

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra parazitologie**

Studijní program Biologie

Studijní obor Biologie



Vítězslav Gottfried

**Srovnání metod molekulární identifikace flebotomů**

Comparison of molecular methods for identification of sand flies

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Vít Dvořák, PhD.

Praha 2015

**Prohlášení:**

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

V Praze dne 1.8.2015

**Poděkování:**

Děkuji svému školiteli za obětavou pomoc a trpělivost při sepisování této práce.

## Abstrakt

Flebotomové jsou významní trapiči a přenašeči medicínsky a veterinárně významných virových, bakteriálních a protozoárních onemocnění, kteří se především vyskytují v subtropických a tropických oblastech celého světa. Nejvýznamnějším přenášeným onemocněním je leishmanióza.

V současnosti je popsáno více než 900 druhů a poddruhů podčeledi Phlebotominae rozdělených do 32 rodů. Jejich taxonomie není dosud ustálena. Morfologická identifikace jednotlivých druhů je časově náročná, u některých druhů dokonce nemožná. Pro druhovou identifikaci flebotomů jsou proto používány molekulární metody. V této práci jsou popsány metody založené na zkoumání molekulárních struktur, případně etologických projevů flebotomů. Všechny tyto metody byly použity k druhové identifikaci flebotomů, k čemuž jsou v jednotlivých kapitolách uvedeny příklady a výhody a nevýhody jejich použití.

**Klíčová slova:** *Phlebotomus*, Phlebotominae, molekulární identifikace, morfologická identifikace

## Abstract

Phlebotomine sand flies are vectors of important human and veterinary infectious diseases which are distributed mainly in subtropical and tropical areas around the world. The most important transmitted infection is leishmaniosis.

Over 900 species and subspecies of Phlebotominae subfamily have been described and classified into 32 genera. Their taxonomy has not been fully resolved yet. Morphological identification of each species is time-consuming, some species are even morphologically undefinable. For these reasons the molecular methods of identification are used. The methods described in this bachelor thesis study molecular structures and etologic displays. All these methods had been used for species identification of sand flies and are followed by examples of usage, advantages and disadvantages.

**Key words:** *Phlebotomus*, Phlebotominae, molecular identification, morphology identification

## Seznam zkratek

BOLD	Barcode of Life database
COI	podjednotka I cytochromoxidázy
cyt <i>b</i>	cytochrom <i>b</i>
DNA	deoxyribonucleic acid
EF- $\alpha$	elongation factor $\alpha$
iBOL	international Barcode of Life
IG1	indeterminate gametophyte
ITS	internal transcribed spacer
<i>Lu.</i>	<i>Lutzomyia</i>
MALDI TOF MS	matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry
N-J	neighbor joining
ND4	podjednotka NADH dehydrogenázy
PCR	polymerase chain reaction
<i>Ph.</i>	<i>Phlebotomus</i>
RAPD	random amplified polymorphic DNA
rDNA	ribosomal deoxyribonucleic acid
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
<i>Se.</i>	<i>Sergentomyia</i>

# Obsah

1 Úvod .....	1
2 Morfologická identifikace.....	2
2.1 Určování dospělců .....	2
2.1.1 Hlava.....	2
2.1.2 Hrud'.....	3
2.1.3 Zadeček.....	3
2.2 Určování larev.....	4
2.3 Určování vajíček.....	5
2.4 Limity morfologické identifikace .....	5
3 Molekulární metody identifikace .....	7
3.1 Sekvenování DNA .....	7
3.1.1 DNA barcoding.....	8
3.1.2 Ostatní sekvenované geny .....	10
3.2 RFLP (restriction fragment length polymorphism) analýza.....	13
3.3 DNA hybridizace .....	15
3.4 PCR (polymerase chain reaction) .....	15
3.5 RAPD (random amplified polymorphic DNA) .....	16
3.6 Metoda založená na analýze proteinů .....	16
4 Analýza feromonů .....	18
5 Analýza zvukových projevů .....	18
6 Diskuze a závěr .....	19
7 Použitá literatura.....	22

## 1 Úvod

Zástupci podčeledi flebotomů (*Phlebotominae*) jsou, jak jejich název (*phlebos* = žíla a *tome* = řez) napovídá, hematofágní hmyz. Patří do řádu dvoukřídlí (*Diptera*), podřádu dlouhoroží (*Nematocera*) a čeledi koutulovití (*Psychodidae*). V současnosti je popsáno přes 900 žijících druhů a poddruhů flebotomů (shrnuťo v Depaquit, 2014), rozdělených do 32 rodů.

Flebotomové jsou významní trapiči a přenašeči virových, bakteriálních a protozoárních infekčních onemocnění člověka a domácích i volně žijících zvířat. Viry přenášené flebotomy patří do tří skupin (*Bunyviridae*, *Rhabdoviridae* a *Reoviridae*) a u lidí způsobují horečnatá a neuroinvasivní onemocnění. V posledních letech začala být výzkumu těchto virů věnována větší pozornost vzhledem k narůstající incidenci jimi způsobených onemocnění. Flebotomové rodu *Lutzomyia* přenášejí bakterii *Bartonella spp.* způsobující Carriónovu nemoc. Nejvýznamnějším protozoárním onemocněním přenášeným flebotomy je leishmanióza, způsobená prvky rodu *Leishmania*. Leishmaniózou je ohroženo 350 miliónů lidí žijících v tropických a subtropických oblastech celého světa, každý rok jsou leishmaniózou nakaženy dva milióny lidí (WHO, 2010). Předpokládaným nebo potvrzeným přenašečem lidské leishmaniózy je 98 druhů flebotomů (shrnuťo v Maroli et al., 2013). Všechny tyto druhy patří do dvou rodů, rodu *Phlebotomus* ve Starém světě a rodu *Lutzomyia* v Novém světě (Killick-Kendrick, 2002).

Přes velký lékařský a veterinární význam flebotomů není v recentně publikovaných pracích taxonomii věnována dostatečná pozornost. Poslední práce věnující se celkovému taxonomickému přehledu skupiny flebotomů byly publikovány v osmdesátých letech minulého století (Lane, 1986; Lewis, 1982). Tyto práce jsou založeny na popisu morfologických struktur determinujících jednotlivé druhy. Ačkoliv od té doby byly mnohé druhy synonymizovány a u jiných byly naopak pečlivějším morfologickým přístupem nebo použitím molekulárních metod popsány nové, dříve kryptické druhy, nebyla žádná nová souhrnná taxonomická studie takového rozsahu doposud publikována.

V této práci bych chtěl popsat morfologické struktury flebotomů používané pro druhovou identifikaci a uvést příklady jejich nedostatečnosti pro rozlišování některých druhů. V hlavní části se budu věnovat popisu molekulárních identifikačních metod, které byly dosud u flebotomů použity, a na závěr porovnání jejich aplikace s klasickým morfologickým přístupem.

## 2 Morfologická identifikace

### 2.1 Určování dospělců

Pro morfologickou identifikaci flebotomů je nutné nejprve odlišit samce a samice. Pohlavní dimorfismus této skupiny je značný a pro identifikaci každého pohlaví v rámci jednoho druhu se používají jiné morfologické znaky. Nejvýznamnějším znakem pohlavního dimorfismu jsou velké vnější genitální přívěsky u samců sloužící k uchopení samice při kopulaci. Tyto struktury pochopitelně u samic chybí a morfologické struktury jejich pohlavních orgánů jsou z větší části internalizovány (Lewis, 1982).

#### 2.1.1 Hlava

Na hlavě se nachází mnoho taxonomicky významných struktur. Dominují zde dvě velké oddělené složené oči. Mezi očima vyrůstají z hlavy tykadla sestávající ze šestnácti článků. První článek je prstenčitý, druhý je kulovitý a články 3 – 14 jsou víceméně válcovitého tvaru. Mezidruhově významným znakem je poměr délek jednotlivých článků (Young a Duncan, 1994). Pro určení podrodu flebotomů je významný poměr délky třetího článku ku délce horního pysku (Lewis, 1982). Na člancích tykadel jsou ascoidy. Jde o struktury se sensorickými funkcemi a jsou mezidruhově morfologicky a početně velmi diverzifikované. Dle počtu askoidů na jednotlivých člancích tykadel se vytvoří tykadlový vzorec (např. 2/3 – 15 znamená, že na 3. – 15. článku je po dvou askoidech) (Artemiev, 1975). Jedním z charakteristických znaků pro podrod *Adlerius* je absolutní délka ascoidu na čtvrtém tykadlovém článku a relativní délka k danému článku (Artemiev, 1980). Dalším významným znakem jsou palpy. Ty mají pět článků, z nichž první je vždy nejkratší (Young a Duncan, 1994). Podobně jako u tykadel se u palp zjišťuje poměr délek jednotlivých článků. Tím vzniká tzv. palpální vzorec.

Ústní ústrojí flebotomů je bodavě sací. Sosák samic se skládá z kusadel, čelistí a hypofaryngu, jež jsou kryty dorzálně horním pyskem a ventrálně spodním pyskem. Kusadla jsou ostrá s ozubením na vnitřní straně. U samců jsou všechny části zmenšené, kusadla úplně chybí. Významným znakem čelistí je jejich tvar a dvě řady zubů. Jedna řada zubů je na vnější straně poblíž vrcholu a druhá, vzdálenější od vrcholu, je na vnitřní straně. Podle střečovitého nebo hákovitého tvaru čelisti flebotomové preferují pro sání krve plazy, respektive savce (Lewis, 2009). *Hypofarynx* může mít u svého konce pilovitou strukturu. Její přítomnost je charakteristická pro rod *Phlebotomus*, její absence značí naopak rod

*Sergentomyia* (Artemiev, 1975). U horního pysku je pro morfologickou identifikaci důležitá délka a tvar jeho zakončení.

Na sosák navazuje vnitřní struktura *cibarium*. V cibariu jsou pozorovatelné přední a zadní zuby, u některých flebotomů rodu *Lutzomyia* i boční zuby. Na zadní straně cibaria může být pigmentová skvrna, což je ztluštěnina chitinózního plátu tvořícího *cibarium*, kde se upínají svaly. Další navazující vnitřní strukturou je hltan. Hltan je tvořen třemi chitinózními destičkami a má většinou kuželovitý tvar. Na distálním konci hltanu mohou být různé struktury - zuby, jehličky nebo šupiny. Tvar, počet, velikost a rozložení zubů cibaria a hltanu jsou mezidruhově i mezirodově velmi významné.

