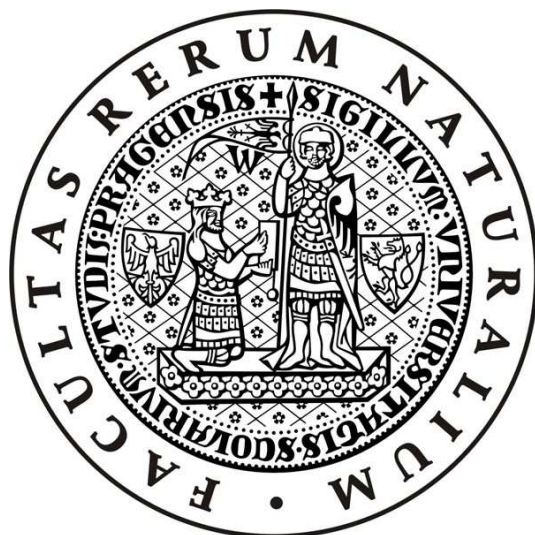


**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Parazitologie



**Mgr. Alena Kučerová**

**Bakteriální mikroflóra ve střevech flebotomů  
Bacterial microflora in the gut of the sand fly**

Rigorózní práce

**Praha, 2013**

**Prohlášení:**

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

V Praze, 27. 3. 2013

Podpis:

## Abstrakt

Leishmanióza je významné lidské parazitární onemocnění tropů a subtropů, které je přenášeno sáním drobného krevsajícího hmyzu rodů *Phlebotomus* a *Lutzomyia*. Touto chorobou trpí lidé v mnoha oblastech světa, zejména v Africe, Latinské Americe, jižní a střední Asii, ale i v okolí Středoziemního moře a na Středním Východě. Projevy onemocnění jsou od mírných kožních příznaků až po závažné smrtelné viscerální formy. Leishmanie se množí a vyvíjejí v trávicím traktu flebotomů, kam se dostávají s krví hostitelů. Flebotomové se však živí i cukernými roztoky z rostlin či produkovanými jiným hmyzem (např. medovice mšic). Příjem rozličné potravy způsobuje, že jsou do střev flebotomů přijímány i mikroorganismy, které mohou mít vliv na vývoj přenašečů i na přenášené parazity. Ke kontaminaci trávicího traktu flebotomů bakteriemi dochází též během larválního vývoje. Samice kladou vajíčka do míst s výskytem organického detritu a rozkládajících se živočišných výkalů, kde se larvy následně živí a vyvíjejí.

Předkládaný článek, který byl publikován ve Folia Parasitologica, se zabývá složením bakteriální mikroflóry u laboratorně chované kolonie *Phlebotomus duboscqi*. Ve střevech larev i dospělců byly identifikovány aerobní nebo fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinky. Poprvé byl u flebotomů potvrzen transstadiální přenos bakterií z larev až do dospělců. Bakterie kmene AK, identifikovaná jako rod *Ochrobactrum*, byla v hojném množství izolovaná ze střev larev, z kulek i z nově vylíhnutých samic. Práce byla doplněna ověřením hypotézy, že lektinová aktivita přítomná ve střevech flebotomů nemá antibakteriální účinek na gramnegativní bakterie. Poznatky a závěry této publikace jsou citovány ve více jak dvou desítkách nových prací týkajících se bakteriální mikroflóry flebotomů.

Dříve se předpokládalo, že mikroorganismy nedokáží přežívat drastické fyziologické změny probíhající ve stádiu kukly a že dospělci se líhnou se sterilním trávicím traktem. Dnes je již zřejmé, že některé bakterie dokáží metamorfózu hmyzu přežívat. Vědci uvažují, že bakterií schopných přežít metamorfozu hmyzu by bylo možné využít v biologickém boji proti flebotomům či flebotomy přenášeným leishmaniím. Tato nová strategie biologické kontroly (zvaná „paratransgenenze“) předpokládá využití bakterií jako nositelů genů pro antileishmaniové molekuly. Transegenní bakterie by byly s potravou vpraveny do trávicího traktu flebotomů, kde by se množily a produkovaly vybrané molekuly s antiparazitárním účinkem. K tomuto účelu se jeví jako vhodné symbiotické, komenzální či jiné bakterie, u nichž je přežití metamorfózy hmyzu jedním ze základních předpokladů.

### Klíčová slova:

Leishmanióza, *Phlebotomus*, *Lutzomyia*, střevní bakterie, *Ochrobactrum*, antimikrobiální molekuly.

## Abstract

Leishmaniasis is an important human parasitic disease of tropical and subtropical areas transmitted by bloodsucking insects of the genus *Phlebotomus* or *Lutzomyia*. There are many people under threat, especially in Africa, Latin America, South and Central Asia, in the Mediterranean and the Middle East. The disease manifests from mild skin symptoms to fatal visceral forms. *Leishmania* parasites proliferate and develop in the digestive tracts of sand fly. Phlebotomine sandflies feed on sugar solutions produced by plants or other insects (eg. honeydew of aphids). Intake of various food causes the contamination of gut with many microorganisms that may affect the vector and/or transmitted parasites. In addition, microbial colonization of the digestive tract occurs during larval development. Females lay eggs in places rich in organic detritus and decaying animal faeces serving as a larval food.

The article published in *Folia Parasitologica* deals with the composition of the bacterial microflora in laboratory-reared colony of *Phlebotomus duboscqi*. Mainly aerobic or facultative anaerobic gram-negative rod-shaped bacteria were identified in the gut of larvae and adults. We demonstrated, for the first time in the sandflies, transstadial passage of bacteria from larvae to adults. Bacteria of strain AK, identified as genus *Ochrobactrum*, was isolated in large numbers from the gut of the larvae, the pupae and from newly hatched females. In addition, the work revealed that the lectin activity present in the sand fly midgut has no antibacterial activity against gram-negative bacteria. The findings and conclusions presented in this paper were cited in more than twenty recent articles related to bacterial microflora of sand flies.

Previously, it was assumed that these microorganisms can not survive the drastic physiological changes during pupation and the adults emerge with sterile digestive tract. Today it is, however, clear that some bacteria can survive the insect metamorphosis. Scientists consider that these bacteria could be used in biological control of sand flies or transmitted *Leishmania* parasites. This novel strategy of biological control (called "paratransgenesis") uses the bacteria as carriers of genes for antileishmanial molecules. Transgenic bacteria eaten by sand flies and their larvae would proliferate in their gut and produce selected molecules with antiparasitic effect. For this purpose, it seems appropriate to use the symbiotic, commensal or other bacteria that can survive metamorphosis of the insects.

### Keywords:

Leishmaniasis, *Phlebotomus*, *Lutzomyia*, gut bacteria, *Ochrobactrum*, antimicrobial molecules.

## **OBSAH:**

1. Mikroorganismy krevsajícího hmyzu.....	6
2. Střevní mikroflóra flebotomů.....	10
3. Seznam použité literatury.....	17
4. Příloha.....	23

## 1. Mikroorganismy krevsajícího hmyzu

Mikroorganismy se vyskytují v trávicích traktech téměř všech živočichů, včetně hmyzu. Podle jejich působení na fitness jedince se může jednat o relativně neškodné komenzály, kteří z hostitele těží, ale na oplátku mu neposkytují žádnou výhodu (Dillon a Dillon, 2004) nebo o mikroorganismy s negativním vlivem na život hostitelského hmyzu (entomopatogeny), nebo o organismy symbiotické, které jsou pro život hmyzu a jeho úspěšný vývoj nezbytné. Mnoho prací se v současnosti věnuje druhové rozmanitosti a identifikaci bakteriální střevní mikroflóry hmyzu s cílem nalézt vhodné modelové mikroorganismy v boji proti závažným, vektory přenášeným lidským chorobám jako jsou virová horečnatá onemocnění, malárie, spavá nemoc, Chagasova choroba, leishmaniózy a filariózy.

