

**Přírodovědecká fakulta**  
**Univerzita Karlova v Praze**  
**Katedra Parazitologie**

Studijní program Biologie  
Studijní obor Parazitologie



Bc. Lucia Pohanková

**Protilátková odpověď na sliny flebotomů**

Host antibody response to sand fly saliva

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Iva Kolářová, Ph.D.

Praha 2014

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury. Žádná část této práce nebyla použita pro získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Hradci Králové 15.4.2014

Lucia Pohanková

Poděkování:

Jako první člověk, které bych chtěla poděkovat je moje školitelka RNDr. Iva Kolářová PhD.. Byla mi nepopsatelnou pomocí při mém magisterském a dříve i bakalářském studiu. Děkuji, Ivo. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Michaele Kindlové PhD., která mi byla významnou pomocí při mých pokusech. Dále si vážím podpory celého kolektivu laboratoře Prof. RNDr. Petra Volfa CSc.. Nebudu jmenovat, určitě bych na někoho významného zapomněla, takže děkuji všem. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat mým rodičům za vytrvalou podporu na mých studiích. Mým přátelům, kolegům a kolegyním z práce za dodávání optimismu.

## ABSTRAKT

Leishmanioóza je typické protozoární onemocnění, které se do hostitele přenáší při sání flebotoma. V průběhu sání infikovaného flebotoma dochází nejen k přenosu leishmanií, ale i sliny samotného flebotoma jsou při sání inokulovány do hostitele. Tyto sliny silně ovlivňují odpověď imunitního systému. U hostitelů, kteří se ještě nesetkali se slinami flebotomů je průběh infekce většinou horší. U kožní leishmaniózy se vyvíjejí kožní léze dříve, bývají destruktivnější, zůstávají déle a jejich vyléčení není vždy podmínkou. U hostitelů žijících v endemických oblastech výskytu leishmaniózy a jejich přenašečů bývají hostitelé často vystaveni opakovanému sání neinfikovaných flebotomů. Na hostitele působí opakovaně inokulované sliny antigeny a indukují tvorbu specifické buněčné a protilátkové odpovědi. Buněčná a protilátkové odpověď není stejná u všech hostitelů. U myši a psů, kteří patří mezi nejčastější laboratorní modely, jsou podmínky pro sledování vývoje leishmaniové infekce o poznání lepší než u lidí. U lidí jako hostitelů je těžké sledovat vývoj leishmaniové infekce po předchozí expozici, proto se u lidí především sledují hladiny protilátek proti slinám flebotomů. Podle hladin specifických protilátek můžeme u hostitelů určit míru poštipání flebotomy a riziko přenosu leishmaniózy.

Klíčová slova: protilátky, IgG, *Phlebotomus*, *Lutzomyia*

## ABSTRACT

Leishmaniasis is protozoan diseases, which is transport into the host during the feeding of sand fly. During the feeding of infected sand flies not only the leishmania but also the sand fly saliva are inoculated into the hosts. Sand fly saliva can strongly affect the response of the immune system. If the host hadn't met sand fly saliva yet, the course of infection is usually worse. In cutaneous leishmaniasis, the lesions developed early, being more destructive and persisting longer, if not healed. The hosts living in endemic areas of leishmaniasis and the vector hosts are often exposed to feeding uninfected sand flies. To hosts are repeatedly inoculated the sand fly saliva antigen and induced specific cellular and antibody responses. Cellular and antibody responses are different for different hosts, attempts were made most frequently in murine and canine models. In humans, as host is it difficult to monitor development leishmania infection after previous exposure, that's why in humans mainly it is monitors the levels of antibodies, according to which we can determine the extent of sand fly bite and the risk of transmission of leishmaniasis. The specificity of immune responses against sand fly saliva is important for the testing new type of controlling and healing programs against sand fly and leishmaniasis.

Keywords: antibodies, IgG, *Phlebotomus*, *Lutzomyia*

Přehled častěji se opakujících zkratk:

ADP	adenosindifosfát (angl. adenosine diphosphate)
<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>
<i>Am.</i>	<i>Amblyomma</i>
AMP	adenosinmonofosfát (angl. adenosine monophosphate)
<i>An.</i>	<i>Anopheles</i>
ATP	adenosintrifosfát (angl. adenosine triphosphate)
BALB/c	inbrední kmen myši vnímavý k leishmaniové infekci
CBA	inbrední kmen myši rezistentní k leishmaniové infekci
<i>Cu.</i>	<i>Culex</i>
C57BL/6	inbrední kmen myši rezistentní k leishmaniové infekci
<i>De.</i>	<i>Dermacentor</i>
DTH	přecitlivělost oddáleného typu (angl. <u>D</u> elayed- <u>t</u> ype <u>H</u> ypersensitivity)
IFN- $\gamma$	interferon gamma
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL	interleukin
<i>Ix.</i>	<i>Ixodes</i>
<i>Le.</i>	<i>Leishmania</i>
<i>Lu.</i>	<i>Lutzomyia</i>
NO	oxid dusnatý
NK	přirození zabíječi (angl. natural killer)
<i>Pa.</i>	<i>Panstrongylus</i>
PBS	fosfátový pufr (angl. <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline)
<i>Ph.</i>	<i>Phlebotomus</i>
<i>Rh.</i>	<i>Rhodnius</i>
<i>Rhi.</i>	<i>Rhipicephalus</i>
Th	pomocné T lymfocyty (angl. helper T lymfocyte)
<i>Tr.</i>	<i>Triatoma</i>

## OBSAH

1. Úvod.....	9
2. Literární přehled	
2.1. Sliny krevsajících členovců.....	11
2.1.1. Sliny Phlebotominae.....	11
2.1.2. Sliny Culicidae.....	13
2.1.3. Sliny Ixodidae.....	14
2.1.4. Sliny Reduviidae.....	15
2.2. Vliv slin na hostitele	
2.2.1. Vliv slin Phlebotominae na hostitele.....	16
2.2.1.1. Protektivita proti leishmanióze.....	18
2.2.2. Vliv slin Culicidae na hostitele.....	20
2.2.3. Vliv slin Ixodidae na hostitele.....	21
2.2.4. Vliv slin Reduviidae na hostitele.....	21
2.3. Protilátková odpověď.....	22
2.3.1. Phlebotominae.....	22
2.3.2. Culicidae.....	26
2.3.3. Ixodidae.....	29
2.3.4. Reduviidae.....	29
3. Metodika	
3.1. Chov flebotomů.....	32
3.2. Pitva slinných žláz flebotomů.....	32
3.3. Pitva slinných žláz komárů.....	33
3.4. Imunizace myši – Dynamika protilátkové odpovědi.....	33
3.5. Odběr krve z ocasu myši.....	34
3.6. Imunizace myši – Zkřížené reakce.....	34
3.7. Imunizace myši – Vliv délky imunizace na vývoj leishmaniových lézí.....	35

3.8.	Infekce myši – Vliv délky imunizace na vývoj leishmaniových lézí.....	36
3.9.	ELISA.....	37
3.10.	SDS PAGE Elektroforéza.....	38
3.11.	Western Blot.....	39
3.12.	Imunoblot.....	39
3.13.	Stříbření.....	40
3.14.	Čipová elektroforéza.....	40
3.15.	Statistika.....	41
4.	Výsledky	
4.1.	Dynamika protilátkové odpovědi u myši poštípaných <i>Phlebotomus papatasi</i> .....	42
4.2.	Charakterizace antigenů a proteinů ve slinných žlázách <i>Phlebotomus papatasi</i> .....	47
4.3.	Specifita protilátkové odpovědi proti slinám <i>Phlebotomus papatasi</i> .....	49
4.4.	Specifita antigenů slinných žláz <i>Phlebotomus papatasi</i> .....	51
4.5.	Vliv délky imunizace na vývoj kožních leishmaniových lézí a na produkci protilátek proti slinám <i>Phlebotomus papatasi</i> .....	52
5.	Diskuze	
5.1.	Dynamika protilátkové odpovědi u myši poštípaných <i>Phlebotomus papatasi</i> .....	56
5.2.	Charakterizace antigenů a proteinů ve slinných žlázách <i>Phlebotomus papatasi</i> .....	58
5.3.	Specifita protilátkové odpovědi proti slinám <i>Phlebotomus papatasi</i> .....	61
5.4.	Specifita antigenů slinných žláz <i>Phlebotomus papatasi</i> .....	61
5.5.	Vliv délky imunizace na vývoj kožních leishmaniových lézí a na produkci protilátek proti slinám <i>Phlebotomus papatasi</i> .....	62
6.	Souhrn.....	65

7. Příloha	
7.1. Proteinové profily slinných žláz různých druhů krevsajících členovců.....	66
7.2. Bioinformatická analýza aminokyselinových sekvencí proteinů ze slinných žláz <i>Phlebotomus papatasi</i> .....	68
8. Seznam použité literatury.....	71



## Úvod a cíle

Leishmanióza patří mezi vážná protozoární onemocnění. Jejím původcem je prvok rodu *Leishmania*. K přenosu tohoto onemocnění dochází při sání flebotomů, což jsou krevsající členovci z řádu Diptera. Světová zdravotnická organizace (WHO) považuje leishmaniózu za jednu z deseti nejvýznamnějších infekcí, co do počtu nakažených osob.

Při sání flebotoma na savčím hostiteli dochází spolu s přenosem leishmanií i k přenosu slin flebotoma. Tyto sliny výrazně ovlivňují další vývoj leishmaniové infekce. Ribeiro (1987) popsal sliny flebotomů jako imunomodulační a antihemostatické. Při prvotním styku hostitele se slinami je hostitel v nevýhodě, protože u hostitele dochází vlivem slin k potlačení přirozených obranných mechanismů. Speciálním efektem slin flebotomů je schopnost podpořit rozvoj infekce i při velmi nízké infekční dávce leishmanií. Bez slin flebotoma by k rozvoji leishmaniové infekce při nízkých infekčních dávkách leishmanií nedošlo. Tento jev je známý pod anglickým označením „enhancing efekt“, a poprvé jej popsal v roce 1987 Ribeiro (Ribeiro, 1987; Titus a Ribeiro; 1988).

Při opakovaném sání flebotoma na hostiteli, dochází k tvorbě protilátek specifických proti slinám daného flebotoma. Tato tvorba protilátek již byla prokázána u celé řady laboratorních i volně žijících hostitelů (Gomes a Oliveira, 2012)

Cíle diplomové práce:

- 1) Zjistit dynamiku protilátkové odpovědi proti slinám *Phlebotomus papatasi* u myší kmene C57BL/6, včetně charakterizace hlavních antigenních složek slin *Ph. papatasi*.
- 2) Stanovit specifitu protilátkové odpovědi proti slinám *Ph. papatasi* v porovnání se slinami jiných krevsajících členovců.
- 3) Zjistit vliv opakovaného sání *Ph. duboscqi* na vývoj leishmaniové léze a produkci protilátek proti slinám *Ph. duboscqi* u myší kmene BALB/c.

## **2. Literární přehled**

### **2.1. Sliny krevsajících členovců**

2.1.1. Phlebotominae

2.1.2. Culicidae

2.1.3. Ixodidae

2.1.4. Reduviidae

### **2.2. Vliv slin na hostitele**

2.2.1. Phlebotominae

2.2.1.2. Protektivita proti leishmanióze

2.2.2. Culicidae

2.2.3. Ixodidae

2.2.4. Reduviidae

### **2.3. Protilátková odpověď proti slinám krevsajících členovců**

2.3.1. Phlebotominae

2.3.2. Culicidae

2.3.3. Ixodidae

2.3.4. Reduviidae

## 2. Literární přehled

### 2.1. Sliny krevsajících členovců

Při přenosu některých onemocnění se jako účinný virulentní faktor uplatňují sliny krevsajících členovců (Gillespie a kol., 2000; Andrade a kol., 2005). V níže uvedeném přehledu se věnuji pouze vybraným zástupcům krevsajících členovců, především těm, se kterými jsem při svých pokusech pracovala.

Sliny jsou důležité už ve fázi vyhledání ideálního místa bodnutí (Ribeiro, 1987). V následné fázi sání se do místa bodnutí dostávají sliny, které v hostiteli potlačují přirozené hemostatické a zánětlivé imunitní reakce (Ribeiro, 1995 A). Přirozenou reakcí každého hostitele je zabránit velkým ztrátám krve pomocí vasokonstrikce, srážení a agregace destiček (Ribeiro, 1995 A). Krevsající členovci, kteří krev potřebují pro svou výživu a tvorbu vajíček, mají ve svých slinách látky, které naopak sání krve usnadňují a podporují (Ribeiro, 1987; Gillespie a kol., 2000).

V níže popsané kapitole zmiňuji vybrané proteinové a neproteinové složky slin vybraných krevsajících členovců, podrobné popisy proteinového obsahu slin jsou dostupné v cDNA knihovnách *Lutzomyia longipalpis* (Charlab a kol. 1999; Valenzuela a kol., 2004), *Phlebotomus ariasi* (Oliveira a kol., 2006), *Ph. papatasi* (Valenzuela a kol., 2001; Abdeladhim a kol., 2012), *Ph. arabicus* (Hostomská a kol., 2009), *Ph. duboscqi* (Kato a kol., 2006), *Ph. argentipes* (Anderson a kol., 2006), *Ph. perniciosus* (Anderson a kol., 2006), *Aedes aegypti* (Ribeiro a kol., 2007), *Culex quinquefasciatus* (Ribeiro a kol., 2004), *Triatoma infestans* (Assumpção a kol., 2008), *Ixodes ricinus* (Chmelař a kol., 2008) a v přehledových člancích Ribeiro a Francischetti, 2003; Ribeiro a Arcá, 2009 a další.

#### 2.1.1. Sliny Phlebotominae

Ve slinách *Lu. longipalpis* byl objeven silný vazodilatační peptid pojmenovaný EIF (erythema inducing factor) (Ribeiro a kol., 1989A), následně přejmenovaný na maxadilan (Lerner a kol., 1991). U maxadilanu byla objevena pětsetkrát silnější schopnost vazodilatace než u do té doby nejsilnějšího vazodilatátoru, neuropeptidu CGRP (calcitonin gene-related protein) (Lerner a kol., 1991). Další součástí slin flebotomů jsou např. apyráza nebo hyaluronidáza (Charlab a kol., 1999, Černá a kol., 2002). Narozdíl od maxadilanu byly oba tyto enzymy či jejich aktivity popsány ve slinách flebotomů rodu *Lutzomyia* i *Phlebotomus* (Ribeiro a kol., 1986; Ribeiro, 1987; Ribeiro a kol., 1989 B; Černá a kol.,

2002, Volfová a kol., 2008). Zatímco apyráza potlačuje agregaci a degranulaci destiček v místě vpichu (Ribeiro a kol., 1986), hyaluronidáza štěpí v těle hostitele hyaluronan, který je zásadní složkou extracelulární matrix obratlovců (Stern a kol., 2006 podle Volfová a kol., 2008), čímž zlepšuje propustnost pro další složky slin vektora a může tak napomáhat šíření parazita (Volfová a kol., 2008). U *Ph. papatasi* byly ve slinách popsány antiagregační látky jako adenosin a 5'AMP (Ribeiro a kol., 1999), které byly objeveny i ve slinách *Ph. argentipes* (Ribeiro a Modi, 2001). Adenosin však nebyl nalezen ve slinách flebotomů rodu *Lutzomyia* (Andrade a kol., 2005). U obou rodů flebotomů byla dále popsána skupina tzv. D7 proteinů (Valenzuela a kol., 2002). Funkce těchto proteinů u flebotomů není dosud zcela známa, avšak jelikož jsou řazeny do skupiny tzv. Odour binding proteinů, tak se nepředpokládá jejich přímý vliv na hemostázi hostitele (Ribeiro a kol., 2010). Proteiny skupiny D7 mají ve slinách krevsajícího dvoukřídlého hmyzu široké rozšíření (Valenzuela a kol., 2002; Ribeiro a Arcà, 2009; Ribeiro a kol., 2010).

Tabulka 1. Vybrané složky slin ve slinách podčeledi Phlebotominae

Název složky slin	Funkce	Výskyt	Odkazy
Maxadilán	vasodilatace	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Lerner a kol., 1991
Apyráza	antiagregace	<i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Phlebotomus papatasi</i>	Ribeiro a kol., 1986, Ribeiro, 1987
Adenosin	antiagregace	<i>Phlebotomus papatasi</i>	Ribeiro a kol., 1999
5'AMP	antiagregace	<i>Phlebotomus papatasi</i> , <i>Phlebotomus argentipes</i>	Ribeiro a kol., 1999, Ribeiro a kol., 2001
Hyaluronidáza	štěpí hyaluronan	<i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Phlebotomus papatasi</i> , <i>Phlebotomus duboscqi</i> , <i>Phlebotomus halepensis</i> , <i>Phlebotomus perniciosus</i>	Charlab a kol., 1999, Černá a kol., 2002
Proteiny skupiny D7	není definovaná	rod <i>Lutzomyia</i> , rod <i>Phlebotomus</i>	Valenzuela a kol., 2002

Obsah látek ve slinných žlázách flebotomů se různí mezidruhově i mezi různými koloniemi v rámci jednoho druhu, dále pak mezi pohlavími a u různě starých jedinců v rámci jednoho druhu (Volf a Rohoušová, 2001). Ve slinných žlázách různých kolonií *Lu. longipalpis* byla prokázána velká různorodost v aminokyselinové sekvenci maxadilánu (Lanzaro a kol., 1999). Různý obsah látek je i ve slinách u laboratorně chovaných a v přírodě žijících kolonií flebotomů *Ph. papatasi* (Ahmed a kol., 2010). Geograficky závislá

odlišnost ve složení slinných žláz byla prokázána u *Lu. longipalpis* (Warburg a kol., 1994) a *Ph. sergenti* (Rohoušová a kol., 2012). Vysoká variabilita proteinů ve slinách byla prokázána mezi koloniemi i mezi jednotlivci u tří druhů rodu *Phlebotomus*: *Ph. sergenti*, *Ph. perniciosus* a *Ph. papatasi* (Rohoušová a kol., 2012). Nejvyšší variabilita byla pozorována u skupiny tzv. Yellow-related proteinů (Rohoušová a kol., 2012).

### 2.1.2. Sliny Culicidae

Dalšími zástupci krevsajících členovců, kteří mají ve svých slinách antihemostatické a imunomodulační látky, jsou komáři (Ribeiro, 1995 A; Ribeiro a Francischetti, 2003; Andrade a kol., 2005).

U *Aedes aegypti* byla ve slinách prokázána apyráza, přítomnost apyrázy byla také potvrzena ve slinách komárů rodu *Anopheles* (Arca a kol., 1999) a *Culex* (Nascimento a kol., 2000). Apyráza štípe ADP a tím zabraňuje agregaci destiček (Champagne a kol., 1995). Bylo prokázáno, že *Ae. aegypti* má vyšší schopnost apyrázové aktivity ve svých slinách než *An. albimanus* a *Cu. quinquefasciatus* (Ribeiro, 2000). U *Cu. quinquefasciatus* byl ve slinách objeven enzym schopný inhibice faktoru PAF (platelet-aggregation factor), který indukuje jednu z cest agregace destiček (Ribeiro a Francischetti, 2001). Tento enzym tak zřejmě nahrazuje nízký obsah apyrázy ve slinných žlázách *Cu. quinquefasciatus* (Ribeiro, 2000). U *Ae. aegypti* se žádný enzym schopný inhibice faktorů PAF nenašel (Ribeiro a Francischetti, 2001). *Anopheles stephensi*, přenašeč lidské malárie, je schopný inhibovat kolegenem indukovanou agregaci destiček. V jeho slinách byl objeven protein nazvaný AAPP (anopheline antiplatelet protein), který se váže na kolagen a specificky tak blokuje přilnavost destiček na kolagen s následnou agregací destiček (Yoshida a kol., 2008). Ve slinných žlázách *Cu. quinquefasciatus* byla popsána vysoká hyaluronidázová aktivita, ale u *Ae. aegypti* a *An. stephensi* nebyla hyaluronidázová aktivita detekována vůbec (Volfová a kol., 2008).

Z antikoagulačních látek byl ve slinách rodu *Aedes* popsán inhibitor faktoru Xa (Stark a James, 1996). Tento inhibitor patří do rodiny serpinů, inhibitorů serinových proteáz (Stark a James, 1998). U komárů rodu *Anopheles* byly ve slinách nalezeny unikátní malé peptidy neznámé funkce. Byly nazvány anopheliny a chovají se jako inhibitory trombinu (Francischetti a kol., 1999; Valenzuela a kol., 1999). Rozdíly v protisrážlivé aktivitě nebyly výrazné při porovnání *An. albimanus* a *Ae. aegypti*, ale protisrážlivá aktivita u *Cu. quinquefasciatus* byla v porovnání s předchozími druhy výrazně nižší (Ribeiro, 2000).

Nejvyšší vasodilatační aktivita slin byla naměřena u *An. albimanus*, nižší pak u *Cu. quinquefasciatus* a nejnižší u *Ae. aegypti* (Ribeiro, 2000).

U komárů *Cu. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti*, *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. stephensi*, *An. darlingi* byla pospána podskupina tzv. D7 proteinů (Valenzuela a kol., 2002). U jednoho člena skupiny D7 proteinů ze slin *An. gambiae* konkrétně u proteinu s označením D7r1 bylo prokázáno, že má schopnost ovlivňovat aktivaci koagulační kaskády (Mans a kol., 2007).

### 2.1.3. Sliny Ixodidae

Ve slinách klíšťat byla potvrzena apyráza, která má srovnatelnou aktivitu hydrolýzy ATP i ADP (Ribeiro a kol., 1985). Hydrolýzou ADP na AMP dochází k inhibici agregace trombocytů (Ribeiro a kol., 1985). Ribeiro (1982) popsal v sekretu slin klíšťat aktivitu blokující účinky histaminu a serotoninu (Ribeiro, 1982). V obsahu slinných žláz klíšťat byl nalezen kalretikulin, který má schopnosti antiangiogeneze a tím naruší obnovu tkáně poškozené při dlouhém sání klíšťat (Jaworski a kol., 1995; Pike a kol., 1998 obojí podle Ribeiro a Francischetti, 2003). Mezi vazodilatátory ve slinných žlázách klíšťat patří velké množství prostaglandinů (Ribeiro a Francischetti, 2003). Poznatky o slinných žlázách *Ixodes scapularis* dokazují, že slinné žlázy působí jako inhibitor proliferace endotelových buněk a jako inhibitor angiogeneze, tím se vysvětluje, proč jsou klíšťata schopna sát na svém hostiteli několik dní (Francischetti a kol., 2005). Ve slinných žlázách *Ix. ricinus* se v průběhu sání objevuje protein zvaný Iris (*Ixodes ricinus* immunosuppressor) (Leboulle a kol., 2002). Už podle názvu je patrné, že má velmi silný imunomodulační vliv na imunitní a hemostatickou odpověď hostitele. Pozdější proteinová analýza tohoto proteinu prokázala jeho příslušnost ke skupině serpinů, což jsou inhibitory serinových proteáz (Prevot a kol., 2006). Další ze skupiny serpinů, který byl nalezen ve slinách *Ix. ricinus* je IRS-2 (*Ixodes ricinus* serpin-2) (Chmelař a kol., 2011). Na kmeni myši C57BL/6 bylo prokázáno, že tento protein působí inhibici produkce katepsinu G a chymázy, čímž přímo působí proti akutnímu zánětu v místě sání. Při vyšších koncentracích působí tento protein inhibici indukce trombinu, čímž zase inhibuje agregaci krevních destiček (Chmelař a kol., 2011).

Také u klíšťat byla zjištěna molekulární variabilita v proteinech slinných žláz mezi jednotlivci stejného druhu (Wang a kol., 1999). Výrazná odlišnost v proteinovém profilu

slinných žláz klíšťat byla demonstrována u druhů *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* a *Ix. ricinus* (Wang a kol., 1999).

#### 2.1.4. Sliny Reduviidae

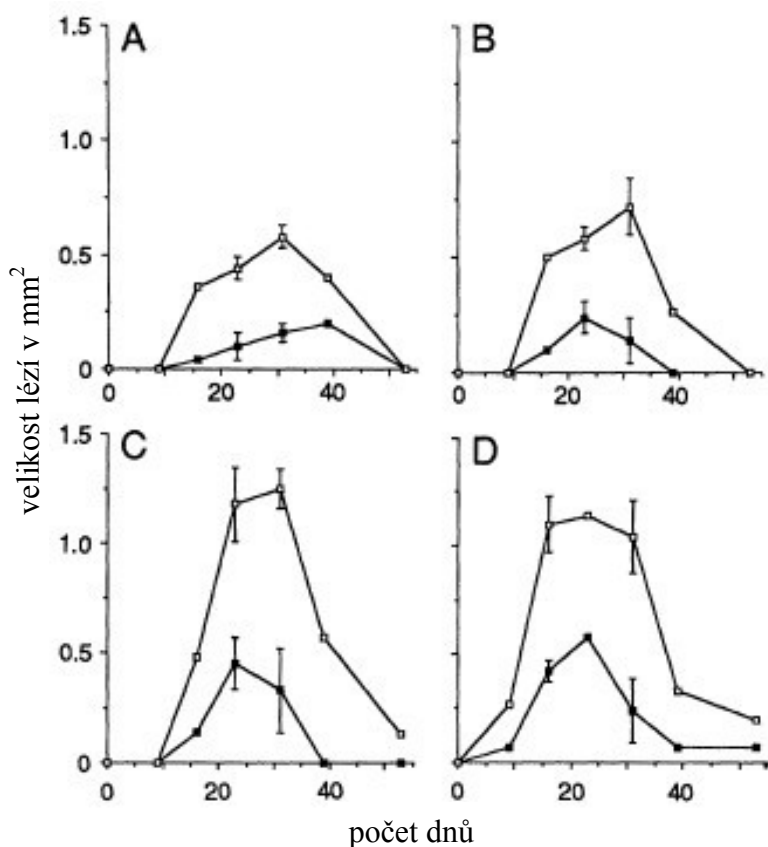
Velice rozšířenou součástí slin krevsajícího hmyzu je apyráza. Byla popsána ve slinách flebotomů (Ribeiro a kol., 1986; Ribeiro, 1987), komárů (Arca a kol., 1999; Nascimento a kol. 2000) i klíšťat (Ribeiro a kol., 1985). Apyráza a její vazodilatační účinky byly také popsány i u řádu Heteroptera, čeledi Reduviidae, u rodů *Dipetalogaster*, *Panstrongylus*, *Rhodnius* a *Triatoma* (Ribeiro a kol., 1998; Champagne, 2005). Jednotlivé druhy se však liší ve schopnosti hydrolýzy ADP a ATP. Rod *Rhodnius* má větší schopnost hydrolýzy ATP než ADP a naopak u rodu *Triatoma* je větší schopnost hydrolýzy ADP než ATP (Ribeiro a kol., 1998). Ve slinách *Rh. prolixus* byly popsány proteiny nitroforiny, které mají unikátní vazodilatační účinky. Nitroforiny vyvazují histamin, čímž zabraňují svědivému pocitu v místě vpichu (Champagne a kol., 1995; Ribeiro a kol., 1995 B). Při zkoumání slinných žláz *Rh. prolixus* byl nalezen protein RPAI-1 (*Rhodnius prolixus* aggregation inhibitor 1), který inhibuje kolagenem indukovanou agregaci destiček (Francischetti a kol., 2000). Stejnou funkci má protein nalezený ve slinách *Tr. pallidipennis*, který byl pojmenován pallidipin (Andrade a kol., 2005). V homogenátu slinných žláz všech testovaných 24 druhů čeledi *Reduviidae* byla detekována antikoagulační aktivita (Ribeiro a kol., 1998). V případě druhu *Tr. infestans* jsou to silné inhibitory antikoagulačního faktoru V a VIII (Pereira a kol., 1996). Ve slinách *Rh. prolixus* nebyla potvrzena žádná hyaluronidázová aktivita (Volfová a kol., 2008). Zajímavé jsou molekuly, které neovlivňují imunitní a hemostatické reakce hostitele a přesto jsou při sání důležité. Jedná se o molekuly ze slin *Tr. infestans*, které působí jako lokální anestetika. Tyto látky inhibují aktivitu sodíkových kanálů v nervové soustavě, čímž dochází k přerušení vedení nervového vzruchu. V místě sání ploštice *Tr. infestans* tedy dochází ke snížení citlivosti (Dan a kol., 1999).

Rozdílné zastoupení proteinů ve slinných žlázách bylo popsáno u brazilských kolonií *Panstrongylus megistus* (Barbosa a kol., 1999; Barbosa a kol., 2004). Vysoká variabilita v proteinovém profilu slinných žláz byla potvrzena mezi různými kmeny a různými vývojovými stádii ploštice *Tr. infestans* (Dorňáková a kol., 2014).

## 2.2. Vliv slin

### 2.2.1. Vliv slin Phlebotominae na hostitele

Sliny flebotomů inokulované v průběhu sání ovlivňují imunitní reakci hostitele. Významnou funkcí slin je schopnost vyvolat u hostitele enhancing efekt, který byl poprvé popsán na modelu *Leishmania major* a *Lutzomyia longipalpis* a odhaluje schopnost slin potlačit imunitní reakce hostitele, čímž umožní uchycení leishmanií a vyvolání infekce i při velmi malé infekční dávce parazitů (Titus a Ribeiro, 1988)(Obr.1). Kožní léze u myší, které byly infikovány samotnými leishmaniami byly pět až desetkrát menší než léze u myší, které byly infikovány leishmaniami v kombinaci se slinami *Lu. longipalpis*. Tento pokus také potvrdil, že v přítomnosti slin flebotomů se uchytí i nízké infekční dávky leishmanií (Titus a Ribeiro, 1988).



Obr. 1: Enhancing efekt slin na modelu *Lutzomyia longipalpis* – *Leishmania major* Myši kmene CBA byly infikovány (A)  $10^1$ , (B)  $10^2$ , (C)  $10^3$ , (D)  $10^4$  promastigoty *Le. major* v přítomnosti (■) nebo bez (□) lyzátu slinných žláz *Lu. longipalpis* (převzato a upraveno z Titus a Ribeiro, 1988).