### 2.1.2 Hruď

Hruď je tvořena třemi články. Každý článek nese po jednom páru končetin. Na druhém článku je navíc jeden pár křídel a na třetím je pár redukovaných křídel – kyvadélek. Nejčastěji používanými znaky z oblasti hrudi jsou skladba a délky žilek na křídlech. Tvar křídel je mezirodově odlišný, u rodu *Sergentomyia* jsou křídla užší a špičatější na rozdíl od rodu *Phlebotomus*. Na křídlech se měří délky jednotlivých žilek, případně poměry jejich délek. Byl vypracován morfometrický systém křídel s třinácti body. Na základě těchto bodů byly definovány rozměry označené řeckými písmeny (zpracováno dle Passerat de Silans et al., 1996):

- $\alpha$  – délka druhé radiální žilky od rozvětvení s třetí radiální žilkou po vrchol křídla,
- $\beta$  – délka druhé a třetí radiální žilky před jejich rozdělením,
- $\gamma$  – délka druhé, třetí a čtvrté radiální žilky od oddělené páté radiální žilky po jejich rozdělení,
- $\delta$  – část první radiální žilky přesahující úroveň rozdělení druhé a třetí radiální žilky, může nabývat kladných i záporných hodnot,
- $\pi$  – vzdálenost od úrovně oddělení třetí a čtvrté radiální žilky od druhé radiální žilky k rozdělení první a druhé mediální žilky.

### 2.1.3 Zadeček

Jak uvádím na začátku kapitoly, na zadečku je pod lupou případně i pouhým okem rozlišitelné, zda se jedná o samce či samici. U samců jsou přítomny velké vnější pohlavní přívěsky. Zadeček byl původně tvořen deseti články.

Vnější genitálie samců se vytvořily ze dvou článků, jejich částmi jsou *coxit* s navazujícím stylem, *paramer*, *aedeagus* a *surstyle*. Všechny tyto struktury jsou párové. U



všech výše jmenovaných struktur je morfologicky významný jejich tvar, velikost a vzájemná relativní velikost. Z coxitu se na bázi vnitřní strany může oddělovat lalok. Na coxitu, případně na odděleném laloku, mohou být shluky chlupů. Významný je jejich počet a vzdálenost distálního okraje chlupového shluku od báze coxitu (Artemiev, 1980). Na stylu je několik trnů, jejichž počet, umístění a velikost jsou i mezirodově významné. Pod coxitem se nachází *paramer*. Ten může nabývat různých tvarů, může být rozdvojený i roztrojený, což je důležitým znakem pro určení druhu (Young a Duncan, 1994). *Surstyle* je na dorzální straně. Je to dlouhá válcovitá struktura, na které mohou být trny, typicky u rodu *Phlebotomus* (Lewis, 1982). *Aedeagus* je tmavý, často velmi sklerotizovaný, samčí reprodukční orgán. Na bázi se oba *aedeagi* spojují v jeden (Young a Duncan, 1994). Pro morfologickou identifikaci je důležitá jeho délka a tvar zakončení. Především u podrodu *Adlerius* je důležitým znakem tvar zářezu na aedeagu (Artemiev, 1980). Samčí vnitřní pohlavní orgány používané jako znak pro určení druhu jsou genitální filamenta a spermatická pumpa. Měří se jejich absolutní délka a používá se i jejich vzájemná relativní délka.

U samic je vnější strukturou, užívanou pro morfologickou identifikaci, pohlavní štítek vytvořený na ventrální straně devátého článku. Tento štítek je tvořen dvěma trojúhelníkovými pláty různých rozměrů a tvarově se lišícím otvorem mezi nimi (Mukhopadhyay a Ghosh, 1997). Vnitřní genitálie samic jsou nejčastěji používanou strukturou pro jejich druhovou identifikaci. Jsou jimi spermatéky a jejich kanálky. Spermatéka je párová, může být samostatně na dlouhém spermatickém kanálku nebo mohou být blízko sebe na krátkých kanálcích spojujících se ve společný spermatický kanálek. Mezirodově je významný tvar spermaték. Jejich povrch na preparátu ve světelném mikroskopu může být hladký, neúplně článkovaný nebo článkovaný. Na vrcholu spermatéky je hlavička, jež může být na různě dlouhém krčku. Na hlavičce mohou být přítomné „chlupy“, které jsou ve skutečnosti mezibuněčnými kanálky sekrečních buněk obklopujících spermatéku. Délka krčku a případná přítomnost límce okolo hlavičky jsou mezidruhově specifické (Artemiev, 1991).

## 2.2 Určování larev

Morfologickými znaky, které byly použity k druhové identifikaci larválních stádií flebotomů, jsou spirakuly. Larvy jich mají po jednom páru na hrudi a zadečku. Na obrázcích ze skenovacího elektronového mikroskopu je vidět střední plát obklopený kruhem výběžků. V průběhu vývoje larev je jejich počet velmi variabilní. Až u čtvrtého larválního stádia je

možné některé druhy odlišit (Fausto et al., 1999, 1998). Praktický význam má tato identifikace malý, jelikož je velmi těžké v terénu larvy najít.

### 2.3 Určování vajíček

U několika druhů flebotomů převážně z Nového světa byly popsány morfologické znaky pro druhovou identifikaci vajíček. Základem pro tuto identifikaci je jejich povrchový vzor, který je vytvořen choriovým obalem. Vzory mohou být například polygonální nebo spojitě či nespojitě podélné rýhy. Tyto struktury jsou viditelné pouze za použití skenovacího elektronového mikroskopu. Podle závěru studie, věnující se druhové identifikaci vajíček u pěti druhů rodu *Lutzomyia* (*Lutzomyia anthophora*, *Lu. cruciata*, *Lu. diabolica*, *Lu. shannoni* a *Lu. vexator*), není identifikace možná na základě velikosti, protože je u nich velká vnitrodruhová variabilita (Endris et al., 1987). Praktické použití druhové identifikace pomocí vajíček je popsáno u osmi morfologicky velmi podobných samic (*Lutzomyia townsendi*, *Lu. youngi*, *Lu. spinicrassa*, *Lu. evansi*, *Lu. lichyi*, *Lu. trinidadensis*, *Lu. venezuelensis* a *Lu. olmeca bicolor*) vyskytujících se ve stejném areálu ve Venezuele. Tyto samice byly chyceny, pokud nebyly nasáté krví, případně gravidní, byly v laboratorních podmínkách nakrmeny. Následně byly jednotlivě umístěny do lahviček a po vykladení byla vajíčka zafixována a určena do druhu (Felicangeli et al., 1993). Tato metoda při soudobém rozvoji molekulárních identifikačních metod již nemá pro svoji náročnost význam. Sběr vajíček v terénu není pro jejich velikost a způsob kladení flebotomů prakticky možný.

### 2.4 Limity morfologické identifikace

Ačkoli je morfologický popis flebotomů velmi podrobný, některé druhy mají nejasné rozlišovací znaky. Z předcházejícího výčtu znaků je zřejmé, že samci mají více morfologicky variabilních terminálií na zadečku a tudíž je většinou snazší jejich druhová identifikace. Příkladem morfologicky téměř nerozlišitelných samic je *Ph. papatasi* a *Ph. duboscqi*, kde jako nejjednodušší morfologická identifikace je popsáno skenování genitálního plátu pomocí elektronového mikroskopu (Mukhopadhyay a Ghosh, 1997).

Vzhledem k pohlavnímu dimorfismu může být obtížné přiřadit k sobě samce a samice jednoho druhu. Jedním takovým příkladem je *Phlebotomus betisi* z Malajsie. Samice byly popsány v šedesátých letech minulého století (Lewis a Wharton, 1963). Samci byli přiřazeni k tomuto druhu na základě odchytu ve stejné lokalitě a zároveň to byli zde jediní odchycení samci podrodu *Larrousius*. Příslušnost k tomuto rodu potvrzuje tvar zakončení aedeagu.

Samci i samice se zároveň shodovali v sekvenci mitochondriálního ND4 genu. Odchyceni a popsání byli až nedávno (Khadri et al., 2008).

Na základě poměru délek třetího tykadlového článku a epifaryngu byla definována morfologická odlišnost dvou druhů, jejichž areály výskytu se z 95 % překrývají. Jsou jimi *Ph. perniciosus* a *Ph. longicuspis*. Rozsahy poměrů délek výše zmíněných struktur se však pro oba druhy částečně překrývají, tudíž někteří jedinci jsou nerozlišitelní (Collantes a Martinez-Ortega, 1996).

Další těžko rozlišitelnou skupinou flebotomů je druhový komplex *Ph. major*. Morfologická identifikace samic této skupiny je většinou založena na délce společného spermatického kanálku a relativních rozměrech hltanu. Měření těchto struktur vyžaduje použití speciálních technik přípravy preparátu (Kasap et al., 2013).

*Phlebotomus chinensis* a *Ph. sichuanensis* jsou nejvýznamnějšími přenašeči viscerální leishmaniózy v Číně. Jejich areály rozšíření se překrývají. Jejich morfologické odlišení je definováno počtem chlupů na coxitu, 20 – 27 u *Ph. chinensis* oproti 34 – 37 u *Ph. sichuanensis* (Yan-Jia a Zhi-Cheng, 1983). Každý druh je přenašečem leishmaniózy v jiné nadmořské výšce (Zhang et al., 2013).

Dalším limitním faktorem pro morfologickou identifikaci je výskyt anomálií v důležitých znacích vedoucích dle klíče k určení druhu. Příkladem je práce zabývající se samci *Lutzomyia shannoni* (Florin et al., 2010). Ti byli odchyceni na stejné lokalitě, avšak lišili se v počtu trnů na gonostylu. Jeden z nich měl nadpočetný pátý trn. Molekulární analýzou byla potvrzena příslušnost k druhu *Lu. shannoni*.