Strategie využití hmyzích střevních mikroorganismů v boji proti lidským nemocem může být trojího typu: (1) mikroorganismy negativně ovlivňují přímo svého nositele (entomopatogeny), (2) mikroorganismy modulují parazitární infekci ve vektorovi nebo (3) mikroorganismus (symbiotický či komenzální, nebo třeba i virus) je geneticky modifikován za účelem produkce konkrétních antiparazitárních molekul a vpraven zpět do vektora, aby zde tyto molekuly expimoval a zabraňoval existenci a/nebo množení vektorem přenášených parazitů (tzv. „paratransgeneze“ – viz níže). Tyto možnosti se jeví jako ideální z hlediska lokalizace vývoje přenášeného parazita (ten je přijímán, prodělává svůj vývoj, popř. je vylučován různými částmi bakteriemi osídleného trávicího systému) a z hlediska jednoduchosti kontaminace vektora vybranými mikroorganismy (s potravou larev event. sáním dospělců).

**Ad 1)** Dosud bylo izolováno několik desítek druhů bakterií prokazatelně vykazujících status fakultativních či obligátních patogenů hmyzu. K nejvýznamnějším druhům patří: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Serratia marcescens*, *S. entomophila*, zástupci rodu *Clostridium* a *Bacillus* (*B. cereus*, *B. thuringensis*, *B. sphaericus*) a další. Jsou využívány v boji proti dospělcům i larvám hmyzu (larvicidy), škodí produkcí endotoxinů a/nebo masivní invazí do hmyzího těla (septikémie). Toxiny *B. thuringensis* a *B. sphaericus* byly vyzkoušeny a jsou používány v boji proti larvám a dospělcům komárů (Castro a kol., 2012) i proti flebotomům (Wahba, 2000). Larvicidní účinek na larvy *An. stephensi*, *C. quinquefasciatus* a *A. aegypti* (vektory malárie, dengue a filariózy) mají i filtráty z bakterie *Streptomyces citreofluorescens* (Singh a kol., 2012). Bakterie rodu *Serratia* a *Klebsiella* označili jako patogenní pro komáry např. Seitz a kol. (1987), Pumpuni a kol. (1993) a Gonzales-Ceron a kol. (2003).

**Ad 2)** Bakterie, plísně a jimi produkované antimikrobiální peptidy či toxiny mohou rovněž významně ovlivňovat přežívání a životní cyklus parazitů v trávicím traktu hmyzích přenašečů. Pumpuni a kol. (1996) identifikovali u různých druhů anofelů např. bakterie

*S. marcescens*, *Klebsiella ozonae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter agglomerans* a všimli si významné redukce počtu oocyst *P. falciparum* u samic po příjmu cukerné, těmito bakteriemi kontaminované potravy. Ukázalo se, že sporogonii plasmodií jsou schopny ovlivňovat jen gramnegativní, nikoliv grampozitivní bakterie. Autoři rovněž naznačují, že bakteriemi ovlivněné střevní prostředí vyvolává v hmyzích přenašečích obecné obranné imunitní reakce, které rovněž mohou mít vliv na přenášené parazity.

Bylo zjištěno, že červený pigment prodigiosin produkovaný bakterií *S. marcescens* (i některými dalšími druhy bakterií) mají antibakteriální, antifugální a antiprotozoální účinky (Croft a kol., 2002). Trypanolytická aktivita byla pozorována právě v souvislosti se *S. marcescens* (Azambuja a kol., 2004; Castro a kol., 2007a) a tentýž účinek byl popsán i u bakterie *Pseudomonas fluorescens* (Mercado a Colon-Whitt, 1982). Azambuja a kol. (2004) se však nedomnívají, že za trypanolytický efekt je zodpovědný výhradně prodigiosin. Moraes a kol. (2008, 2009) studovali lytický efekt pigment-produkujících a pigment-neprodukujících *S. marcescens* na *Leishmania chagasi* a *L. braziliensis*. Připouštějí roli prodigiosinu, ale zároveň upozorňují spíše na význam D-manose-vazebného receptoru na fimbriích bakterie, který je zodpovědný za navázání bakterie a vede k lýze leishmanií. Prodigiosin může mít vliv např. i na funkci mitochondrií (narušení oxidativní fosforylace) trypanozom (Genes a kol., 2011). Bylo rovněž pozorováno, že derivát prodigiosinu (heptyl prodigiosin) je schopný zabít *P. falciparum* in vivo (Lazaro a kol., 2002).

Existuje celá řada dalších potenciálních antiparazitárních molekul produkovaných různými střevními bakteriemi (převážně *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *E. coli*, *E. cloacae* a *Enterococcus faecalis*) - jako např. cytotoxické metaloproteázy, hemolyziny, antibiotika, hemaglutininy (shrnuto dle Azambuja a kol., 2005).

Přítomnost mikroorganismů ve tělech hmyzu aktivizuje jejich vnitřní imunitní systém. Imunitní odpovědi hmyzu zahrnují složku buněčnou (fagocytóza hemocyty, mikroagregace, enkapsulace, fenoloxidázová kaskáda) a humorální (lektiny, lysozym, antimikrobiální peptidy (AMP)). Výčet a význam některých **antimikrobiálních peptidů (AMP)** u krevsajícího hmyzu shrnuje Boulanger a kol. (2006). Tyto molekuly se exprimují ve střevě a/nebo hemolymfě hmyzu po infekci parazity (bakteriemi či prvoky), jsou nedílnou součástí imunitního systému hmyzu a mohou významně regulovat vývoj některých parazitů. Mezi často diskutované AMP patří defensin, cecropin, attacin, diptericin, stomoxyn, apidaecin, melittin, dermaseptin a další. Je známo, že některé tyto molekuly mají přímé antiparazitární (antiprotozoární) účinky nebo naopak mohou bránit parazitické prvoky před patogenním účinkem bakterií.

Poměrně dobře jsou AMP prostudované u přenašečů trypanosom (ploštic a mouchy tse-tse) a u komárů (viz např. shrnující publikace Boulanger a kol., 2006; Azambuja a kol., 2005). U flebotomů jsou však poznatky o antimikrobiálních molekulách zatím omezené. Zájem

vědců je zaměřen na defensin. Jeho antileishmanicidní aktivita byla zaznamenána ve střevech a hemolymfě *P. duboscqi* po infekci promastitoty *L. major* (Boulanger a kol., 2004). Zvýšená exprese genu pro defensin u *L. longipalpis* byla pozorována během prvních 48 hodin po střevní infekci promastigoty *L. mexicana* a třetí den po jejich intratorakální injekci (Telleria a kol., 2013). Leishmanicidní účinek mají např. i pavoučí AMP (gomesin) (Silva a kol., 2000), AMP produkované žábami (temporiny z kůže skokana hnědého) (Mangoni a kol., 2005) či savčí cathelicidin-type antimikrobiální molekuly (cathelicidin bovine myeloid antimicrobial peptide BMAP-28) (Lynn a kol., 2011).