Důležitá složka slin *Lu. longipalpis*, protein zvaný maxadilan, (Ribeiro a kol., 1989 A; Lerner a kol., 1991) zhoršuje vývoj leishmaniové infekce stejně jako homogenát celých slinných žláz *Lu. longipalpis* (Morris a kol., 2001). Zhoršení vývoje lézí bylo potvrzeno i u myši kmene C57BL/6, kterým byla inokulována *Le. major* v kombinaci se slinami *Phlebotomus papatasi* (Theodos a kol., 1991). Myši kmene C57BL/6 jsou jinak k leishmaniové infekci rezistentní a jsou schopné samovolně léze vyhojit (Sacks a Noben-Trauth, 2002), ovšem při infekci spolu se slinami flebotomů se leishmaniová infekce u tohoto kmene myši úspěšně uchytí a léze mají destruktivnější charakter (Theodos a kol., 1991). Při inokulaci samotných leishmanií *Le. braziliensis braziliensis* do ucha myši kmene BALB/c se vyvíjely malé a rychle se hojící léze, ale po inokulaci se slinami *Lu. longipalpis* došlo k výraznému zhoršení průběhu infekce (Samuelson a kol., 1991). Došlo ke zvětšení lézí, které měly destruktivnější charakter a obsahovaly velké množství makrofágů plných leishmaniových amastigotů, než při inokulaci samotných leishmanií (Samuelson a kol., 1991). Byl prokázán vliv slin *Lu. whitmani* na kožní léze *Le. braziliensis*, po inokulaci *Le. braziliensis* spolu se slinami *Lu. whitmani*, došlo k vývoji rozsáhlejších lézí u myši, kterým byly inokulovány leishmanie spolu se slinami flebotoma (Bezerra a kol., 2001). U křečka zlatého (*Mesocricetus aureus*) se enhancing efekt slin flebotomů na průběh leishmaniové infekce nepotvrdil (Melo a kol., 2001). Vývoj typických kožních lézí byl sledován také u křečků, kteří byli infikováni slinnými žlázami *Lu. longipalpis*, ale pouze v kombinaci s nejvyšší podanou dávkou *Le. major*, a sice s dávkou promastigotů  $10^7$ . U křečků, kterým byly podány nižší dávky leishmanií se léze nevyvíjely (Melo a kol., 2001). Na modelu pes, *Le. chagasi* a *Lu. longipalpis* také nebyl potvrzen žádný enhancing efekt slin na průběh intradermální infekce. U psů infikovaných samotnými leishmanii a u psů infikovaných leishmanii v kombinaci se slinami *Lu. longipalpis* nebyl žádný rozdíl v průběhu infekce a hladiny naměřených leishmanií ve slezině byly také srovnatelné a bez rozdílu (Paranhos-Silva a kol., 2003).

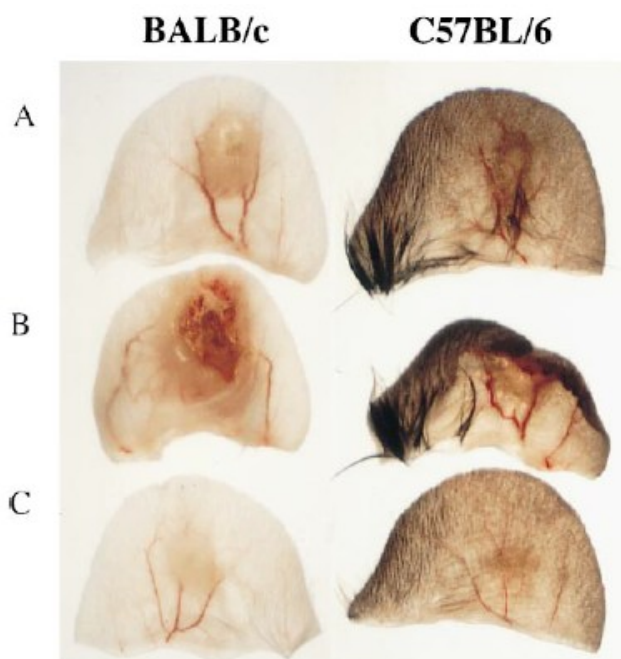
Za enhancing efekt slin flebotomů je zodpovědná především ta imunomodulační složka, která ovlivňuje buněčnou imunitu hostitele. Sliny *Phlebotomus duboscqi* působí jako chemoatraktant, který do místa vpichu přiláká makrofágy (Anjili a kol., 1995). Makrofágy zde začnou ihned pohlcovat se slinami inokulované leishmanie. Leishmanie se touto cestou dostanou rychleji a snadněji do své hostitelské buňky (Anjili a kol., 1995). Slinné žlázy *Lu. longipalpis* inhibují schopnost makrofágů vystavení leishmaniových antigenů na svém

povrchu a tím znemožňují detekci leishmaniové infekce pro T-buňky (Theodos a Titus, 1993).

Imunomodulační účinky slin flebotomů byly pozorovány v homogenátu slinných žláz *Lu. longipalpis* byly nalezeny látky, které zvýší infiltraci makrofágů a eozinofilů u myši kmene BALB/c, ale tento jev zvýšené infiltrace makrofágů a eozinofilů nebyl pozorován u myši kmene C57BL/6 (Texeira a kol., 2005). Homogenát slinných žláz *Lu. longipalpis* inhibuje expresi kostimulačních molekul lidských monocytů a makrofágů (Costa a kol., 2004). Dále dochází ke snížení schopnosti dozrání dendritických buněk (Costa a kol., 2004). Buněčná odpověď na sliny *Ph. papatasi* vede u lidí ke zvýšení IL-10 a je také směřována k Th2 imunitní odpovědi (Abdeladhim a kol., 2011). Slinné žlázy *Ph. papatasi* podané spolu s leishmaniami v infekční dávce jsou schopné dramaticky zhoršit vývoj a průběh kožní leishmaniové infekce u CBA myši, které jsou v nepřítomnosti slinných žláz flebotomů k leishmaniové infekci rezistentní. Toto zhoršení průběhu infekce souvisí s inhibicí produkce Th1 cytokinů (IL-12 a IFN- $\gamma$ ) a se zvýšením některých Th2 cytokinů (IL-4). Ovšem nebyl prokázán vliv na zvýšení cytokinů IL-10 a TGF- $\beta$  (Mbow a kol., 1998). Sliny flebotomů *Ph. sergenti* a *Lu. longipalpis* mají schopnost potlačení produkce IFN- $\gamma$  a IL-2 (Rohoušová a kol., 2005 B). Sliny *Ph. papatasi* přímo ovlivňují expresi IL-4 mRNA i u myši, kterým byly inokulovány samotné sliny *Ph. papatasi* bez leishmanií (Mbow a kol., 1998). Sliny *Ph. papatasi* jsou schopny utlumit produkci NO u makrofágů s pohlcenými leishmaniami a tím výrazně potlačí schopnost hostitele eradikovat parazita (Hall a Titus, 1995).

#### 2.2.2.1. Protektivita proti leishmanióze

Po opakované imunizaci neinfikovanými flebotomy rodů *Phlebotomus* a *Lutzomyia* dochází k navození ochrany proti leishmanióze (Belkaid a kol., 1998; Kamhawi a kol., 2000; Silva a kol., 2005; Thiakaki a kol., 2005; Rohoušová a kol., 2011). První pokus, který prokázal protektivitu proti kožní leishmanióze po opakované expozici neinfikovanými flebotomy, provedli a publikovali Belkaid a kol., (1998). Prokázalo se, že předchozí imunizace slinami navodila u myši protektivitu a kožní léze byly mnohem menší (Obr. 2C) než u myši bez předchozí imunizace. Zároveň byl opět potvrzen enhancing efekt slin. Myši bez předchozí imunizace *Ph. papatasi*, kterým byla podána infekční dávka leishmanií se slinami, měly větší a destruktivnější léze (Obr. 2B) než myši, jejichž infekční dávka obsahovala samotné leishmanie (Obr. 2A)(Belkaid a kol., 1998).



Obr. 2: Kožní léze, v desátém týdnu po infekci u myší, které byly infikovány A) samotnými leishmaniami B) leishmaniami spolu se slinami *Ph. papatasi* C) leishmaniami spolu se slinami *Ph. papatasi* po předchozí imunizaci slinami *Ph. papatasi* (převzato a upraveno z Belkaid a kol., 1998)

Protektivita udělená imunizací slinami *Ph. papatasi* se projevila silnou DTH reakcí (delayed type hypersensitivity)(Kamhawi a kol., 2000). Myši imunizované slinami *Ph. papatasi* na další imunizaci slinami *Ph. papatasi* odpovídaly zvýšeným průtokem krve, která sebou přinášela monocyty a makrofágy. Zvýšený průtok krve byl nejvýraznější 24 hodin po imunizaci (Belkaid a kol., 2000). Silnou infiltraci monocytů a makrofágů do místa inokulace jsou schopné po opakovaném podání vyvolat i sliny *Lu. longipalpis* (Silva a kol., 2005) a sliny *Lu. intermedia* (Moura a kol., 2010). Silná buněčná odpověď s DTH reakcí probíhala i u psů opakovaně pobodaných *Lu. longipalpis* (Collin a kol., 2009).

Ve slinách některých druhů flebotomů byly identifikovány konkrétní molekuly zodpovědné za vyvolání DTH reakce. Ve slinách *Lu. longipalpis* byly detekovány dva proteiny LJL143 (identifikační číslo pro databázi GenBank AY445936) a LJM17 (identifikační číslo pro databázi GenBank AF132518), které jsou u psů imunizovaných neinfikovanými *Lu. longipalpis* schopné indukovat silnou DTH odpověď a naopak psi imunizovaní proteiny LJL143 a LJM17 odpovídají na pobodání *Lu. longipalpis* velmi

silnou DTH reakcí v místě sání (Collin a kol., 2009). Protein s označením LJM17 ze slin *Lu. longipalpis* patří do skupiny Yellow-related proteinů (Valenzuela a kol. 2004; Gomes a kol., 2008) a protein LJM143 ze slin *Lu. longipalpis* nemá žádnou výraznou příbuznost s některým ze známých proteinů, byl nalezen pouze u flebotomů (Valenzuela a kol., 2004). Sekvence podobná proteinu LJM143 ze slin *Lu. longipalpis* nebyla nalezena ani u rodu *Drosophila* nebo *Anopheles* (Valenzuela a kol., 2004). Křečci imunizovaní proteinem LJM19 ze slin *Lu. longipalpis* vytvářely po sání neinfikovaných *Lu. longipalpis* silnou DTH reakci v místě sání, která byla nejsilnější 48 hodin po sání (Gomes a kol., 2008). Ve slinách *Ph. papatasi* byly detekovány proteiny PpSP15 (Valenzuela a kol., 2001), PpSP42 a PpSP44 (Oliveira a kol., 2008), které jsou schopné u hostitele vyvolat silnou DTH reakci (Valenzuela a kol., 2001; Oliveira a kol., 2008). Protein s označením PpSP15 ze slin *Ph. papatasi* dal název celé skupině PpSP15-like proteinů (Valenzuela a kol., 2001). Proteiny s označením PpSP42 a PpSP44 ze slin *Ph. papatasi* patří do skupiny tzv. Yellow-related proteinů (Valenzuela a kol., 2001). Ve slinách *Ph. ariasi* byly detekovány proteiny, které indukují stejně silnou DTH odpověď jako celé slinné žlázy *Ph. ariasi*. Jsou to proteiny s označením ParSP01, ParSP03 a ParSP25 (Oliveira a kol., 2006).

U lidí poprvé poštípaných neinfekční *Lu. longipalpis* dochází po sání k akutní kožní reakci, která se projevuje tvorbou silně ohraničených hemoragií v místě sání, které ovšem do 24 hodin odezní. Po opakovaném sání *Lu. longipalpis* se v místě sání vytváří slabě znatelné hemoragie bez ohraničení s mnohem menší intenzitou (Vinhas a kol., 2007).

### 2.2.2. Vliv slin Culicidae na hostitele

K určité imunomodulaci u hostitele dochází i po střetu se slinami komárů. V kultuře naivních splenocytů byla prokázána schopnost slin *Ae. aegypti* potlačovat produkci Th1 cytokinů, IL-2 a IFN- $\gamma$ , sliny ovšem neměly žádný vliv na produkci cytokinů IL-4 a IL-5 (Cross a kol., 1994). Ovšem při dalších pokusech bylo zjištěno, že sliny *Ae. aegypti* výrazně redukuje schopnost myších splenocytů produkovat Th1 i Th2 cytokiny (Wanasen a kol., 2004). Tato schopnost ovlivnit produkci Th1 a Th2 cytokinů u myších splenocytů nebyla prokázána u slin *Cu. quinquefasciatus* (Wanasen a kol., 2004). Wasserman a kol. (2004) prokázaly, že k inhibici cytokinů dochází v závislosti na dávce slin. Sliny *Ae. aegypti* jsou schopné snižovat produkci cytokinů IL-2 a IFN- $\gamma$  i při velmi malém množství, kdežto ke snížení produkce IL-4 došlo až při trojnásobně vyšší dávce slin *Ae. aegypti*. Nízké koncentrace extraktu slinných žláz snižují Th1 cytokiny a ke snížení

produkce Th2 cytokinů je zapotřebí několika násobně vyšší koncentrace extraktu slinných žláz *Ae. aegypti* (Wasserman a kol., 2004). Sliny *Ae. aegypti* utlumují v hostiteli Th1 a antivirové cytokiny, čímž v hostiteli vytvářejí lepší prostředí pro úspěšnější přenos a uchycení arbovirů (Schneider a Higgs, 2008).

### 2.2.3. Vliv slin Ixodidae na hostitele

Ve slinách klíšťat byly prokázány látky, které u hostitele také vyvolávají určitou imunomodulaci. Bylo prokázáno, že sliny *Rhiphicephalus microplus* potlačují expresi kostimulační molekuly makrofágů, čímž mohou zabránit aktivaci vrozené imunity u dobytka (Brake a León, 2012). Extrakt ze slinných žláz *Ix. ricinus* ovlivňuje přirozenou imunitu myši kmene BALB/c utlumením aktivity NK buněk a schopnosti makrofágů produkovat NO (Kopecký a Kuthejlová, 1998). K potlačení aktivity NK buněk dochází i u lidí a to prostřednictvím extraktu ze slinných žláz *Dermacentor reticulatus* (Kubeš a kol., 1994). Další pokusy, které ukázaly vliv slinných žláz *Ix. ricinus* na lidské buňky provedl Kovář a kol. (2001). Ke zvýšené produkci IL-10, IL-4 a IL-6 po stimulaci slinnými žlázami *Ix. ricinus* dochází v kultuře lidských buněk (PBMC) k nasměrování imunitní odpovědi směrem k Th2 odpovědi, dochází také ke snížení tvorby cytokinů IL-2 a IFN- $\gamma$ , které by imunitní odpověď směřovaly k Th1 (Kovář a kol., 2001). Pro porovnání byl stejný model pokusu proveden i na kultuře myších splenocytů a po stimulaci slinnými žlázami *Ix. ricinus* došlo k výrazné polarizaci směrem k Th2 imunitní odpovědi (Kovář a kol., 2002).

### 2.2.4. Vliv slin Reduviidae na hostitele

Slinné žlázy *Tr. braziliensis*, *Pa. megistus*, *Rhodnius prolixus* jsou schopné blokovat klasickou cestu aktivace komplementu (Cavalcante a kol., 2003). V průběhu sání *Tr. infestans* jsou sliny inokulované do místa vpichu schopné inhibovat aktivitu sodíkových kanálů v nervech a tudíž působí antinociceptivně, což plošticí umožňuje získat větší množství krve v průběhu jednoho sání (Dan a kol., 1999). Sliny ploštice *Rh. prolixus* mají schopnost inhibovat bradykinin, který se uplatňuje zejména při zánětech, edémech a bolesti. Tím, že bradykinin sliny *Rh. prolixus* inhibují, potlačí vazodilataci a zabrání stimulaci nociceptorů (Andrade a kol., 2005). Dalším účinek slin *Rh. prolixus* je potlačit, jak spontánní tak mitogenem indukovanou proliferaci lymfocytů u myši (Kalvachová a kol., 1999).

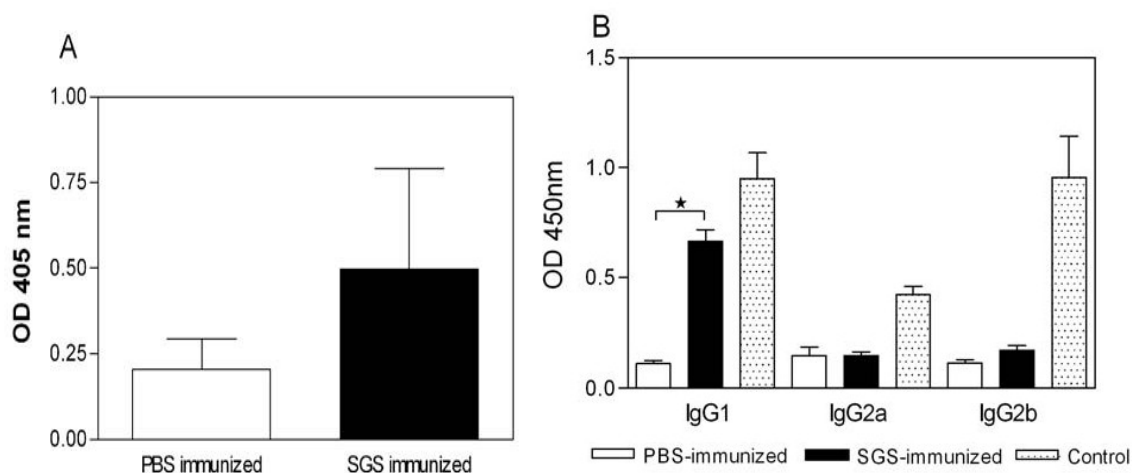
## 2.3. Protilátková odpověď

Po opakovaném sání krevsajících členovců (např. flebotomů, komárů, klíšťat a ploštic čeledi *Reduviidae*) se u hostitelů vytváří specifické protilátky proti složkám slin. Hladiny těchto protilátek se využívají jako marker expozice (Schwartz a kol., 1991; Sanders a kol., 1998 A; Barral a kol., 2000; Inokuma a kol., 2000; Gomes a kol., 2002; Rohoušová a kol., 2005 A; Hostomská a kol., 2008; Schwarz a kol., 2009 A; Drame a kol., 2010; Londono-Renteria a kol., 2010; Doucoure a kol., 2012). Podle hladin protilátek můžeme předpovědět pravděpodobnost přenosu případného onemocnění. K testování na hladiny protilátek dochází také při ověřování úspěšnosti profylaktických opatření, jako jsou například repelenty, insekticidy, acaricidy a sítě proti hmyzu (David a kol., 2001; Mencke a kol., 2003; Otranto a kol., 2007; Schwarz a kol., 2011).

### 2.3.1. Protilátková odpověď proti slinám Phlebotominae

Opakované vystavení sání flebotomů rodu *Lutzomyia* a *Phlebotomus* v hostiteli vyvolává tvorbu specifických protilátek (Barral a kol., 2000; Valenzuela a kol., 2001; Volf a Rohoušová, 2001; Rohoušová a kol., 2005 A; Silva a kol., 2005; Thiakaki a kol., 2005; Oliveira a kol., 2006; de Moura a kol., 2007; Gomes a kol., 2007; Vinhas a kol., 2007; Hostomská a kol., 2008; Clements a kol., 2010; Marzouki a kol., 2011; Vlková a kol., 2011; Vlková a kol., 2012). Při testování vzorků sér jihoamerických psovitých šelem Maikong (*Cerdocyon thous*) z endemické oblasti výskytu viscerální leishmaniózy, byly detekovány výrazně vyšší hladiny IgG protilátek proti slinám *Lu. longipalpis* než u šelem z neendemických oblastí v Jižní Americe (Gomes a kol., 2007). Opakovaně pobodání psi vytvářeli vysoké hladiny specifických IgG protilátek proti slinám flebotoma *Lu. longipalpis*, jehož sání byli opakovaně vystaveni (Hostomská a kol., 2008). Při testování lidských sér ze stejných endemických a neendemických oblastí výskytu viscerální leishmaniózy se potvrdily podobné výsledky, což se týče hladin IgG protilátek proti slinám *Lu. longipalpis* (Gomes a kol., 2007). První pokusy s dobrovolníky, kteří byli vystaveni sání flebotoma *Lu. longipalpis*, detekovaly anti-*Lu. longipalpis* IgG protilátky, zejména protilátky podtřídy IgG1 a IgG4. Tyto protilátky byly detekovatelné ještě 60 dní po první expozici samicím *Lu. longipalpis* (Vinhas a kol., 2007). Druhé expozici sání *Lu. longipalpis* byli dobrovolníci vystaveni až rok po první expozici a potom naměřené hladiny IgG1 a IgG4 protilátek dosahovaly vyšších hladin než po první expozici (Vinhas a kol., 2007).

Opakovaná expozice slinám *Lu. longipalpis* vyvolala u myší kmene BALB/c tvorbu IgG protilátek, jejichž největší část byla zastoupena podtřídou protilátek IgG1 (Silva a kol., 2005). U myší opakovaně imunizovaných slinami *Lu. intermedia* byly detekovány vyšší hladiny IgG protilátek než u myší imunizovaných fosfátovým pufrém (PBS)(Obr. 3A). Při bližší charakteristice IgG protilátkové odpovědi na sliny *Lu. intermedia* bylo zjištěno, že podtřída IgG1 protilátek byla výrazně vyšší u imunizovaných myší než u myší neimunizovaných, nebyl zjištěn žádný rozdíl mezi imunizovanými a neimunizovanými jedinci u podtříd protilátek IgG2a a IgG2b (Obr. 3B)(de Moura a kol., 2007).

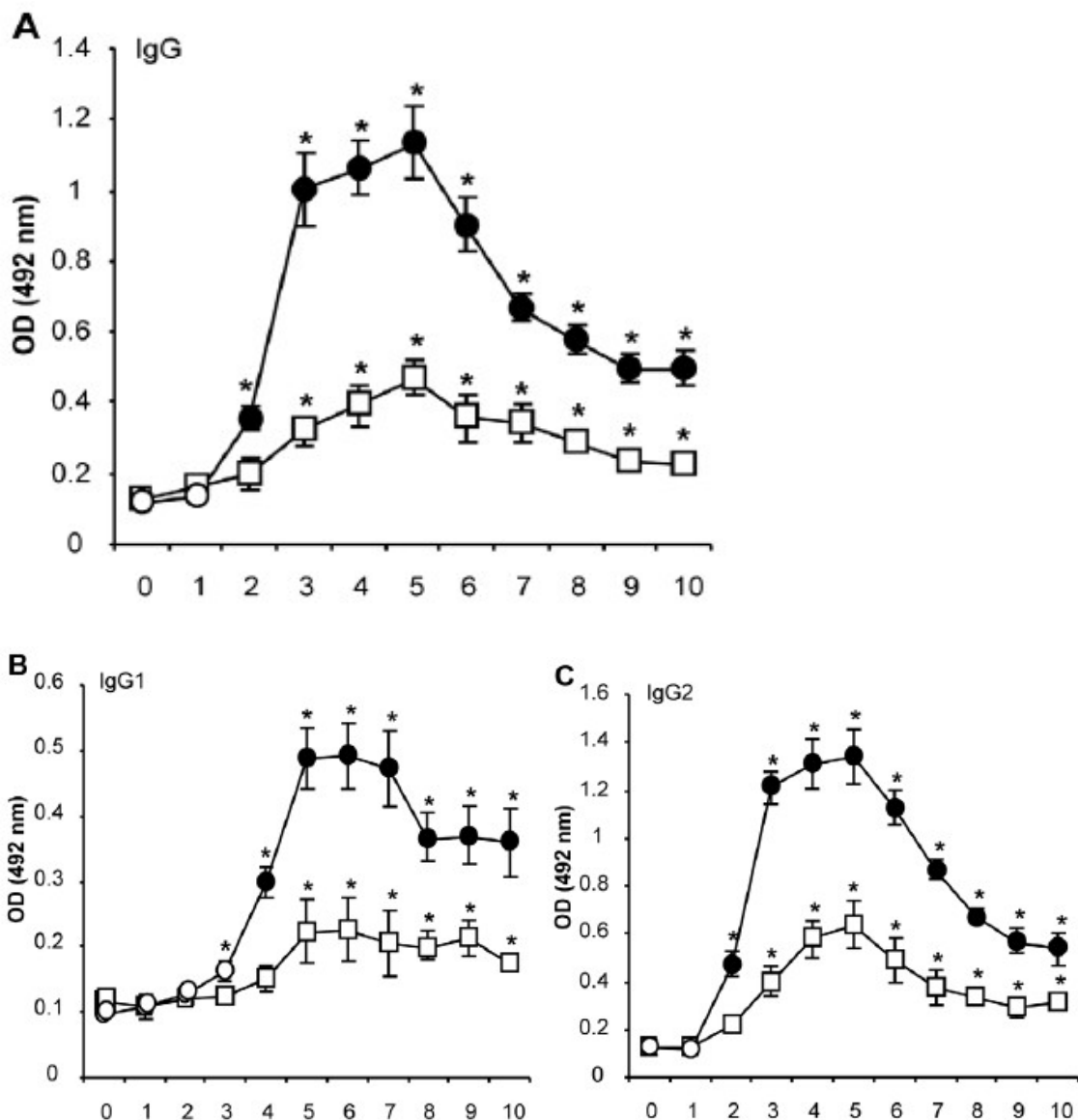


Obr. 3: (A) Hladiny protilátek IgG proti slinám *Lu. intermedia* u myší imunizovaných slinými žlázami *Lu. intermedia* (SGS – salivary gland sonicate) a myší kontrolních „imunizovaných“ fosfátový pufrém (PBS) (B) podtřidy protilátek IgG u myší imunizovaných slinými žlázami *Lu. intermedia* (SGS – salivary gland sonicate) a myší kontrolních „imunizovaných“ fosfátový pufrém (PBS), (převzato a upraveno z de Moura a kol., 2007).

Jak je popsáno v kapitole 2.1.1. Sliny Phlebotominae, je důležitou molekulou obsaženou ve slinách *Lu. longipalpis* peptid maxadilan (Ribeiro a kol., 1989 A; Lerner a kol., 1991). Po opakované expozici slinám *Lu. longipalpis* se vytvářejí IgG protilátky přímo proti maxadilanu (Milleron a kol., 2004). Bylo zjištěno, že protilátky proti maxadilanu mohou negativně ovlivnit kondici a snížit snůšku vaje samice flebotoma, která tyto protilátky nasaje spolu s krví hostitele (Milleron a kol., 2004).

Při testování lidských sér na protilátky proti slinám *Ph. papatasi* bylo zjištěno různé procentuální zastoupení podtříd IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4. Nejčastěji byla detekována podtřída protilátek IgG4, která se vyskytovala u lidí v 76%, dále pak následovaly podtřidy

IgG2 s 50% zastoupením, IgG1 a IgG3, obojí s 39% zastoupením u lidí (Marzouki a kol., 2011). U 44,6% lidí byli detekovány IgE protilátky proti slinám *Ph. papatasi*, ovšem hladiny těchto protilátek nebyly tak výrazné jako v případě IgG protilátek proti slinám *Ph. papatasi* (Marzouki a kol., 2011). U experimentálně pobodaných psů byly detekovány protilátky třídy IgG a podtřídy IgG1 a IgG2. Dynamiku vývoje těchto protilátek uvádí obr. 4 (Vlková a kol., 2011). U psů vystavených nekontrolovanému sání *Ph. perniciosus* v přírodě byly také detekovány IgG, IgG1 a IgG2 protilátky ovšem s rozličnými hladinami v průběhu kalendářního roku, odrážející sezónnost výskytu flebotomů (Vlková a kol., 2011).



Obr. 4: Dynamika anti-*Ph. perniciosus* (A) IgG, (B) IgG1, (C) IgG2 protilátek u psů experimentálně pokoušených (□) nízkým a (●) vysokým počtem samic *Ph. perniciosus*. Sání probíhalo v 1 – 5 týdnu. (převzato a upraveno z Vlková a kol., 2011)



Byla také testována doba, po kterou jsou protilátky IgG proti slinám flebotomů detekovatelné a bylo zjištěno, že anti-*Ph. argentipes* IgG protilátky mají poločas rozpadu zhruba 166 dní (Clements a kol., 2010). U myši kmene BALB/c a byly anti-*Ph. papatasi* protilátky detekovatelné i 21. týden od poslední imunizace *Ph. papatasi* (Vlková a kol., 2012). Průměrná hladina IgG protilátek proti slinám koreluje s průměrným výskytem samic *Ph. argentipes* (Clements a kol., 2010). Hladiny protilátek IgG proti slinám *Lu. longipalpis* přímo odrážejí intenzitu expozice sání (Hostomská a kol., 2008). Pozitivní korelaci mezi hladinou naměřených IgG protilátek s mírou pobodání *Ph. papatasi* se potvrdila u myši kmene BALB/c (Vlková a kol., 2012).