Pro morfologickou identifikaci je velmi limitující, že v posledních třech desetiletích nedochází k jejímu dostatečnému rozvoji. Dříve byly vydávány rozsáhlé taxonomické klíče k určování flebotomů, platné pro velké oblasti (Abonnenc a Minter, 1965; Lewis, 1982, 1978; Theodor, 1948) a zároveň byly vydávány katalogy flebotomů s informacemi o umístění holotypů (Lewis, 1973; Seccombe et al., 1993). Naopak některé instituce vydávaly katalog u nich uložených jedinců (Townsend et al., 1990), takovéto přehledy se zřídka objevují i recentně (dos Santos et al., 2014). Klíče publikované v poslední době jsou úzce zaměřené s malou územní platností (Dancesco, 2008; Dantas-Torres et al., 2014; Fryauff et al., 1995; Lane a Al-Taqi, 1983). Někteří autoři se systematicky věnují popisu flebotomů v jedné oblasti (Depaquit et al., 2008, 2007; Léger et al., 2005; Randrianambinintsoa a Depaquit, 2013; Randrianambinintsoa et al., 2013).

## 3 Molekulární metody identifikace

### 3.1 Sekvenování DNA

K rozvoji molekulárních identifikačních metod došlo od druhé poloviny sedmdesátých let minulého století, zejména díky objevu nových metod sekvenace DNA a jejich automatizaci.

Doposud standardně používanou metodou čtení pořadí nukleotidů v molekule DNA je Sangerova biochemická metoda (Shokralla et al., 2012). Nejprve potřebujeme izolovat DNA. Při reakci jsou enzymem DNA-polymerázou na nově vznikající vlákno DNA přidávány z roztoku jednotlivé báze dle templátového vlákna. DNA-polymeráza nemůže sama začít polymerizovat komplemetární vlákno, vždy začíná od primeru, který je v živé buňce syntetizován RNA-polymerázou. Zde je proto nutné přidat uměle vytvořený primer. V roztoku, kde probíhá syntéza, jsou mimo běžných nukleotidů (deoxynukleotidtrifosfát) obsahujících 2'-deoxyribózu také terminační nukleotidy (dideoxynukleotidtrifosfát) obsahující 2',3'-dideoxyribózu. Této dideoxyribóze na rozdíl od deoxyribózy chybí na třetím uhlíku OH skupina. V zařazování těchto nukleotidů polymerázou do řetězce není rozdíl. Avšak po zařazení dideoxynukleotidtrifosfátu s chybějící OH skupinou na třetím uhlíku cukru není DNA-polymeráza schopna vytvořit fosfodiesterovou vazbu a připojit tak další nukleotid. Dojde k zastavení syntézy tohoto řetězce. Díky směsi nukleotidů dojde k navázání terminačního nukleotidu v různých vzdálenostech od primeru, na n-té pozici dané báze. Následně jsou tyto řetězce rozděleny elektroforézou v polyakrylamidovém gelu podle délky a rentgenografií jsou určeny polohy studovaného nukleotidu (Sanger et al., 1977). Celý proces je nutné opakovat čtyřikrát, odděleně pro každý nukleotid. Proto byly později terminační nukleotidy pro jednotlivé báze označeny různými fluorescenčními barvivy. Po rozdělení řetězců elektroforézou je podle seřazení barev možné interpretovat pořadí bází (Prober et al., 1987).

V současnosti začíná být Sangerova metoda nahrazována novou generací sekvenčních metod (Next-Generation Sequencing). Mezi tyto metody patří pyrosekvenování, fluorescenční značení nukleotidů (Tipu a Shabbir, 2015) a sekvenování založené na technologii nanopórových senzorů (Guo et al., 2014).

Sekvenování částí genomu se používá pro druhovou identifikaci nebo pro evoluční systematiku. Podle využití jsou sekvenovány různé části genomu, jak jaderné, tak i

mitochondriální DNA. Pro druhovou identifikaci je nutné, aby se použité sekvence nelišily mezi jedinci jednoho druhu, a naopak, aby vykazovaly dostatečné mezidruhové rozdíly.

Nejčastěji sekvenovanou částí genomu flebotomů je gen cytochromu *b* v mitochondriální DNA (Depaquit, 2014). Sekvenování nějaké části genomu bylo doposud provedeno u 180 druhů flebotomů, což je 20 % popsáných druhů (shrnutí v Depaquit, 2014). Na dotaz „phlebotomus“ v kategorii „animals“ je na GenBanku zobrazeno 26 024 záznamů, ale 23 607 z nich je pro druh *Phlebotomus papatasi*. Toto velké zastoupení *Ph. papatasi* je způsobeno pokusy o sekvenování celého jeho genomu a tvorbou cDNA knihovny. Absolutně nejvíce bylo sekvenovaných druhů z rodu *Phlebotomus* – 46, což odpovídá 46 % popsáných druhů. Naopak u největšího rodu *Sergentomyia* bylo zatím sekvenováno 24 druhů, to odpovídá pouhým 9 % popsáných druhů. Například u rodů *Australophlebotomus* a *Spelaophlebotomus* nebyl doposud sekvenován žádný druh (Depaquit, 2014). Tyto údaje ukazují velkou nevyváženost získaných a veřejně přístupných dat napříč celou skupinou.

### 3.1.1 DNA barcoding

DNA barcoding je identifikační metoda založená na sekvenování genu pro podjednotku I mitochondriální cytochrom c oxidázy (COI). Její autoři dospěli k názoru, že tento krátký úsek genomu (přibližně 600 párů bází) je charakteristický pro každý druh. Tato část genomu je mezidruhově velmi variabilní a díky zvolené délce používaného úseku je jeho sekvenování poměrně rychlé (Hebert et al., 2003a). S aplikací této metody vyvstala potřeba vytvoření referenční databáze sekvencí, které by charakterizovaly jednotlivé druhy studovaných organismů. Výsledkem snah o vytvoření takové databáze se stal projekt „Barcode of Life“, jenž vedl v roce 2004 k založení Konsorcia pro „Barcode of Life“, které mimo jiné ustanovilo standardní protokol pro získání této sekvence. V současnosti je největším projektem iBOL (International Barcode of Life) sdružující celosvětovou knihovnu těchto sekvencí genu COI eukaryotických organismů (Jinbo et al., 2011).

Jednou z velkých nevýhod této metody je její novost. S morfologickým určováním fenotypu máme zkušenost více než 200 let, zatímco se sekvenováním genotypu pouhých několik let (Will a Rubinoff, 2004). U druhů, které zatím vykazují velkou mezidruhovou variabilitu genu COI, může být tato skutečnost způsobena zkoumáním malého počtu jedinců a s tím související podhodnocení vnitrodruhové variability (Will a Rubinoff, 2004). Ve většině článků věnujících se DNA barcodingu jsou získané sekvence COI genu používány pro vytváření fylogenetických stromů (Taylor a Harris, 2012). Většina získaných sekvencí je

ukládána do GenBanku, čímž se rozšiřují databáze a zpětně může být porovnáována vnitrodruhová i mezidruhová variabilita na velkém množství jedinců. Hebert a Gregory (2005) předpovídali, že díky pokroku a zmenšování technologií bychom v následujících letech mohli očekávat kompaktní přístroj k druhové identifikaci, založený právě na použití DNA barcodingu. Současný vývoj uskutečnění této myšlenky nenasvědčuje.

Byla publikována jedna práce odkazující použitím výrazu DNA „barcoding“ k této metodě (Krüger et al., 2011). Tato práce používá stejnou myšlenku vytvoření databáze standardizovaných krátkých druhově specifických úseků DNA. Není zde však použitý gen COI, ale gen cytochromu *b*, proto se výsledkům této práce podrobněji věnuju v následující kapitole.

V Panamě na ostrově Barro Colorado bylo na pobřeží a v lese odchyceno více než 437 jedinců flebotomů. Na základě morfologické identifikace byli určeni do 17 druhů rodu *Lutzomyia* a dvou druhů rodu *Brumptomyia*. U 49 jedinců byl sekvenován gen COI. Neighbor-joining (N-J) analýzou COI genu bylo 47 jedinců rozděleno do skupin stejně jako morfologickou identifikací. U morfologicky identifikovaných jedinců *Lu. vespertilionis* a *Lu. gomezi* se nachází po jednom jedinci, který je od ostatních vzdálen. Tito jedinci byli buďto špatně určeni nebo se jedná o kryptické druhy (Azpurua et al., 2010).

V Indii byl DNA barcoding otestován na 62 jedincích, morfologicky určených do sedmi druhů (Kumar et al., 2012). Poprvé zde byl sekvenován gen COI potvrzených vektorů leishmaniózy *Ph. argentipes* a *Ph. papatasi*. N-J analýza sekvencí genu COI hraničící s mezidruhovou variabilitou 3,1 % rozdělila morfologicky těžko rozlišitelné samce *Se. babu* a *Se. insularis*. Bylo odhaleno, že *Se. bailyi* je druhový komplex dvou druhů s mezidruhovým rozdílem 13,5 % (Kumar et al., 2012).

V Kolumbii byla účinnost DNA barcodingu testována na 36 druzích flebotomů odchycených na různých lokalitách (Gutiérrez et al., 2014). Odchycení jedinci v počtu 148 byli určeni morfologicky a poté u nich byl sekvenován gen COI. Všechny studované druhy patřily do třech rodů: *Lutzomyia*, *Waryleya* a *Brumptomyia*. Byla provedena N-J analýza, která rekonstruuje fylogenetické stromy na principu vyhledávání párů taxonomických jednotek a tím minimalizuje délku jednotlivých větví (Saitou a Nei, 1987). Výsledky této analýzy odpovídaly rozdělení při morfologické identifikaci. V původní práci (Hebert, et al. 2003) byla pro hmyz navržena minimální mezidruhová variabilita 3 % a maximální vnitrodruhová variabilita 2 %. V této kolumbijské studii byla mezidruhová variabilita v rozmezí 9 % – 26 %.