AMP jsou v současnosti velice aktuální z hlediska možnosti přípravy transgenních organismů, buď přímo transgenního hmyzu nebo transgenních bakterií vpravených do střeva hmyzu za účelem produkce těchto molekul (tzv. „paratransgeneze“) (Coutinho-Abreu a kol., 2010). Jako nejvhodnější mikroorganismy pro genovou manipulaci se jeví symbiotické nebo komenzální bakterie žijící v trávicích traktech hmyzu. Tyto vybrané mikroorganismy by měly podle Hurwitze a kol. (2011) splňovat následující požadavky: (1) trvalé soužití s vektorem, který danou chorobu přenáší, (2) snadná kultivovatelnost in vitro, (3) genetická modifikovatelnost, (4) bezpečnost a stabilita, (5) snadná reinfikovatelnost vektora a (6) transgenní produkt musí interagovat s parazitem. Stejní autoři shrnují výše navržený postup pro model flebotomus – leishmanie takto: Nejprve je potřeba vybrat vhodný bakteriální druh a geneticky jej upravit za účelem produkce antileishmaniových molekul. Dále se musí takto upravené bakterie vpravit do míst, kde flebotomové kladou svá vajíčka – tam se vylíhlé larvy kontaminují s přijatou potravou. Je bezpodmínečně nutné, aby tyto bakterie přežily metamorfózu flebotoma a zůstaly v jeho trávicím traktu děleníschopné a produkovaly tak vybrané antiparazitární molekuly blokující vývoj leishmanií v dospělých samicích (Hurwitz a kol., 2011).

**Ad 3) Symbiotické a komenzální mikroorganismy** (kvasinky, bakterie a rickettsie) byly u hmyzu popsány hlavně ve střevech, ale i v reprodukčních orgánech, tukových tělesech, Malpighiho tubicích, hemolymfě a dalších částech hmyzího těla. Přítomnost symbiontů v trávicích traktech hmyzu je nezbytná pro doplňování esenciálních živin (aminokyselin, vitamínů), které jsou v nedostatečném množství přijímány z vnějšího prostředí. Řada hmyzích symbiotických mikroorganismů je důležitá i pro životaschopnost a plodnost svého hostitele a může hrát i významnou roli ve vývoji přenášených parazitů. Jejich odstranění má často negativní dopad na život a vývoj hmyzu samotného nebo ovlivňuje jeho náchylnost k infekci parazity. Např. Dong a kol. (2009) antibiotiky eliminovali střevní mikroflóru *An. gambiae* a to způsobilo, že komáři byli náchylnější i infekci *P. falciparum*. V této práci je poukázáno rovněž na fakt, že některé bakterie (jejich působky) mohou bránit infekci plasmodii prostřednictvím aktivizace imunitního systému komára.



Symbiotický organismus *Wolbachia pipientis* (gramnegativní bakterie čeledi *Rickettsiace*, obligátní intracelulární parazit širokého spektra členovců) byl poprvé popsán z vaječníků komára *Culex pipiens* (Hertig a kol., 1924). Tato bakterie je známá především jako významný manipulátor reprodukčního potenciálu svých hostitelů, šíří se přenosem v cytoplazmě vajíčka na potomstvo v mateřské linii. Wolbachie je v poslední době velice často diskutována právě jako organismus vhodný k biokontrolě hmyzem přenášených lidských nemocí (Sinkins a O'Neill, 2000). Byl pozorován její efekt na řadu životních funkcí hmyzích vektorů - např. po umělé infekci komárů *Aedes aegypti* (přenašeče horečky dengue) touto bakterií došlo ke zkrácení života a sníženému sání krve u komárů (Turley a kol., 2009), zároveň byl pozorován i přímý negativní vliv na životní cyklus viru dengue (Bian a kol., 2010; Iturbe-Ormaetxe, 2011). Rovněž u viru západonilské horečky byla zaznamenána inhibice replikace RNA v přítomnosti wolbachii (Hussain, 2013). Na jiném komáří laboratorním modelu, *A. aegypti* – *P. gallinaceum*, byla pozorována významná redukce oocyst u komárů po infekci wolbachii (Moreira a kol., 2009). Snížení výskytu lidských plasmodií po infekci wolbachii bylo popsáno i u *An. gambiae* (Kambris a kol. 2010; Hughes a kol. 2011; Walker a Moreira, 2011). Stejný fenomén byl pozorován i u komárů a filárií (Kambris a kol., 2009). Výskytu wolbachii a jejich fylogenezi ve vztahu k různým druhům flebotomů Starého a Nového Světa se věnoval Ono a kol. (2001) a Azpurua a kol. (2010). Benlarbi a Ready (2003) popsali dva kmeny wolbachii z různých částí těla samců i samic *Phlebotomus perniciosus* a *P. papatasi*.

Nejznámějšími endosymbionty ve střevě glossin jsou wolbachie, konkrétně *Wigglesworthia glossinidia* a *Sodalis glossinidius* (dříve známé jako RLO = rickettsia-like organismy). *S. glossinidius* urychluje vývoj trypanosom v glossině (Welburn a Maudlin, 1991), naopak její odstranění negativně ovlivňuje délku života glossiny (Dale a Welburn, 2001). Glossiny bez *W. glossinidia* mají narušený proces trávení krve a nemohou se řádně reprodukovat (Pais a kol., 2008).

Jen pro doplnění výčtu zde připomínám známé symbiotické vztahy ploštic a aktinomycet u dvojic *Rhodnius prolixus* – *Rhodococcus rhodnii* a *T. infestans* – *Corynebacteria*, kde bakterie zajišťují ploštícím životně nezbytné vitamíny a hrají tak důležitou roli ve vývoji ploštic (Durvasula a kol., 2008; Hurwitz a kol., 2011). Součástí střevní mikroflóry komárů rodu *An. stephensi* jsou zase symbiotické bakterie rodu *Asaia* (Favia a kol., 2007), po jejich odstranění došlo k opožděnému vývoji larev (Chouaia a kol., 2012).

## 2. Střevní mikroflóra flebotomů

Flebotomové (*Diptera: Psychodidae*) jsou významní přenašeči lidského parazitárního onemocnění tropů a subtropů - leishmaniózy. Leishmanióza je způsobována různými druhy rodu *Leishmania* (bičíkatí prvoci řádu *Trypanosomatida*) a má několik forem (kožní, difúzní kožní, kožně-slizniční a viscerální). K přenosu na člověka dochází při sání drobného krevsajícího dvoukřídlého hmyzu rodu *Phlebotomus* (ve Starém Světě) nebo *Lutzomyia* (v Novém Světě). Se slinami vektora se do lidského těla dostávají infekční stádia – metacyklickí promastigoti. Leishmaniózou trpí lidé v mnoha oblastech světa, zejména v Africe, Latinské Americe, jižní a střední Asii, ale i v okolí Středozemního moře a na Středním Východě. Těžké formy tohoto onemocnění způsobují závažná znetvoření až smrt. WHO odhaduje celosvětový výskyt onemocnění přibližně na 12 milionů, s roční úmrtností okolo 60 tisíc lidí a asi s dvěma milióny nových případů ročně. Asi 350 milionů lidí v 88 zemích světa žije s rizikem nákazy (WHO, 2012).