Protilátky IgG z přirozeně imunizovaných jedinců flebotomem *Lu. longipalpis* rozpoznávaly ve slinách *Lu. longipalpis* mnoho antigenů, nejsilněji rozpoznávaly protein o molekulové velikosti 45 kDa, dále pak proteiny o molekulových velikostech 16 kDa, 17 kDa, 35 kDa, 43 kDa a 44 kDa (Gomes a kol., 2002). Séra psů opakovaně vystavených sání *Lu. longipalpis* detekovala 6 proteinů o přibližné molekulové velikosti 25 kDa, 34 kDa, 37 – 39 kDa, 45 kDa, 55 kDa a 66kDa (Hostomská a kol., 2008). Protilátky ze sér dobrovolníků imunizovaných *Lu. longipalpis*, které byly získány šedesát dní po expozici, rozpoznávaly s nejvyšší intenzitou protein o molekulové velikosti 45 kDa, dále pak následovaly proteiny o molekulových velikostech 17 kDa, 35 kDa, 43 kDa a 44 kDa (Vinhas a kol., 2007). U psů přirozeně infikovaných *Le. chagasi* se protilátky proti slinám přenašeče (*Lu. longipalpis*) vázaly na proteiny o molekulové velikosti 28,6 kDa a 47,3 kDa (Bahia a kol., 2007). Protein o molekulové hmotnosti 28,6 kDa byl identifikován jako LuLo-D7 (identifikační číslo pro databázi GenBank AF420274) patřící do skupiny D7 proteinů, široce rozšířených u krevsajícího dvoukřídlého hmyzu (Valenzuela a kol., 2002). Druhý protein o molekulové hmotnosti 47,3 kDa byl charakterizován jako Lulo-Yellow (identifikační číslo pro databázi GenBank AF1322518). Tento protein je podobný Yellow proteinu u drosofilu (Albert a kol., 1999, podle Bahia a kol., 2007). Specifické protilátky IgG, vytvořené po opakovaném sání u myši kmene BALB/c rozpoznávaly ve slinách *Lu. longipalpis* hlavně proteiny o molekulových velikostech 16 kDa, 44 kDa a 45 kDa (Silva a kol., 2005). Protilátky psových šelem Maikong z endemických oblastí Jižní Ameriky rozpoznávaly ve slinách *Lu. longipalpis* proteiny o molekulové velikosti 15 kDa, 32 kDa, 44 kDa a 45 kDa (Gomes a kol., 2007). Protilátky třídy IgG proti slinám *Ph. papatasi* u lidí rozpoznávaly ve slinách *Ph. papatasi* celkem 7 proteinů o molekulových velikostech 12 kDa, 15 kDa, 21 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 36 kDa a 44 kDa (Marzouki a kol.,

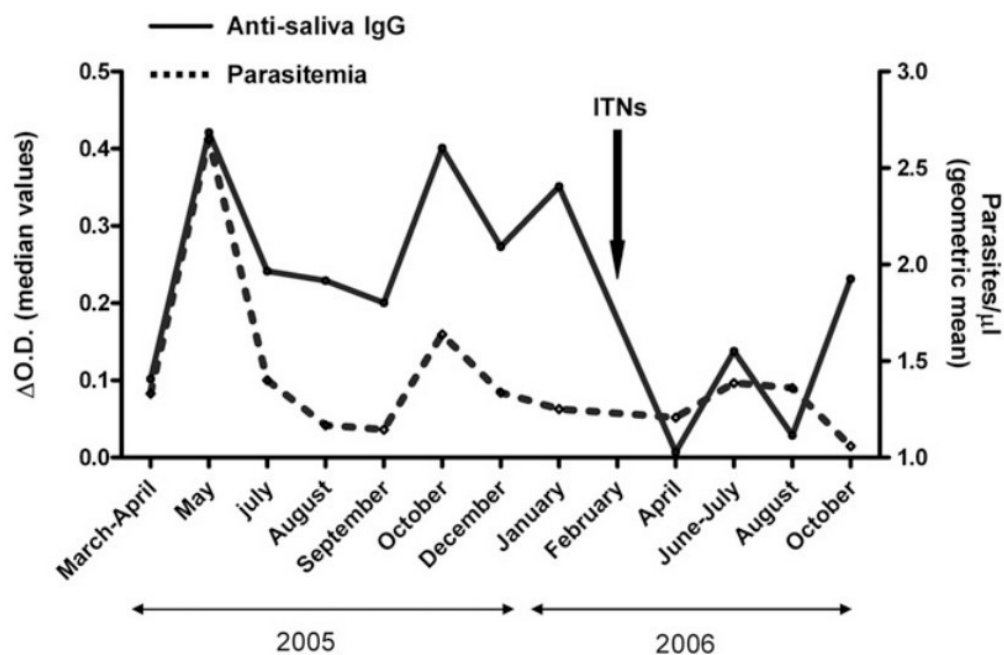
2011). Protilátky experimentálně pobodaných psů rozpoznávaly ve slinách *Ph. perniciosus* 12 proteinů v rozmezí molekulových velikostí 14 – 75 kDa (Vlková a kol., 2011). Rekombinantně připravené proteiny vyvolávají specifickou protilátkovou odpověď a zdají se být spolehlivým ukazatelem expozice a spolu s daty a procentuálním zastoupením infikovaných flebotomů mohou sloužit epidemiologům při odhadu přenosu leishamniové infekce. Nejvíce proteinů bylo doposud připraveno a testováno ze slin *Lu. longipalpis*. U psů imunizovaných slinami *Lu. longipalpis* vyvolala inokulace rekombinantně připravených proteinů ze slin *Lu. longipalpis* LJM143 (identifikační číslo pro databázi GenBank AY445936) a LJM17 (identifikační číslo pro databázi GenBank AF132518) tvorbu silné protilátkové odpovědi (Collin a kol., 2009). Protein LJM17 patří do skupiny tzv. Yellow-related proteinů, protein LJM143 zatím není zařazen do určité velké skupiny proteinů, sekvence podobná tomuto proteinu nebyla nalezena u žádného jiného krevsajího členovce (Valenzuela a kol., 2004). Rekombinantní proteiny připravené ze slin *Lu. longipalpis* LJM11 (identifikační číslo pro databázi GenBank AY445935) a LJM17 (identifikační číslo pro databázi GenBank AF132518), jsou velmi silně rozpoznávány protilátkami přirozeně poštipaných lidí (Souza a kol., 2010; Teixeira a kol., 2010) a psů (Teixeira a kol., 2010). U lidí bylo navíc prokazána velice nízká možnost zkřížená reakce rozpoznání rekombinantních proteinů LJM11 a LJM17 protilátkami proti slinám *Lu. intermedia* (Souza a kol., 2010). Tyto poznatky nám dávají možnost zastupitelnosti celých slinných žláz z daného flebotoma vhodně vytipovaným rekombinantním proteinem ze slin daného flebotoma.

### 2.3.2. Protilátková odpověď proti slinám Culicidae

Protilátkovou odpověď u hostitelů vyvolávají i sliny komárů *Ae. vexans* (Peng a kol., 1996). Konkrétně u lidí vyvolávají tvorbu IgG a IgE protilátek. Obě třídy protilátek dosahovaly vyšších hladin u osob, u kterých se v místě sání objevila akutní kožní reakce (Peng a kol., 1996). K výrazné produkci IgE a IgG protilátek došlo i u lidí po sání *Cu. quinquefasciatus* a u králíků po sání *Ae. aegypti* (Peng a Simons, 1998). Při zjišťování schopnosti slin komára *An. dirus* vyvolat u lidí protilátkovou odpověď v přírodních podmínkách v Thajsku byly odebrány vzorky séra od pacientů trpících malárií, od zdravých lidí a dále pak od lidí žijící mimo malarickou oblast, avšak z Thajska (Waitayakul a kol., 2006). Byly detekovány specifické IgG a IgM protilátky proti slinám *An. dirus*. Nejvyšších hladin IgG a IgM protilátek proti slinám *An. dirus* dosahovaly séra od lidí akutně trpících malárií, kdežto séra od lidí z nemalarických oblastí neměla téměř

žádné specifické protilátky (Waitayakul a kol., 2006). Anti-*Ae. caspius* IgG protilátky u lidí z ostrova Reunion jsou detekovatelné po dobu 4 měsíců od poslední expozice (Fontaine a kol., 2011). U lidí jsou hlavními složkami IgG protilátkové odpovědi na sání komárů podtřídy IgG1 a IgG4 (Peng a Simons, 2004). Protilátky třídy IgG a IgE, stejně jako zvýšená proliferace lymfocytů, jsou zdá se zapojeny do patogeneze alergické reakce (Peng a Simons, 2004). Silnou tvorbu IgE protilátek u lidí alergických, než u lidí nealergických na komáry, způsobují sliny *Ae. aegypti*, *Ae. vexans* a *Ae. albopictus* (Peng a kol., 1998). U lidí žijících v oblasti Artibonite Valley na Haiti byly detekovány IgG a IgM protilátky proti slinám *An. albimanus*, což je hlavní přenašeč malárie v dané oblasti (Londono-Renteira a kol., 2010). U lidí trpících malárií byly naměřeny vyšší hladiny protilátek než u neinfikovaných lidí. Byla také potvrzena pozitivní korelace mezi anti-*An. albimanus* IgG a IgM protilátkami (Londono-Renteira a kol., 2010).

Při ověřování účinnosti insekticidy ošetřených sítí v Angole, v oblastech endemického výskytu malárie, se testovaly hladiny anti-*An. gambiae* IgG protilátek a míra parazitémie před a po použití sítí (Obr. 5)(Drame a kol., 2010). Po aplikaci sítí došlo k výraznému a celkem rychlému poklesu hladin anti-*An. gambiae* IgG protilátek, v porovnání oproti stejnému měsíci v minulém roce, kdy insekticidem ošetřené sítě nebyly použity (Drame a kol., 2010). U sér hostitelů vysoce imunizovaných slinami *Ae. albopictus* docházelo k časté pozitivní reaktivitě se slinami *Ae. aegypti* a naopak. Což nasvědčuje tomu, že některé antigeny ve slinách jsou v rámci rodu *Aedes* shodné (Fontaine a kol., 2011; Doucoure a kol., 2012). Hustota výskytu komárů má výrazný vliv na hladiny IgG protilátek proti slinám u komárů druhu *An. gambiae* (Drame a kol., 2010) a druhu *Ae. caspius* (Fontaine a kol., 2011).



Obr. 5: Hladiny anti-*An.gambiae* IgG protilátek a míra parazitémie u lidí před a po použití insekticidy ošetřených sítí (ITNs)(převzato a upraveno z Drame a kol., 2010).

Domácí zvířata nemusí být vnímavá k plasmodiové infekci, ale zdá se, že mohou hrát významnou roli pro epidemiologii malárie u lidí tím, že přitahují komáry rodu *An. gambiae* (Boulanger a kol., 2011). V oblastech okolo senegalských vesnic byla testována séra získaná od domácích zvířat na antigeny ze slin komárů rodu *An. gambiae* a překvapivě bylo zjištěno, že skot, ovce ani kozy nerozpoznávají žádný protein ve slinách *An. gambiae*. Pouze tři ze sedmi získaných sér od koňů silně rozpoznávala 72kDa protein (Boulanger a kol., 2011). Specifické anti-*An. dirus* protilátky ze sér lidí trpících akutní malárií v endemických oblastech Thajska rozpoznávali ve slinách *An. dirus* antigeny o molekulové hmotnosti 24, 28, 30, 30.5, 32, 33, 42, 44, 47, 54, 75 a 120 kDa (Waitayakul kol., 2006). Séra myši opakovaně vystavených sání *Cu. quinquefasciatus* rozpoznávala jen dva antigeny ve slinách *Cu. quinquefasciatus* a sice o molekulové velikosti 35.7 a 28.3 kDa (Nascimento a kol., 2000). Lidské IgE protilátky, které se vytváří po sání *Ae. togoi* rozpoznávaly stejné proteiny ve slinách *Ae. togoi* jako myší protilátky IgG1, které se vyvíjejí také po sání *Ae. togoi*, jedná se proteiny o molekulové velikosti 30.5 kDa, 33 kDa, 37 kDa, 57,5 kDa (Jeon a kol., 2001).

Ve slinách *An. gambiae* byl nalezen malý specifický protein s označením gSG6, který byl vytipován jako spolehlivý marker expozice sání *An. gambiae*. Při testování sér lidí z hyperendemických oblastí výskytu malárie a jejího přenašeče *An. gambiae* v Burkině Faso byly v sérech lidí přímo detekovány anti-gSG6 protilátky (Rizzo a kol., 2011).

### 2.3.3. Protilátková odpověď proti slinám Ixodidae

Hladiny protilátek proti slinám klíšťat označované zkratkou ATSA (Anti-tick saliva antibody) byly testovány u lidí a byly označeny jako vhodný marker expozice sání, což představuje rizikový faktor pro přenos lymfské boreliózy, kterou klíšťata přenášejí (Schwartz a kol., 1991). Při testování sér lidí byly odhaleny protilátky proti rekombinantně připravenému kalretikulinu ze slinných žláz *Ambyloma americanum* (Sanders a kol., 1998B). Kalretikulin který jak je popsáno výše v kapitole 2.1.3 klíšťata ve svých slinách produkují až po třech dnech sání (Jaworski a kol., 1995, podle Ribeiro a Francischetti, 2003). Hladiny protilátek ATSA indikují obecné sání klíšťat na hostiteli, zatímco protilátky proti rekombinantně připravenému kalretikulinu ukazují na to, že klíště na hostitele sálo minimálně 3 dny (Sanders a kol., 1998 B). Při pokusech na modelu pes – klíště byli psi dvakrát vystaveni sání *Rhi. sanguineus*, v průběhu bylo odebráno sérum a z něho zjišťována dynamika antiklíštěcích protilátek. Anti-*Rhi. sanguineus* protilátky u imunizovaných psů byly zvýšené až od šestého dne po druhém sání, toto zvýšení bylo patrné do 18. dne po druhém sání a poté se hladina anti-*Rhi. sanguineus* protilátek začala snižovat a 30. den po druhém sání byly protilátky na stejné hladině jako před druhým sáním *Rhi. sanguineus* (Inokuma a kol., 2000). Zvýšené hladiny protilátek třídy IgG proti slinám *Rhi. sanguineus* byly prokazatelné i v sérech morčat, na kterých klíšťata *Rhi. sanguineus* sála (Szabo a kol., 2003). Bylo prokázáno, že hladina IgG protilátek proti slinám klíšťat u králíků se zvyšuje se zvyšujícím se počtem klíšťat *Am. americanum* a *De. variabilis*, které na králících sají (Sanders a kol., 1998 A).

### 2.3.4. Protilátková odpověď proti slinám Reduviidae

Protilátky proti slinám se vytvářejí i po opakovaném sání ploštic čeledi Reduviidae. Vytvářejí se u různých savčích hostitelů (Volf a kol., 1993; Nascimento a kol., 2001; Barbosa a kol., 2004; Schwarz a kol., 2009 A). Výrazné zvýšení hladin anti-*Tr. infestans* IgG protilátek vyvolalo u myši až druhé a třetí sání. Po sání nymfálních stádií došlo k rychlejšímu vývoji anti-*Tr. infestans* IgG protilátek než po sání dospělců *Tr. infestans*. Nicméně vyšší hladiny anti-*Tr. infestans* IgG protilátek byly detekovány ze sér myši, na kterých sály dospělci (Volf a kol., 1993). IgG protilátky byly detekovány i u osob žijících v místech výskytu *Tr. infestans* (Nascimento a kol., 2001). IgG1 podtřída protilátek byla nalezen ve všech pozitivně odpovídajících sérech, ale podtřída protilátek IgG4 byla detekována jen u osob s Chagasovou chorobou, již jsou *Tr. infestans* přenašečem

(Nascimento a kol., 2001). Také další druh z čeledi *Reduviidae*, *Panstrongylus megistus*, vyvolává tvorbu protilátek a to všechny testované populace. Nejvyšší nárůst hladiny anti-*Pa. megistus* specifických protilátek třídy IgG byl patrný až po 3. sání (Barbosa a kol., 2004). U kuřat i u morčat byla detekována tvorba IgG protilátek proti slinám *Tr. infestans* již druhý den po prvním sání (Schwarz a kol., 2009 A). U zvířat, která byla exponována sání pouhých 5 triatom při jednom sání, byly hladiny naměřených protilátek v průběhu celého pokusu výrazně nižší protilátky než u zvířat exponovaných sání 25 triatom při jednom sání (Schwarz a kol., 2009 A). Byla tedy prokázána pozitivní korelace mezi hladinou naměřených IgG protilátek a počtu ploštic *Tr. infestans*, které na hostiteli sály (Schwarz a kol., 2009 A).

Protilátky z myši opakovaně sátých *Tr. infestans* rozpoznávaly antigeny vyšších molekulových velikostí a sice 80, 100 a 120 kDa (Volf a kol., 1993). Séra králíků imunizovaných *Pa. megistus* rozpoznávaly různé antigeny v závislosti na typu populace, jakou byly imunizovány, ale celkově nejčastěji rozpoznávané antigeny byly v rozmezí molekulové velikosti 17 – 29 kDa a 68 – 97,4 kDa (Barbosa a kol., 2004). Anti-*Tr. infestans* protilátky z hostitelů opakovaně sátých různými počty *Tr. infestans* rozpoznávaly antigeny ve slinách v rozmezí 10 – 79 kDa v sérech kuřat a v rozmezí 14 – 79 kDa v sérech morčat s různou variabilitou v rámci kmenů *Tr. infestans*. Byla testována i specifita rozpoznávání antigenů z jiných kmenů, než kterým byly kuřata a morčata imunizovány. Anti-*Tr. infestans* protilátky všech kuřat rozpoznávaly 14 a 21 kDa protein ve slinách všech testovaných triatom. U morčat byl rozpoznáván pouze jediný protein o molekulové velikosti 79 kDa (Schwarz a kol., 2009 A). Poslední studie ukazují, že ačkoliv je silná variabilita nejen v profilech slinných žláz mezi různými kmeny *Tr. infestans* tak i mezi různými vývojovými stádii *Tr. infestans*, tak specifické protilátky, ze sér všech hostitelů, na kterých opakovaně sáli různé kmeny a různá vývojová stádii *Tr. infestans* rozpoznávají ve slinách *Tr. infestans* antigen o molekulové velikosti 35 kDa (Dorňáková a kol., 2014). Tento protein lze tedy použít jako spolehlivý marker expozice sání *Tr. infestans* v kampaních zaměřených na monitorování a tlumení přenosu Chagasovy choroby (Dorňáková a kol., 2014).

Při testování sér vykazujících vysoké hladiny specifických protilátek proti slinám *Tr. infestans* s antigeny slin komárů, flebotomů a klíšťat nebyla detekována částěčná zkřížená reaktivita. Anti-*Tr. infestans* IgG protilátky nerozpoznávaly žádné antigeny ze slin *Lu. longipalpis*, *Am. americanum*, *De. variabilis*, *Ix. scapularis* u kuřat ani u morčat.

Navíc protilátky u morčat nerozpoznávaly žádné antigeny ze slin *Ph. duboscqi*, *Ae. freeborni* a *Ae. aegypti*. Anti-*Tr. infestans* IgG protilátky z kuřat rozpoznávaly několik antigenů ze slin *Ph. duboscqi*, *Cu. quinquefasciatus*, *Ae. freeborni* a *Ae. aegypti* (Schwarz a kol., 2009 A).

Ze slin *Tr. infestans* byl připraven rekombinantní protein rTiSP14.6 o molekulové velikosti 14,6 kDa vhodný jako marker expozice sání triatom *Tr. infestans*. Anti-*Tr. infestans* IgG protilátky u málo imunizovaných zvířat tento protein rozpoznávaly dostatečně silně a zároveň tento protein není rozpoznáván protilátkami proti slinám komárů a flebotomů. Zároveň byl tento protein rozpoznán i IgG protilátkami ze zvířat, na kterých sály jiné druhy triatom (Schwarz a kol., 2009 B). Tento protein se zdá být spolehlivý pro detekci sání triatom a může velice pomoci při testování eliminace triatom z oblastí, kde se vyskytuje Chagasova choroba, jíž jsou triatomy přenašečem (Schwarz a kol., 2009 B).

Další třídou protilátek, které byly po sání *Tr. infestans* detekovatelné v sérech kuřat je potřída IgM protilátek. Nárůst anti-*Tr. infestans* IgM protilátek u kuřat byl již první den po sání (Schwarz a kol., 2010). Tyto IgM protilátky rozněž rozpoznávaly rekombinantní protein rTiSP14.6 a nerozpoznávaly žádné antigeny ze slin *An. freeborni*, *Ae. aegypti*, *Cu. quinquefasciatus*, *Lu. longipalpis* (Schwarz a kol., 2010). Pro vyšší úspěšnost detekce expozice sání by bylo vhodné použít kombinaci výše zmiňovaných antigenů, které protilátky hostitelů ve slinách *Tr. infestans* rozpoznávají.

### 3. Materiál a metodika

#### 3.1. Chov flebotomů

Péče o kolonii flebotomů byla prováděna třikrát týdně za podmínek popsanych v článku Volf a Volfová (2011). Dospělí flebotomové byli vypouštěni do monofilových sítí, které byly natažené na nerezových konstrukcích o rozměrech 40 x 40 x 40 cm. Natažené sítě byly uchovávány v igelitových pytlích s navlhčenou vatou pro lepší regulaci vlhkosti, která se tak pohybuje v rozmezí 70 – 95 %. Flebotomům byl v síti jako potrava podáván 50% cukerný roztok na smotku vaty, který byl 3× týdně vyměňován. Do sítě s 5 až 7 dní starými samicemi flebotomů byly umístěny myši uspané anestezií. Sání flebotomů probíhalo ve tmě po dobu 1 hod. Nasáté samice byly 5 – 7 dní po nasátí, umístěny do sádkou vylitého, navlhčeného kelímku, uchovávaného v dobře těsnící plastové nádobě s navlhčeným pískem. Zakelímkovaným samicím byl k dispozici smotek vaty namočený v cukerném roztoku. Po vykladení byla těla mrtvých samic z kelímku odstraněna. Larvy byly krmeny mletou směsí fermentovaných králíčích bobků a králíčích pelet. Celý vývoj flebotomů, od vajíček po vylétnutí dospělců, trvá přibližně 5 až 6 týdnů. Klece s dospělci a nádoby s vajíčky a larvami jsou umístěny v místnosti při teplotách 25 – 28 °C a vlhkostí 60 – 70 %. Flebotomé jsou chováni s fotoperiodou nastavenou na 14 hod světla a 10 hod tma.

Použité roztoky:

Anastezie: 0,2% xylazinu (Rometar; Spofa), 0,8% ketaminu (Narketan; Vétoquinol), 150 mM sterilního NaCl

#### 3.2. Pitva slinných žláz flebotomů

Pitva slinných žláz se provádí na lupě s podsvícením a černým pozadím. Pro pitvy slinných žláz byly použity samice flebotomů těchto druhů flebotomů, kteří jsou chováni v laboratorních chovech katedry Parazitologie, PřF UK v Praze: *Phlebotomus papatasi* (původem z Turecka), *Phlebotomus duboscqi* (původem ze Senegalu), *Phlebotomus argentipes* (původem z Indie), *Phlebotomus perniciosus* (původem ze Španělska). Samice byly staré minimálně 4 až 5 dní. Pro znehybnění byly samice uchovávány na ledu. Na podložní sklo do kapky TRIS-NaCl byla přenesena znehybněná samice flebotoma. Pomocí



tzv. pitvátka, vyrobeného z minucie o průměru 0,15 mm zabodnuté do dřevené špejle, byla samice přidržena za abdomen a ostrou pinzetou chycena za hlavou. Pomalým a plynulým tahem byla samici oddělena hlava od zbytku těla. Dvě mléčně zbarvené slinné žlázy, které se objevily za hlavou, byly odříznuty a přeneseny pomocí pitvátka do šroubovací mikrozkuřavky s chlazeným TRIS-NaCl. Žlázy byly pitvány v poměru 1 žláza na 1  $\mu$ l TRIS- NaCl do minimálního objemu 10  $\mu$ l TRIS-NaCl. Vzorčky žláz byly skladovány při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Použité roztoky:

TRIS-NaCl: 20 mM Tris (TRIZMA Base, Sigma T6066); 150 mM NaCl

### 3.3. Pitva slinných žláz komárů

Pitva slinných žláz byla prováděna na lupě s podsvícením a černým pozadím. Pro pitvy slinných žláz byly použity 5 až 7 dní staré samice *Culex quinquefasciatus* (původem z Indie), *Aedes aegypti* (získány z laboratorních chovů PaÚ BC AV ČR). Komáři byli znehybněni na ledu a po celou dobu pitev na ledu uchováváni. Do kapky TRIS-NaCl (složení viz kapitola 3.2.) na podložním skle byl umístěn komár, kterému byly odstraněny všechny páry nohou. Komár byl přidržen pitvátkem na abdomenu a ostrou pinzetou chycen za hlavou. Pomalým tahem byla oddělena hlava od zbytku těla. Tímto pohybem byly z hrudi vytaženy 2 slinné žlázy, každá složená ze 3 lobů. Slinné žlázy byly poté odděleny od slinných vývodů a přeneseny do mikrozkuřavky s chlazeným TRIS-NaCl (složení viz kapitola 3.2.). Žlázy byly pitvány v poměru 1 žláza na 1  $\mu$ l TRIS-NaCl do minimálního objemu 20  $\mu$ l TRIS-NaCl. Žlázy byly uchovávány při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4. Imunizace myši – Dynamika protilátkové odpovědi

Veškerá manipulace se zvířaty v rámci této diplomové práce probíhala pod dozorem osoby vlastnící certifikát pro práci se zvířaty dle §17 zákona č. 246/1992 sb. (Dr. Kolářová, č.: CZU 934/05). Dvanáct myši kmene C57BL/6 bylo dodáno do chovů Přírodovědecké fakulty UK v Praze ve stáří 6 týdnů (AnLab). Myši byly rozděleny na dvě skupiny po 6 myších a byl jim ponechán čas na aklimatizaci v novém prostředí. Ve věku 8 týdnů byly myši uspány (složení anestezie viz kapitola 3.1.), zváženy, vystříháním srsti označeny a z

ocasů jim byla odebrána krev (viz kapitola 3.5.). Ve věku 7 týdnů byly myši poprvé vystaveny sání flebotomů. Expozice flebotomům probíhala v monofilových sítí o rozměrech 20 x 20 x 20 cm, do kterých bylo umístěno 35 samic *Phlebotomus papatasi* ve stáří 5 – 7 dní. Myši byly uspány, umístěny po jedné do sítí s flebotomy a ve tmě ponechány po dobu jedné hodiny. Poté byly myši vyndány ze sítí a nasáté samice flebotomů byly spočítány. Expozice byla opakována jednou týdně po dobu 5 po sobě následujících týdnů. Myšim byla odebírána krev podle následujícího schématu: prvních pět týdnů vždy den před expozicí, v týdnu 6 až 11 každý 7. den a od 12. do 26. týdne vždy jednou za 14 dní. Pokus byl proveden ve dvou nezávislých opakováních. V níže prezentovaných grafech 1 – 5 (viz kapitola 4.1. Dynamika protilátkové odpovědi u myši poštipaných *Phlebotomus papatasi*) jsou souhrnné výsledky měření z obou pokusů.

### **3.5. Odběr krve z ocasu myši**

Odběr krve byl prováděn z ocasní cévy odstrižením špičky ocasu. V průběhu odběru byl ocas myšim jemně masírován. Od každé myši byly nabrány 2 kapiláry krve, každá o objemu 60 $\mu$ l (lékařské kapiláry bez protisrážlivé úpravy typ 75/60, Merci s.r.o., kat. č.: 632263000533). Po odběru byly kapiláry na jedné straně zataveny a centrifugovány po dobu 5 minut při 6000 otáčkách (centrifuga MPV 310, rotor CM 304). Takto získané sérum bylo přeneseno do mikrozkušavek a uchováváno při teplotě – 20 °C.

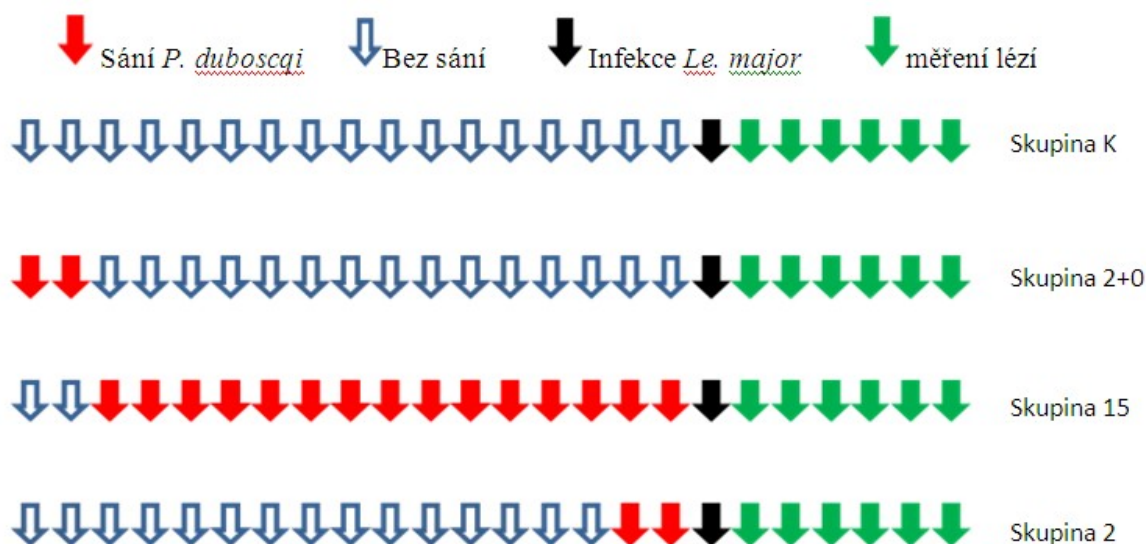
### **3.6. Imunizace myši – Zkřížené reakce**

Pro další náš pokus jsme použili 4 myši kmene C57BL/6 a 4 myši kmene BALB/c, které byly do chovů PřF UK dodány ve věku 6 týdnů (AnLab) a byly jim ponechány 2 týdny na aklimatizaci. Následně byly myši uspány (složení anestezie viz kapitola 3.1.), zváženy, označeny a z ocasu jim byla odebrána krev (viz kapitola 3.5.). Ve věku 9 – 10 týdnů byly myši uspány a každá jednotlivě po dobu 1 hodiny vystavena sání v průměru 30 samicím *Ph. papatasi*. Toto sání se opakovalo každé dva týdny a celkem proběhlo 7 expozic. Poté byly myši hluboce uspány a z podklíčkové tepny jim byla odebrána krev do mikro zkušavek. Po odběru byla krev centrifugována po dobu 5 minut při 6000 otáčkách (centrifuga Eppendorf MiniSpin). Získané sérum bylo uchováváno při teplotě – 20 °C.

