 – 83.
- Schorscher, J.A., Goris, M. (1992).** Incrimination of *Phlebotomus (Laroussius) orientalis* as a vector of visceral leishmaniasis in western Upper Nile Province, southern Sudan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 622 – 623.
- Schwarz, A., Helling, S., Collin, N., Teixeira, C.R., Medrano-Mercados, N., Hume, J.C.C., Assumpção, T.C., Marcus, K., Stephan, Ch., Meyer, H.E., Ribeiro, J.M.C., Billingsley, P.F., Valenzuela, J.G., Sternberg, J.M., Schaub, G.A. (2009a).** Immunogenic salivary proteins of *Triatoma infestans*: Development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of Triatomines. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3: e532.
- Schwarz, A., Medrano-Mercado, N., Billingsley, P.F., Schaub, G.A., Sternberg, J.M. (2010).** IgM-antibody responses of chickens to salivary antigens of *Triatoma infestans* as early biomarkers for low-level infestation of triatomines. *International Journal for Parasitology*, 40: 1295–1302

- Schwarz, A., Sternberg, J.M., Johnston, V., Medrano-Mercado, N., Anderson, J.M., Hume, J.C.C., Valenzuela, J.G., Schaub, G.A., Billingsley, P.F. (2009b).** Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. *International Journal of Parasitology*, 39: 1021 – 1029.
- Souza, A.P., Andrade, B.B., Aquino, D., Entringer, P., Miranda, J.C., Alcantara, R., Ruiz, D., Soto, M., Teixeira, C.R., Valenzuela, J.G., de Oliveira, C.I., Brodskyn, C.I., Barral-Neto, M., Barral, A. (2010).** Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral leishmaniasis endemic areas. *PLoS Neglected Diseases*, 4: e649.
- Teixeira, C., Gomes, R., Collin, N., Reynoso, D., Jochim, R., Oliveira, F., Seitz, A., Elnaiem, D.E., Caldas, A., de Souza, A.P., Brodskyn, C.I., de Oliveira, C.I., Mendonca, I., Costa, C.H.N., Volf, P., Barral, A., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G. (2010).** Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4: e638.
- Thomson, M.C., Elnaiem, D.A., Ashford, R.W., Connor, S.J. (1999).** Towards a kala-azar risk map for Sudan: mapping the potential distribution of *Phlebotomus orientalis* using digital data of environmental variables. *Tropical Medicine and International Health*, 4: 105 – 113.
- Tonui, W.K. (2006).** Situational analysis of leishmaniases research in Kenya. *African Journal of Health Sciences*, 13: 7 – 21.
- Travi, B.L., Osorio, Y., Guarín, N., Cadena, H. (1998).** *Leishmania (Leishmania) chagasi*: Clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis. *Experimental parasitology*, 88: 73 – 75.
- Valenzuela, J.G., Belkaid, Y., Garfield, M.K., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E.D., Sacks, D.L., Ribeiro, J.M.C. (2001).** Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: Characterization of a protective salivary protein. *The Journal of Experimental Medicine*, 194: 331 – 342.
- Valenzuela, J.G., Garfield, M., Rowton, E.D., Pham, V.M. (2004).** Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *The Journal of Experimental Biology*, 207: 3717 – 3729.

- Vlková, M., Rohoušová, I., Drahota, J., Stanneck, D., Kruedewagen, E.M., Mencke, N., Otranto, D., Volf, P. (2011).** Canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission. PLoS Neglected Tropical Diseases, 5: e1344.
- Volf, P., Grubhoffer, L., Hošek, P. (1993).** Characterization of salivary gland antigen of *Triatoma infestans* and antigen-specific serum antibody response in mice exposed to bites of *T. infestans*. Veterinary Parasitology, 47: 327 – 337.
- Volf, P., Hostomská, J., Rohoušová, I. (2008).** Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. Parasite, 15: 237 – 243.
- Volf, P., Rohoušová, I. (2001).** Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. Parasitology, 122: 37 – 41.
- Volf, P., Skarupová, S., Man, P. (2002).** Characterization of the lectin from females of *Phlebotomus duboscqi* sand flies. European Journal of Biochemistry, 269: 6294 – 6301.
- Volf, P., Volfova, V. (2011).** Establishment and maintenance of sand fly colonies. Journal of Vector Ecology, 36: S1 – S9.
- Wahba, M., Riera, C., Abdel-Hamid, Y.M., Kamal, H. (2005).** Immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role on vertebrate host. Journal of the Egyptian Society of Parasitology, 35: 1135 – 1147.
- Xu, X., Oliveira, F., Chang, B.W., Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., Reynoso, D., my Pham, V., Elnaiem, D.-E., Kamhawi, S., Ribeiro, J.M.C., Valenzuela, J.G., Andersen, J.F. (2011).** Structure and function of a “yellow” protein from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* that confers protective immunity against *Leishmania major* infection. Journal of Biology Chemistry, 286: 32383 – 32393.

Internetové zdroje:

[http:// www.who.int/leishmaniasis/resources/ETHIOPIA.pdf](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/ETHIOPIA.pdf) [2012-06-12]

<http://endtheneglect.org/2011/12/visceral-leishmaniasishiv-co-infection-in-east-africa/> [2012-07-10]

<http://www.worldmapfinder.com/> [2010-07-10]