Flebotomové, stejně jako většina dalších parazitických dvoukřídlých, přijímají potravu dvojího typu: krev jako zdroj bílkovin a cukerné roztoky rostlinného (míza, nektar) či živočišného původu (medovice mšic) jako zdroj sacharidů. S potravou se do jejich trávicího traktu dostávají různé typy mikroorganismů (bakterie, plísně, fleboviry, různí zástupci čeledi *Trypanosomatidae* vč. lidských patogenních i nepatogenních druhů leishmanií). V souvislosti s příjmem potravy rostlinného původu stojí za zmínku, že některé okrasné rostliny (např. *Solanum jasminoides*, *Ricinus communis*) působí na dospělé flebotomy toxicky a výrazně zkracují jejich život (Schlein a kol., 2001). Ke kontaminaci trávicího traktu flebotomů dochází již během larválního vývoje. Samice kladou vajíčka do míst s výskytem organického detritu a rozkládajících se živočišných či lidských výkalů. Zde se následně vyvíjejí larvální stádia, která se živí směsicí tlejícího materiálu spolu s širokým spektrem mikroorganismů.

O střevní mikroflóře flebotomů a jejím možném vlivu na přežívání a reprodukci, jakož i na interakci vektor-patogen (flebotomus-leishmanie) je celkově známo relativně málo. V posledních cca 25-ti letech však zájem vědců o tuto problematiku z výše naznačených důvodů stoupá. Je známo několik prací, které popisují bakteriální faunu ve střevech laboratorně chovaných i volně žijících flebotomů jak na základě kultivačních metod, tak za použití metod molekulárně genetických. Klasické mikrobiologické kultivační a identifikační metody byly zvoleny i v pokusech s *P. duboscqi*, jejichž výsledky jsou shrnuty v přiloženém článku.

Otázka vlivu střevní mikroflóry na vývoj leishmanií ve flebotomech je poprvé diskutována Adlerem a Theodorem (1929), kteří upozornili na to, že mikroorganismy přítomné ve střevech flebotomů mohou zabraňovat vývoji leishmanií. Schlein a kol. (1985) zaznamenali

zvýšený výskyt mikroorganismů (bakterií i plísní) ve střevech a Malpighiho trubicích u *Phlebotomus papatasi* a *P. tobbi* a zopakovali hypotézu, že jejich přítomnost může negativně ovlivňovat vývoj a možnosti přenosu leishmanií. Plísně izolované ze střev laboratorně chovaných *P. papatasi* (*Aspergillus sclerotiorum* a *Saccharomyces cerevisiae*) a jimi infikovaní flebotomové vykazovaly rezistenci vůči experimentální infekci *L. major*. Autoři ale zároveň připouštějí, že některé střevní bakterie mohou likvidovat růst plísní a tím nepřímo napomáhat vývoji leishmanií ve flebotomech. Studie rovněž demonstruje antibakteriální aktivitu přítomnou ve střevech flebotomů proti různým druhům bakterií (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Streptococcus* skupiny A a *Pseudomonas aeruginosa*) v kultuře. Tyto výsledky odpovídají i našim dřívějším zjištěním – lyzáty se střev a těl flebotomů vykazovaly antibakteriální aktivitu proti grampozitivním bakteriím *Micrococcus luteus* a *Bacillus subtilis* (Kiewegová, 1999). Tím, že některé bakterie a plísně přijaté s cukernou potravou mohou eliminovat leishmaniové infekce nebo dokonce flebotomy i zabít, se zabíral ve svých výzkumech i Killick-Kendrick (1987).

Rajendran a Modi (1982) popsali u volně žijících druhů *Phlebotomus argentipes* a *Sergentomyia* (Indie) následující bakterie: *E. coli*, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus tetragenus* a několik druhů plísní. Střevní mikroflóru u *Phlebotomus pedifer* a *P. elgonensis* studovali Sang a Chance (1993). Tito autoři zaznamenali poměrně vysoký podíl grampozitivních nepatogenních bakterií rodu *Corynebacterium* ve střevech samic při současném výskytu promastigotů leishmanií, což bylo v souvislosti s výše uvedenými závěry Schleina a kol. (1985) překvapivé. Dillon a kol. (1996) izolovali 17 druhů bakterií z volně žijících *P. papatasi* (Egypt). Nejvíce byly zastoupeny druhy *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.* a blíže neidentifikované grampozitivní i gramnegativní koky. Bakterie *Enterobacter cloacae* je uváděna jako nejčastěji se vyskytující a život svého nositele neovlivňující střevní bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* ve střevech hmyzu (Tanada a Kaya, 1993). Velice často je popisována ze střev různých druhů rodu *Phlebotomus* i *Lutzomyia* (viz dále).

Dillon a kol. (1996) dále zjišťovali množství bakterií ve střevech v závislosti na stáří samic. Ukázalo se, že počty bakterií vyskytujících se ve střevech čerstvě vylíhnutých flebotomů byly nízké, nejvyšších počtů pak bylo dosahováno od 5.-6. dne po vylíhnutí z kukly. Tyto výsledky odpovídají skutečnosti, že ve střevech hmyzích larev těsně před zakuklením probíhají procesy eliminace střevních mikroorganismů díky výrazným fyziologickým změnám uvnitř střeva a pravděpodobně též díky zvýšené antibakteriální aktivitě. Teprve po vylétnutí nových dospělců se střevní mikroflóra postupně obnovuje nárůstem stávajících, kuklení přeživších mikroorganismů, či (a to je pravděpodobně častěji) novými kontaminacemi z přijaté potravy. Toto podporují i výsledky v příložené publikaci, ze kterých je zřejmý masivní nárůst počtu bakterií od 2. dne po příjmu krevní potravy. Zajímavým výsledkem z uvedené práce je rovněž

to, že byl poprvé u flebotomů potvrzen transstadiální přenos bakterií z larev přes kukly do dospělých flebotomů. Transstadiální přenos bakterií byl později zjištěn i u *P. argentipes* (Hurwitz a kol., 2011). U komárů rodu *Anopheles* byl transstadiální přenos bakterií potvrzen již dříve úspěšným pasážováním *E. coli* HS5 z larev až do dospělců (Pumpuni a kol., 1996).

U volně žijících flebotomů Nového Světa, konkrétně u *L. longipalpis* (Brazílie, Minas Gerais) studoval střevní mikroflóru Oliveira a kol. (2000). Identifikoval 8 druhů bakterií: gramnegativní nefermentující bakterie (*Acinetobacter lwoffii*, *S. maltophilia*, *Pseudomonas putina* a *Flavimonas oryzihabitans*), fermentující (*Enterobacter cloacae*, *Klebsiella ozaenae*) a grampozitivní druhy (*Bacillus thuringensis* a *Staphylococcus spp.*). Je zajímavé, že entomopatogenní bakterie *B. thuringensis* byla v této práci izolována z 18 % samic a některých samců flebotomů.

Na třech brazilských volně žijících populacích *L. longipalpis* prováděl svůj výzkum i Gouveia a kol. (2008). Nejčastěji se vyskytovaly: rod *Enterobacter*, *S. maltophilia*, *Pantoea agglomerans*, *S. marcescens*, *Flavimonas oryzihabitans*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* aj. Všudypřítomná gramnegativní *Pantoea agglomerans* je považována za jednu z nejčastěji se vyskytujících bakterií v přírodě (v půdě, na rostlinách). Pouze dva stejné bakteriální druhy byly předtím popsány Oliveirou a kol. (2000) u *L. longipalpis* – *E. cloacae* a *S. maltophilia*, což naznačuje, že by se mohlo jednat o mikroorganismy trvaleji přebývající v trávicím traktu tohoto druhu.