### 3.7. Imunizace myši - Vliv délky imunizace na vývoj leishmaniových lézí

Celkem 24 myší kmene BALB/c byly dovezeny do chovů PřF UK ve věku 6 týdnů (AnLab). Po dvou týdnech aklimatizace byly myši rozděleny na 4 skupiny po šesti, označeny a byla jim z ocasu odebrána krev. Ve věku 8 týdnů byly myši uspány (složení anestezie viz kapitola 3.1.) a každá jednotlivě po dobu 1 hodiny vystavena sání samičím *Phlebotomus duboscqi* podle schématu 1. Skupina 2+0 byla vystavena sání *Ph. duboscqi* po dobu dvou po sobě jdoucích týdnů a následných 15 týdnů před infekcí ponechána bez imunizace, skupina 15 byla vystavena imunizaci *Ph. duboscqi* patnáct po sobě jdoucích týdnů těsně před infekcí a skupina 2 byla vystavena imunizaci *Ph. duboscqi* po dobu dvou po sobě jdoucích týdnů těsně před infekcí. Týden po posledním imunizačním sání byla myším znovu odebrána krev z ocasu a myši byly následně infikovány (viz kapitola 3.8.).

Schéma 1: Rozpis imunizací pro pokus; jednotlivé týdny pokusu jsou znázorněny šipkou, barevnost šipek je uvedena v legendě a odpovídá fázi pokusu



### 3.8. Infekce myši – Vliv délky imunizace na vývoj leishmaniových lézí

Pro infekční pokusy byl použit kmen *Leishmania major* LV561 (MHOM/IL/67/LRC-L137 Jericho II). Po vymražení z kryobanky byla kultura leishmanií přeočkována do RPMI média a kultivována při teplotě 23 °C v plochých kultivačních lahvích o objemu 50 ml. Po týdnu byly leishmanie sterilně přeočkovány do 10 ml nového kultivačního média, po dalším přeočkování (pasáž 2) byly leishmanie použity pro infekce myši BALB/c. Leishmanie byly dvakrát promyty semisterilním fyziologickým roztokem na centrifuze JUAN BR4i po dobu 8 min při 4000 otáčkách (rotor HiM S20) a 23 °C. Po posledním promytí byl sediment resuspendován v 1 ml semisterilního fyziologického roztoku, spočtena koncentrace leishmanií v Burkerově komůrce. Myši byly infikovány intradermálně do pravého ucha dávkou  $10^4$  promastigotů *Leishmania major* v kombinaci s homogenátem slinných žláz *Ph. duboscqi* odpovídající 0,5 žláze. Objem infekční dávky byl 5  $\mu$ l.

V průběhu pokusu byla myším pravidelně měřena velikost kožních leishmaniových lézí (Schéma 1). Léze byly měřeny jednou týdně pomocí digitálního posuvného měřítka a ve dvou na sebe kolmých rozměrech, z těchto rozměrů byla počítána velikost kožních lézí, a sice podle vzorce pro plochu elipsy  $((a+b)^2/4 * \pi)$ . Devátý týden po infekci byly myši hluboce uspány a z podklíčkové tepny jim byla odebrána krev. Krev byla zcentrifugována po dobu 5 min při 6 000 otáčkách (centrifuga Eppendorf MiniSpin). Oddělené sérum bylo přeneseno do čisté mikrozkušavky a uchováváno při – 20 °C.

Použité roztoky:

Kultivační RPMI médium: RPMI 1640 s Hapes (Sigma), 10% fetální bovinní sérum (Gibco), 1% antibiotikum Amikin (Bristol-Myers Squibb), 1% BME vitamíny (Sigma), 0,5% sterilní moč

Fyziologický roztok: 150 mM NaCl

### 3.9. ELISA

Pro stanovení hladin protilátek byla použita metoda ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Na 96 jamkovou destičku (Nunc Covalink NH) byly nanášeny žlázy krevsajících členovců rozředěné do navazovacího roztoku v koncentraci podle tabulky 2. Destička byla inkubována přes noc při teplotě 4 °C. Poté byla destička dvakrát promyta roztokem PBS-Tw. Pro zablokování neobsazených míst na dně destičky bylo použito 6% odtučněné mléko ředěné v PBS-Tw. Blokování probíhalo 45 min při 37 °C. Poté byla destička třikrát promyta roztokem PBS-Tw. Séra byla naředěna v poměru 1:200 do 2% nízkotučného mléka v PBS-Tw a inkubována při teplotě a po dobu uvedenou v tabulce 3. Destička byla čtyřikrát promyta roztokem PBS-Tw. Sekundární protilátka (AbD Serotec) byla naředěna do roztoku PBS-Tw podle rozpisu v tabulce 3 a inkubována při teplotě a po dobu uvedenou v tabulce 3. Po inkubaci byla destička šestkrát promyta roztokem PBS-Tw. Poté bylo do každé jamky nanášeno 100 µl substrátového roztoku a vyvolání probíhalo ve tmě při pokojové teplotě, po dobu 4 – 6 minut. Reakce byla zastavena 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Pro měření výsledné absorbance při vlnové délce 492 nm byl použit spektrofotometr Tecan Infinite M200.

Tabulka 2: Rozpis koncentrací slinných žláz krevsajícího členovce použitých jako antigen pro metodu ELISA

krevsající členovec	počet µl slinné žlázy k potažení 100 jamek
<i>Ph. papatasi</i>	20,4 µl
<i>Ph. duboscqi</i>	2,0 µl
<i>Ph. argentipes</i>	79,0 µl
<i>Ph. perniciosus</i>	14,0 µl
<i>Cu. quinquefasciatus</i>	6,7 µl
<i>Ae. aegypti</i>	6,9 µl
<i>Tr. infestans</i>	1,9 µl
<i>Ix. ricinus</i>	49,0 µl

Tabulka 3: Rozpis podmínek inkubací a ředění séra a sekundární protilátky pro ELISU

Detekovaná protilátka	Inkubace séra	Ředění sekundární protilátky (AbD Serotec)(kat. č.)	Inkubace sekundární protilátky
IgG	2 hodiny, 37°C	1:1000 (STAR 120P)	45 minut, 37°C
IgG1	přes noc, 4°C	1:9000 (STAR 132P)	45 minut, 37°C
IgG2b	přes noc, 4°C	1:200 (STAR 134P)	2 hodiny, 37°C
IgG2c	přes noc, 4°C	1:400 (STAR 134P)	2 hodiny, 37°C
IgG3	přes noc, 4°C	1:200 (STAR 136P)	2 hodiny, 37°C

Použité roztoky:

Navazovací roztok (karbonát-bikarbonát): 20 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 20 mM NaHCO<sub>3</sub>; pH 9,0 – 9,5

Fosfátový pufr (PBS): 150 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 mM KCl; pH 7,2

Promývací roztok (PBS-Tw): PBS, 0,05 % Tween 20; pH 7,2 – 7,5

Substrátový roztok (McIlweín fosfát-citrát): 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O, 0,5 M C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>; pH 5,5

### 3.10. SDS – PAGE Elektroforéza

Proteiny ze slinných žláz byly na gelu rozděleny v elektrickém poli na vertikální elektroforéze

(Mini-Protean III, BioRad). Elektroforéza probíhala za neredukujících podmínek a v přítomnosti SDS pufru. Gely měly tloušťku 0,75 mm. Dělicí gel obsahoval 12 % akrylamidu a startovací 4 %. Slinné žlázy flebotomů byly smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 2 díly slin a 1 díl pufru a 3 minuty povařeny. Poté byl standard a vzorky naneseny na gel a byla spuštěna elektroforéza při limitním napětí 200 V a maximálním proudu. Ta probíhala po dobu 30 – 35 minut.

Použité roztoky:

Vzorkový pufr – neredukující: 60 mM TRIS-HCl (pH 6,8), 25% glycerol, 2% SDS, 0,1% bromophenolová modř

Separční gel (12%): 30 % roztoku A; 25 % roztoku B; 0,06 % TEMED

(N,N,N',N'- tetramethyl-ethylenediamine); 0,6% peroxidisíran amonný  
Startovací gel (4%): 10 % roztoku A; 25 % roztoku C; 0,12 %TEMED  
(N,N,N',N'- tetramethyl-ethylenediamine); 1 % peroxidisíran amonný  
Roztok A: 40 % akrylamid; bis-akrylamid (Biorad)  
Roztok B: 60 % 2 M Tris-HCl (pH 8,8); 3,2 % SDS  
Roztok C: 50 % 1 M Tris-HCl (pH 6,8); 4 % SDS  
SDS pufr (Tris/Glycine/SDS pufr): 25 mM Tris ; 192 mM glycine; 0.1 % SDS; pH 8,3  
(BioRad).

### 3.11. Western Blot

Elektroforeticky rozdělené proteiny byly přebloťovány na nitrocelulózovou membránu na přístroji iBlot™ Invitrogen (materiál iBlot™ Gel Transfer Stack, Nitrocellulose, Mini, kat. č. IB 3010-02, Invitrogen). Membrána byla po přebloťování inkubována v PonceauS po dobu 5 – 6 minut. Přebytečné barvivo bylo odmyto destilovanou vodou (dH<sub>2</sub>O). Následně byla membrána nařezána na proužky a dále použita pro imunoblot (viz kapitola 3.12.).

Použité roztoky:

TRIS-Tween (TRIS-Tw): 20mM Tris-NaCl; 0,05% Tween

Barvicí roztok PonceauS: 0,2% Ponceau S (Sigma), 3% C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>

Odbarvovací roztok pro amidočern: 25% isopropanol, 10% C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>

### 3.12. Imunoblot

Volná místa na membráně byla zablokována v 5% nízkotučném mléce ředěného do TRIS-Tw přes noc při 4 °C. Poté byly proužky promyty v TRIS-Tw. Promývání probíhala vždy třikrát po dobu 5 minut. Membrána byla následně inkubována se séry ředěnými do TRIS-Tw v poměru 1:200 a inkubace probíhala po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě na třepačce. Po navázání protilátek z testovaných sér byla membrána promyta v TRIS-Tw. Sekundární protilátka ředěná do TRIS-Tw (tabulka 4) byla na membráně ponechána po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Poté byla membrána dvakrát promyta v TRIS-Tw a poté jednou v TRIS-NaCl. Barevná reakce probíhala v přítomnosti čerstvě připraveného substrátového roztoku na třepačce za pokojové teploty. Reakce byla zastavena dH<sub>2</sub>O a

proužky byly usušeny, zdokumentovány naskenováním a uchovány.

Použité roztoky:

Substrátový roztok pro imunoblot: 20 ml TRIS-NaCl, 0,01 g diaminobenzidinu, 6 $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
NaCl – 150 mM NaCl

Tabulka 4: Rozpis podmínek inkubací sekundární protilátky pro imunoblot

Detekovaná protilátka	Ředění sekundární protilátky (AbD Serotec)(kat. č.)	Inkubace sekundární protilátky
IgG	1:1000 (STAR 120P)	1 hodina, 23°C
IgG1	1:3000 (STAR 132P)	1 hodina, 23°C
IgG2b	1:1000 (STAR 134P)	1 hodina, 23°C

### 3.13. Stříbření

Gel s rozdělenými proteiny byl fixován ve fixačním roztoku na třepačce přes noc při pokojové teplotě. Pro odmytí fixačního roztoku byl gel ponechán po dobu 2 hodin v dH<sub>2</sub>O na třepačce při pokojové teplotě. Poté bylo na gel nalito 50 ml 0,02 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a po 1 minutě opláchnut v dH<sub>2</sub>O. Dále byl gel inkubován s 50 ml čerstvě připraveného roztoku 0,1 % dusičnanu stříbrného po dobu 10 min, ve tmě na třepačce při pokojové teplotě. Následovalo opláchnutí gelu v dH<sub>2</sub>O a ve vyvíjecím roztoku. Poté byl gel inkubován v 50 ml vyvíjecího roztoku při pokojové teplotě do objevení barevné reakce. Reakce byla zastavena přidáním 2,5 ml 2,3M kyseliny citrónové; inkubace probíhala po dobu 10 minut na třepačce. Gel byl potom přenesen do čírého euroobalu a naskenován.

Použité roztoky:

Fixační roztok pro stříbření: 0,0185% CH<sub>2</sub>O, 40% CH<sub>3</sub>OH

Vyvíjecí roztok pro stříbření: 3 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,08% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0,0185% CH<sub>2</sub>O

### 3.14. Čipová elektroforéza

Ke stanovení množství proteinů a molekulových hmotností jednotlivých složek slinných žláz krevsajících členovců byla použita čipová elektroforéza (Experion<sup>TM</sup> Pro 260



Reagents and Supplies for 10 chips, kat.č. 700-7152; Experion™ Pro 260 10 Chips, kat.č. 700-7151, obojí Bio-Rad). Při měření jsme postupovali dle návodu výrobce. Změny oproti návodu jsou uvedeny níže. Při přípravě roztoků GS (gel s fluorescenční barvičkou) a G (gel) byly tyto roztoky přefiltrovány při 10 000 otáčkách (centrifuga Eppendorf 5415 D) po dobu 10 min místo doporučených 5 min. Příprava vzorkového pufru probíhala beze změny. Jako vzorky byly použity homogenizované slinné žlázy *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus argentipes*, *Phlebotomus duboscqi*, *Phlebotomus perniciosus*, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* (původ vzorků viz kapitoly 3.2., 3.3.). Dále byly použity vzorky slinných žláz *Triatoma infestans* (původem z Chile), *Ixodes ricinus* (původem z České republiky). Při přípravě vzorků jsme smíchali 4 µl homogenátu žlázy a 2 µl neredukujícího vzorkového pufru, poté byly vzorky krátce rozmíchány a centrifugovány po dobu 20 sekund při 10 000 otáčkách (centrifuga Eppendorf 5415 D), následně byly inkubovány na termobločku (Thermomixer komfort, Eppendorf) při teplotě 98°C a 400otáčkách po dobu 4 minut. Po krátkém vychladnutí při pokojové teplotě byly opět krátce centrifugovány při 10 000 otáčkách (centrifuga Eppendorf 5415 D) a poté byly vzorky naředěny v poměru 1:1 dd H<sub>2</sub>O (Bio-Rad). Standard pro čipovou elektroforézu byl připraven podle návodu. Po natažení gelu do kapilár čipu na přístroji Experion Priming Station Bio-Rad byly nanášeny vzorky. Poté byl čip vložen do analyzátoru (Bio-Rad, Experion Automated Electrophoresis Station) a byla spuštěna analýza shodně s návodem. Před a po elektroforéze byly elektrody analyzátoru očištěny v dd H<sub>2</sub>O (Bio-Rad). Získané hodnoty byly analyzovány softwarem Experion™ Software, verze 3.2 (Bio-Rad).

### 3.15. Statistika

Při vyhodnocování dat byl použit program NCSS 6.0. Pro vyhodnocení výsledků z pokusu 'Dynamiky protilátek u myši kmene C57BL/6 po opakovaném sání *Ph. papatasi*' jsme použili GLM ANOVA – Tukey-Kramer Multiple Comparison. A pro porovnání korelací mezi hladinami protilátek a mírou expozice sání *Ph. papatasi* jsme použili neparametrický Spearman rank correlation matrix. Pro vyhodnocení specifických protilátek v pokusu 'Infekce myši – Vliv délky imunizace na vývoj leishmaniových lézí' jsme neparametrický Wilcoxon test.

## 4. Výsledky

### 4.1. Dynamika protilátkové odpovědi u myši poštípaných *Phlebotomus papatasi*

Při imunizačních sáních se v průměru nasálo  $26 \pm 2$  (průměr $\pm$ SD) z 35 samic *Ph. papatasi* na jednu myš (tabulka 5). Hladina specifických protilátek u imunizované skupiny byla významně vyšší ( $p < 0,05$ ) než u skupiny myši neimunizovaných pouze u podtřídy IgG1 (graf 2). U ostatních testovaných podtříd protilátek se kinetika protilátek proti slinám *Ph. papatasi* nelišila mezi skupinami (graf 1, 3, 4, 5), nicméně u IgG byly pozorovány signifikantní rozdíly v jednotlivých týdnech (graf 1).

Signifikantní rozdíl v produkci anti-*Ph. papatasi* IgG (graf 1) byl patrný již po třetím sání, tedy ve 4. týdnu a po všechny následující týdny, vyjma 24. týdne. U protilátek IgG vidíme v grafu 1 prudký nárůst protilátek až do 8. týdne, kdy je hladina protilátek v rámci celého měření nejvyšší ( $0,758 \pm 0,119$ ) s mírným poklesem v 7. týdnu. Následuje postupný pokles s mírným výkyvem, kdy došlo ke zvýšení hladin IgG protilátek v 11. a 12. týdnu. Protilátky byly signifikantně zvýšené až do 26. týdne, kdy byl pokus ukončen.

V případě podtřídy IgG1 (graf 2) byly hladiny protilátek signifikantně zvýšené od 4. týdne a nejvyšší hladina byla naměřena v 6. týdnu ( $0,913 \pm 0,141$ ), tedy týden po poslední imunizaci flebotomy. V 7. týdnu dochází k poklesu a v 8. týdnu k opětovnému mírnému zvýšení, od 8. týdne je patrná stagnace hladiny protilátek až do 12. týdne, kdy začíná pozvolný pokles hladin protilátek. Signifikantní rozdíl množství protilátek mezi imunizovanou a neimunizovanou skupinou myši je patrný až do ukončení pokusu ve 26. týdnu.

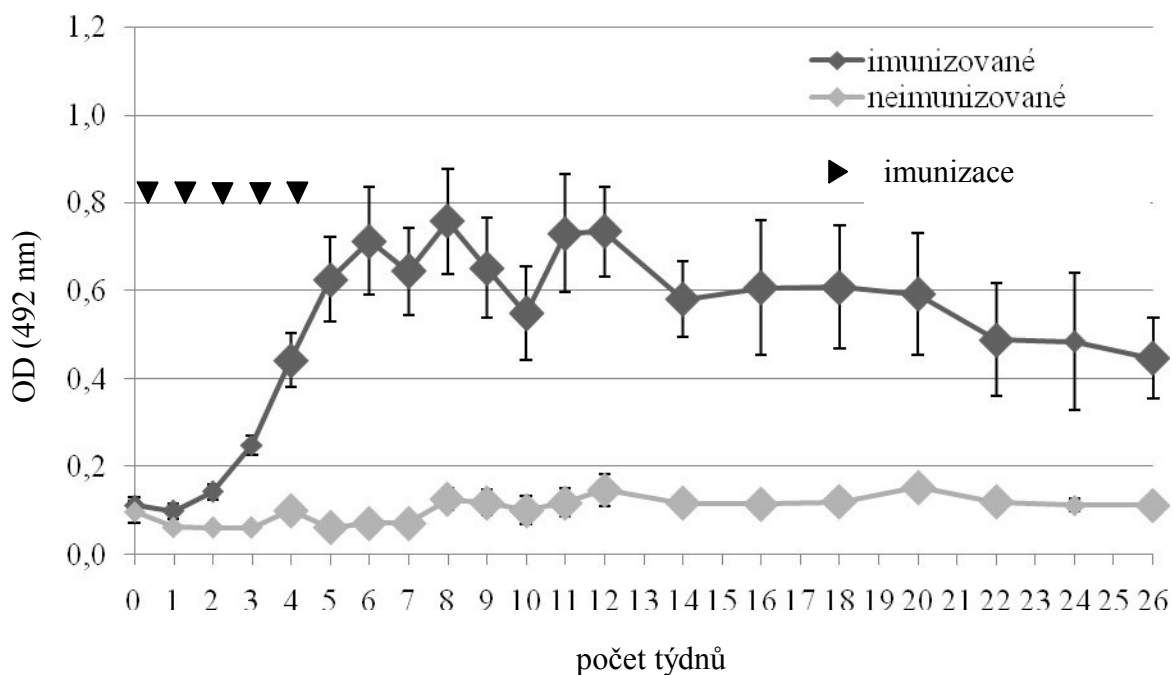
I když není u protilátek třídy IgG a podtřídy IgG1 v 2. a 3. týdnu potvrzen signifikantní rozdíl vůči kontrole již zde byl patrný trend k nárůstu hladin těchto protilátek. Protilátky IgG a IgG1 byly detekovatelné a hladiny naměřených protilátek byly signifikantní po dobu 21. týdnů po ukončení expozice *Ph. papatasi* (grafy 1 a 2).

U protilátek podtříd IgG2b (graf 3) a IgG2c (graf 4) se skupina imunizovaných a neimunizovaných myši nelišila ani v jednom ze sledovaných týdnů a průběh křivky v obou grafech byl velice podobný s pouze nepatrnými výkyvy u obou sledovaných skupin myši. U IgG3 podtřídy protilátek měly imunizované myši signifikantně zvýšené hladiny pouze ve 20. týdnu (graf 5).

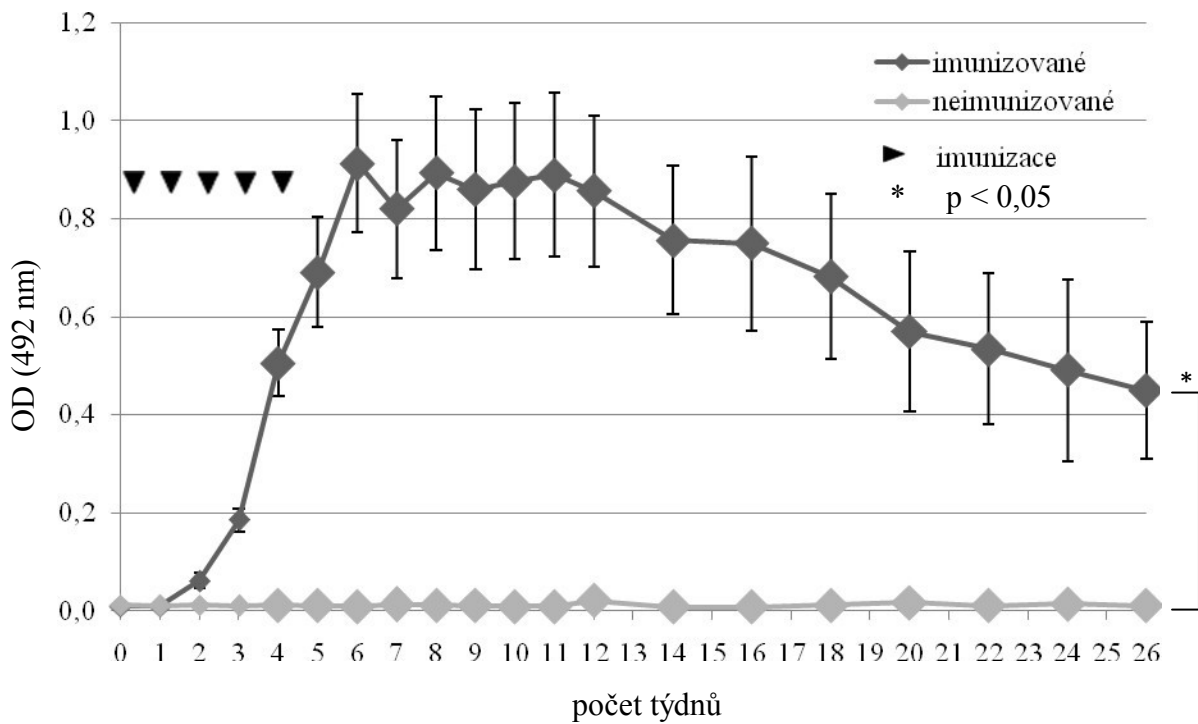
Tabulka 5: Počty nasátých samic *Ph. papatasi* u jednotlivých myší

týden\myš	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	19	16	16	23	34	25	23	34	22	31
2	20	21	20	23	24	23	22	26	24	28
3	22	19	18	21	26	28	31	30	29	30
4	30	31	30	31	30	25	26	29	25	24
5	33	33	33	29	31	27	26	28	31	27
průměr/myš	25	24	23	25	29	26	26	29	26	28
SD	6,3	7,5	7,6	4,3	4,0	1,9	3,5	3,0	3,7	2,7
průměr celkem										26
SD										2,0

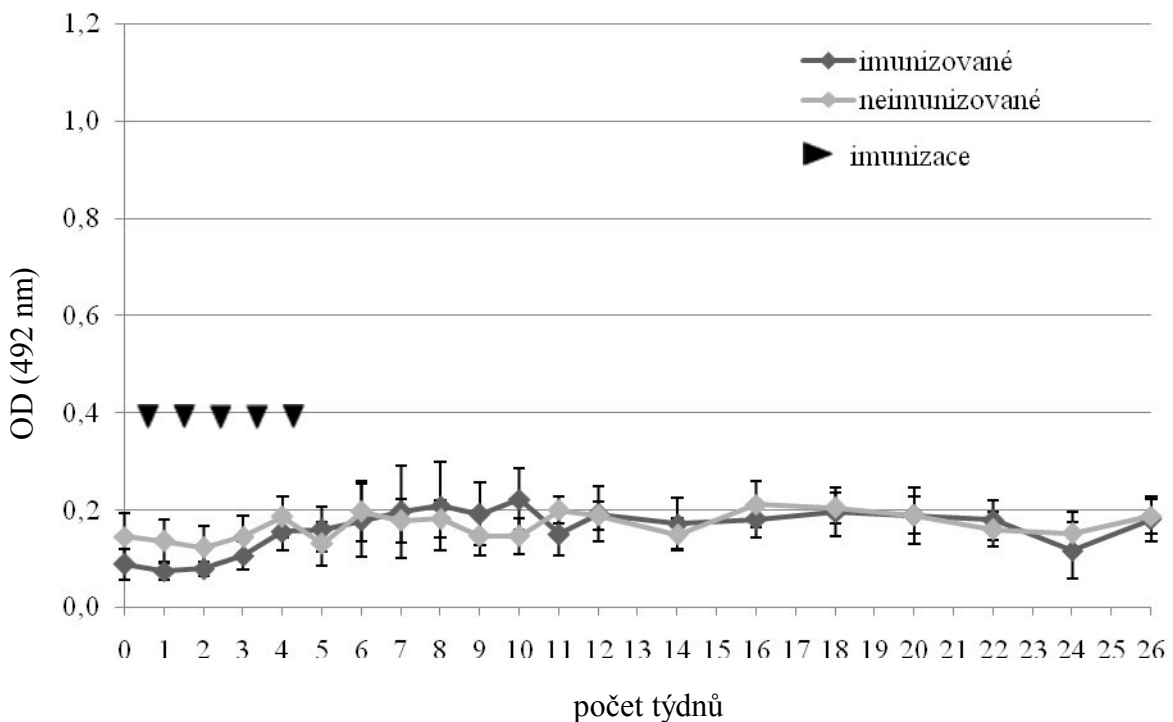
Graf 1: Hladiny protilátek IgG proti slinám *Ph. papatasi*. Signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi skupinami v rámci stejného týdne byl označen větší velikostí bodů v grafu. Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr  $\pm$  směrodatná chyba.



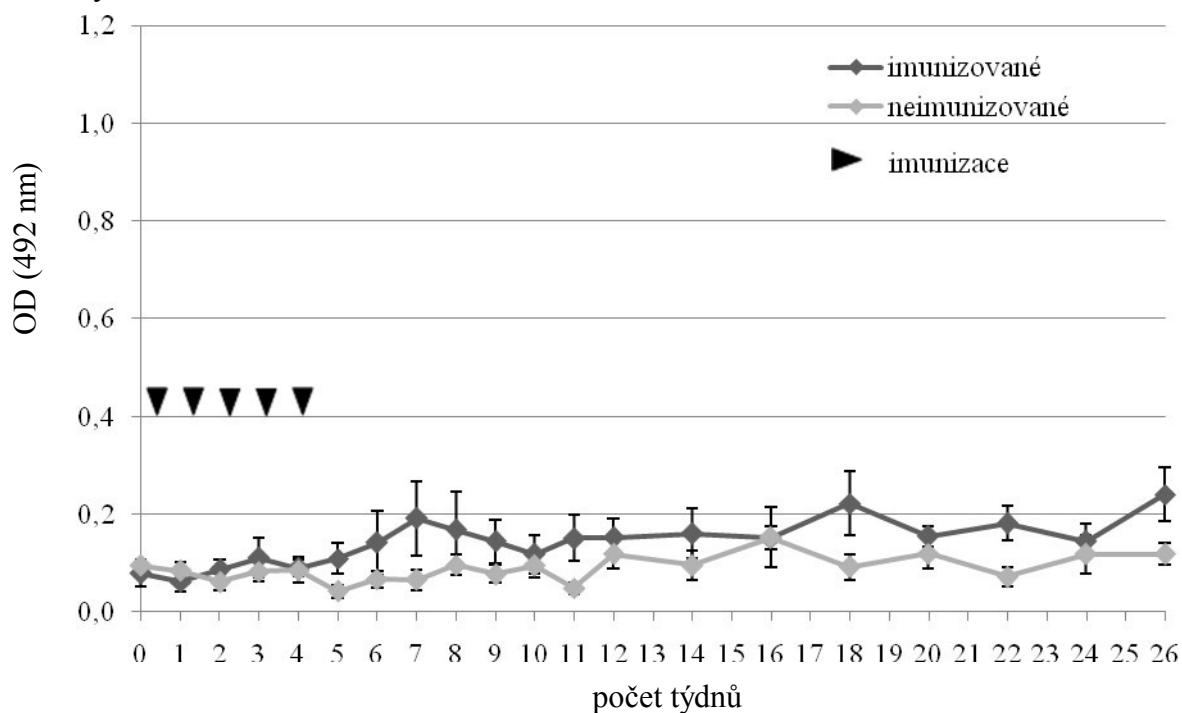
Graf 2: Hladiny protilátek IgG1 proti slinám *Ph. papatasi*. Signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi skupinami v rámci stejného týdne byl označen větší velikostí bodů v grafu. Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr  $\pm$  směrodatná chyba.