Vnitrodruhová variabilita ale u několika druhů tento navržený limit překročila: *Lu. gomezi* 6 %, *Lu. panamensis* 4,6 % a *Lu. trinidadensis* 3,4 %. Tato velká vnitrodruhová variabilita může být důsledkem oddělených populací nebo přítomností kryptických druhů (Hoyos et al., 2012).

V Tunisku byli na několika lokalitách chyceni jedinci *Phlebotomus perniciosus* a *Ph. longicuspis* (Boudabous et al., 2012) Původně byli samci těchto dvou druhů rozlišitelní podle zakončení aedeagu. Samice byly rozlišitelné až později podle rozšíření na bázi spermatických kanálků (Léger et al., 1983). V nedávné době byla publikována práce, která zpochybnila identifikační znak samců, protože byli popsáni atypičtí samci *Ph. perniciosus*, kteří jsou velmi podobní samcům *Ph. longicuspis* (Ghrab et al., 2006). Na základě sekvenování genu *cyt b* a COI je možné rozlišit tyto dva morfotypy *Ph. perniciosus* a zároveň je možné všechny tyto jedince odlišit od *Ph. longicuspis* (Boudabous et al., 2012).

Recentně byla publikována práce využívající DNA barcoding k druhové identifikaci flebotomů vyskytujících se na území Peru (Nzulu et al., 2015). U 159 jedinců flebotomů z Peru byl sekvenován gen COI (Nzulu et al., 2015). Všichni tito jedinci byli nejdříve morfologicky identifikováni do 19 druhů. Na základě N-J analýzy byla největší vnitrodruhová variabilita zjištěna u *Lu. perunsi*, její hodnota činí 5,96 %. Mezdruhová variabilita nabývala hodnot 8,39 % – 19,08 %, tudíž byla ve všech případech větší než vnitrodruhová. Velká vnitrodruhová variabilita u některých druhů může být způsobena přítomností kryptických druhů (Scarpassa a Alencar, 2013).

Druhová identifikace flebotomů pomocí COI genu byla ověřována na jedincích vyskytujících se v Portugalsku. Odchycení jedinci byli morfologicky určeni jako *Se. minuta*, *Ph. sergenti*, *Ph. ariasi*, *Ph. chadlii* a *Ph. perniciosus*. Na základě sekvencí COI byli jedinci *Ph. chadlii* a *Ph. ariasi* spojeni do jedné skupiny. Do budoucna je třeba tuto metodu pro flebotomy z jižní Evropy zpřesnit nebo pro jejich identifikaci používat jiné markery (Maia et al., 2015).

### 3.1.2 Ostatní sekvenované geny

Mimo COI genu jsou sekvenovány mnohé další geny jak mitochondriální, tak jaderné DNA. Nejvíce sekvenovaným genem u flebotomů je *cyt b*, který byl nejčastěji používaným genem před příchodem DNA barcodingu a stále je používán.

Poprvé byl cytochrom *b* použit k potvrzení druhové identifikace jedinců *Phlebotomus longicuspis* odchycených v Burkina Faso (J. Depaquit et al., 2005). Jedinci byli nejprve určeni

dle morfologických znaků, především dle počtu chlupů na vnitřní straně coxitu (Benabdennbi et al., 1999; Pesson et al., 2004). Následně, protože to byl první zaznamenaný výskyt tohoto druhu jižně od Sahary, byla z hrudi, křídel, nohou a zadečku izolována DNA a sekvenován gen cytochromu *b*. Tato sekvence se plně shodovala s jedním haplotypem (Icus 01) tohoto druhu odchyceným v Maroku (Pesson et al., 2004).

Původně byla jako vektor *Leishmania braziliensis* v Kolumbii určena *Lutzomyia townsendi*. Na základě bližšího morfologického zkoumání a sekvenování jaderného genu pro EF- $\alpha$  byla novým vektorem určena *Lu. youngi*. Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi *Lu. youngi* z Venezuely. Tato lutzomie patří do stejné druhové skupiny *Lu. townsendi*, ve které jsou všechny samice morfologicky nerozlišitelné. V genu EF- $\alpha$  byly pro druhovou identifikaci nalezeny dva ustálené polymorfismy. Gen cyt *b* není pro identifikaci v této skupině vhodný, jelikož je zde velký vnitrodruhový polymorfismus (Testa et al., 2002).

Flebotomové podrodu *Transphlebotomus* jsou předpokládání přenašeči *Leishmania infantum* a morfologické určení jejich druhu je velmi obtížné. U jedinců *Ph. mascittii*, *Ph. canaaniticus* a *Ph. economidesi*, patřících do tohoto podrodu, byl sekvenován mitochondriální gen ND4. Nebyla nalezena žádná vnitrodruhová variabilita i přesto, že jedinci *Ph. mascittii* pocházeli z různých lokalit. Mezidruhová variabilita byla naopak okolo 10 %, což činí sekvenci ND4 genu velmi vhodnou pro identifikaci tohoto podrodu (Jérôme Depaquit et al., 2005).

Z vápencových jeskyní v Thajsku byl popsán nový druh *Phlebotomus mascomai*. Samci a samice patřící k novému druhu byli identifikováni na základě ekologických, morfologických a molekulárních znaků. U jedinců obou pohlaví byl sekvenován gen cyt *b*, jenž měl úplnou shodu (Muller et al., 2007). Získané sekvence mohou být použity například pro další identifikaci jedinců toho druhu.

Studie zaměřená na rozdíl *Lutzomyia pia* a *Lutzomyia tihuiensis* patřící do skupiny *Pia* druhového komplexu *Lutzomyia verrucarum* potvrdila, že se skutečně jedná o dva druhy (Pérez-Doria et al., 2008). Oba tyto druhy se vyskytují v Andách, jsou přenašeči leishmaniózy, jsou antropofilní a liší se svým chováním. Zatímco *Lu. pia* otálí s bodnutím, *Lu. tihuiensis* bodá ihned po dosednutí na kůži (shrnuto v Bejarano et al., 2004). Samice těchto dvou druhů se morfologicky odlišují pouze pigmentovými skvrnami na pleuře. Pro nalezení rozdílu v genetickém kódu byla sekvenována mitochondriální DNA od 3' konce genu cytochromu *b* po gen podjednotky I NAD dehydrogenázy. V tomto úseku byly nalezeny značné rozdíly,



mimo jiné různá délka a odlišné pořadí nukleotidů genu cytochromu *b* a přítomnost IG1 (indeterminate gametophyte) pouze u *Lu. pia* (Pérez-Doria et al., 2008).

V severozápadním Íránu byl sekvenován gen cyt *b* a EF-1 $\alpha$  (elongation faktor  $\alpha$ ) jedinců podrodu *Larrousius*, a to druhy *Phlebotomus tobbi*, *Ph. perfiliewi* a *Ph. major*. Samice těchto tří druhů jsou morfologicky velmi podobné. V sekvencích výše zmíněných genů byl nalezen signifikantní rozdíl mezi jednotlivými druhy (Absavaran et al., 2009). Zároveň ale byla potvrzena jejich příbuznost, jež se dala předpokládat z morfologické podobnosti.

Další práce z Íránu byla zaměřena na možnost rozlišení samic druhů *Ph. mongolensis* a *Ph. caucasicis* (Parvizi et al., 2010). Samci těchto dvou druhů jsou morfologicky rozlišitelní dle coxitu, zatímco samice jsou nerozlišitelné (Lewis, 1982; Nadim a Javadian, 1976; Parvizi et al., 2010; Theodor a Mesghali, 1964). Ze samců byla izolována DNA a sekvenován gen cytochromu *b*. V získaných sekvencích není mezidruhový rozdíl.

Na vojenských základnách v severním Afgánistánu byl prováděn výzkum flebotomů pro zhodnocení rizika nakažení aliančních vojáků leishmaniózou (Krüger et al., 2011). Po morfologické identifikaci bylo zjištěno šest druhů rodu *Phlebotomus* (*Ph. alexandri*, *Ph. caucasicus*, *Ph. keshishiani*, *Ph. papatasi*, *Ph. sergenti* a *Ph. turanicus*) a čtyři druhy rodu *Sergentomyia* (*Se. clydei*, *Se. dreyfussi turkestanica*, *Se. grekovi* a *Se. murgabiensis*). Z 27 jedinců všech druhů byl sekvenován gen cyt *b*. Tato sekvence DNA je dostatečně signifikantní pro identifikaci všech zahrnutých druhů s výjimkou výše zmíněných *Ph. mongolensis* a *Ph. caucasicis* (Parvizi et al., 2010).

Na Srí Lance byly sekvenovány geny cytochromu *b* a podjednotky I cytochrom oxidázy z populací druhového komplexu *Phlebotomus argentipes*. Již dříve byly na základě morfometrických dat poměru délky *sensilla chaetica* a tykadlového flagelomeru popsány dva morfotypy (Ilango, 2000). Odchycení jedinci byli podle tohoto znaku rozděleni do skupin morfotypů A a B. Následně získaná molekulární data korelují s morfologickým rozdělením. Pravděpodobně se jedná o dva oddělené druhy (Gajapathy et al., 2013).

Na Komorských ostrovech byl zaznamenán výskyt flebotomů v letech 2003, 2007 a 2011. Mezi odchycenými jedinci byl popsán nový druh *Sergentomyia personi* (Randrianambinintsoa et al., 2012). Vedle morfologického popisu byl sekvenován cyt *b*, který může při dalších odchycích usnadnit druhovou identifikaci.

Na Filipínách byl popsán nový druh *Chinius samarensis*. Byl vytvořen morfologický popis samců i samic. Autoři je přiřazují k jednomu druhu na základě úplné shody sekvencí genu *cyt b*, jenž byl sekvenován (Léger et al., 2012). Stejným způsobem, na základě shodného genu *cyt b*, k sobě byli přiřazeni jedinci samčího a samičího pohlaví u nově popsaného druhu *Idiophlebotomus padillarum* (Léger et al., 2014).