Mikroflóra flebotomů byla nově studována i na povrchu (kutikule) flebotomů. Akhouni a kol. (2012) našli ve střevech a na povrchu 5 druhů flebotomů ze severozápadní oblasti Íránu (z oblasti výskytu viscerální leishmaniózy) široké spektrum hub a bakterií. Ze střeva i kutikuly zároveň izolovali (*S. marcescens*, *P. fluorescens*, *K. ozaenae*, *Acinetobacter*, *B. subtilis*, *M. luteus*), pouze ze střeva (*E. cloacae*, *E. coli* a *C. albicans*) a pouze z kutikuly (*Asaia sp.*, *Pantea sp.* a houby *Fusarium* a *Geotrichum*). Navíc vysledovali, že počty bakterií ze střev i z kutikuly se zvyšují směrem od hladových samic až po samice gravidní, tedy od mladých po staré.

Pro identifikaci střevní mikroflóry flebotomů se v posledních letech využívají i **molekulárně genetické metody**. Hillesland a kol. (2008) ze střev *P. argentipes* (z oblasti Bihar v Indii) izolovali a na základě metody PCR amplifikace 16S rDNA identifikovali 28 mikrobiálních druhů, nejčastěji různé druhy *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Enterobacter* a *E. coli*. Obrovská rozmanitost druhů byla dána pestrostí míst, odkud byly flebotomové získávány. Výsledky byly navíc roztrženy z hlediska patogenicity pro člověka za účelem navržení některých druhů jako vhodných organismů pro genové manipulace a zároveň bezpečných (nepatogenních) pro člověka a jiné živočichy. Jako nejlepší kandidáti pro

„paratransgenezi“ z tohoto výzkumu vzešly *Bacillus megatherium* a *B. linens*. Oba tyto druhy bakterií se hojně využívají v biotechnologických postupech - jako složky biofertilizátorů (*B. megatherium* podporuje růst a omezuje výskyt chorob u různých druhů hospodářských plodin) a probiotických směsí pro živočichy, *B. linens* se používá např. i v procesu zpracování mléka a zrání sýrů. Jejich používání v oblastech, odkud byli flebotomové pro výzkum odchycováni, se proto logicky odráží i ve výsledcích pitev. *B. linens* navíc produkuje chemické látky jako methanthiol a kyselinu isovalerovou (známé látky produkované komenzálními bakteriemi přítomnými na kůži člověka), které byly popsány jako silné hmyzí atraktanty pro komáry anofely (Braks a kol., 1999). Některé střevní bakterie flebotomů vhodné pro genetickou úpravu navrhuje i Mukhopadhyay a kol. (2012). Podrobili výzkumu laboratorní kolonie *P. papatasi* - nejčastěji se vyskytovaly: *B. flexus*, *B. pumilus*, *B. megatherium*, *B. licheniformis* a *B. subtilis*. Tyto bakterie se jeví jako bezpečné díky tomu, že jsou běžně používané jako přísady do probiotických směsí pro různé druhy živočichů.

Guernaoui a kol. (2011) se věnovali bakteriálnímu osídlení střeva u různých vývojových stádií laboratorně chovaných *P. duboscqi* a volně žijících *P. papatasi* za použití metody TGGE (gelová elektroforéza s teplotním gradientem) fragmentu genu pro 16S rDNA. Poprvé popsali výskyt (s největší pravděpodobností z půdy pocházející) bakterie rodu *Chloroflexi* u flebotomů, pouze však u larválních stádií a kulek, nikoli u dospělců. Naproti tomu bakterie rodu *Microbacterium* byly izolovány z larev 2. a 4. instaru, z kulek i dospělých flebotomů druhu *P. duboscqi*, a toto je další důkaz transstadiálního přenosu bakterií u flebotomů. Bakterie rodu *Microbacterium* byla popsána rovněž Hilleslandem a kol. (2008) (viz výše) u volně žijících *P. argentipes* v Indii.

Na základě analýzy bakteriálního 16S rDNA genu metodou DGGE (denaturační gradientová gelová elektroforéza) popsali Sant'Anna a kol. (2012) 19 různých bakteriálních druhů u volně žijících *L. longipalpis* a *L. cruzi* ze čtyř oblastí Brazílie a Kolumbie. Nejvíce zastoupeným druhem byla bakterie *Ralstonia solanacearum* (gramnegativní půdní bakterie, fakultativní patogen lilkovitých rostlin). Byla nalezena i *Erwina* – další potencionální rostlinný patogen. Nález bakterie *Bradyrhizobium* (hlízkovitá bakterie z kořenů rostlin, *Rhizobiaceae*) podporuje hypotézu Siddalla a kol. (2004), že tyto bakterie mohou plnit funkci endosymbiontů u bezobratlých živících se krví. Vědci dále identifikovali dvě bakterie, které jsou potencionálními patogeny lidí a koní – *Chryseobacterium meningosepticum* a *Burkholderia*. Těmito objevy vyvstává otázka, zda flebotomové nemohou být přenašeči chorob rostlin a i jiných, méně známých či sporadických chorob savců. Symbiotická *Wolbachia* nebyla u těchto dvou studovaných (výše uvedených) druhů rodu *Lutzomyia* nalezena, což koresponduje s nálezem Ono (2001).

McCarthy a kol. (2011) zvolili pro identifikaci střevních mikroorganismů *L. longipalpis* jiný postup - metagenomickou analýzu. Metodou pyrosequencing odhalili u *L. longipalpis*

do té doby nepopsané či neidentifikovatelné mikroorganismy (zástupce rostlin, prvoků, bakterie, houby), ale i genové sekvence, které poukazují na sání lutzomyií na člověku, ptácích i plazech.

Výše zmíněné molekulárně genetické metody jsou velmi vhodné pro identifikaci pomalu rostoucích bakterií, které by při použití konvenčních kultivačních metod byly potlačeny jinými, rychleji rostoucími bakteriemi či plísněmi.

Na závěr této kapitoly uvedu ještě několik informací o významu i jiných než střevních bakterií, které mají značný vliv na vývoj flebotomů. Bylo pozorováno, že některé bakterie produkují chemické látky, které se jeví jako atraktivní pro kladoucí samice flebotomů. Radjame a kol. (1997) pozorovali, že některé druhy půdních bakterií (*Bacillus firmus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* a *Staphylococcus saprophyticus*) urychlují ovipozici u samic *P. papatasi*. Navíc *B. pumilus* a *B. licheniformis* fungovaly jako silné induktory kladení. Za povšimnutí stojí, že se jedná právě o bakterie rodu *Bacillus*, které jsou navrhovány pro „paratransgenezi“ (viz výše). Problematice ovlivnění ovipozice a chemických atraktantů/stimulantů produkovaných mikroorganismy se u *L. longipalpis* věnovali např. ElNaiem a Ward (1992). Všimli si, že samice preferují a kladou signifikantně více vajec do míst, která obsahují králičí výkaly (či jejich extrakt). Byla též pozorována časnější snůška a delší přežívání samic v souvislosti s výskytem výkalů. Dougherty a kol. (1995) extrahovali plynovou chromatografií dvě chemické látky (hexanal a 2-metyl-2-butanol) z výkalů králíků a kuřat, které významně lákají samice flebotomů a pozitivně ovlivňují ovipozici *L. longipalpis*.