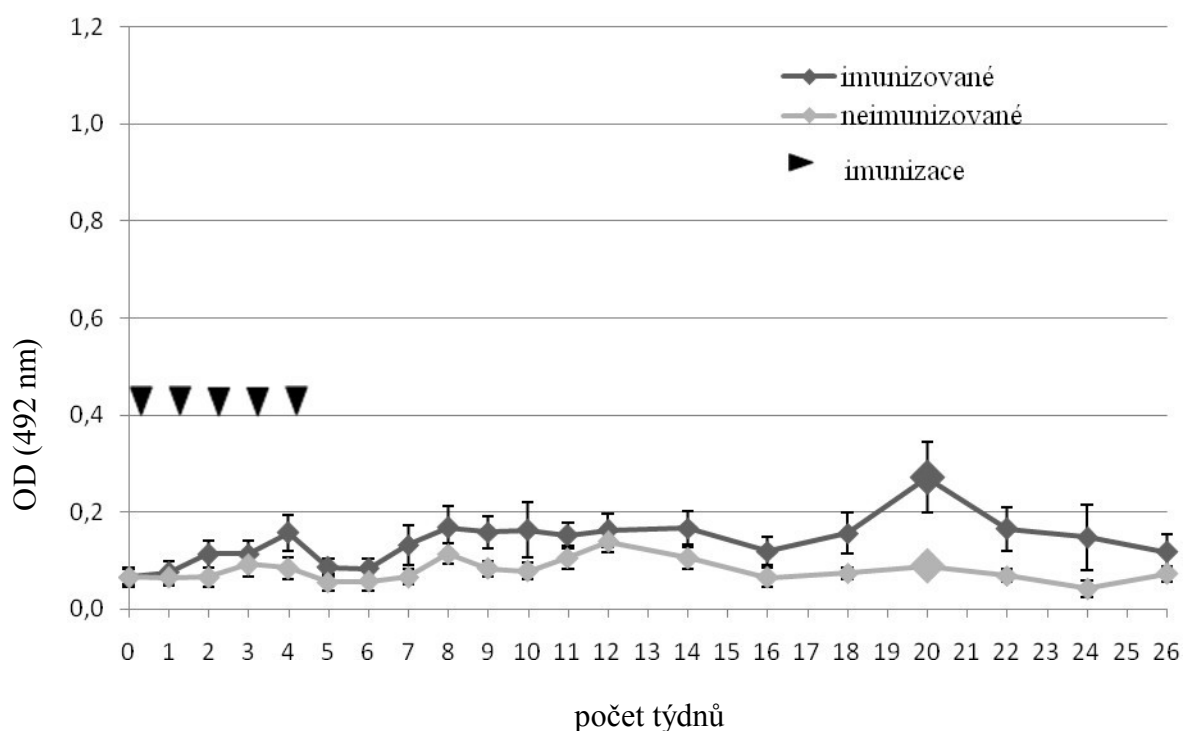
Graf 3: Hladiny protilátek IgG2b proti slinám *Ph. papatasi*. Signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi skupinami v rámci stejného týdne byl označen větší velikostí bodů v grafu. Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr  $\pm$  směrodatná chyba.



Graf 4: Hladiny protilátek IgG2c proti slinám *Ph. papatasi*. Signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi skupinami v rámci stejného týdne byl označen větší velikostí bodů v grafu. Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr  $\pm$  směrodatná chyba.

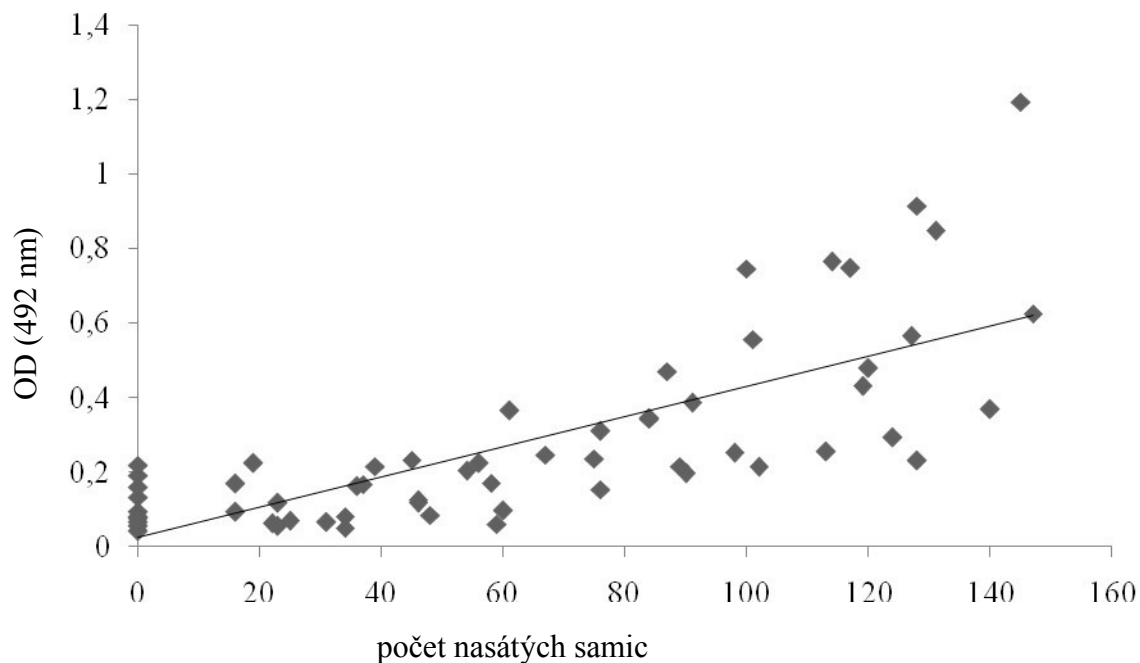


Graf 5: Hladiny protilátek IgG3 proti slinám *Ph. papatasi*. Signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi skupinami v rámci stejného týdne byl označen větší velikostí bodů v grafu. Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr  $\pm$  směrodatná chyba.

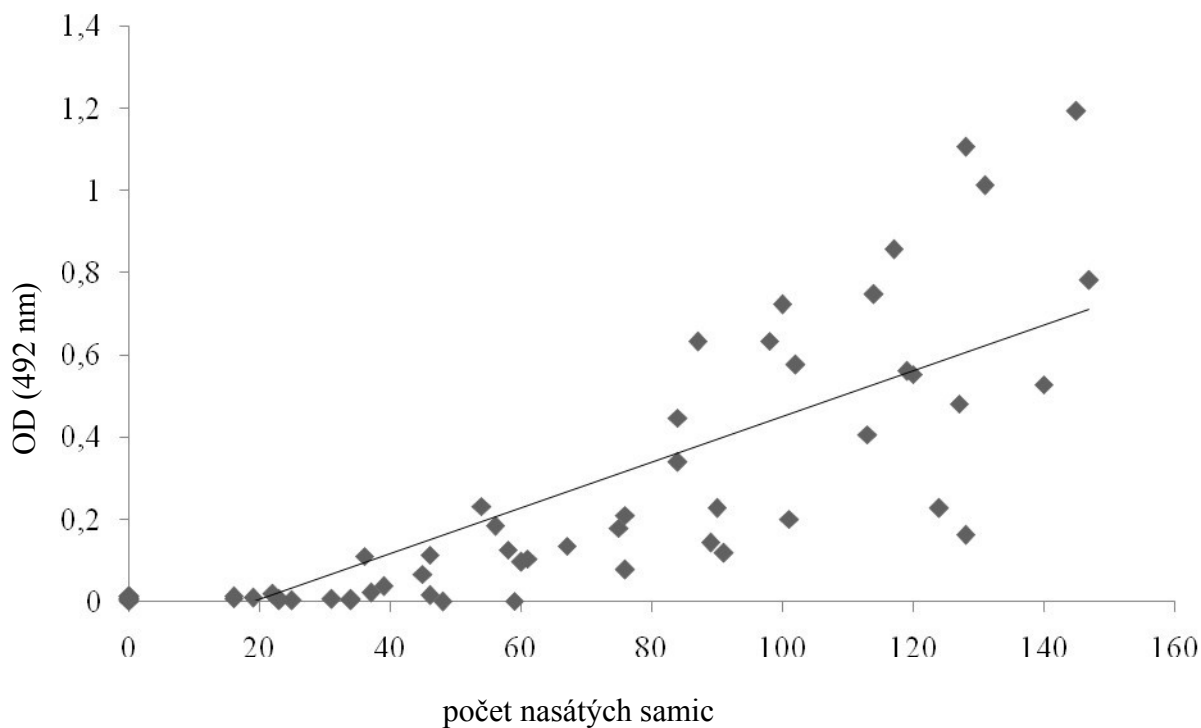


Počet nasátých samic flebotomů pozitivně koreloval s hladinou anti-*Ph. papatasi* IgG ( $r_s = 0,803$ ;  $p < 0,001$ )(graf 6) a hladinou IgG1 ( $r_s = 0,858$ ;  $p < 0,001$ )(graf 7). U podtříd IgG2b, IgG2c a IgG3 protilátek nebyla žádná korelace s intenzitou imunizace zjištěna.

Graf 6: Korelace počtu nasátých *Ph. papatasi* a hladiny protilátek IgG



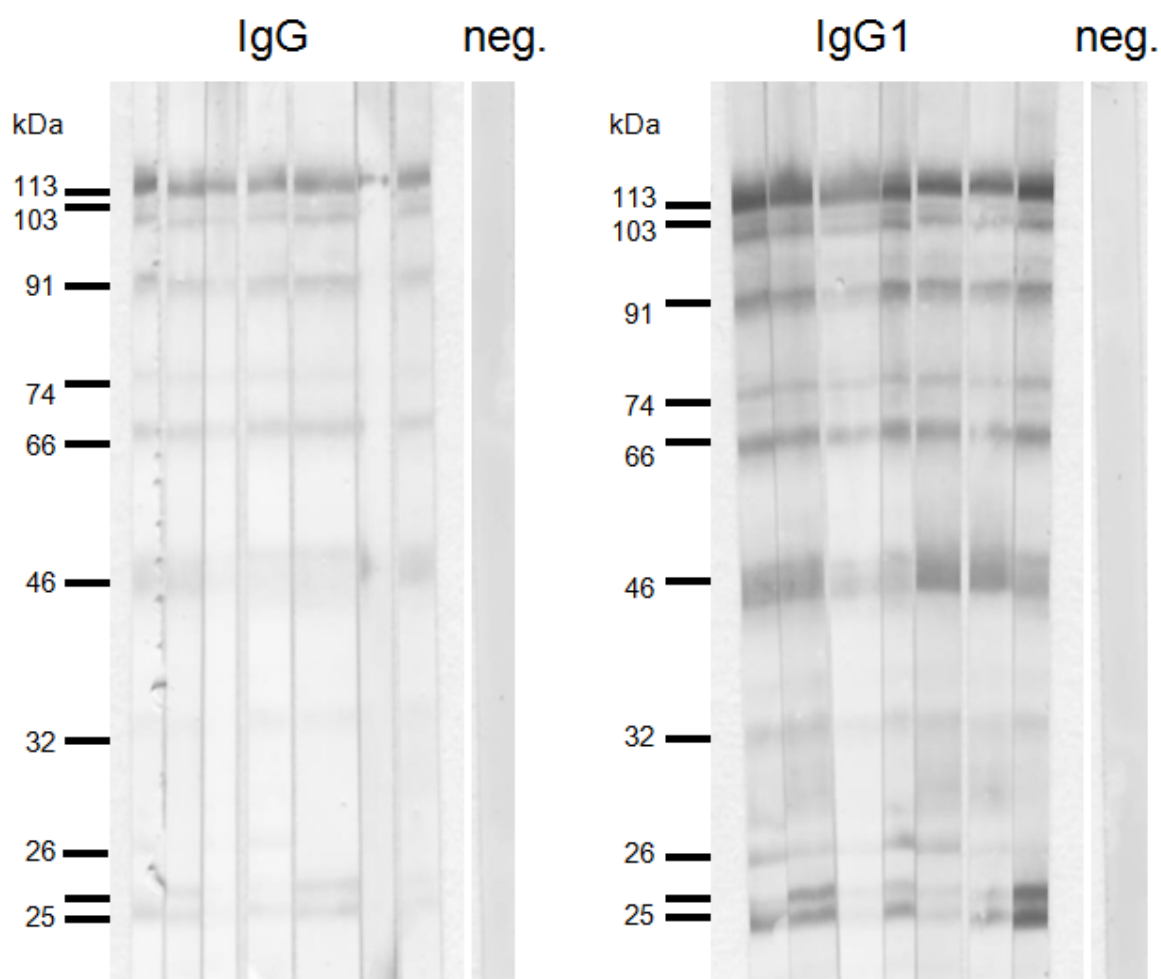
Graf 7: Korelace počtu nasátých *Ph. papatasi* a hladiny protilátek IgG1



#### 4.2. Charakterizace antigenů a proteinů ve slinných žlázách *Phlebotomus papatasi*

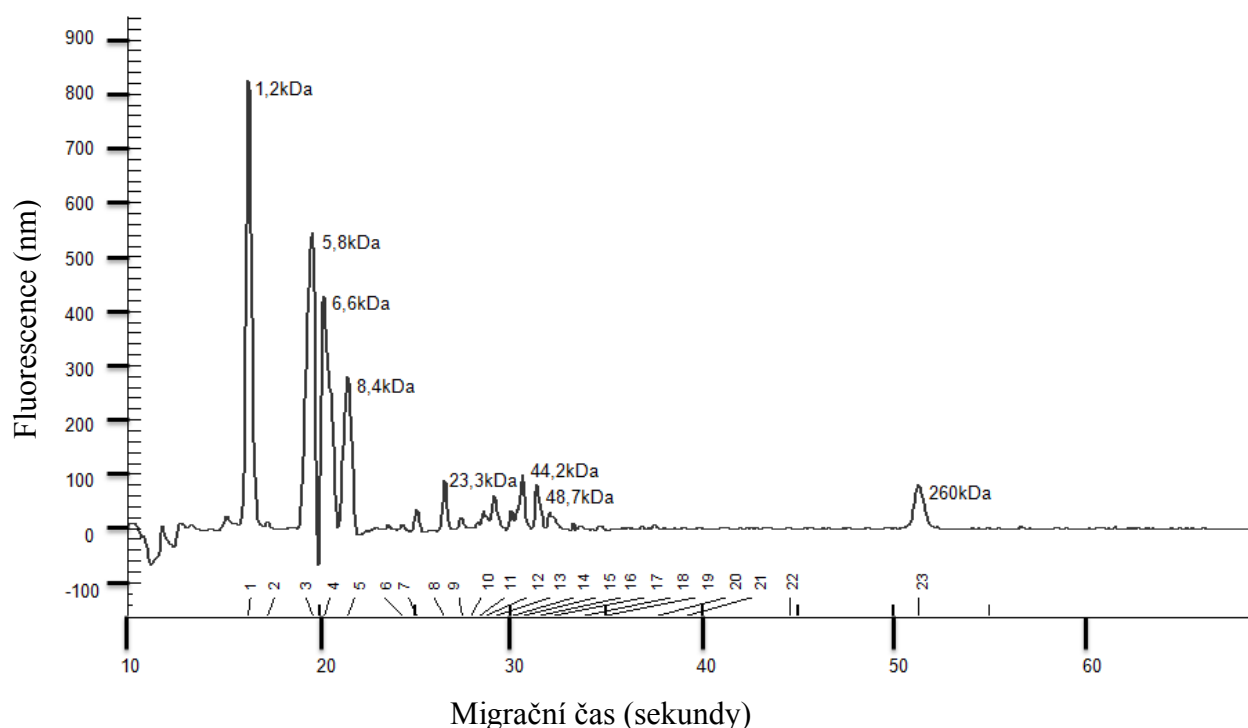
Protilátky IgG a IgG1 z myši kmene C57BL/6, které byly po dobu 5-ti týdnů vystavené sání samicím *Ph. papatasi* rozpoznávaly ve slinách *Ph. papatasi* stejné antigeny v rozmezí 25 – 113 kDa, avšak s různou intenzitou. Molekulové velikosti jednotlivých antigenů jsou znázorněny v obrázku 6.

Obrázek 6: Antigeny ve slinách *Ph. papatasi* rozpoznávané IgG a IgG1 protilátkami ze séra myši imunizovaných *Ph. papatasi*; neg. označuje sérum z neimunizované myši



Proteinový profil slinných žláz *Phlebotomus papatasi* jsme získali na čipové elektroforóze (histogram 1). Celkem bylo ve slinách detekováno 17 proteinů o molekulové velikosti v rozmezí od 15,4 kDa do 171 kDa. Nejvíce zastoupené byly proteiny 44,2 kDa (20,6 %), 48,7 kDa (16 %) a 23,3 kDa (16,6 %)(tabulka 6).

Histogram 1: Proteinový profil slinných žláz *Phlebotomus papatasi* Vrcholy č. 1 a 23 o velikosti 1,2 a 260 kDa jsou dolní a horní hranicí měřitelnosti a vrcholy č. 2 – 5 (2,6; 5,8; 6,6; 8,4 kDa) jsou proteiny standardně přítomné ve vzorkovém pufru



Tabulka 6: Proteiny slinných žláz *Ph. papatasi*

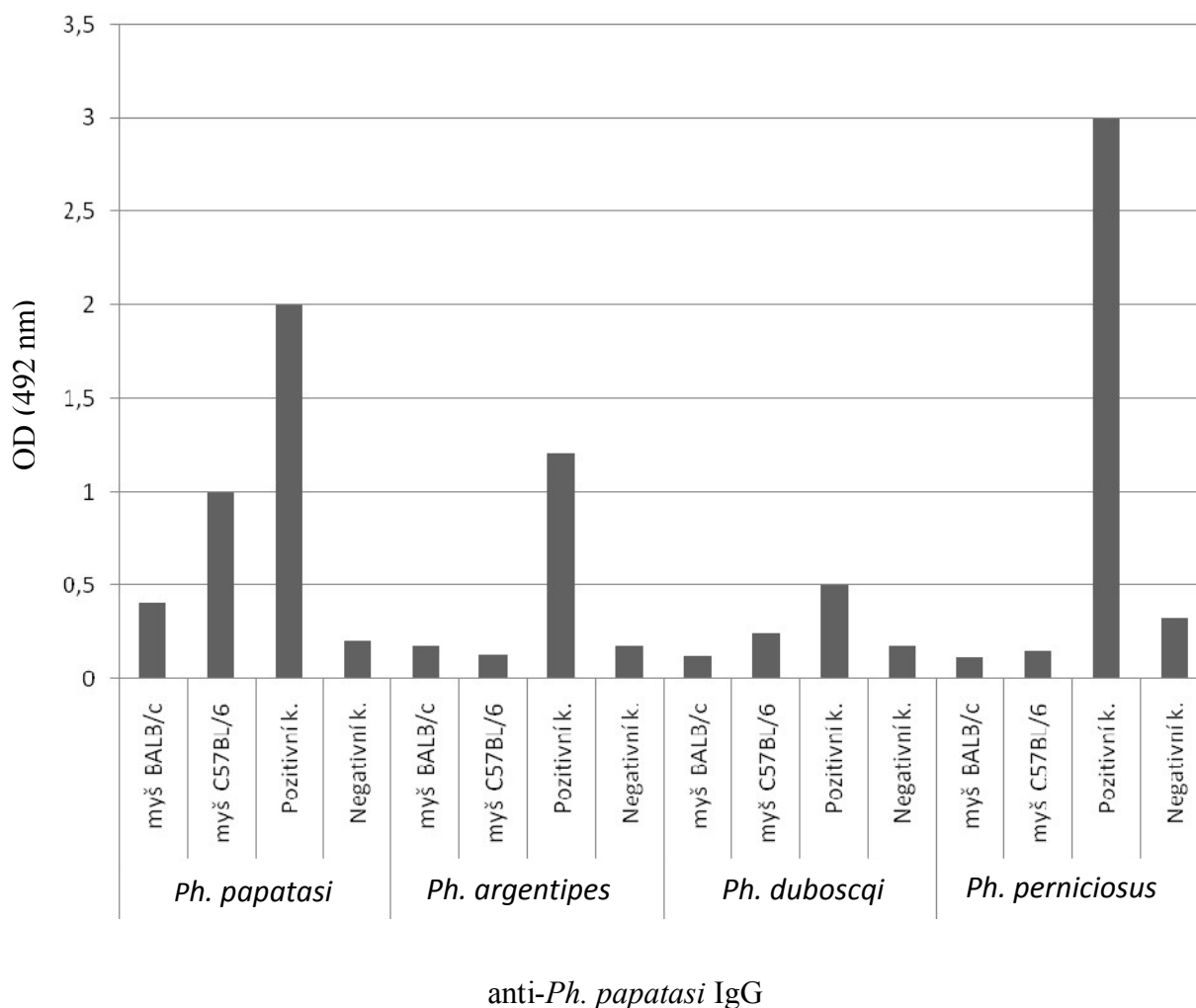
č. píku	migrační čas (sec)	MW (kDa)	% koncentrace	poznámka
* 1	16,30	1,20		dolní značka
2	17,32	2,60		systemový pík
3	19,65	5,81		systemový pík
4	20,24	6,61		systemový pík
5	21,50	8,35		systemový pík
6	24,37	15,39	0,88	
7	25,10	17,74	6,52	
8	26,56	23,29	16,60	
9	27,43	27,41	3,28	
10	27,87	29,60	0,28	
11	28,31	31,78	1,51	
12	28,60	33,24	6,63	
13	29,13	35,92	13,38	
14	30,01	40,80	4,94	
15	30,59	44,17	20,61	
16	31,37	48,67	15,96	
17	32,05	53,12	7,28	
18	33,65	64,27	0,55	
19	34,77	72,03	0,74	
20	37,54	95,92	0,52	
21	39,05	110,61	0,17	
22	44,54	170,99	0,16	
* 23	51,30	260,00		horní značka



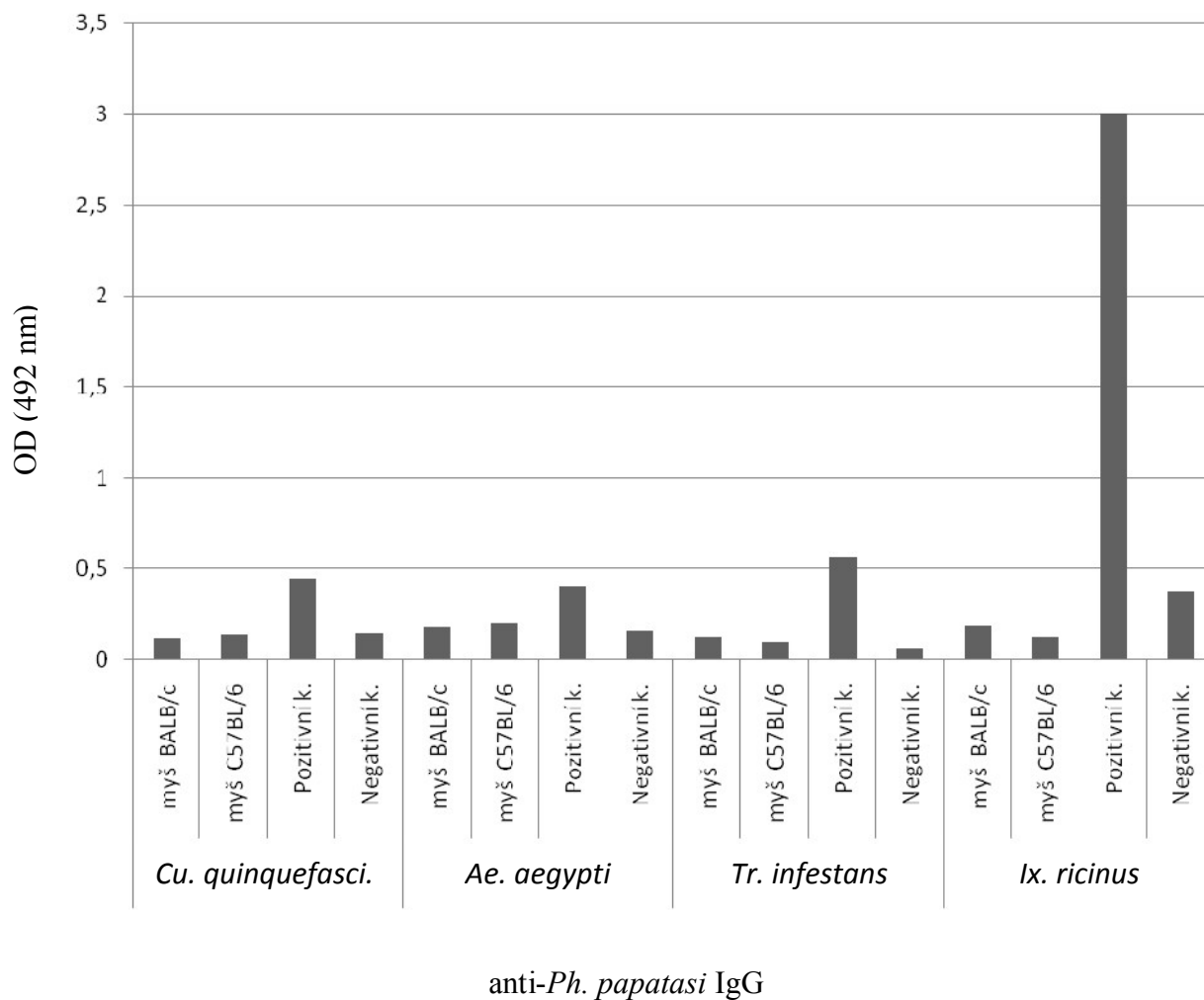
### 4.3. Specifita protilátkové odpovědi proti slinám *Phlebotomus papatasi*

Myši kmene BALB/c a C57BL/6 byly 7 krát vždy s dvoutýdenním odstupem imunizovány průměrně  $28 \pm 2$  *Ph. papatasi* (průměr $\pm$ SD). Séra, která byla získána z myši po ukončení imunizace, byla testována na specifitu anti-*Ph. papatasi* IgG protilátek vůči antigenům z jiných druhů flebotomů (graf 8), z komárů a z dalších krevsajících členovců (graf 9). Anti-*Ph. papatasi* IgG protilátky z imunizovaných myši obou kmenů nejsilněji odpovídali na antigeny slin *Ph. papatasi*. Protilátky se nevázaly na sliny *Ph. argentipes*, *Ph. duboscqi*, *Ph. perniciosus* (graf 8). Anti-*Ph. papatasi* IgG protilátky se nevázaly ani na antigeny ostatních krevsajících členovců (graf 9).

Graf 8: Anti-*Ph. papatasi* IgG testované se slinami různých druhů flebotomů



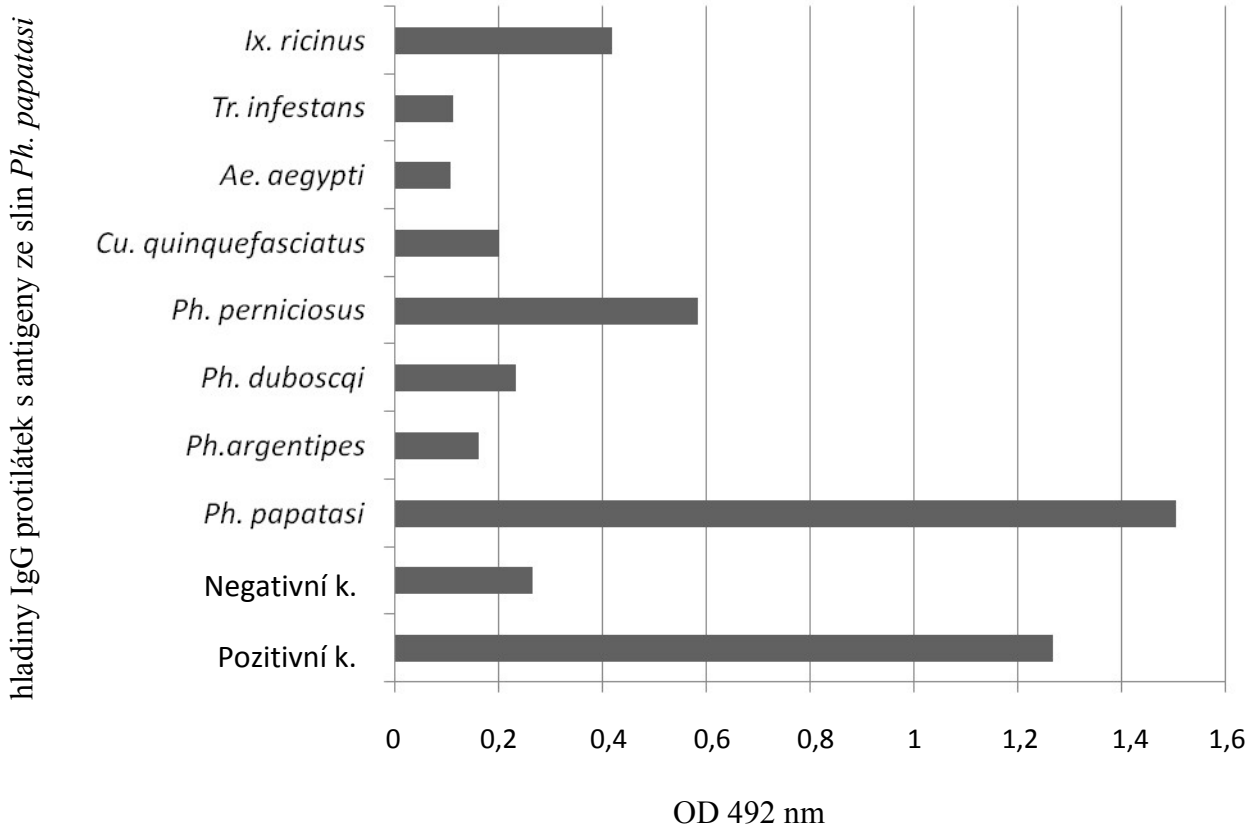
Graf 9: Anti-*Ph. papatasi* IgG testované se slinami komárů a dalších krevsajících členovců



#### 4.4. Specifita antigenů slinných žláz *Phlebotomus papatasi*

Při testování pozitivních sér od hostitelů, kteří byli opakovaně poštípani různými krevsajícími členovci (graf 10) se ukázalo, že dochází k částečné zkřížené reakci mezi antigeny ze slin *Ph. papatasi* a protilátkami ze sér hostitelů, kteří byli vystaveni sání *Ph. perniciosus*, *Ix. ricinus*. K nejsilnější pozitivní reakci s antigeny ze slin *Ph. papatasi* došlo s anti-*Ph. papatasi* protilátkami.