Podrod *Transphlebotomus* je velmi málo morfologicky diverzifikovanou skupinou, ve které byly doposud popsány tři druhy (*Phlebotomus mascittii*, *Ph. canaaniticus* a *Ph. economidesi*). Spekuluje se o tom, že *Ph. mascittii* by mohl být přenašečem *Leishmania infantum* v centrální Evropě (Naucke et al., 2008). Recentně byli mezi jedinci odchycenými na Krétě a pobřeží Anatólie v Turecku popsány dva nové druhy *Ph. anatolicus* a *Ph. killicki* patřící do tohoto podrodu (Kasap et al., 2015). Tyto druhy byly odlišeny na základě analýzy genů *cyt b* a ND4 a následně byly popsány i morfologicky.

### 3.2 RFLP (restriction fragment length polymorphism) analýza

Polymorfismus délky štěpných fragmentů je metoda, při které dojde k rozštěpení DNA řetězce restriční endonukleázou v určitém, pro konkrétní endonukleázu specifickém, místě. Na základě polohy restričního místa v řetězci zvoleného úseku DNA, naamplifikovaného pomocí PCR, se vytvoří různě dlouhé řetězce. Jejich délka je následně zjištěna pomocí elektroforézy. Tato metoda je velmi rychlá a použitelná k odlišení blízce příbuzných druhů (Tiwary et al., 2012).

V Ekvádoru byla RFLP analýza ribozomální 18S RNA úspěšně použita k rozlišení sedmi druhů rodu *Lutzomyia* (*Lu. ayacuchensis*, *Lu. hartmanni*, *Lu. panamensis*, *Lu. trapidoi*, *Lu. dysponeta*, *Lu. gomezi* a *Lu. serrana*). Byly použity restriční endonukleázy Afa I a Hinf I. Molekulární identifikace druhů odpovídala morfologickému rozdělení (Terayama et al., 2008).

Pro odlišení třech indických druhů flebotomů (*Ph. argentipes*, *Ph. papatasi* a *Se. babu*) odchycených v několika blízko u sebe ležících vesnicích byla ověřena použitelnost RFLP analýzy. Odlišení těchto druhů je důležité, protože *Ph. argentipes* je přenašečem lidské viscerální leishmaniózy na indickém subkontinentu, zatímco další dva zmíněné druhy se v přenosovém cyklu neuplatňují. Všichni jedinci byli nejdříve identifikováni morfologicky. Poté byla izolována DNA, provedena PCR reakce genu 18S ribozomální RNA, řetězce byly naštěpné restričními enzymy Hinf I a Hpa II a vzniklé produkty byly rozděleny

elektroforézou v agarózovém gelu. S použitím obou enzymů byly tyto druhy zřetelně odlišitelné (Tiwary et al., 2012).

Pro identifikaci středomořských flebotomů *Ph. perniciosus*, *Ph. neglectus*, *Ph. perfiliewi*, *Ph. papatasi* a *Se. minuta* byl použit restriční enzym Ase I na amplifikovanou část genu *cyt b*. Všechny výše zmíněné druhy byly tímto způsobem rozlišitelné (Latrofa et al., 2012). Ve studii bylo zahrnuto pouze 74 jedinců odchycených ve dvou jihoitalských krajích. Je nutné ověřit, zda bude tato metoda použitelná i pro odlišení jedinců z širší geografické oblasti.

V Bangladéši, v oblasti s výskytem viscerální leishmaniózy, bylo RFLP metodou identifikováno 1055 odchycených samic flebotomů (Alam et al., 2012). Za použití restričních endonukleáz Afa I a Hinf I na genu 18S rRNA bylo 679 jedinců identifikováno jako dva druhy rodu *Sergentomyia* a 376 jedinců bylo identifikováno jako *Phlebotomus argentipes*. U 287 vzorků se nepodařilo amplifikovat DNA.

Na východě Severní Ameriky byla metoda RFLP mitochondriálního COI genu použita pro rozlišení čtyř druhů flebotomů (*Lu. longipalpis*, *Lu. vexator*, *Lu. shannoni* a *Ph. papatasi*). Na základě restriční mapy těchto čtyř druhů, vygenerované pomocí programu NEBCutter 2.0 (Vincze et al., 2003), byly použity tři restriční endonukleázy: HpyCH4 III, BspM I a Sau961. Pomocí HpyCH4 III byl odlišitelný pouze *Ph. papatasi* od jedinců rodu *Lutzomyia*. Za použití BspM I byla odlišena *Lu. shannoni* od zbylých dvou lutzomií a pomocí Sau961 byly odlišeny *Lu. vexator* a *Lu. longipalpis* (Minter et al., 2013).

*Lu. vexator* a *Lu. stewarti* jsou sympatrické druhy přenášející v Kalifornii plazi malárii. K jejich odlišení byla použita RFLP analýza COI genu pomocí endonukleáz Acc I, štěpící pouze fragment DNA izolovaný z *Lu. stewarti*, a Sau 961, štěpící pouze fragment DNA *Lu. vexator* (Hughes et al., 2014).

V Alžírsku bylo 131 flebotomů identifikováno morfologicky jako deset druhů rodu *Phlebotomus* (*Ph. bergeroti*, *Ph. alexandri*, *Ph. sergenti*, *Ph. chabaudi*, *Ph. riouxi*, *Ph. perniciosus*, *Ph. longicuspis*, *Ph. perfiliewi*, *Ph. Ariasi* a *Ph. chadlii*), sedm druhů rodu *Sergentomyia* (*Se. fallax*, *Se. minuta*, *Se. antennata*, *Se. schwetzi*, *Se. Clydei* a *Se. christophersi*) a *Grassomyia dreyfussi*. Pro RFLP analýzu *cyt b* byly použity enzymy Ase I a Mnl I, pro COI Msp I a Taq I. V prvním případě cytochromu *b* nebylo možné po rozdělení fragmentů na gelu rozlišit jedince *Ph. longicuspis* a *Ph. perfiliewi*, ve druhém případě COI

nebyli rozlišitelní jedinci *Ph. ariasi* a *Se. schwezi*. Z toho vyplývá, že tato metoda není vhodná pro identifikaci všech druhů flebotomů ve Středomoří (Bounamous et al., 2014).

### 3.3 DNA hybridizace

Metoda DNA hybridizace spočívá v navázání druhově specifického označeného úseku DNA (sondy) na studovanou DNA. Není nutné DNA přímo izolovat, stačí pouze rozdrtit část tkáně a fyzikálně nebo chemicky denaturovat DNA tak, aby došlo k rozdělení polynukleotidových řetězců. Výhodou metody je její rychlost, bez nutnosti izolace DNA, a její specifita. Nevýhodou je, že dostaneme pouze informaci, zda se jedná o předpokládaný druh, či nikoli.

U flebotomů byla tato metoda použita pouze jednou, pro druhovou identifikaci druhu *Phlebotomus papatasi* (Ready et al., 1988). Byla použita sonda o délce 3200 bází, komplementární s mezigenovým úsekem rDNA. Tato část DNA byla detekována u jedinců všech geograficky oddělených populací a zároveň nebyla detekována u žádného jiného druhu. Touto metodou je možné s použitím vhodné sondy detekovat infekci *Leishmania major* (Ready et al., 1988).

### 3.4 PCR (polymerase chain reaction)

Metoda polymerázové řetězové reakce se uplatňuje při amplifikaci úseků genomu, používaných při sekvenční analýze či podrobovaných působení restričních enzymů v metodě RFLP, vytvořením druhově specifických primerů však lze samotnou PCR amplifikaci využít přímo k potvrzení druhové identifikace. Případně můžeme rozhodovat mezi několika málo druhy použitím více primerů, které budou druhově specifické. V PCR reakci je tedy využít pouze primer specifický pro přítomný druh. Produkty s použitím jednotlivých primerů by se měly lišit svojí délkou. Výsledek je vyhodnocen pomocí elektroforézy.

Na jihu Indie byl pro identifikaci *Ph. argentipes* a *Ph. papatasi* použit jeden přímý primer a dva reverzní primery, specifické pro dané druhy (Manonmani et al., 2010). Reverzní primery byly navrženy tak, aby se výsledný produkt lišil přibližně o 100 bází. Po rozdělení získaných řetězců elektroforézou byl mezidruhový rozdíl dobře patrný.

V Súdánu jsou tři hlavní přenašeči *Leishmania major*, jsou jimi *Phlebotomus papatasi*, *Ph. duboscqi* a *Ph. bergeroti*. U těchto blízce příbuzných druhů podrodu *Phlebotomus* jsou samice morfologicky nerozlišitelné. Druhově specifickými primery byla amplifikována část genu ITS2 mitochondriální DNA. Výsledkem elektroforézy je zřetelné odlišení jednotlivých druhů (Khalid et al., 2010).

Pro identifikaci flebotomů odchytených v jižní Itálii byla použita amplifikace ITS2 části ribozomální DNA. Po zjištění velikosti fragmentů elektroforézou byly zřetelné mezidruhové rozdíly: pro *Ph. perniciosus* 450 kb, pro *Ph. neglectus* 490 kb, pro *Ph. perfiliewi* 460 kb, pro *Ph. papatasi* 480 kb a pro *Se. minuta* 530 kb (Latrofa et al., 2012).

### 3.5 RAPD (random amplified polymorphic DNA)

K druhové identifikaci lze také použít metodu RAPD (random amplified polymorphic DNA), která se od výše popsané tradiční PCR liší tím, že neznáme DNA sekvenci zkoumaného organismu a tudíž se používají krátké, nespecifické primery, které amplifikují náhodné části DNA v rámci celého genomu. Z nich získáme po elektroforéze specifickou sérii proužků (Williams et al., 1990). Jde o jednu z metod DNA fingerprintingu, jejíž hlavní oblastí využití jsou především fylogenetické studie, zkoumající na základě podobnosti řady generovaných profilů příbuznost blízkých druhů či populací v rámci druhu, byla nicméně úspěšně vyzkoušena na identifikaci *Phlebotomus papatasi* a *Ph. dubosqi*, kteří jsou potvrzenými přenašeči *Leishmania major*, původce kožní leishmaniózy. Byli použiti jedinci z laboratorních kolonií. Kolonizovaní jedinci *Ph. papatasi* pocházeli z Izraele a *Ph. dubosqi* z Keni a Senegalu. Zároveň byli použiti jedinci z terénních odchyťů *Ph. papatasi* v Izraeli a Indii a *Ph. dubosqi* v Keni (Mukhopadhyay et al., 2000).