Na tyto poznatky navázali Peterkova-Koci a kol. (2012), kteří se věnovali vlivu králičích a hlodavčích výkalů (resp. bakterií, které v hojném množství obsahují) na chování samic flebotomů při kladení vajec a na vývoj larev. Výsledky ukázaly jasnou preferenci březích samic k nesterilním výkalům než ke sterilním, zároveň samice kladly signifikantně více (až několikanásobně vyšší snůšky) na nesterilní výkaly. To potvrzuje, že výkaly s aktivním komplexem bakterií produkují chemické látky, které jsou pro samice flebotomů lákavé (viz výše). Z čerstvých králičích výkalů bylo dále identifikováno téměř 20 druhů bakterií, z nichž šest (*Morganella morgani*, 2 druhy *Pseudomonas sp.*, *Rhizobacterium radiobacter*, *Enterococcus gallinarum* a *Bacillus sp.*) bylo použito v pokusech na larvách. Byl zaznamenáván vliv jednotlivých druhů bakterií na dobu larválního vývoje a na úmrtnost larev. Výsledky byly velice různorodé, např. larvy žijící na výkalech jen s *M. morgani* měly asi o polovinu kratší dobu vývoje (asi 34 dní) než larvy na výkalech s *Bacillus sp.* KK-1. Stejná bakterie (*Bacillus sp.* KK-1) způsobovala i nejvyšší úmrtnost larev na rozdíl např. od *R. radiobacter* a *Pseudomonas sp.* KK-1 (kde více než 80 % jedinců přežívalo do dospělosti). Podstata bakteriálního přispění k vývoji larev však douds není dostatečně známa. Může zahrnovat rozklad potravy na více stravitelné komponenty či produkci živin (vitamínů, aminokyselin).

Lze shrnout, že z dosud publikovaných prací vyplývá vyšší výskyt gramnegativních bakterií oproti grampozitivním, což může být dáno například přítomností střevní antimikrobiální aktivity proti grampozitivním bakteriím (Volf a kol., 2002 – viz příložená publikace). Dále je patrné, že ve střevech flebotomů se nalézají celá řada v přírodě volně se vyskytujících mikroorganismů (půdních bakterií, bakterií z povrchů rostlin, ze zvířecích výkalů ap.). Některé bakterie ze střev flebotomů, kterým se podaří přežít metamorfózu, se mohou chovat spíše jako užiteční symbionti než jako náhodná kontaminace z vnějšího prostředí a mohou tak být v populacích flebotomů přirozeně rozšiřovány.

Studie věnované mikrobiálnímu osídlení flebotomů se provádějí především za účelem nalezení způsobu boje proti leishmanióze a je zřejmé, že přítomnost specifických bakterií ve střevech hmyzu může mít vliv na úspěšný přenos patogena. To, že bakterie a jimi produkované látky s antimikrobiálními (antiparazitárními) účinky mohou ovlivňovat vývoj původců závažných lidských parazitóz v hmyzích hostitelích, skýtá reálnou možnost biologické kontroly těchto chorob. Nově vyvinuté metody biologického boje by tak mohly nahradit používání chemických pesticidů, které se stávají díky vznikající rezistenci hmyzu neúčinnými a pro nutnost častých opakování i finančně neúnosné.

Článek, který je předkládán v této práci (publikovaný ve Folia Parasitologica 49 v roce 2002), se zabývá složením bakteriální mikroflóry ve střevech laboratorně chovaných flebotomů *P. duboscqi*. Ve střevech larev i dospělců byly identifikovány hlavně aerobní nebo fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinky (*Ochrobactrum sp.*, *Serratia marcescens* a *Stenotrophomonas maltophilia*). U larev se dostaly do trávicího traktu potravou, dospělci se většinou kontaminovali z cukerného roztoku sacharózy, kterým se chovy flebotomů běžně krmí. Poprvé byl u flebotomů popsán transstadiální přenos bakterií z larev až do dospělců. Uvedená bakterie rodu *Ochrobactrum* (v publikaci ještě označená jako kmen AK) byla v hojném množství izolovaná ze střev larev 4. instaru krátce před zakuklením, z kukel i z nově vylíhnutých samic. Tato bakterie byla zároveň jedinou, která byla nalezena ve střevech čerstvě vylíhnutých samic. To dokazuje, že některé bakterie přežijí i extrémní fyziologické změny, ke kterým během stádia kukly dochází.

Dále byla ověřována hypotéza, zda může mít lektinová aktivita přítomná ve střevech flebotomů antibakteriální účinek. Abychom toto zjistili, byly samice při umělém sání přes membránu krmeny krví s přidáním známého sacharidového inhibitoru lektinu - galaktosaminu. Nebyly však zjištěny žádné významné rozdíly mezi experimentálními a kontrolními skupinami a proto předpokládáme, že lektinová aktivita ve střevě flebotomů nemá vliv na přítomnost gramnegativních bakterií.

Publikace je sice již přes 10 let stará, ale je citována častěji až v posledních letech (z dosavadního počtu 22 citací na Web of Science je více jak polovina za uplynulé dva roky 2011 a 2012). Výskyt bakterie rodu *Ochrobactrum* u *P. duboscqi* je zmiňován i v nové obsáhlé knize Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens (ed. Dongyou Liu, 2011).

Věřím, že data získaná našimi pokusy přispějí i k dalšímu výzkumu mikroorganismů v trávicí soustavě flebotomů i jiného krevsajcího hmyzu, a že podpoří perspektivu jejich využití v boji proti vektory přenášeným chorobám.



### 3. Seznam použité literatury

- Adler S. and Theodor O. 1929. Attempts to transmit *Leishmania tropica* by bite: The transmission of *L. tropica* by *Phlebotomus sergenti*. Ann. Trop. Parasitol. 23: 1-18.
- Akhoundi M., Bakhtiari R., Guillard T., Baghaei A., Tolouei R., et al. 2012. Diversity of the Bacterial and Fungal Microflora from the Midgut and Cuticle of Phlebotomine Sand Flies Collected in North-Western Iran. PLoS ONE 7(11): e50259. Dostupné z: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0050259>
- Azambuja P., Feder D. and Garcia E.S. 2004. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. Exp. Parasitol. 107: 89-96.
- Azambuja P., Garcia E.S. and Ratcliffe N. 2005. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. Trends Parasitol. 21: 568-572.
- Azpuruá J., De La Cruz D., Valderama A. and Windsor D. 2010. *Lutzomyia* Sand Fly Diversity and Rates of Infection by *Wolbachia* and an Exotic *Leishmania* Species on Barro Colorado Island, Panama. PLoS Negl Trop Dis. 2010 March; 4(3): e627. Dostupné z: <http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0000627>
- Benlarbi M., Ready P.D. 2003. Host-specific *Wolbachia* strains in widespread populations of *Phlebotomus perniciosus* and *P. papatasi* (Diptera: *Psychodidae*) and prospects for driving genes into these vectors of *Leishmania*. Bull Entomol. Res. 93: 383–391.
- Bian G., Xu Y., Lu P., Xie Y., Xi Z. 2010. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. PLoS Pathog 6: e1000833.
- Boulanger N., Bulet P., Lowenberger C. 2006. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. Trends Parasitol. 22: 262-268.
- Boulanger N., Lowenberger C., Volf P., Ursic R., Sigutova L., Sabatier L., Svobodova M., Beverley S.M., Spath G., Brun R., Pesson B. and Bulet P. 2004. Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. Infect Immun. 72(12): 7140-6.
- Braks M.A., Anderson R.A., Knols B.G. 1999. Infochemicals in mosquito host selection: human skin microflora and *Plasmodium* parasites. Parasitol Today 15: 409–413.
- Castro E.C., Bautista Á.R., Vargas L.L. 2012. Mortalidad en larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles albimanus* (díptera: culicidae), causada con un producto de *Bacillus sphaericus* (bacteria: bacillaceae) en presentación granulada en condiciones experimentales. Revista de Medicina Veterinaria. Dostupné z: <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/mv/article/view/63>
- Castro D.P., Moraes C.S., Garcia E.S., Azambuja P. 2007a. Inhibitory effects of D-mannose on trypanosomatid lysis induced by *Serratia marcescens*. Experimental Parasitology 115: 200-204.
- Coutinho-Abreu I.V., Zhu K.Y., Ramalho-Ortigao M. 2010. Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: current status and future challenges. Parasitol Int. 59(1): 1-8. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2824031/pdf/nihms-151847.pdf>
- Croft S. L., Seifert K. and Duchene M. 2002. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. Mol. Biochem. Parasitol. 126: 165-172.