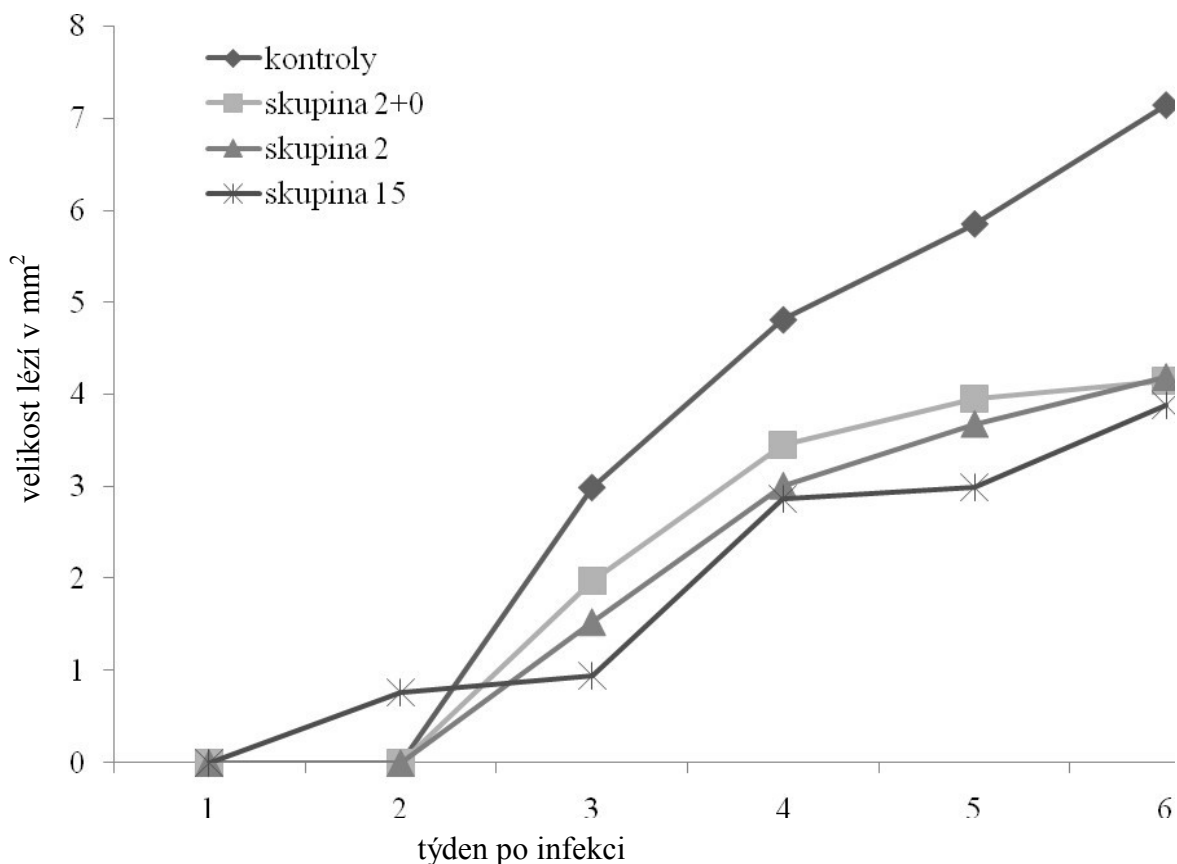
Graf 10: Antigeny ze slin *Ph. papatasi* testované se séry zvířat imunizovaných různými druhy krevsajících členovců (pozitivní kontrola je sérum získané z myši kmene BALB/c, která byla 32 krát vystavena sání *Ph. papatasi*)



#### 4.5. Vliv délky imunizace na vývoj kožních leishmaniových lézí a na produkci protilátek proti slinám *Phlebotomus duboscqi*

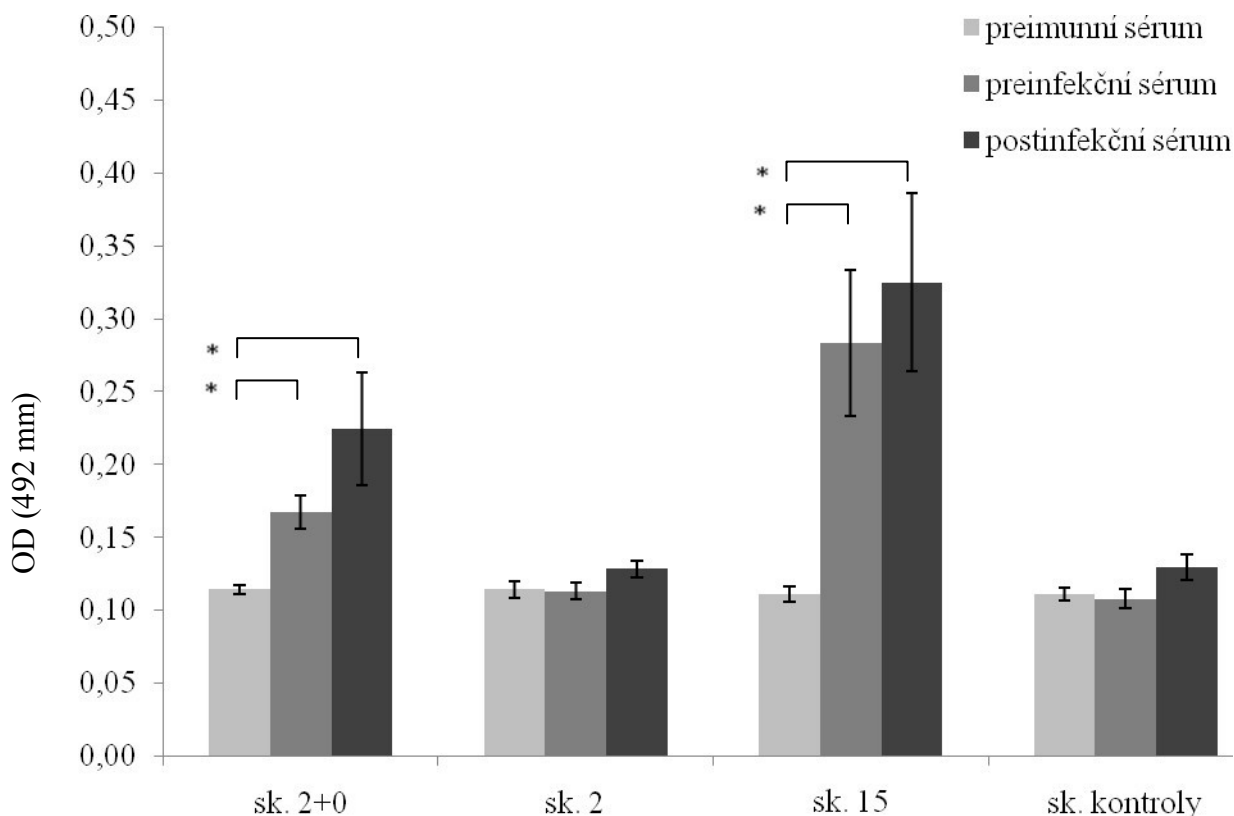
Myši kmene BALB/c byly imunizovány samicemi *Ph. duboscqi*, podrobné schéma pokusu je uvedeno v kapitole 3.8. U skupiny 2+0, která byla po dobu dvou po sobě jdoucích týdnů vystavena sání *Ph. duboscqi* a následných 15 týdnů do infekce ponechána bez imunizace, se průměrně nasálo  $33 \pm 3$  (průměr $\pm$ SD) samic *Ph. duboscqi*, u skupiny 15, která byla patnáct po sobě jdoucích týdnů před infekcí vystavena imunizaci *Ph. duboscqi*, se průměrně nasálo  $27 \pm 1$  samic *Ph. duboscqi* a u skupiny 2, která byla dva týdny těsně před infekcí vystavena dvakrát imunizaci *Ph. duboscqi*, se průměrně nasálo  $23 \pm 2$  samic *Ph. duboscqi*. Velikost lézí byla měřena po dobu šesti týdnů od infekce (graf 11). Nárůst velikosti lézí byl u kontrolní skupiny patrný již od 2. týdne s maximem v posledním měřeném týdnu, kdy plocha léze dosahovala  $7,14 \pm 2,65 \text{ mm}^2$ . U ostatních skupin, které byly před infekcí imunizovány, probíhal vývoj lézí podobně, ale plocha léze byla výrazně menší. V posledním šestém týdnu dosahovala v průměru  $3,88 - 4,19 \text{ mm}^2$ .

Graf 11: Velikost lézí po infekci *Le. major*

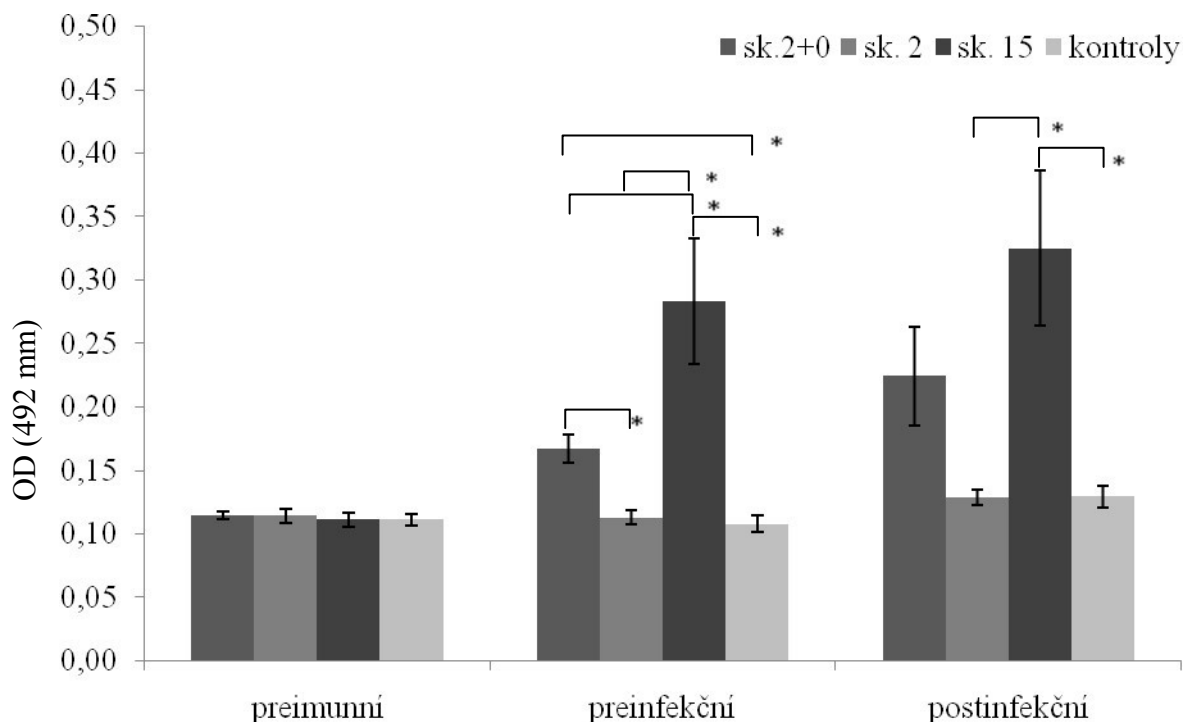


V průběhu pokusu bylo od myši získáno sérum ve třech termínech, před začátkem imunizace (preimunní), po ukončení imunizace a zároveň před infekcí (neinfekční) a poté 6. týden po infekci (postinfekční). Tato séra byla testována na anti-*Ph. duboscqi* protilátky třídy IgG (graf 12 a 13). Je patrné, že v rámci skupin 15 a 2+0 se signifikantně liší preimunní sérum od séra preinfekčního a preimunní sérum od séra postinfekčního (graf 12). U obou skupin došlo k významnému zvýšení anti-*Ph. duboscqi* IgG protilátek vůči příslušnému preimunnímu séru. U skupin 2 a kontrolní nedošlo k signifikantní nárůstu anti-*Ph. duboscqi* IgG protilátek v průběhu pokusu (graf 12). V grafu 10 máme naměřené hodnoty srovnány podle toho, v jaké fázi pokusu byly odebrány. Vidíme zde, že není žádný významný rozdíl mezi skupinami u preimunních sér. U myši po imunizaci je patrné, že naměřené hodnoty anti-*Ph. duboscqi* IgG protilátek skupiny 2+0 se signifikantně liší od všech ostatních skupin. Jsou vyšší než u skupiny 2 a kontrolní, ale nedosahují hodnot naměřených u skupiny 15. Hladiny anti-*Ph. duboscqi* IgG protilátek u skupiny 15 byly významně vyšší oproti všem ostatním měřeným skupinám. U postinfekčního séra se signifikantně lišily hladiny naměřených anti-*Ph. duboscqi* IgG protilátek u skupiny 15 již pouze vůči skupině kontrolní a skupině 2 (graf 13).

Graf 12: Protilátky proti slinám *Ph. duboscqi*; ( $p < 0,05$ )



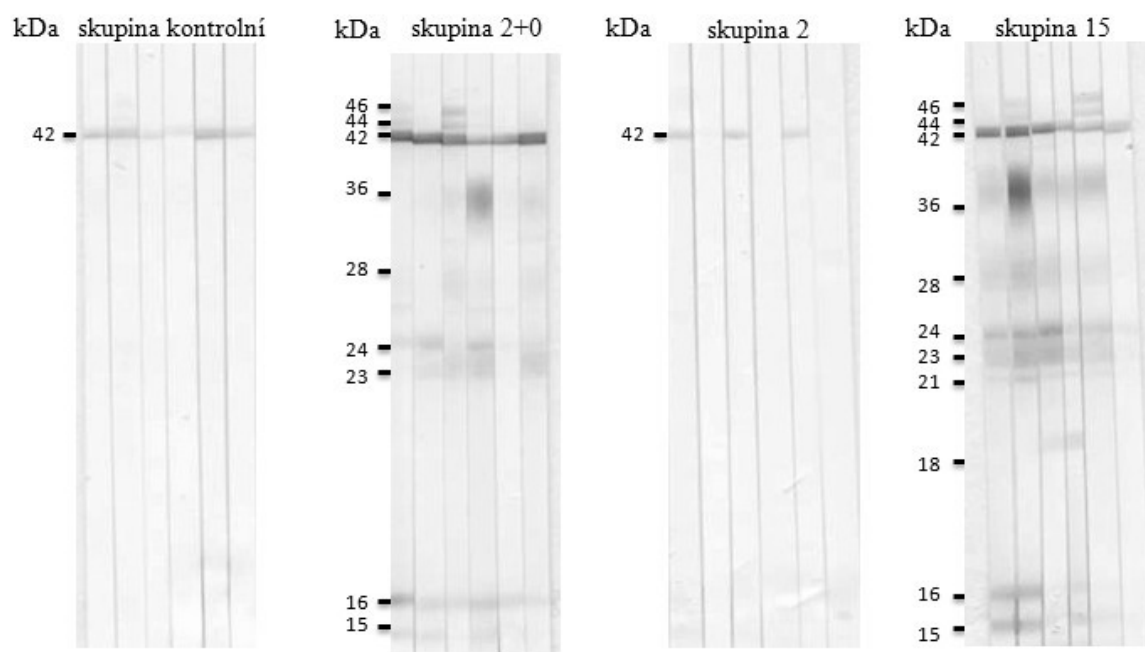
Graf 13: Protilátky proti slinám *Ph. duboscqi*; ( $p < 0,05$ )



Molekulové velikosti antigenů rozpoznávaných protilátkami IgG z myši opakovaně vystavených sání samicím *Ph. duboscqi* jsou zobrazeny v obrázku 5. Skupina 2 a skupina kontrolní rozpoznávaly jediný antigen ve slinách *Ph. duboscqi* o velikosti 42kDa. Skupina 2+0 a skupina 15 rozpoznávaly dalších 8 – 10 antigenů, v rozmezí 15 – 46 kDa. Nejvíce antigenů rozpoznávala skupina 15. Z celkem 11 proteinů byly proteiny o velikosti 18 kDa a 21kDa rozpoznávány jen skupinou 15 (obrázek 7).

Obrázek 7: Antigeny ve slinách *Ph. duboscqi* rozpoznávané IgG protilátkami ze sér myši kmene BALB/c

Kontrolní = neimunizovaná skupina, ostatní skupiny (2+0, 2, 15) imunizovány sáním *Ph. duboscqi* dle různých schémat (detailněji v kapitole 3.7). Všechny skupiny byly infikovány *Le. major* v kombinaci s 0,5 žlázy *Ph. duboscqi* (viz kapitola 3.8.).



## 5. Diskuze

### 5.1. Dynamika protilátkové odpovědi u myši poštípaných *Phlebotomus papatasi*

Ribeiro (1987) svými pokusy vyvrátil domněnku, že flebotomové jsou „injekční stříkačky“, které by pouze přenášely leishamanie. Sliny flebotomů, které jsou v průběhu sání inokulovány do hostitele, vyvolávají imunitní odpověď (Ribeiro, 1987). Při opakovaném sání flebotomů se v hostiteli vytváří buněčná a protilátková odpověď na sliny flebotomů (Baral a kol., 2000; Volf a Rohoušová, 2001; Gomes a kol., 2002; Rohoušová a kol., 2005 A; Gomes a kol., 2007). Zvýšené hladiny protilátek třídy IgG proti slinám byly naměřeny u myši, které byly opakovaně vystavené sání *Ph. papatasi* (Rohoušová a kol., 2005 A; Vlková a kol., 2012) a *Ph. sergenti* (Rohoušová a kol., 2005 A).

Při našich pokusech se ukázalo, že myši kmene C57BL/6 produkují po opakovaném sání *Ph. papatasi* protilátky třídy IgG. Hlavní produkovanou podtřídou byla podtřída protilátek IgG1. Toto zjištění koresponduje s poznatkami, že u kmene myši BALB/c se po opakovaném sání *Ph. papatasi* také vytváří hladiny protilátek IgG. Ovšem u kmene myši BALB/c jsou to hlavně protilátky podtřídy IgG1 a IgG2b (Vlková a kol., 2012). Při opakovaném sání *Lu. longipalpis* na myších kmene BALB/c se také projeví zvýšené hladiny protilátek IgG a dokonce se prokázalo, že došlo ke zvýšení hladiny podtřídy protilátek IgG1 (Silva a kol., 2005). Tato podtřída protilátek, tedy IgG1, byla také nejhojněji zastoupena v sérech myši opakovaně vystavených sání *Lu. intermedia* (de Moura a kol., 2007). Všechny tyto poznatky nasvědčují tomu, že hlavní produkovanou podtřídou protilátek u myši po opakovaném sání *Ph. papatasi* je podtřída IgG1.

Při našem testování se u myši kmene C57BL/6 vystavených opakovanému sání *Ph. papatasi* neprojeví žádné zvýšení hladin protilátek podtříd IgG2b, IgG2c a IgG3. Hladiny těchto protilátek se u myši opakovaně vystavených sání nelišily od hladin u myši, které žádnému sání vystaveny nebyly. U protilátek proti slinám *Ph. papatasi* u myši kmene C57BL/6, na kterých se pět po sobě jdoucích týdnů nasálo v průměru 27 samic *Ph. papatasi* došlo ve 4. týdnu pokusu k signifikantnímu nárůstu protilátek a poté se hladiny protilátek IgG a podtřídy IgG1 držela signifikantně zvýšená po zbytek pokusu, tedy do 27. týdne, kdy byl pokus ukončen. Po celých 21. týdnů od poslední imunizace se hladiny protilátek proti slinám *Ph. papatasi* u myši kmene C57BL/6 udržely s lehkými výkyvy na stejné hladině a byly signifikantně vyšší oproti hladině protilátek neimunizované skupiny myši. Tento signifikantní rozdíl v hladinách protilátek proti slinám *Ph. papatasi* u



imunizované a neimunizované skupiny byl patrný po celou dobu 21. týdnů od poslední imunizace u kmene myši BALB/c (Vlková a kol., 2012).

Vlková a kol. (2012) provedli v závěru pokusu ještě jednu imunizaci a vystavily v 26. týdnu celého pokusu myši kmene BALB/c sání *Ph. papatasi* a došlo k výraznému zvýšení hladin protilátek IgG, podtříd IgG1 a IgG2b (Vlková a kol.; 2012). To nasvědčuje, že se u myši po dlouho dobu po posledním sání zachovávají paměťové buňky (Vlková a kol.; 2012). Tuto část pokusu, kdy by došlo po delší době bez sání k opětovné expozici samicím *Ph. papatasi*, jsme při pokusu s myšmi kmene C57BL/6 neprovedli z důvodu nedostatku samic *Ph. papatasi*.

Vysokou pravděpodobnost existence imunologické paměti na sání flebotomů nasvědčuje i pokus, u lidí žijící v oblastech výskytu viscerální leishmaniózy, na kterých přirozeně sají flebotomové *Ph. argentipes* (Clements a kol., 2010). Lidé byli během hospitalizace v nemocnici umístěni pod ochranné sítě, takže na nich v průběhu 30-ti dní nesáli žádný flebotomové. Po propuštění z nemocnice a opětovném styku se slinami *Ph. argentipes* došlo k výraznému zvýšení hladin specifických protilátek (Clements a kol., 2010). Podobná dynamika snížení a rapidního zvýšení hladiny specifických protilátek proti slinám flebotomů u lidí žijících ve stejné oblasti byla prokázána i u protilátek proti slinám *Ph. papatasi*. Při zamezení styku sání flebotomů na lidech, dojde u lidí ke snížení hladin protilátek, avšak dojde-li k další expozici slinám flebotomů, nárůst protilátek je rychlý a výrazný a může dosahovat vyšších hladin než před zamezením styku flebotomů s lidmi (Clements a kol., 2010). U lidí žijících v místě výskytu *Ph. papatasi* byly detekovány protilátky třídy IgG, ovšem nejvíc zastoupena byla podtřída protilátek IgG4 (Marzouki a kol., 2011). Specifické protilátky byly sledovány i u lidí opakovaně pobodaných *Lu. longipalpis* a pouhá jediná expozice stačila k výraznému zvýšení protilátek proti slinám *Lu. longipalpis* (Vinhas a kol., 2007). Specifické protilátky proti slinám *Lu. longipalpis* byly detekovatelné i 135 dní po poslední expozici (Vinhas a kol., 2007). U lidí se po opakovaném sání *Lu. longipalpis* také vytváří protilátky třídy IgE (Vinhas a kol., 2007).

My jsme neprováděli jsme žádnou detekci protilátky třídy IgE z důvodu nedostatku séra myši kmene C57BL/6. U myši kmene BALB/c nebyl zjištěn významný rozdíl v hladinách IgE mezi skupinami myši, které byly vystaveny sání *Ph. papatasi* a které sání vystaveny nebyly (Vlková a kol., 2012).

Důležitost sledování specifických protilátek proti slinám flebotomů u psů prokázala Vlková a kol. (2011), kdy specifické protilátky podtřídy IgG2 byly označeny jako hlavní ukazatel míry expozice neinfekčního sání *Ph. perniciosus* (Vlková a kol., 2011). Prokázalo se totiž, že u psů vyskytujících se v endemické oblasti *Leishmania infantum* dochází k negativní korelaci mezi hladinou protilátek proti slinám *Ph. perniciosus* a hladinou protilátek proti *Le. infantum* (Vlková a kol., 2011). Všechny tyto poznatky mohou pomáhat při eradikačních opatřeních proti leishmanióze.

Na modelu *Lu. longipalpis* – pes byla sledována korelace mezi množstvím flebotomů, kteří na hostiteli sály a hladinami specifických protilátek, které hostitel vytvářel (Hostomská a kol., 2008). Bylo prokázáno, že hladiny IgG protilátek jsou vyšší u psů, kteří byli vystaveni většímu počtům samic *Lu. longipalpis* při jednom sání (Hostomská a kol., 2008). Také v našem pokusu se prokázala pozitivní korelace mezi počtem nasátých samic *Ph. papatasi* a hladinou protilátek třídy IgG a podtřídy IgG1 u myši kmene C57BL/6. Závislost hladin protilátek proti slinám *Ph. papatasi* u lidí korelovala s hustotou výskytu tohoto flebotomů v místě jeho výskytu v oblasti Nepálu (Clements a kol., 2010). Pozitivní korelace počtu nasátých samic *Ph. perniciosus* byla potvrzena na modelu pes – *Ph. perniciosus* (Vlková a kol., 2011). Také u flebotoma *Ph. argentipes* byla potvrzena pozitivní korelace mezi hustotou výskytu *Ph. argentipes* a hladinami protilátek u lidí žijících v místě výskytu *Ph. argentipes* v oblastech Nepálu a Indie (Clements a kol., 2010). Pozitivní korelace mezi hladinou protilátek třídy IgG a počtů nasátých kusů byla prokázána i na zcela odlišném druhu členovců, a sice u ploštic rodu *Tr. infestans* (Schwarz a kol., 2009 A). K podobnému závěru došli i Sanders a kol., (1998 A) když prokázali, že se zvyšujícím se počtem klíšťat *Am. americanum* a *De. variabilis*, které sály na králících, se u králíků zvyšují hladiny protilátek IgG proti slinám klíšťat (Sanders a kol., 1998 A). Tato korelace nám umožňuje předpovídat riziko přenosu infekce, za předpokladu, že budeme schopni určit míru nakažení daného druhu krevsajícího členovce v dané lokalitě.

## **5.2. Charakterizace antigenů a proteinů ve slinných žlázách *Phlebotomus papatasi***

Na histogramu z proteinového profilu slinných žláz *Ph. papatasi* bylo detekováno celkem 17 proteinů o molekulové hmotnosti v rozmezí od 15,4 kDa do 171 kDa. Přičemž přes 50 % obsahu slinných žláz *Ph. papatasi* tvořila trojice proteinů o molekulové velikosti 23,3 kDa, 48,7 kDa a 44,2 kDa. Nejhojněji zastoupený protein byl o molekulové velikosti

44,2 kDa, jeho podíl v obsahu slinných žláz byl 20.6 % a porovnáním s proteomickou analýzou se na základě molekulové velikosti bude zřejmě jednat o tzv. Yellow-related protein (Valenzuela kol., 2001; Abdeladhim a kol., 2012).

Specifické protilátky u myši kmene C57BL/6, které se vytvářeli v průběhu pokusu dynamiky protilátkové odpovědi proti slinám *Ph. papatasi* jsme otestovali na reaktivitu se slinami *Ph. papatasi*. K tomuto testování jsme použili séra z 6. týdne pokusu, tedy séra po posledním expozici *Ph. papatasi*. Tato séra měla naměřena nejvyšší hladiny protilátek IgG i podtřídy IgG1. Séra myši kmene C57BL/6 rozpoznávaly v slinách *Ph. papatasi* proteiny o molekulové velikosti v rozmezí 25 – 113 kDa. Myši kmene BALB/c rozpoznávaly ve slinách *Ph. papatasi* proteiny o molekulové velikosti od 15 do 70 kDa (Vlková a kol., 2012). Téměř shodný výsledek publikovala Rohoušová a kol., (2005 A), kdy zjistily, že protilátky ze sér myši kmene BALB/c, které byly opakovaně vystaveny sání *Ph. papatasi* rozpoznávaly ve slinách *Ph. papatasi* proteiny o molekulové velikosti od 12 do 70kDa (Rohoušová a kol., 2005 A). Na imunoblotu myši kmene C57BL/6 bylo patrné, že výrazně silněji rozpoznávaly antigeny ve slinách *Ph. papatasi* protilátky podtřídy IgG1. U myši kmene BALB/c rozpoznávali proteiny ve slinách *Ph. papatasi* protilátky třídy IgG a podtřídy IgG1 a IgG2b (Vlková a kol., 2012). Nebyl ovšem pozorován tak výrazný rozdíl mezi třídou IgG a podtřídou IgG1 jako to bylo patrné u myši kmene C57BL/6.

Specifické protilátky proti slinám *Lu. longipalpis* většiny dobrovolníků opakovaně pobodaných *Lu. longipalpis* nejčastěji rozeznávaly proteiny ze slin *Lu. longipalpis* a molekulové velikosti 45, 44, 43 a 35 kDa (Vinhas a kol., 2007). Avšak protilátky lidí žijících v oblasti výskytu *Lu. longipalpis* rozpoznávali proteiny ze slin o molekulové velikosti 15 – 65 kDa (Texeira a kol., 2010). Rozsáhlé spektrum antigenů ve slinách *Tr. infestans* rozpoznávaly i protilátky třídy IgG, které byly získány od kuřat a morčat, na kterých opakovaně sály ploštice *Tr. infestans* (Schwarz a kol., 2009 A). Protilátky z kuřat rozpoznávaly antigeny o molekulové velikosti 10 – 79 kDa a protilátky z morčat antigeny o molekulové velikosti 14 – 79 kDa (Schwarz a kol., 2009A). Což nahrává domněnce, že pro každý druh členovce by se dal vytipovat specifický antigen, který je rozpoznáván protilátkami hostitele a dal by se použít jako ideální marker expozice sání.