V Saudské Arábii bylo odchyteno pět druhů flebotomů (*Phlebotomus papatasi*, *Ph. bergeroti*, *Ph. sergenti*, *Sergentomyia antennata* a *Se. clydei*) (Al-Ajmi et al., 2013). Po morfologické identifikaci byla z jedinců izolována DNA. Pro RAPD metodu byly použity primery Opa-2 a Ap-16. U některých druhů byly zaznamenány nepatrné rozdíly v získaných sériích proužků na gelu po elektroforéze, které mohou být způsobené vnitrodruhovou variabilitou.

### 3.6 Metoda založená na analýze proteinů

MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization) TOF (time of flight) MS (mass spectrometry) je metoda hmotnostní spektrometrie umožňující měření molekulových hmotností větších částic než klasická hmotnostní spektrometrie a zároveň umožňuje měřit najednou celé spektrum bílkovin. Přímou ionizací laserem se větší molekuly štěpí, za použití nepřímého působení laseru přes matrici se však tomuto nežádoucímu jevu předejde a je možné tyto velké molekuly ionizovat. Ionizované molekuly jsou urychleny silným elektrickým polem a vstupují do evakuované trubice detektoru měřícího dobu průletu. Z naměřené doby je možné vypočítat poměr molekulové hmotnosti a náboje částice. Pokud tuto metodu

použijeme na proteiny extrahované z homogenizované tkáně jedince, dostaneme unikátní druhově specifické spektrum bílkovin (Holland et al., 1996).

V současné době je tato metoda rutinně využívána v medicíně k identifikaci mikroorganismů (Seng et al., 2010). Možnosti jejího využití pro identifikaci mnohobuněčných organismů, konkrétně hmyzu, byly poprvé úspěšně ověřeny na druhové skupině *Drosophila melanogaster* (Campbell, 2005). Záhy byla využita také k identifikaci některých hmyzích přenašečů lidských i zvířecích parazitárních onemocnění. Byly publikovány čtyři práce využívající ji k identifikaci tiplíků rodu *Culicoides* (Kaufmann et al., 2012a, 2012b, 2011; Uhlmann et al., 2014), kteří představují v rámci dvoukřídých taxonomicky velmi obtížnou skupinu. Další práce se věnují určování dospělců komárů (Müller et al., 2013; Yssouf et al., 2013), jedna práce byla zaměřena na identifikaci larválních stádií šesti druhů komárů z rodů *Anopheles*, *Culex* a *Aedes* (Dieme et al., 2014). Dvakrát byla tato metoda využita k druhové identifikaci much tse tse rodu *Glossina* (Hoppenheit et al., 2014, 2013).

Možnost druhové identifikace flebotomů pomocí MALDI byla poprvé vyzkoušena na pěti druzích (*Phlebotomus papatasi*, *Ph. sergenti*, *Ph. perniciosus*, *Ph. tobbi*, *Ph. arabicus*) z laboratorních kolonií (Dvorak et al., 2014). Byly vyzkoušeny různé metody uchování vzorků před jejich identifikací a různé roztoky pro extrakci proteinů na základě předchozích zkušeností s identifikací tiplíků (Kaufmann et al., 2011). Nejlepších výsledných spekter bylo dosaženo u zmrazených vzorků homogenizovaných v destilované vodě (Dvorak et al., 2014; Mathis et al., 2015). Mezdruhové rozdíly získaných spekter jednoznačně rozlišily mezi zkoumanými druhy. Spektra samců a samic jednoho druhu byla téměř identická (Dvorak et al., 2014). Další práce byla neobvykle zaměřena na porovnání spekter získaných pomocí dvou různých přístrojů, Ultraflex III MALDI TOF hmotnostní spektrometr (Bruker Daltonics, Brémy, Německo) a MALDI-TOF Axim Confidence hmotnostní spektrometr (Shimadzu-Biotech Corporation, Kjóto, Japonsko). Spektra získaná z obou přístrojů byla porovnatelná (Mathis et al., 2015), což může být velkým přínosem pro rychlejší rozvoj této metody. Doposud byla vytvořena databáze spekter pro 20 druhů flebotomů (Mathis et al., 2015). Pro rozvoj této metody, která vykazuje velkou specifitu, je nutné vytvořit centrální otevřenou databázi spekter (Mathis et al., 2015).

## 4 Analýza feromonů

Samci rodu *Lutzomyia* produkují žlázami umístěnými na zadečku feromony, které slouží samicím k rozpoznání samců stejného druhu (Killick-Kendrick, 1999). U rodu *Phlebotomus* přítomnost feromonů dokazuje pouze jedna práce na základě pozorování chování samců a samic (Chelbi et al., 2011).

U některých druhů rodu *Lutzomyia* byly nalezeny rozdíly ve složení samci produkováných feromonů. *Lutzomyia cruzi* je přenašečem viscerální leishmaniózy v několika oblastech Brazílie a je blízce příbuzná *Lutzomyia longipalpis*, která je významným přenašečem původce lidské viscerální leishmaniózy. Samice těchto dvou druhů jsou morfologicky nerozlišitelné. U samců *Lu. cruzi* byl objeven feromon 9-methyl-germacrene-B (Vigoder et al., 2010), který se vyskytuje u některých populací *Lu. longipalpis* v Brazílii (Hamilton et al., 2005), Argentíně (Salomón et al., 2010) a Paraguayi (Brazil et al., 2009).

*Lutzomyia longipalpis* v Brazílii, potažmo v celé Jižní Americe, je komplex několika kryptických druhů, doposud však nebylo určeno, kolik druhů obsahuje (Brazil et al., 2009). Podle chemického složení feromonů je možné tento komplex rozdělit na pět chemotypů (Hamilton et al., 2005).

V brazilském státě Sao Paulo, kde se jako v celé Brazílii vyskytuje viscerální leishmanióza, byly u *Lu. longipalpis* objeveny tři chemotypy (Casanova et al., 2015). Tyto chemotypy se shodují s dříve popsányými (Hamilton et al., 2005).

## 5 Analýza zvukových projevů

Samci rodu *Lutzomyia* vyluzují při kopulaci vibrací křídel zvuky. Tyto zvuky jsou lidským uchem neslyšitelné, proto jsou nahrávány, převáděny na slyšitelné frekvence a analyzovány. Jsou klasifikovány do několika kategorií, které by mohly být dalším klíčem k druhovému složení rodu *Lutzomyia*.

U šesti populací *Lutzomyia longipalpis* v Brazílii byly nahrávány kopulační zvuky. Byly zaznamenány praskavé a pulsní zvuky. Pulsní byly dále rozděleny podle periody a síly do tří podkategorií (Souza et al., 2004). Později byly nahrávány tyto kopulační zvuky u 25 populací stejného druhu v Brazílii. Zde byl zaznamenán jeden typ praskavého a pět typů pulzního zvuku (Vigoder et al., 2010). Tyto dobře rozlišitelné akustické signály mohou být klíčem k odlišení kryptických druhů *Lutzomyia longipalpis* (Vigoder et al., 2015).

U samců *Lu. cruzi* odchylených v jedné lokalitě v Brazílii byly analyzovány kopulační zvuky. Jsou složeny z pravidelného praskání. Oproti praskavým zvukům *Lu. longipalpis* se liší kratším intervalem mezi jednotlivými prasknutími (Vigoder et al., 2010).

## 6 Diskuze a závěr

Nové metody molekulární druhové identifikace se nabízejí jako levnější a méně časově náročná alternativa ke klasickému morfologickému určování druhů. Určit druh morfologicky je schopen pouze odborník na danou skupinu organismů. Některé popsání druhů není možné kvůli minimálnímu rozdílu morfologických znaků rozlišit (Collantes a Martinez-Ortega, 1996; Yan-Jia a Zhi-Cheng, 1983). U flebotomů je proces druhové identifikace na základě morfologických znaků časově náročný, protože je nejdříve nutné z každého jedince připravit kvalitní mikroskopický preparát. Interpretace často minuciózních rozdílů v morfologii blízké příbuzných druhů vyžaduje značnou zkušenost a stává se, že tyto drobné mezidruhové rozdíly mohou být i dlouhou dobu zcela přehlíženy a teprve použití molekulárních metod odhalí existenci samostatných druhů v rámci dříve popsaného taxonu, jako tomu bylo u nedávno nově popsaných druhů podrodu *Transphlebotomus* (Kasap et al., 2015).

U většiny molekulárních metod je nutným prvním krokem izolace a amplifikace DNA, což zvyšuje jejich časovou náročnost a také nebezpečí kontaminace a následného chybného určení. Metody PCR, RFLP a RAPD s rozdělením produktu elektroforézou jsou vhodné k potvrzení již určeného druhu, případně k rutinnímu rozlišení několika málo předpokládaných druhů v určité oblasti. Ačkoliv je RFLP metoda obecně velmi specifická, například u několika středomořských flebotomů v Alžírsku bylo dosaženo jejího limitu rozlišení (Bounamous et al., 2014). U RAPD metody, založené na nespécifické amplifikaci náhodných úseků genomu, může docházet k amplifikaci sekvencí podléhajících častým mutacím, což se následně projevuje na gelu při elektroforéze druhově nestálými proužky. Interpretace a reprodukovatelnost těchto výsledků je náročná (Al-Ajmi et al., 2013).

Nutnost izolovat DNA odpadá u metody DNA hybridizace. Je zde ale nutné znát poměrně dlouhou sekvenci nukleotidů, která bude v rámci druhu stabilní. U flebotomů bylo použití této metody k druhové identifikaci popsáno pouze v jedné práci (Ready et al., 1988), následně se již nikdy neuplatnila.