- Dale C. and Welburn, S. 2001. The endosymbionts of tsetse flies: manipulating host–parasite interactions. *International Journal for Parasitology*. 31(5-6): 628-631.
- Dillon R.J. and Dillon V.M. 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol*. 49: 71-92.
- Dillon R. J., Kordy E. E L., and Lane R. P. 1996. The prevalence of microbiota in the digestive tract of *Phlebotomus papatasi*. *Ann Trop Med Parasitol*. 90: 669–673.
- Dong Y., Manfredini F., Dimopoulos G. 2009. Implication of the Mosquito Midgut Microbiota in the Defense against Malaria Parasites. *PLoS Pathog* 5(5): e1000423. Dostupné z: <http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000423>
- Dongyou Liu (ed.). 2011. *Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens*. New South Wales, Australia. CRC Press. 1,278 Pages. ISBN: 978-1-4398-1238-9.
- Dougherty M.J., Guerin P.M., Ward R.D. 1995. Identification of oviposition attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: *Psychodidae*) in volatiles of faeces from vertebrates. *Physiological Entomology*. 20(1): 23-32.
- Durvasula R.V., Sundaram R.K., Kirsch P., Hurwitz I., Crawford C.V., Dotson E., Beard C.B. 2008. Genetic transformation of a *Corynebacterial* symbiont from the Chagas disease vector *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol*. 119: 94-98.
- ElNaiem D.E. and Ward R.D. 1992. Oviposition attractants and stimulants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: *Psychodidae*). *J Med Entomol*. 29(1): 5-12.
- Favia G., et al. 2007. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(21): 9047–51.
- Genes C., Baquero E., Echeverri F., Maya J.D. and Triana O. 2011. Mitochondrial dysfunction in *Trypanosoma cruzi*: the role of *Serratia marcescens* prodigiosin in the alternative treatment of Chagas disease. *Parasit Vectors*. 4: 66. Dostupné z: <http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/>
- Gonzalez-Ceron L., Santillan F., Rodríguez M.H., Mendez D. & Hernández-Avila J.E. 2003. Bacteria in midguts of fieldcollected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. *J. Med. Entomol*. 40: 371-4.
- Gouveia C., Asensi M.D., Zahner V., Rangel E.F., Oliveira S.M. 2008. Study on the bacterial midgut microbiota associated to different Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: *Psychodidae*). *Neotrop Entomol*. 37(5): 597-601.
- Guernaoui S., Garcia D., Gazanion E., Ouhdouch Y., Boumezzough A., Pesson B., Fontenille D. and Sereno D. 2011. Bacterial flora as indicated by PCR-temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) of 16S rDNA gene fragments from isolated guts of phlebotomine sand flies (Diptera: *Psychodidae*). *Journal of Vector Ecology*. 36(Suppl.1): 144-S147.
- Hertig, M. and Wolbach, S. 1924. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. *J Med Res* 44, 329–374.
- Hillesland H., Read A., Subhadra B., Hurwitz I., McKelvey R., Ghosh K., Das P. and Durvasula R. 2008. Identification of Aerobic Gut Bacteria from the Kala Azar Vector, *Phlebotomus argentipes*: A Platform for Potential Paratransgenic Manipulation of Sand Flies. *Am J Trop Med Hyg*. 79(6): 881–886.

- Hughes G.L., Koga R., Xue P., Fukatsu T., Rasgon J. 2011. *Wolbachia* infections are virulent and inhibit the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. PLoS Pathog 7: e1002043. Dostupné z: <http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1002043>
- Hurwitz I., Fieck A., Read A., Hillesland H., Klein N., Kang A. and Durvasula R. 2011. Paratransgenic Control of Vector Borne Diseases. International Journal of Biological Science. 7(9): 1334-1344.
- Hurwitz I., Hillesland H., Fieck A., Das P., Durvasula R. 2011. The paratransgenic sand fly: A platform for control of *Leishmania* transmission. Parasit Vectors. 4: 1–9.
- Hussain M., Lu G., Torres S., Edmonds J.H., Kay B.H., Khromykh A.A and Asgari S. 2013. Effect of *Wolbachia* on replication of West Nile virus in a mosquito cell line and adult mosquitoes. J Virol. 87(2): 851-8.
- Chouaia B., Rossi P., Epis S., Mosca M., Ricci I., Damani C., Ulissi U., Crotti E., Daffonchio D., Bandi C. and Favia G. 2012. Delayed larval development in *Anopheles* mosquitoes deprived of *Asaia* bacterial symbionts. BMC Mikrobiology 12(Suppl 1):S2 doi:10.1186/1471-2180-12-S1-S2. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/S1/S2>
- Iturbe-Ormaetxe I., Walker T. and O' Neill S.L. 2011. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. EMBO Rep., 12: 508–518.
- Kambris Z., Blagborough A.M., Pinto S.B., Blagrove M.S., Godfray H.C., Sinden R.E., Sinkins S.P. 2010. *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits plasmodium development in *Anopheles gambiae*. PLoS Pathog 6: e1001143. Dostupné z: <http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1001143>
- Kambris Z., Cook P.E., Phuc H.K., Sinkins S.P. 2009. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. Science 326: 134-136.
- Kiewegová A. 1999. Antimikrobiální aktivity ve střevě *Phlebotomus duboscqi*. 81 s. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy na katedře Parazitologie. Vedoucí diplomové práce Petr Volf.
- Killick-Kendrick R. and Killick-Kendrick M. 1987. Honeydew of aphids as a source of sugar for *Phlebotomus ariasi*. Med. Vet. Entomol. 1: 297-302.
- Lazaro J.E., Nitchou J., Predicala R.Z., Mangalindan G.C., Nessler F., Marzin D., Concepcion G.P., Diquet B. 2002. Heptyl prodigiosin, a bacterial metabolite, is antimalarial in vivo and non-mutagenic in vitro. J Nat Toxins. 11(4): 367–377.
- Lynn M.A., Kindrachuk J., Marr A.K., Nenesen H., Panté N., Elliott M.R., Napper S., Hancock R.E., McMaster W.R. 2011. Effect of BMAP-28 antimicrobial peptides on *Leishmania major* promastigote and amastigote growth: role of leishmanolysin in parasite survival. PLoS Negl Trop Dis. 5(5):e1141. Dostupné z: <http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0001141>
- Mangoni M.L., Saugar J.M., Dellissanti M., Barra D., Simmaco M., Rival L. 2005. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. J Biol Chem. 280(2): 984-90.
- McCarthy Ch.B., Diambra L.A. and Pomar R.V.R. 2011. Metagenomic Analysis of Taxa Associated with *Lutzomyia longipalpis*, Vector of Visceral Leishmaniasis, Using an Unbiased High-Throughput Approach. PLoS Negl Trop Dis. 5(9): e1304. Dostupné z: <http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0001304>