K testování protilátek proti slinám daného členovce by se nemuseli používat celé slinné žlázy, ale stačilo by použít laboratorně připravený rekombinantní protein. To bylo ostatně provedeno a odzkoušeno ve studii, kdy byl ve slinách *An. gambiae* nalezen specifický

protein s označením gSG6 (Rizzo a kol., 2011). Při testování lidí žijících v Burkině Faso, v místě kde *An. gambiae* je jedním z přenašečů malárie, byly v sérech nalezeny přímo anti-gSG6 protilátky (Rizzo a kol., 2011). Ze slin *Tr. infestans* byl připraven rekombinantní protein rTiSP14.6 o molekulové velikosti 14,6 kDa, který byl silně rozpoznáván protilátkami třídy IgG, které se u hostitelů vytvořili po opakovaném sání plošnice *Tr. infestans* (Schwarz a kol., 2009 B). Tento rekombinantní protein ovšem nebyl rozpoznáván protilátkami proti slinám komárů nebo flebotomů, což může být velice vhodné při testování eradikace triatom z oblastí, kde jsou triatomy přenašečem Chagasovy choroby (Schwarz a kol., 2009 B). Ve slinách *Tr. infestans* byl nově objeven protein o molekulové velikosti 35 kDa, který byl rozpoznáván protilátkami hostitelů, na kterých sáli různé kolonie a různá vývojová stádia *Tr. infestans* (Dorňáková a kol., 2014). Rekombinantní proteiny byly také připraveny ze slin *Ph. papatasi*, kdy tyto proteiny byly testovány se séry od myši kmene BALB/C, které byly opakovaně vystaveny sání *Ph. papatasi* a které měli signifikantně vyšší hladiny protilátek, oproti kontrolním myším, na kterých samice *Ph. papatasi* nesály (Vlková a kol., 2012). Jednalo se celkem o 4 rekombinantní proteiny, přičemž dva z nich rPpSP44 a rPpSP42 patří do skupiny tzv. Yellow-related proteinů, a další dva rPpSP30 a rPpSP28 do skupiny D7-related proteinů (Valenzuela a kol., 2001). S největší intenzitou byl protilátkami proti slinám *Ph. papatasi* rozpoznáván rekombinantní protein s označením rPpSP30, ale k tomu rozpoznání nedošlo u všech myších sér. Takže pokud by se hledal spolehlivý rekombinantní protein, který by měl sloužit jako marker expozice sání *Ph. papatasi*, bylo by nejlépe využít kombinaci výše zmiňovaných rekombinantních proteinů (Vlková a kol., 2012). Rekombinantně připravené proteiny ze slin *Ph. papatasi* byly testovány také se séry získaných od dětí, kteří žijí v Tunisku, v oblastech výskytu kožní leishmaniózy a měli vysoké hladiny protilátek IgG proti slinám *Ph. papatasi* (Marzouki a kol., 2012). Zatímco rekombinantní protein s označením rPpSP30 bych rozpoznáván velice slabě, druhý testovaný protein s označením rPpSP32 byl silně rozpoznáván lidskými séry. Tento protein se tedy jeví, jako vhodný kandidát pro testování expozice lidí slinám *Ph. papatasi* ve velkém měřítku (Marzouki a kol., 2012). Také u dalšího rodu *Phlebotomus*, konkrétně u druhu *Ph. perniciosus* byly připraveny a otestovány rekombinantní proteiny právě ze slin tohoto flebotoma, které byly silně rozpoznávány specifickými protilátkami, které se tvořili u myši kmene SKH1 a u psů rasy bígl, kteří byly opakovaně vystaveni sání *Ph. perniciosus* (Drahota a kol., 2014). Konkrétně se jedná o protein rSP03B, který patří mezi tzv. Yellow-related proteiny, a dále pak o apyrázy s označením rSP01B a rSP01. Zdá se být velice vhodné využití těchto

proteinů pro prověřování psích sér v oblasti výskytu viscerální leishmaniózy, kde by se pomocí testování získala míra expozice sání *Ph. perniciosus* a tím možnost přenosu *Le. infantum* na psy, případně na lidi (Drahota a kol., 2014). Rekombinantní proteiny, které by byly rozpoznávané specifickými protilátkami u opakovaně imunizovaných hostitelů byly nalezeny i u flebotoma *Lu. longipalpis* (Souza a kol., 2010; Teixeira a kol., 2010). Konkrétně se jedná o rekombinantní proteiny s označením LJM11 a LJM17 a dají se využít jako vhodný marker expozice sání *Lu. longipalpis* (Souza a kol., 2010; Teixeira a kol., 2010).

### **5.3. Specifita protilátkové odpovědi proti slinám *Phlebotomus papatasi***

Po opakované expozici myši kmene BALB/c a C57BL/6 sání průměrně 28 samicím *Ph. papatasi* jsme na sérech získaných od těchto dvou skupin myší, testovali schopnost protilátek reagovat s antigeny jiných druhů flebotomů, komárů, klíštěte a plošice. Nebyla nalezena žádná zkřížená reaktivita ani v rámci rodu *Phlebotomus* (*Ph. argentipes*, *Ph. duboscqi*, *Ph. perniciosus*) ani se slinami komárů (*Cu. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti*), klíštěte (*Ix. ricinus*) a plošice (*Tr. infestans*). Ke stejnému výsledku, kdy nebyla nalezena žádná zkřížená reaktivita anti-*Ph. papatasi* protilátek s dalšími rody *Phlebotomus* publikoval již Volf a kol. (2001), kdy protilátky proti slinám *Ph. papatasi* získané z opakovaně sátých myší nereagovaly s antigeny ze slinných žláz *Ph. perniciosus* ani *Ph. halepensis* (Volf a kol., 2001). Zkřížené reaktivitě mezi slinami různých druhů flebotomů se věnoval také Drahota a kol. (2009), který popsal, že protilátky získané od myši kmene BALB/c po opakovaném sání *Ph. sergenti* plně rozpoznávali antigeny ve slinách *Ph. sergenti* a částečně rozpoznávali antigeny ve slinách *Ph. papatasi*, ale žádné antigeny ve slinách *Ph. arabicus* (Drahota a kol., 2009). Druh *Ph. papatasi* patří k flebotomům tzv. Starého světa a séra získaná od lidí, kteří žijí v místě výskytu tohoto druhu flebotoma, u kterých je velice pravděpodobné, že byli opakovaně vystaveni sání *Ph. papatasi* nereagovali se slinami *Lu. longipalpis*, který patří k flebotomům tzv. Nového světa (Rohoušová a kol., 2005 A).

### **5.4. Specifita antigenů slinných žláz *Phlebotomus papatasi***

Zkříženou reaktivitu antigenů ze slinných žláz *Ph. papatasi* jsme testovali pomocí sér získaných ze zvířat, na kterých opakovaně sáli jednotlivé druhy flebotomů (*Ph. papatasi*, *Ph. argentipes*, *Ph. perniciosus*, *Ph. duboscqi*), komárů (*Cu. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti*), plošice (*Tr. infestans*) a klíštěte (*Ix. ricinus*). Nejsilněji antigeny ve slinách

*Ph. papatasi* rozpoznávaly protilátky získané po opakovaném sání *Ph. papatasi*. Antigeny ve slinách *Ph. papatasi* ovšem částečně rozpoznávali i protilátky ze sér hostitelů, kteří byli opakovaně vystaveni sání *Ph. perniciosus*, *Ix. ricinus*. Pro vyšší validitu výsledků by měl být pokus zopakován, byl proveden pouze jednou. Určitá zkřížená reaktivita je patrná v rámci rodu *Phlebotomus* u druhů *Ph. sergenti* a *Ph. papatasi* (Drahota a kol., 2009) a mezi druhy *Ph. perniciosus* a *Ph. halepensis* (Volf a Rohoušová, 2001). Také u komárů v rámci rodu *Aedes* je patrné, že některé antigeny ve slinách jsou shodné (Fontaine a kol., 2011; Doucoure a kol., 2012). Protilátky proti slinám konkrétního druhů krevsajícího členovce mohou zkříženě reagovat s antigeny, které jsou podobné u jiného krevsajícího členovce. Mohou mít například podobnou imunomodulační funkci pro hostitele, nebo patří do stejné rodiny proteinů. Proto je důležité u každého druhu najít pouze antigen, na který odpovídají pouze protilátky proti stejnému druhu členovce, z jakého byl antigen získán.

#### **5.5. Vliv délky imunizace na vývoj kožních leishmaniových lézí a na produkci protilátek proti slinám *Phlebotomus dubosqi***

Bylo prokázáno, že u hlodavců, kteří byly opakovaně vystaveni sání neinfikovaných flebotomů se vyvinula určitá slinami vyvolaná buněčná imunita, která hlodavce chrání před kožní nebo viscerální leishmaniovou infekcí (Belkaid a kol., 2000; Kamhawi a kol., 2000; Morris a kol., 2001; Valenzuela a kol., 2001; Gomes a kol., 2008; Oliveira a kol., 2008; Rohoušová a kol., 2011; Tavares a kol., 2011).

V našem pokusu jsme se snažili namodelovat různé přírodní podmínky, jak může hostitel přijít do styku se slinami přenašeče *Le. major*, se slinami *Ph. dubosqi*, a následnou leishmaniovou infekcí. Myši kmene BALB/c byly opakovaně vystaveny expozici sání *Ph. dubosqi* s různým časovým dostupem, před inokulací leishmanií spolu se slinami. Schéma pokusu je podrobně popsáno v kapitole 3.7.. Vývoj kožních lézí byl od doby podání infekce sledován po dobu 6. týdnů od infekce a na konci sledování byly léze u kontrolní skupiny myší v průměru rozměrově dvojnásobné, oproti zbylým třem skupinám, které byly před infekcí vystavené imunizaci *Ph. dubosqi*. U těchto tří skupin myší byly léze na konci pokusu srovnatelně velké, lišila se ovšem dynamika vývoje lézí po infekci. Kdy u skupiny 15, která byla patnáct po sobě jdoucích týdnů před infekcí vystavena imunizaci *Ph. dubosqi* došlo již ve 2. týdnu po infekci k výrazně většímu výskytu lézí, které již byly zřetelné a měřitelné. Při následním měření lézí ve třetím týdnu po infekci již ale byly nejčastěji a nejrozsáhlejší léze u kontrolní skupiny myší. Tento trend, kdy

kontrolní skupiny myši měla léze v průměru největší, byl sledován až do šestého týdne sledování vývoje kožních lézí. U skupin myši, 2+0, 2 a 15, které byly opakovaně vystaveny sání *Ph. duboscqi* již před podáním infekce, se po podání infekční dávky leishmanií se slinami *Ph. duboscqi* vytvořili méně destruktivní a plošně méně rozsáhlé kožní léze, než u kontrolní skupiny myši, která se nikdy před podáním infekční dávky se slinami *Ph. duboscqi* nesečkala. K jasnějšímu výsledku, jak často a jak dlouho před infekcí by měl hostitel přijít do kontaktu se slinami daného přenašeče, poskytnul pokus, který byl testován na stejném modelu, myši kmene BALB/c – *Ph. duboscqi* – *Le. major* (Rohoušová a kol., 2011). Prokázali, že nejúčinnější protektivita je hostiteli udělena, pokud se se slinami přenašeče setká krátce před infekcí a s méně častým opakováním expozice sání *Ph. duboscqi* (Rohoušová a kol., 2011). Předchozí expozice sání *Ph. papatasi* uděluje protektivitu proti kožní leishmanióze vyvolané *Le. major* u myši kmene BALB/c i myši kmene C57BL/6 (Belkaid a kol., 1998; Belkaid a kol., 2000; Kamhawi a kol., 2000). Vzhledem k tomu, že jsme nedostali jasný fenotyp odlišující jednotlivé imunizované skupiny, nedělali jsme podrobnější testy typu kvantitativní PCR.

Jelikož byly myši opakovaně vystavené sání *Ph. duboscqi*, tak byla myším v průběhu pokusu odebírána séra a tyto séra jsme testovali na míru hladiny protilátek proti slinám *Ph. duboscqi*. U všech preimunních sér byla naměřena stejná velice nízká hodnota, kterou lze vzhledem k tomu, že myši se do začátku imunizací se slinami *Ph. duboscqi* nesečkali za negativní hodnoty. U preinfekčních sér v porovnání s preimunními séry již byly naměřeny výrazné rozdíly v hladinách IgG protilátek proti slinám *Ph. duboscqi* u skupiny 2+0 a skupiny 15. U skupiny 15 byly naměřeny v rámci všech preinfekčních sér nejvyšší hladiny specifických protilátek proti slinám *Ph. duboscqi*. Tento fakt odpovídá poznatkům o pozitivní korelaci mezi naměřenými hladinami protilátek a množstvím flebotomů, které na hostiteli sály (Hostomská a kol., 2008; Clements a kol., 2010; Vlková a kol., 2011; Vlková a kol., 2012). Na konci pokusu byla odebrána třetí sada sér a opět byla testována na hladiny protilátek proti slinám *Ph. duboscqi*. U této sady sér měly skupina 2 a kontrolní skupina v porovnání se sérem odebraným těsně před imunizací hladiny protilátek lehce zvýšené, ale nebylo to nějaké rapidní zvýšení. Důvodem je pravděpodobně fakt, že kontrolní skupina se setkala se slinami *Ph. duboscqi* poprvé a skupina 2 teprve potřetí, což ještě nevyvolalo signifikantní zvýšení. U myši kmene BALB/c dochází k signifikantnímu zvýšení hladin protilátek třídy IgG proti slinám *Ph. papatasi* až po čtvrté imunizaci slinami *Ph. papatasi* (Vlková a kol., 2012). Ikdyž u psů opakovaně exponovaných sání

*Lu. longipalpis* k signifikantnímu zvýšení hladin protilátek třídy IgG dochází již po třetí imunizaci (Hostomská a kol., 2008). U postinfekčních sér skupiny 2+0 a skupiny 15 je viditelný rostoucí trend hladiny protilátek v porovnání s hladinami protilátek u sér preinfekčních, je pravděpodobné, že při infekci, kdy infekční dávka obsahovala sliny *Ph. duboscqi*, vyvolala silnou reakci paměťových buněk a došlo k dalšímu zvýšení hladin protilátek třídy IgG. Existenci paměťových buněk předpovídají pokusy, kdy po opakované expozici slinám flebotomů, může jediná dávka slin tohoto flebotoma vyvolat rapidní zvýšení specifických protilátek (Clements a kol., 2010; Vlková a kol., 2012).

Z důvodu nejvyšších dosažených hladin protilátek, zejména u skupiny 15 a 2+0, jsme postinfekční séra, která jsme od myši získali až po ukončení sledování vývoje kožních lézí, otestovali na schopnost protilátek rozpoznávat antigeny ve slinách *Ph. duboscqi*. Protilátky proti slinám *Ph. duboscqi* u myši skupiny 2 a kontrolní skupiny rozpoznávaly ve slinách jediný antigen o molekulové velikosti 42 kDa. V pokusu, který provedli Rohoušová a kol. (2011) protilátky skupin myši s označením 2 a kontrolní skupiny nerozpoznávaly ve slinách *Ph. duboscqi* žádné antigeny (Rohoušová a kol., 2011). Protilátky myši skupiny 2+0 v závislosti na séru rozpoznávaly ve slinách *Ph. duboscqi* 8 – 10 antigenů o molekulové velikosti od 15 do 46 kDa. Nejvíce antigenů ve slinách *Ph. duboscqi* rozpoznávaly protilátky myši skupiny 15, celkem bylo rozpoznáno 11 antigenů o molekulové velikosti v rozmezí 15 – 46 kDa. Protilátky myši skupiny 15 rozpoznávaly jako jediné ve slinách *Ph. duboscqi* antigeny o molekulové velikosti 18 kDa a 21 kDa. Nejvíce antigenů ve slinách *Ph. duboscqi* rozpoznávají protilátky myši nejčastěji imunizované skupiny (Rohoušová a kol., 2011).



## 6. Souhrn

- V našich pokusech jsme zjistili, že opakované sání *Ph. papatasi* na myších kmene C57BL/6 vyvolává tvorbu specifických protilátek třídy IgG. Hlavní skupinou třídy IgG protilátek byly protilátky podtřídy IgG1. Nárůst protilátek třídy IgG a podtřídy IgG1 v porovnání s kontrolní skupinou myši je signifikantní již po třetím sání. Specifické protilátky byly v sérech myši detekovatelné i 21 týdnů po poslední imunizaci. Také jsme potvrdili pozitivní korelaci počtu nasátých *Ph. papatasi* a hladin protilátek třídy IgG a podtřídy IgG1. Specifické protilátky proti slinám *Ph. papatasi* rozpoznávaly ve slinách *Ph. papatasi* shodnou škálu antigenů a sice antigeny o molekulové velikosti 25 – 113kDa, silněji tyto antigeny rozpoznávaly protilátky podtřídy IgG1.
- Při testování sér myši kmene BALB/c a C57BL/6, které byly opakovaně vystaveny sání *Ph. papatasi* s antigeny jiných druhů krevsajících členovců se neprojevila žádná zkřížená reakce. Anti-*Ph. papatasi* protilátky nereagovali se slinami *Ph. argentipes*, *Ph. duboscqi*, *Ph. perniciosus*, *Cu. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti*, *Ix. ricinus*, *Tr. infestans*. K částečné zkřížené reakci došlo při testování pozitivních sér s protilátkami anti-*Ph. perniciosus* a anti-*Ix. ricinus* s antigeny *Ph. papatasi*.
- Při sledování vlivu délky imunizace na vývoj kožních leishamniových lézí se nám nepodařilo zcela jasně určit fenotyp odlišující jednotlivé imunizované skupiny. Ovšem velikost kožních lézí u imunizovaných skupin byly výrazně menší než u neimunizované skupiny. V tomto pokusu jsme také sledovali vývoj protilátek protilátek proti slinám *Ph. duboscqi* u všech skupin. Nejvyšší hladiny protilátek třídy IgG byly naměřené u nejčastěji imunizované skupiny. Specifické protilátky této skupiny také rozpoznávali nejvíce antigenů ve slinách *Ph. duboscqi*.

## 7. Přílohy

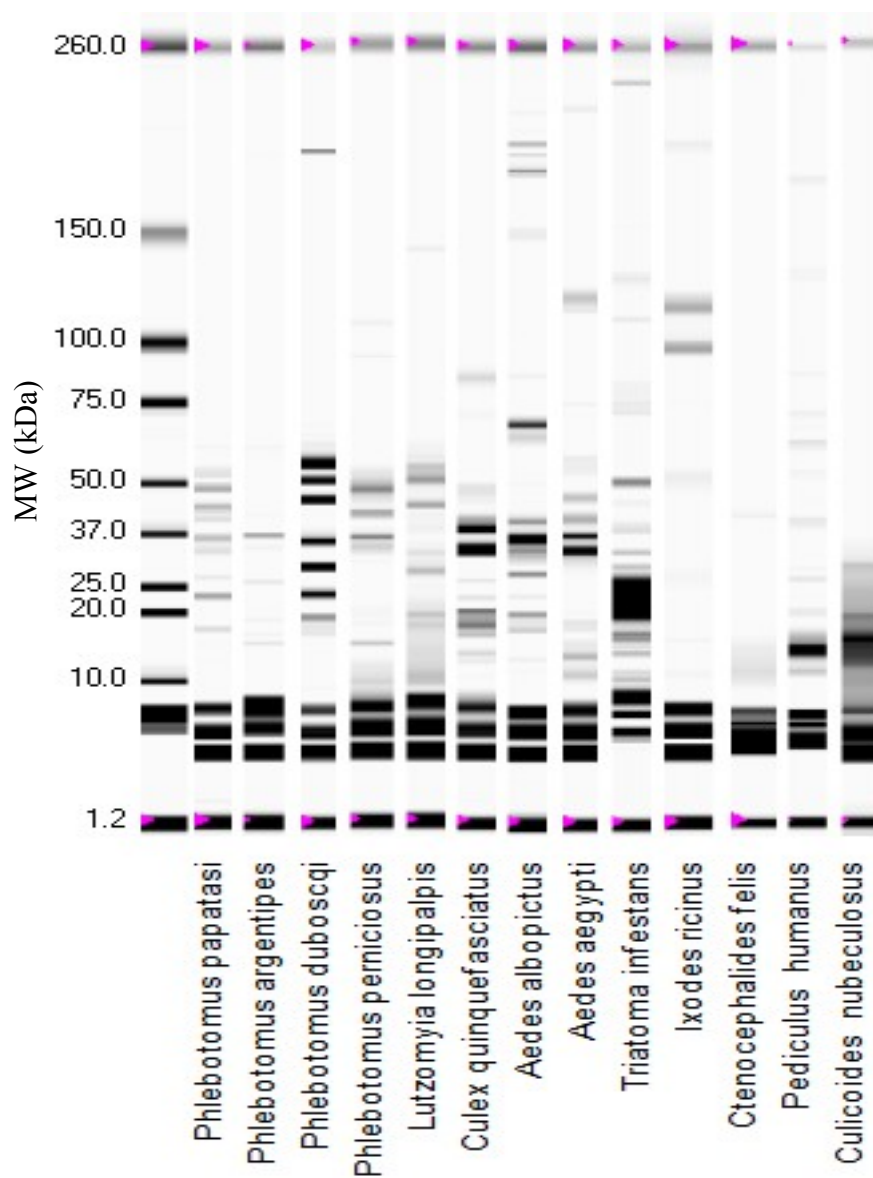
### 7.1. Proteinové profily slinných žláz různých druhů krevsajících členovců

Metodou čipové elektroforézy (viz kapitola 3.14.) jsme testovali vzorky slinných žláz různých krevsajících druhů členovců. Pro proteinové profily slinných žláz byly použity slinné žlázy uvedené v kapitole 3.14. a dále slinné žlázy *Aedes albopictus* (získány z laboratorních chovů PaÚ BC AV ČR), *Lutzomyia longipalpis* (původcem z Brazílie), *Ctenocephalides felis* (získány z laboratorních chovů firmy Bayer Health-Care AG, Leverkusen, Německo). U vzorků slinných žláz *Pediculus humanus* a *Culicoides nubeculosus* se nám nepodařilo zjistit původ.

Tento pokus byl proveden pouze jednou. Pro další opakování by bylo vhodné napitvat si čerstvé slinné žlázy krevsajících členovců.

Profily proteinů ve slinách krevsajících členovců (obrázek 8). Na čipové elektroforéze bylo detekováno ve slinách flebotomů *Phlebotomus papatasi* 17 proteinů v rozmezí 15 – 171 kDa, *Phlebotomus argentipes* 15 proteinů v rozmezí 15,43 – 238,45 kDa, *Phlebotomus duboscqi* 18 proteinů v rozmezí 9,5 – 227,82 kDa, *Phlebotomus perniciosus* 20 proteinů v rozmezí 9,83 – 239,59 kDa, *Lutzomyia longipalpis* 23 proteinů v rozmezí 10,28 – 227,19 kDa, ve slinách komárů *Culex quinquefasciatus* 17 proteinů v rozmezí 10,88 – 198,02 kDa, *Aedes albopictus* 17 proteinů v rozmezí 13,73 – 120,9 kDa, *Aedes aegypti* 20 proteinů v rozmezí 9,39 – 226,47 kDa a ve slinách *Triatoma infestans* 24 proteinů v rozmezí 9,11 – 242,91 kDa, *Ixodes ricinus* 9 proteinů v rozmezí 11,2 – 235,07 kDa, *Culicoides nubeculosus* 7 proteinů v rozmezí 9,49 – 224,67 kDa, *Ctenocephalides felis* 5 proteinů v rozmezí 10,94 – 142,7 kDa, *Pediculus humanus* 11 proteinů v rozmezí 11,1 – 97,02 kDa.

Obrázek 8: Proteiny slinných žláz krevsajících členovců; 1,2 a 260 kDa jsou obsaženy ve vzorkovém pufru a ukazují dolní a horní hranici měřitelnosti



## 7.2. Bioinformatická analýza aminokyselinových sekvencí proteinů ze slinných žláz

### *Phlebotomus papatasi*

V databázi GenBank jsme si dne 19.6.2012 vyhledali aminokyselinové sekvence proteinů ze slinných žláz *Phlebotomus papatasi* (klíčová slova: *Phlebotomus papatasi* AND salivary). Sekvence jsme analyzovali pomocí vybraných aplikací dostupných na stránkách Centra pro analýzu biologických sekvencí při Dánské Technické univerzitě (<http://www.cbs.dtu.dk/services>): SignalP 4.0 pro vyhledání signální sekvence (Petersen a kol., 2011), BepiPred 1.0 pro vyhledání lineárních B-epitopů (Larsen a kol., 2006) a NetNGlyc 1.0 pro vyhledání potenciálních míst pro N-glykosylaci (Gupta a kol., 2004).

V proteinech popsaných k datu 19.6.2012 slinných žláz *Ph. papatasi* byly s použitím volně dostupných analytických nástrojů detekovány pravděpodobné signální sekvence, B-epitopy a N-glykosylace (obrázek 9). B-epitopy byly nalezeny u všech testovaných proteinů, v počtu od 4 po 19 B-epitopů na sekvenci. Délka B-epitopů se pohybovala v rozmezí od 1 aminokyseliny (apyráza, 30 kDa, 28 kDa, 44 kDa, 42 kDa, 15 kDa, 14 kDa a 12 kDa proteinu) až po 137 aminokyselin u 32kDa proteinu. Průměrná délka B-epitopu je 9 aminokyselin. Pravděpodobná glykosylační místa byla nalezena v apyráze (N17 a N209) a v proteinech o molekulové velikosti 44kDa (N29 a N83), 12 kDa (N22 a N122), 15 kDa (N22) a 29 kDa (N152). V proteinech o molekulové velikosti 30 kDa, 28 kDa, 42 kDa, 32 kDa, 14 kDa nebyla detekována žádná možná místa N-glykosylace.

Obrázek 9: Bioinformatická analýza proteinů ze slinných žláz *Phlebotomus papatasi* Aminokyselinová sekvence je vždy uvedena identifikačním číslem (GenBank accession number) a názvem proteinu. Pravděpodobné signální sekvence jsou zvýrazněny tučně, podtržením jsou zvýrazněny B-epitopy a šedým zvýrazněním jsou označeny potenciální N-glykosylační místa.

AAG17637 - apyráza

<b>MFLKFCIVAFACL</b> <u>SINL</u> <b>SEGA</b> PRSGTIYNFAIIADLDKKSISPKNDDNNYSIVKVGELIEVGDKY	66
<b>SVKMKKEDHEIF</b> TKYAYKGRGAELSEFLIYKWKLYTFDDKSGIVFRLKTNADLIPWVTLANGN	129
<b>GDQTDGFKA</b> EWATTKGDKMYVGSTGISFTDKTGKLNNSLWKEIDQDGKVQSLDWKEQYD	190
<b>KIKSAMKIPNGFI</b> WHEAVNWSKLNQWVFLPRKCSEPFDTKTEETIGCNKIIASENFEIISIQ	256
<b>IKGKSINRAAG</b> FSSFKFLPDSDDQILLALKTIEKDDKTATYITVIDITGRVLMPEMQINSDKYEGIV	323
<b>LLKSTEGFLKRSQ</b>	336

AAL11052 - 44 kDa protein

**MKFFLSVIALASFQYVFCDD**VERFYAWRNITFEDVKEGTYKPGDVIPTGVTHDAKTKKLYFGV 63  
 PRRYSNIPYTLAEIDTRNYNRSEIRSPPFKFNSSQSGKEFTSIYQPVIDDCRRLWLDVGQVD 126  
 YKKHGNEYPTKNPEIIAFDLNQEGNPEVHRYKLEGDVARSP LGFGFAVDVINPNGNCAKSD 188  
 ETYLYITNFIDNALIVYDMKNKNAWKFNDDSFKPEPGKSVFNHKGEQYSYIAGIFGITLGDNRK 252  
 DGHRPAYIAGSSTKVYSVNTASLKEKGASLKPRLGGERGFKTEAIALAYDPKTKVIFVESDS 316  
 RQVSAWNIQKELIPKNVGVITYNAYFVFGTDMVDADSTLWFMSNAHPPTELPKLDFDKRQIRL 380  
 MYVPTHRAIRNLPCEVRKPK 400

AAL11051 - 42 kDa protein

**MMKLILCVLSFLSLQVALSDDV**GRAYEWSEIKLVGVRPNAYDSGNIVPTGVAYDAASKMLFF 62  
 GIPRIYSRVPITFAQLSTRSYNSAEIPNPPLDKFSGKSKQPLTSVYQPVIDDCRRLWLDVGIVE 127  
 NEAERKTYPIKKPSLIAFDLTKSNYPEIHRYELTGEAGKNPLGYGGFAVDVWNPKRCSKNEK 190  
 TYIYANFDENSLIVYDKKKGAWSLKDDSFKPEGVTTFTLNGKEHKFKAGIFGIALGDRNKEGN 255  
 RPAYLAGSSTKLYRLDTKLLKKKGSKLEPKLIGDRGFKTEAIALAYDPETKVLFFAEADSRQVS 320  
 CWNIKHELKPENVGVIYANPNFNFGTDMVDSKGLWFMMSGQPPIDEKMEYDVPQIRLMKVK 383  
 TKRAIKGEKCG 395

AAL11049 - 30 kDa protein

**MKRVVQCLVFFSILGLGYS**WRFPNRNGDQTYWAFNTCQRQTDDIESVKLWDQWLLPNNATH 61  
 CYIKCVFIHLGFYNEQEKAINIDAVKKQFKSRGLEIPKDIKLSLGR TDGSKALYEKTIPFFKNNF 127  
 QNLRIAFYGTREESDKWFAKHPEVKPKRTRVSEFC TAEKEKGETKNCRACSLYYYRFVDED 189  
 YQPIYFRKLDIAGITDKQINDCRDKAREKKGCKVGDALYRCLRLINKQGLIATMERLDIESWKY 253

AAL11050 - 32 kDa protein

**MSGHILTVGLIVVAHCATLSSSA**STIPIQSQGKDFPVPFVSEQTDDFYDDKFYDPDISDDNINEV 65  
 VRDNGRKGDRGSKSTPSGKESHPTATQTSGRRPSQSPCGESRPSGSATSGRRPSQSPRGE 126  
 SLPPATLAGRQNSRQQDRRQNKQPDLSKYKNSPAKYIFTTGNVDSGKTPDEERIFRTNRAEY 189  
 VLATGGPYDNYVVEIIDGPNPNDISLKQSTTMGGDSKILDNPNRNTIVGRIKTFKA 246

ABA54266 - 29 kDa protein

**MLKIKHLAVIVLVFTVQSQ**TDYCDRELCKSGNGEVRPHIGC NNGGQLAGNCPSDTEIVLT 62  
 EKQKNLFLKIHNR LRDRFARGAVKPFKPAAKMPMLKW NDELAKLAEFNVKTCCKFAHDKCRA 123  
 TEICRYAGQNLGQMOSYPNFDLINVAIKNI TREWFREYKDATQANTNKFTSGSNKGKQIGHFT 186  
 AFIHEKSDKVGC A VAKFTNDHSFKECLIACNYCYTNMMNEPIYTKGKPCSQCRRKKQCGLVYK 248  
 NLCPEDEEVDTTPEVLKKHRRGGQ 272

AAL11048 - 28 kDa protein

**MNAVITSLVFLSLVGLGYS**WKYPRNADQTLWAFRTCQRRES DNNILKKWYTWELPNDEKTHC 62  
 YVKCVWIHLGLYSKNTKSLRVN KIEKQFTSRGVAIPSDLKSM EGETDGSKAIYDKTISFFNNV 127  
 ADLRTAFYGTIEESNKWYAQNPDVKPKGT KISKFC AKNREQGESNCKHACSAYYYRLVDEDF 190  
 EPIHFRLL EIKGFSNEDIDECTKQTSGGQGCQRSDALYDCLKNKKSAALEAALQILDDQSARTY 254

AAL11047 - 15 kDa protein

**MKYLGLALISAVFLIGTCQAEN**PSKKCEEKFKNDASKMACIPHCKYQYYGFVAMDNNIAKPEI 63  
 RTFSNVLIKYNVVDKSLKADIRKIMHECAKVKKQAREDSHWLNCRTTINYR CILTDKRIGPQ 127  
 RFDRAIQEYDKTINI 142

AAL11046 - 14 kDa protein

**MKYLFAFVIIPLLYAEIAFG**FEHPEAFCIKKHKDTDFECILHCKFKYYNFVDDKYNIKDYHIRNLA 66  
DFLINYNVVPANKRRNVEAHLRSCVAKSIKKHRTPSCDSIFSYYTCITDEKLIYFNDYDNAIRRY 131  
DQTLTVVTRKN 142

AAL11045 - 12 kDa protein

**MKYFVVALISAVFFIGICQAL**NPSRKRLDYKDKVISESCILHCEYKAYGFANDKYDIKRKQIDQ 65  
FVDVLINGKAVASDKRQKLENLLRGCANKARGKNPKLGCHTSIDYYRCIVADQKLINYSKFVGA 129  
IIAYDKKINLN 140

## 8. Seznam použité literatury

- Abdeladhim, M., Ben Ahmed, M., Marzouki, S., Belhadj Hmida, N., Boussoffara, T., Belhaj Hamida, N., Ben Salah, A., Louzir, H.(2011). Human cellular immune response to the saliva of *Phlebotomus papatasi* is mediated by IL-10-producing CD8+ T cells and Th1-polarized CD4+ lymphocytes. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5, e1345.
- Abdeladhim, M., Jochim, R.C., Ben Ahmed, M., Zhioua, E., Chelbi, I., Cherni, S., Louzir, H., Ribeiro, J.M., Valenzuela, J.G..(2012). Updating the salivary gland transcriptome of *Phlebotomus papatasi* (Tunisian strain): the search for sand fly-secreted immunogenic proteins for humans. *PLoS ONE* 7, e47347.
- Ahmed, S.B., Kaabi, B., Chelbi, I., Derbali, M., Cherni, S., Laouini, D., Zhioua, E.(2010). Lack of protection of pre-immunization with saliva of long-term colonized *Phlebotomus papatasi* against experimental challenge with *Leishmania major* and saliva of wild-caught *Ph. papatasi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83, 512 – 514.
- Anderson, J.M., Oliveira, F., Kamhawi, S, et al. (2006).Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics* 7, 52.
- Andrade, B.B., Texeira, C.R., Barral, A., and Barral-Netto, M. (2005). Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 77, 665 – 693.
- Anjili, C.O., Mbatia, P.A., Mwangi, R.W., (1995). The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera, Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta Tropica* 60, 97 – 100.
- Arcà, B., Lombardo, F., de Lara Capurro, M., della Torre, A., Dimopoulos, G., James, A.A., Coluzzi, M. (1999). Trapping cDNAs encoding secreted proteins from the salivary glands of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96,1516 – 1521.
- Assumpção, T.C., Francischetti, I.M., Andersen, J.F., Schwarz, A., Santana, J.M., Ribeiro, J.M..(2008). An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 213 – 232.
- Bahia, D., Gontijo, N.F., Leon ,I.R., Perales, J., Pereira, M.H., Oliveira, G. (2007). Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology Research* 100, 449 – 454.
- Barbosa, S.E., Diotaiuti, L., Soares, R.P., Pereira, M.H. (1999). Differences in saliva composition among three Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae). *Acta Tropica* 72, 91 – 98.