V posledních dvou desetiletích jsou hojně užívány metody sekvenování úseků DNA. Souvisí to s technickými pokroky v této oblasti, které umožnily jejich zrychlení a zlevnění. Při zvolení vhodného úseku DNA a konstrukci druhově specifických primerů lze dosáhnout vysokého stupně specifity. Těmto podmínkám nejčastěji vyhovují mitochondriální geny. Nejčastěji sekvenovaným genem u flebotomů je cyt *b*, v poslední době se začíná hojně uplatňovat COI (Depaquit, 2014), především ve studiích využívajících DNA barcodingu, který právě sekvenci tohoto genu používá (Hebert et al., 2003a). Univerzální barcodingová sekvence genu COI byla vybrána podle dat získaných studiem zástupců hmyzího řádu motýlů (*Lepidoptera*). V rámci programu Barcode of Life je tato metoda ke klasifikaci živočišných druhů hojně užívána. Zda byla volba COI genu správná se patrně projeví po delší době. Už dnes je zřejmé, že pro řadu skupin organismů bude třeba slevit z původního požadavku na zcela univerzální primery a u řady vyšších taxonů zřejmě i z genu COI jako takového. Většina prací o DNA barcodingu se věnuje živočichům, zatímco menšina se jich věnuje rostlinám, houbám, či protistům. Pro tyto skupiny je třeba navrhnout primery pokud možno univerzální v rámci jednotlivých skupin (shrnuto v Taylor a Harris, 2012). Metodou zatím nebyla zpracována podstatnější část druhového spektra flebotomů a veřejně dostupné sekvence v databázích BOLD a GenBank neumožňují její rutinní využívání. Problémy s rozlišením druhů *Ph. ariasi* a *Ph. chadlii* (Maia et al., 2015) navíc naznačují, že ani u flebotomů možná nebude moci být zvolený genový úsek zcela univerzální.

Nejnovější metodou druhové identifikace mnohobuněčných organismů je využívání proteinových spekter celých organismů získaných pomocí hmotnostního spektrometru. Její využitelnost pro druhovou identifikaci hmyzu byla poprvé otestována na *Drosophila melanogaster* (Campbell, 2005). U flebotomů byly doposud publikovány pouze dvě práce využívající tuto metodu (Dvorak et al., 2014; Mathis et al., 2015), také aplikace na další medicínsky významné skupiny hmyzu jsou velmi recentní. Je třeba další testování a především standardizace metody, které ukáže její limity, a je též nutné přikročit k vytváření databází pro její rutinní používání k druhové identifikaci, stejně jako tomu je u mikroorganismů (Seng et al., 2010). Její velkou výhodou je rychlost. Ačkoli jsou pořizovací náklady tohoto přístroje vysoké, jeho provoz je levný.

U novovětských flebotomů rodu *Lutzomyia*, kde se pravděpodobně vyskytuje mnoho nepopsaných kryptických druhů, jsou pro jejich odlišení využívány různé speciální metody. Jednou z metod je druhová identifikace podle složení feromonů (Brazil et al., 2009; Vigoder

et al., 2010). Další metodou je rozlišování zvuků produkovaných samci při kopulaci. Na základě rozdílů těchto zvuků byla studována převážně vnitrodruhová variabilita *Lutzomyia longipalpis* (Souza et al., 2004; Vigoder et al., 2010). Za předpokladu, že budou tyto rozdílné populace popsány jako druhy a bude možné nahrávat a analyzovat tyto zvuky v terénu, mohlo by se jednat o zajímavý a levný způsob druhové identifikace.

Ačkoliv bylo pro identifikaci flebotomů využito mnoho molekulárních identifikačních metod, ve většině případů byly tyto metody použity jako nástroj evoluční systematiky (Depaquit, 2014). Na druhou stranu byly díky molekulární analýze popsány některé nové druhy. U popisu nových druhů je problém s definicí druhu na základě genetických dat. Tradičně je druh definován jako nejnižší taxonomická skupina podobných organismů, kteří sexuálně produkují plodné potomstvo (Mayr, 1942). V současnosti je jednou z uznávaných definic druhu kladistické oddělení. Zjednodušeně řečeno, druh může vzniknout a zaniknout jedině speciací, respektive extinkcí (De Queiroz, 2007). Pokud máme dva morfologicky stejné druhy, které se liší sekvencemi DNA, musíme určit hranici, kdy se skutečně jedná o druhy a kdy o vnitrodruhovou variabilitu. Tato hranice je rozdílná pro jednotlivé skupiny organismů a také pro sekvenované části genomu. Na její přesné určení pro jednotlivé skupiny a jednotlivé sekvenované úseky genomu nemáme dostatek zkušeností.

## 7 Použitá literatura

- Abonnenc, E., Minter, D.M., 1965. Keys for the identification of the sandflies of the Ethiopian region. Cahiers ORSTOM, Serie entomologie medicale et parasitologie 5, 1–63.
- Absavaran, A., Rassi, Y., Parvizi, P., Oshaghi, M.A., Abaie, M.R., Rafizadeh, S., Mohebali, M., Zarea, Z., Javadian, E., 2009. Identification of sand flies of the subgenus *Larroussius* based on molecular and morphological characters in north western Iran. Iranian journal of arthropod-borne diseases 3, 22–35.
- Al-Ajmi, R.A., Al-Jaser, M.H., Al-Qahtani, A.A., 2013. The application of random amplified polymorphic DNA for sandfly species identification in Saudi Arabia. Egyptian academic journal of biological sciences 5, 43–51.
- Alam, M.S., Kato, H., Fukushige, M., Wagatsuma, Y., Itoh, M., 2012. Application of RFLP-PCR based identification for sand fly surveillance in an area endemic for kala-azar in Mymensingh, Bangladesh. Journal of parasitology research 2012, 1–4.
- Artemiev, 1975. Iranian sand flies 1–93.
- Artemiev, M.M., 1980. A revision of sand flies of the subgenus *Adlerius* (Diptera, Phlebotominae, Phlebotomus). Zoologicheskii zhurnal 59, 1177–1192.
- Artemiev, M.M., 1991. A classification of the subfamily Phlebotominae. Parassitologia 33.
- Azpurua, J., De La Cruz, D., Valderama, A., Windsor, D., 2010. *Lutzomyia* sand fly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama. PLoS Neglected tropical diseases 4, 627.
- Bejarano, E.E., Duque, P., Vélez, I.D., 2004. Taxonomy and distribution of the series pia of the *Lutzomyia verrucarum* group (Diptera: Psychodidae), with a description of *Lutzomyia emberai* n. sp. Journal of medical entomology 41, 833–841.
- Benabdennbi, I., Pesson, B., Cadi-Soussi, M., Morillas Marquez, F., 1999. Morphological and isoenzymatic differentiation of sympatric populations of *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus longicuspis* (Diptera: Psychodidae) in northern Morocco. Journal of medical entomology 36, 116–20.
- Boudabous, R., Jaouadi, K., Bounamous, A., Babba, H., 2012. Morphological and molecular investigations of population structure of *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus longicuspis* (Diptera: Psychodidae) in Tunisia. Journal of medical entomology 49, 787–793.
- Bounamous, A., Lehrter, V., Hadj-Henni, L., Delecolle, J.-C., Depaquit, J., 2014. Limits of a rapid identification of common Mediterranean sandflies using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 109, 466–72.
- Brazil, R.P., Caballero, N.N., Hamilton, J.G.C., 2009. Identification of the sex pheromone of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) from Asunción, Paraguay. Parasites & vectors 2, 51.

- Campbell, P.M., 2005. Species differentiation of insects and other multicellular organisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling. *Systematic entomology* 30, 186–190.
- Casanova, C., Colla-Jacques, F.E., Hamilton, J.G.C., Brazil, R.P., Shaw, J.J., 2015. Distribution of *Lutzomyia longipalpis* chemotype populations in São Paulo state, Brazil. *PLoS Neglected tropical diseases* 9, 1–14.
- Collantes, F., Martinez-Ortega, E., 1996. About the validity of the ratio AIII/EP to distinguish *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus longicuspis* (Diptera, Psychodidae). *Parasite* 3, 395–396.
- Dancesco, P., 2008. Les especes de *Phlebotomes* (Diptera: Psychodidae) de Roumanie, certains aspects de leur ecologie et nouvelles stations de capture. *Travaux du Museum National d'Histoire Naturelle „Grigore Antipa" L1*, 185–199.
- Dantas-Torres, F., Tarallo, V., Otranto, D., 2014. Morphological keys for the identification of Italian phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Parasites & vectors* 7, 479.
- De Queiroz, K., 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic biology* 56, 879–886.
- Depaquit, J., 2014. Molecular systematics applied to Phlebotomine sandflies: review and perspectives. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 28, 744–56.
- Depaquit, J., Léger, N., Robert, V., 2007. Phlebotomine sandflies from Madagascar (Diptera: Psychodidae). V - description of *Sergentomyia majungaensis* n. sp. *Parasite* 14, 219–223.
- Depaquit, J., Léger, N., Robert, V., 2008. Phlebotomine sandflies from Madagascar (Diptera: Psychodidae). VI - A new subgenus (*Vattieromyia*) including three new species: *Sergentomyia* (V.) *sclerosiphon*, *S.* (V.) *namo* and *S.* (V.) *anka*. *Parasite* 15, 15–26.
- Depaquit, J., Muller, F., Gantier, J.C., Leger, N., Ferte, H., Ready, P., Niang, a. a., 2005. Phlebotomine sand flies from Ouagadougou, Burkina Faso: First record of *Phlebotomus* (*Larrousius*) *longicuspis* south of the Sahara. *Medical and veterinary entomology* 19, 322–325.
- Depaquit, J., Naucke, T.J., Schmitt, C., Ferté, H., Léger, N., 2005. A molecular analysis of the subgenus *Transphlebotomus* Artemiev, 1984 (*Phlebotomus*, Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA with new northern records of *Phlebotomus mascittii* Grassi, 1908. *Parasitology research* 95, 113–116.
- Dieme, C., Yssouf, A., Vega-Rúa, A., Berenger, J.-M., Failloux, A.-B., Raoult, D., Parola, P., Almeras, L., 2014. Accurate identification of *Culicidae* at aquatic developmental stages by MALDI-TOF MS profiling. *Parasites & vectors* 7, 544.
- Dos Santos, T., Sueli Barros Pinheiro, M., José de Andrade, A., 2014. Catalogue of the type material of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) deposited in the Instituto Evandro Chagas, Brazil. *ZooKeys* 395, 11–21.
- Dvorak, V., Halada, P., Hlavackova, K., Dokianakis, E., Antoniou, M., Volf, P., 2014. Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Parasites & vectors* 7, 21.