- Mercado T.I., Colon-Whitt A. 1982. Lysis of *Trypanosoma cruzi* by *Pseudomonas fluorescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 1051–1057.
- Moraes C.S., Seabra S.H., Albuquerque-Cunha J.M., Castro D.P., Genta F.A., de Souza W., Brazil R.P., Garcia E.S., Azambuja P. 2009. Prodigiosin is not a determinant factor in lysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* after interaction with *Serratia marcescens* D-mannose sensitive fimbriae. *Exp Parasitol.* 122(2): 84–90.
- Moraes C.S., Seabra S.H., Castro D.P., Brazil R.P., de Souza W., Garcia E.S., Azambuja P. 2008. *Leishmania (Leishmania) chagasi* interactions with *Serratia marcescens*: ultrastructural studies, lysis and carbohydrate effects. *Experimental Parasitology* 118: 561–568.
- Moreira L.A., Iturbe-Ormaetxe I., Jeffery J.A., Lu G., Pyke A.T., et al. 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* 139: 1268–1278.
- Mukhopadhyay J., Braig H.R., Rowton E.D., and Ghosh K. 2012. Naturally Occurring Culturable Aerobic Gut Flora of Adult *Phlebotomus papatasi*, Vector of *Leishmania major* in the Old World. *PLoS One.* 2012; 7(5): e35748. Dostupné z: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0035748>
- Oliveira S.M., Moraes B.A., Gonçalves C.A., Giordano-Dias C.M., D'Almeida J.M., Asensi M.D., Mello R.P., Brazil R.P. 2000. Prevalence of microbiota in the digestive tract of wild females of *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: *Psychodidae*). *Rev Soc Bras Med Trop.* 33(3): 319-22.
- Ono M., Braig H.R., Munstermann L.E., Ferro C., O'Neill S.L. 2001. *Wolbachia* infections of phlebotomine sand flies (Diptera: *Psychodidae*). *J Med Entomol* 38(2): 237–241.
- Pais R., Lohs C., Wu Y., Wang J. and Aksoy S. 2008. The obligate mutualist *Wigglesworthia glossinidia* influences reproduction, digestion, and immunity processes of its host, the tsetse fly. *Appl Environ Microb* 74: 5965–5974.
- Peterkova-Koci K., Robles-Murguía M., Ramalho-Ortigao M., Zurek L. 2012. Significance of bacteria in oviposition and larval development of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasites & Vectors.* 5: 145. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3414784/>
- Pumpuni, C.B., Beier M.S., Nataro J.P., Guers L.D. and Davis J.R. 1993. *Plasmodium falciparum*: Inhibition of sporogonic development in *Anopheles stephensi* by gram-negative bacteria. *Exp. Parasitol.* 77: 195-199.
- Pumpuni C.B., Demaio J., Kent M., Davis J.R. and Beier J.C. 1996. Bacterial population dynamics in three *Anopheline* species: The impact of *Plasmodium* sporogonic development. *Am J Trop Med Hyg.* 54: 214-218.
- Radjame K., Srinivasan R., Dhanda V. 1997. Oviposition response of phlebotomid sandfly *Phlebotomus papatasi* to soil bacteria isolated from natural breeding habitats. *Indian J Exp Biol.* 35: 59–61.
- Rajendran P., Modi G.B. 1982. Bacterial flora of Sandfly gut (Diptera: *Psychodidae*). *Indian J Public Health.* 26(1): 49-52.
- Robert L.L., Perich J.M., Schlein Y., Jacobson R.L., Wirtz R.A., Lawyer P.G., Githure J.I. 1997. Phlebotomine sand fly control using bait-fed adults to carry the larvicide *Bacillus sphaericus* to the larval habitat. *J Am Mosq Control Assoc.* 13(2): 140-144.

- Sang D.K., Chance M.L. 1993. Studies on the *Phlebotomus* fauna of Mount Elgon, Kenya. *Ann Trop Med Parasitol.* 87(5): 509-15.
- Sant'Anna M.R., Darby A.C., Brazil R.P., Montoya-Lerma J., Dillon V.M., et al. 2012. Investigation of the bacterial communities associated with females of *Lutzomyia* sand fly species from South America. *PLoS One* 7: e42531. Dostupné z: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0042531>
- Schlein Y., Jacobson R.L. and Muller G.C. 2001. Sandfly feeding on noxious plants: a potential method for the control of leishmaniasis. *Am J Trop Med and Hyg.* 65: 300–303.
- Schlein Y., Polacheck I. and Yuval B. 1985. Mycoses, bacterial infection and antibacterial activity in sand flies (*Psychodidae*) and their possible role in the transmission of leishmaniasis. *Parasitology* 90: 57-66.
- Seitz H.M., Maier W.A., Rottok M. & Becker-Feldmann H. 1987. Concomitant infections of *Anopheles stephensi* with *Plasmodium berghei* and *Serratia marcescens*: Additive detrimental effects. *Zentralbl. Bakteriolog. Hyg.* 266: 155-166.
- Siddall M.E., Perkins S.L. and Desser S.S. 2004. Leech mycetome endosymbionts are a new lineage of alphaproteobacteria related to the *Rhizobiaceae*. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 30: 178–186
- Silva P.I., Daffre S. and Bulet P. 2000. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J Biol Chem.* 275(43): 33464-70.
- Singh G., Prakash S. 2012. Lethal effect of *Streptomyces citreofluorescens* against larvae of malaria, filaria and dengue vectors. *Asian Pac J Trop Med.* 5(8): 594-7.
- Sinkins S.P. and O'Neill S.L. 2000. *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations. In Handler A. and James A. A. (Ed.), *Insect transgenesis: methods and applications.* 271-288. Boca Raton, FL.: CRC Press.
- Soares R.P. and Turco S.J. 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: *Psychodidae*: *Phlebotominae*): a review. *An Acad Bras Cienc.* 75: 301–330.
- Tanada Y. and Kaya H. K. 1993. Associations between insects and nonpathogenic microorganism. In *Insect Pathology.* pp. 12-51. New York: Academic Press.
- Telleria E.L., Sant'anna M.R., Alkurbi M.O., Pitaluga A.N., Dillon R.J., Traub-Csekö Y.M. 2013. Bacterial feeding, *Leishmania* infection and distinct infection routes induce differential defensin expression in *Lutzomyia longipalpis*. *Parasit Vectors.* 6:12. Dostupné z: <http://www.parasitesandvectors.com/content/pdf/1756-3305-6-12.pdf>
- Turley A.P., Moreira L.A., O'Neill S.L., McGraw E.A. 2009. *Wolbachia* Infection Reduces Blood-Feeding Success in the Dengue Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* 3(9): e516. Dostupné z: <http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0000516>
- Volf P., Kiewegova A., Nemec A. 2002. Bacterial colonization in the gut of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: *Psychodidae*): transtadial passage and the role of female diet. *Folia Parasitol.* 49: 73–77.

Wahba M.M. 2000. The influence of *Bacillus sphaericus* on the biology and histology of *Phlebotomus papatasi*. J Egypt Soc Parasitol 30: 315-323.

Walker T. and Moreira L.A. 2011. Can *Wolbachia* be used to control malaria? Mem Inst Oswaldo Cruz. 106(1): 212-217.

Welburn S.C. and Maudlin I. 1991. Rickettsia-like organisms, puparial temperature and susceptibility to trypanosome infection in *Glossina morsitans*. Parasitology. 102(Pt2): 201-206.

WHO: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/integrated\\_media\\_leishmaniasis/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media_leishmaniasis/en/)

#### 4. Příloha

Folia Parasitol (Praha). 2002;49(1):73-7.

**Bacterial colonisation in the gut of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: *Psychodidae*): transtadial passage and the role of female diet.**

Volf P, Kiewegová A, Nemeč A.