- Barbosa, S.E., Diotaiuti, L., Braga, E.M., Pereira, M.H. (2004). Variability of the salivary proteins of 20 Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Acta Tropica* 92, 25 – 33.
- Barral, A., Honda, E., Caldas, A., Costa, J., Vinhas, V., Rowton, E.D., Valenzuela, J.G., Charlab, R., Barral-Netto, M., and 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.
- Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Ribeiro, J., and Sacks, D.L. (1998). Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: Powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *Journal of Experimental Medicine* 188, 1941 – 1953.
- Belkaid, Y., Valenzuela J.G., Kamhawi S., Rowton E., Sacks D.L., Ribeiro J.M.C. (2000). Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by sand fly? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6704 – 6709.
- Bezerra, H. S., Teixeira M. J. (2001). Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) Salivary Gland Lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection in BALB/c Mice. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 96, 349 – 351.
- Boulanger, D., Doucoure, S., Grout, L., Ngom, A., Rogerie, F., Cornelié, S., Sokhna, C., Mouchet F, Riveau G, Simondon F, Remoue FJ. Immunoglobulin G antibody profiles against *Anopheles* salivary proteins in domestic animals in Senegal. *Journal of Medical Entomology* 48, 691 – 693.
- Brake, D.K. a Pérez de León, A.A. (2012). Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*. *Parasites and Vectors* 5, 38.
- Cavalcante, R.R., Pereira, M.H., Gontijo, N.F. (2003). Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology* 127, 87 – 93.
- Cerna, P., Mikes, L., and Volf, P. (2002). Salivary gland hyaluronidase in various species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 1691 – 1697.
- Clements , M.F., Gidwani K., Kumar R., Hostomska J., Dinesh D.S., Kumar V., Das P., Müller I., Hamilton G., Volfova V., Boelaert M., Das M., Rijal S., Picado A., Volf P., Sundar S., Davies C.R. and 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.E., 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.
- Costa, D.J., Favali, C., Clarencio, J., Afonso, L., Conceicao, V., Miranda, J.C., Titus, R.G., Valenzuela, J., Barral-Netto, M., Barral, A., and Brodskyn, C.I. (2004). *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infection and Immunity* 72, 1298 – 1305.
- Cross, ML; Cupp, EW; Enriquez, EJ. (1994). Differential modulation of murine cellular immune responses by salivary gland extract of *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51, 690 – 696.
- de Moura, TR; Oliveira, F; Novais, FO, et al. (2007). Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following pre-exposure to sandfly saliva. *Plos Neglected Tropical Diseases* 1, e84.
- de Moura, T.R., Oliveira, F., Rodrigues, G.C., Carneiro, M.W., Fukutani, K.F., Novais, F.O., Miranda, J.C., Barral-Netto, M., Brodskyn, C., Barral, A., de Oliveira, C.I. (2010). Immunity to *Lutzomyia intermedia* saliva modulates the inflammatory environment induced by *Leishmania braziliensis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4, e712.
- Dan, A., Pereira, M.H., Pesquero, J.L., Diotaiuti, L., Beirão, P.S. (1999). Action of the saliva of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) on sodium channels. *Journal of Medical Entomology* 36, 875 – 879.
- David, J.R., Stamm, L.M., Bezerra, H.S., Souza, R.N., Killick-Kendrick, R., Lima, J.W.(2001). Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96, 839 – 847.
- Drahota, J., Lipoldova M., Volf, P., Rohousova I. (2009). Specificity of anti-saliva immune response in mice repeatedly bitten by *Phlebotomus sergenti*. *Parasite Immunology* 31, 766 – 770.
- Drahota, J., Martin-Martin, I., Sumova, P., Rohousova, I., Jimenez, M., Molina, R., Volf, P. (2014). Recombinant antigens from *Phlebotomus perniciosus* saliva as markers of canine exposure to visceral leishmaniasis vector. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8, e2597.
- Drame, P.M., Poinsignon, A., Besnard, P., Le Mire, J., Dos-Santos, M.A., Sow, C.S., Cornelie, S., Foumane, V., Toto, J.C., Sembene, M., Boulanger, D., Simondon, F., Fortes, F., Carnevale, P., Remoue, F. (2010). Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: An immuno-epidemiological biomarker to evaluate the efficacy of insecticide-treated nets in malaria vector control. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83, 115 – 121.

- Dorňáková, V., Salazar-Sanchez, R., Borrini-Mayori, K., Carrion-Navarro, O., Levy, M.Z., Schaub, G.A., Schwarz, A.(2014). Characterization of guinea pig antibody responses to salivary proteins of *Triatoma infestans* for the development of a triatomine exposure marker. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8, e2783.
- Doucoure, S., Mouchet, F., Cournil, A., Le Goff, G., Cornelié, S., Roca, Y., Giraldez, M.G., Simon, Z.B., Loayza, R., Misse, D., Flores, J.V., Walter, A., Rogier, C., Herve, J.P., Remoue, F.(2012). Human antibody response to *Aedes aegypti* saliva in an urban population in Bolivia: A new biomarker of exposure to Dengue vector bites. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 6, e1905.
- Francischetti, I.M., Valenzuela, J.G., Ribeiro, J.M.C. (1999). Anophelin: Kinetics and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry* 38, 16678 – 16685.
- Francischetti, I.M., Ribeiro, J.M.C., Champagne, D., Andersen, J.(2000). Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 12639 – 12650.
- Francischetti, I.M., Mather, T.N., Ribeiro J.M.C.(2005). Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Thrombosis and Haemostasis* 94, 167 – 174.
- Fontaine, A., Pascual, A., Orlandi-Pradines, E., Diouf, I., Remoué, F., Pagès, F., Fusaï, T., Rogier, C., Almeras, L.(2011). Relationship between exposure to vector bites and antibody responses to mosquito salivary gland extracts. *PLoS One* 6, e29107.
- Gillespie, R.D., Mbow, M.L., and Titus, R.G. (2000). The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunology* 22, 319 – 331.
- Gomes, R.B., Brodskyn, U., de Oliveira, C.I., Costa, J., Miranda, J.C., Caldas, A., Valenzuela, J.G., Barral-Netto, M., and Barral, A. (2002). Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *Journal Of Infectious Diseases* 186, 1530 – 1534.
- Gomes, R.B., Mendonça IL, Silva VC, Ruas J, Silva MB, Cruz MS, Barral A, Costa CH. (2007). Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cercopithecus thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101, 127 – 133.
- Gomes, R., Teixeira C, Teixeira MJ, Oliveira F, Menezes MJ, Silva C, de Oliveira CI, Miranda JC, Elnaïem DE, Kamhawi S, Valenzuela JG, Brodskyn CI. (2008). Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 7845 – 7850.

- Gomes, R. a Oliveira, F., The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on leishmania immunity. (2012). *Frontiers in Immunology* 3, 11.
- Gupta, R., Jung, E., Brunak, S. (2004). Prediction of N-glycosylation sites in human proteins; In preparation.
- Hall, L.R. a Titus, R.G.(1995) Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *Journal of Immunology* 155, 3501 – 3506.
- Hostomska, J., Rohousova I., Volfova 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.
- Hostomska J., Jochim R.C., Valenzuela J.G., Volf P. (2009) Analysis of salivary transcripts and antigens of the sand fly *Phlebotomus arabicus*. *BMC Genomics* 10, 282.
- Champagne, D.E., Nussenzveig, R.H., Ribeiro, J.M.C. (1995). Purification, partial characterization, and cloning of nitric oxide-carrying heme proteins (nitrophorins) from salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 8691 – 8695.
- Champagne, D.E. (2005). Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 34, 221 – 227.
- Charlab, R., Valenzuela, J.G., Rowton, E.D., and Ribeiro, J.M.C. (1999). Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 15155 – 15160.
- Chmelar, J., Anderson, J.M., Mu, J., Jochim, R.C., Valenzuela, J.G., Kopecký, J.(2008). Insight into the sialome of the castor bean tick, *Ixodes ricinus*. *BMC Genomics* 20, 233.
- Chmelar, J., Oliveira, C.J., Rezacova, P., Francischetti, I.M., Kovarova, Z., Pejler, G., Kopacek, P., Ribeiro, J.M., Mares, M., Kopecky, J., Kotsyfakis, M.(2011). A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood* 117, 736 – 744
- Inokuma, H., Ohno, K., Onishi, T.(2000). Is the detection of anti-*Rhipicephalus sanguineus* (Rs24p) antibodies a valuable epidemiological tool of tick infestation in dogs? *Veterinary Research* 31, 365 – 369.
- Jeon, S.H., Park, J.W., Lee, B.H.(2001). Characterization of human IgE and mouse IgG1 responses to allergens in three mosquito species by immunoblotting and ELISA. *International Archives of Allergy and Immunology* 126, 206 – 212.

- Kalvachova, P; Hribalova, V; Kodym, P, et al. (1999). Modulation of murine lymphocyte responsiveness by the saliva of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 36, 341 – 344.
- Kamhawi S., Belkaid Y., Modi G., Rowton E., Sacks D. (2000). Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290, 1351 – 1354.
- Kato, H; Anderson, JM; Kamhawi, S, et al. (2006). High degree of conservancy among secreted salivary gland proteins from two geographically distant *Phlebotomus duboscqi* sandflies populations (Mali and Kenya). *BMC Genomics* 7, 226.
- Kopecky, J. a Kuthejlova, M.(1998). Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity in vitro. *Parasite Immunology* 20, 169 – 174.
- Kovar, L., Kopecky, J., Rihova, B. (2001). Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick polarizes the cytokine profile toward Th2 and suppresses proliferation of T lymphocytes in human PBMC culture. *The Journal of Parasitology* 87, 1342 – 1348.
- Kovar, L., Kopecky J., Rihova, B.(2002). Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick modulates the host immune response towards the Th2 cytokineprofile. *Parasitology Research* 88, 1066 – 1072.
- Kubes, M., Fuchsberger, N., Labuda, M., Zuffova, E., Nuttall, P.A. (1994). Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity in vitro. *Immunology* 82, 113 – 116.
- Lanzaro, G.C., Lopes, A.H., 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.
- Larsen, J.E.P., Lund, O., Nielsen M. (2006). Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Research* 2, 2.
- Leboulle, G., Crippa, M., Decrem, Y., Mejri, N., Brossard, M., Bollen, A., Godfroid, E. (2002). Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 10083 – 10089.
- Lerner, E.A., Ribeiro, J.M.C., Nelson, R.J., and Lerner, M.R. (1991). Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 11234 – 11236.
- Londono-Renteria, B.L., Eisele, T.P., Keating, J., James, M.A., Wesson, D.M.(2010). Antibody response against *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) salivary protein as a measure of mosquito bite exposure in Haiti. *Journal of Medical Entomology* 47, 1156 – 1163.

- Mans, B.J., Calvo, E., Ribeiro, J.M.C, Andersen, J.F. (2007). The crystal structure of D7r4, a salivary biogenic amine-binding protein from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Journal of Biological Chemistry* 282: 36626 – 36633.
- Marzouki, S., Ben Ahmed, M., Boussoffara, T., Abdeladhim, M., Ben Aleya-Bouafif, N., Namane, A., Hamida, N.B., Ben Salah, A., Louzir, H.(2011). Characterization of the antibody response to the saliva of *Phlebotomus papatasi* in people living in endemic areas of cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 84, 653 – 661.
- Marzouki, S., Abdeladhim, M., Abdessalem, C.B., Oliveira, F., Ferjani, B., Gilmore, D., Louzir, H., Valenzuela, J.G., Ben Ahmed, M.(2012). Salivary antigen SP32 is the immunodominant target of the antibody response to *Phlebotomus papatasi* bites in humans. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6, e1911.
- Mbow, M.L., Bleyenbergh J.A., Hall R.L., Titus R.G. (1998). *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, 161: 5571 – 5577.
- Melo, M.N., Williams P., Tafuri W.L. (2001). Influence of lysates of the salivary glands of *Lutzomyia longipalpis* on the development of a *Leishmania major*-like parasite in the skin of the golden hamster. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 95, 59 – 68.
- Mencke, N., Volf, P., Volfova, V., Stanneck, D.(2003). Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) in dogs. *Parasitology Research* 90, 108 – 111.
- Milleron, R.S., Mutebi J.P., Valle S., Montoya A., Yin H., Soong L.,Lanzaro G.C. (2004). Antigenic diversity in maxadilan, a salivary protein from the sand fly vector of american visceral leishmaniasis. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 70, 286 – 283.
- Morris, R.V.; Shoemaker, C.B.; David, J.R., Lanzaro G.C., Titus R.G. (2001). Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *Le. major* infection. *Journal of Immunology* 167, 5226 – 5230.
- Nascimento, E.P., dos Santos Malafrente, R., Marinotti, O.(2000). Salivary gland proteins of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Archives of Insect Biochemistry and Fysiology* 43, 9 – 15.
- Nascimento, R.J., Santana, J.M., Lozzi, S.P., Araujo, C.N., and 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.

- Oliveira, F., Kamhawi, S., Seitz, A.E., Pham, V.M., Guigal, P.M., Fischer, L., Ward, J., and 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, PG; 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.
- Otranto, D., Paradies, P., Lia, R.P., Latrofa, M.S., Testini, G., Cantacessi, C., Mencke, N., Galli, G., Capelli, G., Stanneck, D. (2007). Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelledogs in an endemic area. *Veterinary Parasitology* 144, 270 – 278.
- Paranhos-Silva, M., Oliviera, G.G.S, Reis, E.A., Menezes R.M.C., Fernandes O., Sherlock Í., Gomes R.B.B., Pontes-de-Carvalho L.C., dos-Santos W.L.C. (2003). A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Veterinary Parasitology* 114, 97 – 111.
- Peng, Z., Yang M., Simons, F.E. (1996). Immunologic mechanisms in mosquito allergy: Correlation of skin reactions with specific IgE and IgG antibodies and lymphocyte proliferation response to mosquito antigens. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 77, 238 – 244.
- Peng, Z. a Simons, F.E.R. (1998). A prospective study of naturally acquired sensitization and subsequent desensitization to mosquito bites and concurrent antibody responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 101, 284 – 287.
- Peng, Z., Li, H., Simons, F. E.(1998). Immunoblot analysis of salivary allergens in 10 mosquito species with worldwide distribution and the human IgE responses to these allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 101, 498 – 505.
- Peng, Z. a Simons, F.E.(2004). Mosquito allergy: Immune mechanisms and recombinant salivary allergens. *International Archives of Allergy and Immunology* 133, 198 – 209.
- Pereira, M.H. , Souza, M.E., Vargas, A.P., Martins, M.S., Penido, C.M., Diotaiuti, L.(1996). Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/Triatominae). *Acta Tropica* 61, 255 – 261.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8,785 – 786.
- Prevot, P.P., Adam, B., Boudjeltia, K.Z., Brossard, M., Lins, L., Cauchie, P., Brasseur, R., Vanhaeverbeek, M., Vanhamme, L., Godfroid, E.(2006). Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 26361 – 26369.

- Ribeiro, J.M.C. (1982). The antiserotonin and antihistamine activities of salivary secretion of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology* 28, 69 – 75.
- Ribeiro, J.M.C., Makoul, G.T., Levine, J., Robinson, D.R., Spielman, A.(1985). Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *The Journal of Experimental Medicine* 161, 332 – 344.
- Ribeiro, J.M.C., Rossignol, P.A., and Spielman, A. (1986). Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 83A, 683 – 686.
- Ribeiro, J.M.C. (1987). Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annual Review of Entomology* 32, 463 – 478.
- Ribeiro, J.M.C., Vachereau, A., Modi, G.B., Tesh, R.B.(1989 A). A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Science* 243, 212 – 214.
- Ribeiro, J.M.C. (1989 B). Vector saliva and its role in parasite transmission. *Experimental Parasitology* 69, 104 – 106.
- Ribeiro, J.M.C. (1995 A). Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infectious Agents and Disease* 4, 143 – 152.
- Ribeiro, J.M.C., Schneider, M., Guimarães, J.A.(1995 B). Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *The Biochemical Journal* 308, 243 – 249.
- Ribeiro, J.M.C., Schneider, M., Isaias, T., Jurberg, J., Galvão, C., Guimarães, J.A.(1998). Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). *Journal of Medical Entomology* 35, 599 – 610.
- Ribeiro, J.M.C., Katz, O., Pannell, L.K., Waitumbi, J., Warburg, A. (1999). Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *The Journal of Experimental Biology* 202, 1551-1559.
- Ribeiro, J.M.C. (2000). Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). *Medical and Veterinary Entomology* 14, 142 – 148.
- Ribeiro, J.M.C. and Modi, G. (2001). The salivary adenosine/AMP content of *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti, the main vector of human kala-azar. *Journal Of Parasitology* 87, 915 – 917.
- Ribeiro, J.M.C., Francischetti, I.M. (2001). Platelet-activating-factor-hydrolyzing phospholipase C in the salivary glands and saliva of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *The Journal of Experimental Biology* 204, 3887 – 3894.

- Ribeiro, J.M.C. a Francischetti, I.M.(2003). Role of arthropod saliva in blood feeding: Sialome and post-sialome perspectives. *Annual Review of Entomology* 48, 73 – 88.
- Ribeiro, J.M.C., Charlab, R., Pham, V.M., Garfield, M., Valenzuela, J.G.(2004). An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 543 – 563
- Ribeiro, J.M.C., Arcà, B., Lombardo, F., Calvo, E., Phan, V.M., Chandra, P.K., Wikel, S.K. (2007). An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics* 8, 6.
- Ribeiro, J.M.C. a Arcà, 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., Arca, B. (2010) An insight into the sialome of bloodfeeding Nematocera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40, 767 – 784.
- Rizzo, C., Ronca, R., Fiorentino, G., Verra, F., Mangano, V., Poinignon, A., Sirima, S.B., Nèbiè, I., Lombardo, F., Remoue, F., Coluzzi, M., Petrarca, V., Modiano, D., Arcà, B. (2011). Humoral response to the *Anopheles gambiae* salivary protein gSG6: A serological indicator of exposure to Afrotropical malaria vectors. *PLoS One* 6, e17980.
- Rohousova, I., Ozensoy, S., Ozbel, Y., and Volf, P. (2005 A). Detection of species specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* 130, 493 – 499.
- Rohousova, I., Volf, P., Lipoldova, M. (2005 B). Modulation of murine cellular immune response and cytokine production by salivary gland lysate of three sand fly species. *Parasite Immunology* 27, 469 – 473.
- Rohousova, I., Hostomska, J., Vlkova, M., Kobets, T., Lipoldova, M., Volf, P. (2011). The protective effect against leishmania infection conferred by sand fly bites is limited to short-term exposure. *International Journal for Parasitology* 41, 481 – 485.
- Rohousova, I., Volfova V, Nova, S., Volf, P. (2012). Individual variability of salivary gland proteins in three *Phlebotomus* species. *Acta Tropica* 122, 80-86.
- Samuelson, J., Lerner E., Tesh R., Titus R. (1991). A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *Journal Of Experimental Medicine* 173, 49 – 54.
- Sanders, M.L., Glass, G.E., Scott, A.L., Schwartz, B.S.(1998 A). Kinetics and cross-species comparisons of host antibody responses to lone star ticks and American dog ticks(Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 35, 849 – 856.



- Sanders, M.L., Jaworski, D.C., Sanchez, J.L., DeFraités, R.F., Glass, G.E., Scott, A.L., Raha, S., Ritchie, B.C., Needham, G.R., Schwartz, B.S. (1998 B). Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59, 279 – 285.
- Schneider, B.S. a Higgs, S. (2008). The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102, 400 – 408.
- Schwartz, B.S., Ford, D.P., Childs, J.E., Rothman, N., Thomas, R.J.(1991). Anti-tick saliva antibody: a biologic marker of tick exposure that is a risk factor for Lyme disease seropositivity. *American Journal of Epidemiology* 134, 86 – 95.
- Schwarz, A., Sternberg, J.M., Johnston, V., Medrano-Mercado, N., Anderson, J.M., Hume, J.C., Valenzuela, J.G., Schaub, G.A., Billingsley, P.F.(2009 A). Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. *International Journal for Parasitology* 39, 1021 – 1029.
- Schwarz, A., Helling, S., Collin, N., Teixeira, C.R., Medrano-Mercado, N., Hume, J.C., Assumpção, T.C., Marcus, K., Stephan, C., Meyer, H.E., Ribeiro, J.M., Billingsley, P.F., Valenzuela, J.G., Sternberg, J.M., Schaub, G.A.(2009 B). 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., Juarez, J.A., Richards, J., Rath, B., Machaca, V.Q., Castro, Y.E., Málaga, E.S., Levy, K., Gilman, R.H., Bern, C., Verastegui, M., Levy, M.Z.(2011). Anti-triatomine saliva immunoassays for the evaluation of impregnated netting trials against Chagas disease transmission. *International Journal for Parasitology* 41, 591 – 594.
- Silva, F., Gomes, R., Prates, D., Miranda, J.C., Andrade, B., Barral-Netto, M., and Barral, A. (2005). Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 72, 94 – 98.
- 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-Netto, M., Barral, A. (2010). Using Recombinant Proteins from *Lutzomyia Longipalpis* Saliva to Estimate Human Vector Exposure in Visceral Leishmaniasis Endemic Areas. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4, e649.

- Stark, K.R. a James, A.A.(1996). Salivary gland anticoagulants in culicine and anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 33, 645 – 650.
- Stark, K.R. a James, A.A.(1998). Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *The Journal of biological chemistry* 273, 20802 – 20809.
- Szabó, M.P., Aoki, V.L., Sanches, F.P., Aquino, L.P., Garcia, M.V., Machado, R.Z., Bechara, G.H.(2003). Antibody and blood leukocyte response in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) tick-infested dogs and guinea pigs. *Veterinary Parasitology* 115, 49 – 59.
- Tavares, N.M., Silva, R.A., Costa, D.J., Pitombo, M.A., Fukutani, K.F., Miranda, J.C., Valenzuela, J.G., Barral, A., de Oliveira, C.I., Barral-Netto, M., Brodskyn, C. (2011). *Lutzomyia longipalpis* saliva or salivary protein LJM19 protects against *Leishmania braziliensis* and the saliva of its vector, *Lutzomyia intermedia*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5, e1169.
- Teixeira, C.R., Teixeira, M.J., Gomes, R.B.B., Santos, C.S., Andrade, B.B., Raffaele-Netto, I., Silva, J.S., Guglielmotti, A., Miranda, J.C., Barral, A., Brodskyn, C., Barral-Netto M. (2005). Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *Journal of Immunology* 175, 8346 – 8353.
- Teixeira, C.R., Gomes, R., Collin, N., Reynoso, D., Jochim, R., Oliveira, F., Seitz, A., Elnaiem, Dia-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.
- Theodos, C.M., Ribeiro, J.M.C., and Titus, R.G. (1991). Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on leishmania infection in mice. *Infection and Immunity* 59, 1592 – 1598.
- Theodos, CM. a Titus, RG. (1993). Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. *Parasite Immunology* 15, 481 – 487.
- Thiakaki, M., Rohoušová I., Volfová, V., Volf, P., Chang, K.P., Soteriadou, K. (2005). Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis* – BALB/c mouse model. *Microbes and infection* 7, 760 – 766.
- Titus, R.G. a Ribeiro, J.M.C. (1988). Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239, 1306 – 1308.
- Valenzuela, J.G., Francischetti, I.M., Ribeiro, J.M.C.(1999). Purification, cloning, and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*. *Biochemistry* 38, 11209 – 11215.

- Valenzuela, J.G., Belkaid, Y., Garfield, M.K., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E.D., Sacks, D.L., and Ribeiro, J.M.C. (2001). Toward a defined anti-leishmania vaccine targeting vector antigens: Characterization of a protective salivary protein. *Journal Of Experimental Medicine* 194, 331 – 342.
- Valenzuela, J.G., Charlab, R., Gonzalez, E.C., de Miranda-Santos, I.K.F., Marinotti, O., Francischetti, I.M.B. (2002). The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera. *Insect Molecular Biology* 11, 149-155.
- 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*. *Journal of Experimental Biology* 207, 3717 – 3729.
- Vinhas, V., Andrade, B.B., Paes, F., Bomura, A., Clarencio, J., Miranda J.C., Báfica, A., Barral, A., Barral-Netto, M. (2007). Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. *European Journal of Immunology* 37, 3111 – 3121.
- Vlková, M., Rohousova, I., Drahota, J., Stanneck, D., Krudewagen, 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 Disease* 5, e1344.
- Vlková, M., Rohousova, I., Hostomska, J., Pohankova, L., Zidkova, L., Drahota, J., Valenzuela, J.G., Volf P. (2012). Kinetics of antibody response in BALB/c and C57BL/6 mice bitten by *Phlebotomus papatasi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6, e1719
- Volf, P., Grubhoffer, L., Hosek, P.(1993). Characterisation of salivary gland antigens of *Triatoma infestans* and antigen-specific serum antibody response in mice exposed to bites of *T. infestans*. *Veterinary Parasitology* 47, 327 – 337.
- Volf, P. a Rohousova, I. (2001). Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology* 122, 37 – 41.
- Volf, P. a Volfova, V. (2011). Establishment and maintance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology* 36, S1 – 9.
- Volfova, V., Hostomska, J., Cerny, M. (2008). Hyaluronidase of bloodsucking insects and its enhancing effect on leishmania infection in mice. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2, e294.
- Waitayakul, A., Somsri, S., Sattabongkot, J., Looareesuwan, S., Cui, L.W., Udomsangpetch, R. (2006). Natural human humoral response to salivary gland proteins of *Anopheles* mosquitoes in Thailand. *Acta Tropica* 98, 66 – 73.
- Wang, H., Kaufman, W.R., Nuttall, P.A.(1999). Molecular individuality: Polymorphism of salivary gland proteins in three species of ixodid tick. *Experimental & Applied Acarology* 23, 969 – 975.

- Wanasen, N., Nussenzveig, R.H., Champagne, D.E., Soong L., Higgs S. (2004). Differential modulation of murine host immune response by salivary gland extracts from the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Medical and Veterinary Entomology* 18,191 – 199.
- Warburg, A., Saraiva, E., Lanzaro, G.C., Titus, R.G., Neva, F. (1994). Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 345, 223 – 230.
- Wasserman, HA; Singh, S; Champagne, DE. (2004). Saliva of the Yellow Fever mosquito, *Aedes aegypti*, modulates murine lymphocyte function. *Parasite Immunology* 26, 295 – 306.
- Yoshida, S., Sudo, T., Niimi, M., Tao, L., Sun, B., Kambayashi, J., Watanabe, H., Luo, E., Matsuoka, H. (2008). Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline antiplatelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. *Blood* 111, 2007 – 2014.