- Endris, R.G., Young, D.G., Perkins, P. V, 1987. Ultrastructural comparison of egg surface morphology of five *Lutzomyia* species (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology* 24, 412–415.
- Fausto, A.M., Feliciangeli, M.D., Maroli, M., Mazzini, M., 1998. Morphological study of the larval spiracular system in eight *Lutzomyia* species (Diptera: Psychodidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 93, 71–79.
- Fausto, A.M., Taddei, A.R., Mazzini, M., Maroli, M., 1999. Morphology and ultrastructure of spiracles in phlebotomine sand fly larvae. *Medical and veterinary entomology* 13, 101–109.
- Feliciangeli, M.D., Castejon, O.C., Limongi, J., 1993. Egg Surface Ultrastructure of Eight New World Phlebotomine Sand Fly Species (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology* 30, 651–656.
- Florin, D.A., Lawyer, P., Rowton, E., Schultz, G., Wilkerson, R., Davies, S.J., Lipnick, R., Keep, L., 2010. Morphological anomalies in two *Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) specimens collected from Fort Rucker, Alabama, and Fort Campbell, Kentucky. *Journal of medical entomology* 47, 952–956.
- Fryauff, D.J., Cope, S.E., Presley, S.M., Hanafi, H.A., Bailly, C., Said-Salah, E.A., Abro, M., Dabale, D., 1995. Sand flies of the Republic of Djibouti: Ecological distribution, seasonal population trends, and identification of species. *Journal of vector ecology* 20, 168–188.
- Gajapathy, K., Peiris, L.B.S., Goodacre, S.L., Silva, A., Jude, P.J., Surendran, S.N., 2013. Molecular identification of potential leishmaniasis vector species within the *Phlebotomus (Euphlebotomus) argentipes* species complex in Sri Lanka. *Parasites & vectors* 6, 302.
- Ghrab, J., Rhim, A., Bach-Hamba, D., Chahed, M.K., Aoun, K., Nouira, S., Bouratbine, A., 2006. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of human leishmaniosis sites in Tunisia. *Parasite* 13, 23–33.
- Guo, B.-Y., Zeng, T., Wu, H.-C., 2014. Recent advances of DNA sequencing via nanopore-based technologies. *Science bulletin* 60, 287–295.
- Gutiérrez, M.A.C., Vivero, R.J., Vélez, I.D., Porter, C.H., Uribe, S., 2014. DNA barcoding for the identification of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. *PLoS ONE* 9.
- Hamilton, J.G.C., Maingon, R.D.C., Alexander, B., Ward, R.D., Brazil, R.P., 2005. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. *Medical and veterinary entomology* 19, 480–488.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., DeWaard, J.R., 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological sciences / The Royal society* 270, 313–321.
- Hebert, P.D.N., Gregory, T.R., 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic biology* 54, 852–859.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., DeWaard, J.R., 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings. Biological sciences / The Royal society* 270, S96–S99.

- Holland, R.D., Wilkes, J.G., Rafii, F., Sutherland, J.B., Persons, C.C., Voorhees, K.J., Lay, J.O., 1996. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry* 10, 1227–1232.
- Hoppenheit, A., Murugaiyan, J., Bauer, B., Clausen, P.H., Roesler, U., 2014. Analysis of *Glossina palpalis gambiensis* and *Glossina tachinoides* from two distant locations in Burkina Faso using MALDI TOF MS. *Parasitology research* 113, 723–726.
- Hoppenheit, A., Murugaiyan, J., Bauer, B., Steuber, S., Clausen, P.H., Roesler, U., 2013. Identification of tsetse (*Glossina* spp.) using matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry. *PLoS Neglected tropical diseases* 7, 1–9.
- Hoyos, R., Uribe, S., Velez, I., 2012. Tipificación molecular de especímenes colombianos de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera : Psychodidae) mediante DNA Barcodes. *Revista Colombiana de entomología* 38, 134–140.
- Hughes, G.L., Samuels, S.K., Shaikh, K., Rasgon, J.L., Vardo-Zalik, A.M., 2014. Discrimination of the *Plasmodium mexicanum* vectors *Lutzomyia stewarti* and *Lutzomyia vexator* by a PCR-RFLP assay and *Wolbachia* infection. *Journal of vector ecology* 39, 224–227.
- Chelbi, I., Zhioua, E., Hamilton, J.G.C., 2011. Behavioral evidence for the presence of a sex pheromone in male *Phlebotomus papatasi* Scopoli (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology* 48, 518–525.
- Ilango, K., 2000. Morphological characteristics of the antennal flagellum and its sensilla chaetica with character displacement in the sandfly *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti sensu lato (Diptera: psychodidae). *Journal of biosciences* 25, 163–172.
- Jinbo, U., Kato, T., Ito, M., 2011. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomological science* 14, 107–124.
- Kasap, O.E., Dvorak, V., Depaquit, J., Alten, B., Votýpka, J., Volf, P., 2015. Phylogeography of the subgenus *Transphlebotomus* Artemiev with description of two new species, *Phlebotomus anatolicus* n. sp. and *Phlebotomus killicki* n. sp. *Infection, genetics and evolution*, in press.
- Kasap, O.E., Votýpka, J., Alten, B., 2013. The distribution of the *Phlebotomus major* complex (Diptera: Psychodidae) in Turkey. *Acta tropica* 127, 204–211.
- Kaufmann, C., Schaffner, F., Ziegler, D., Pflüger, V., Mathias, A., 2012a. Identification of field-caught *Culicoides* biting midges using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Parasitology* 139, 248–258.
- Kaufmann, C., Steinmann, I.C., Hegglin, D., Schaffner, F., Mathis, A., 2012b. Spatio-temporal occurrence of *Culicoides* biting midges in the climatic regions of Switzerland, along with large scale species identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Parasites & vectors* 5, 246.
- Kaufmann, C., Ziegler, D., Schaffner, F., Carpenter, S., Pflüger, V., Mathis, A., 2011. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for characterization of *Culicoides nubeculosus* biting midges. *Medical and veterinary entomology* 25, 32–38.

- Khadri, M.S., Depaquit, J., Bargues, M.D., Ferté, H., Mas-coma, S., Lee, H.L., Ahmad, A.H., Léger, N., 2008. First description of the male of *Phlebotomus betisi* Lewis and Wharton, 1963 (Diptera: Psychodidae). *Parasitology international* 57, 295–299.
- Khalid, N., Elnaiem, D., Aboud, M., Al Rabba, F., Tripet, F., 2010. Morphometric and molecular differentiation of *Phlebotomus (Phlebotomus)* sandflies. *Medical and veterinary entomology* 24, 352–360.
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in dermatology* 17, 279–289.
- Killick-Kendrick, R., 2002. Phlebotomine sand flies: Biology and control. *World class parasites* 3, 33–43.
- Krüger, A., Strüven, L., Post, R.J., Faulde, M., 2011. The sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in military camps in northern Afghanistan (2007-2009), as identified by morphology and DNA „barcoding". *Annals of tropical medicine and parasitology* 105, 163–176.
- Kumar, N.P., Srinivasan, R., Jambulingam, P., 2012. DNA barcoding for identification of sand flies (Diptera: Psychodidae) in India. *Molecular ecology resources* 12, 414–420.
- Lane, R.P., 1986. Recent advances in the systematics of phlebotomine sandflies. *International journal of tropical insect science* 7, 225–230.
- Lane, R.P., Al-Taqi, M., 1983. Sandflies (Diptera: Phlebotominae) and leishmaniasis in Kuwait. *Bulletin of entomological research* 73, 633.
- Latrofa, M.S., Annoscia, G., Dantas-Torres, F., Traversa, D., Otranto, D., 2012. Towards a rapid molecular identification of the common phlebotomine sand flies in the Mediterranean region. *Veterinary parasitology* 184, 267–270.
- Léger, N., Depaquit, J., Gay, F., 2012. Description of the sandfly species *Chinius samarensis* n. sp. (Psychodidae; Diptera) from the Philippines. *Pathogens and global health* 106, 346–351.
- Léger, N., Depaquit, J., Gay, F., 2014. *Idiophlebotomus padillarum* n. sp. (Diptera Psychodidae) a new sand fly species from Palawan (Philippines). *Acta tropica* 132, 51–56.
- Léger, N., Depaquit, J., Robert, V., 2005. Phlebotomine sandflies from Madagascar (Diptera: Psychodidae). IV--Description of *Sergentomyia (Rondanomyia) goodmani* n. sp. Reinstatement of the subgenus *Rondanomyia* Theodor. *Parasite* 12, 51–57.
- Léger, N., Pesson, B., Madulo-Leblond, G., Abonnenc, E., 1983. Sur la différentiation des femelles du sous-genre (*Larroussi*) Nitzulescu, 1931 (Diptera-Phlebotomidae) de la région méditerranéenne. *Parasite* 38, 611–623.
- Lewis, D.J., 1973. Family Phlebotomidae. In: *A catalog of Diptera of the Oriental region*. s. 245.
- Lewis, D.J., 1978. The phlebotomine sandflies ( Diptera : Psychodidae ) of the Oriental region. *Bulletin of the British museum (Natural history)* 37, 215–345.
- Lewis, D.J., 1982. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Entomology series* 45, 121–209.

- Lewis, D.J., 2009. Functional morphology of the mouth parts in New World phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Transactions of the Royal entomological society of London* 126, 497–532.
- Lewis, D.J., Wharton, R.H., 1963. Some Malayan sandflies (Diptera: Psychodidae). *Proceedings of the Royal entomological society of London* 32, 117–124.
- Maia, C., Parreira, R., Cristóvão, J.M., Afonso, M.O., Campino, L., 2015. Exploring the utility of phylogenetic analysis of cytochrome oxidase gene subunit I as a complementary tool to classical taxonomical identification of phlebotomine sand fly species (Diptera, Psychodidae) from southern Europe. *Acta tropica* 144, 1–8.
- Manonmani, A.M., Mathivanan, A., Srinivasan, R., Jambulingam, P., 2010. Species-diagnostic polymerase chain reaction assays for *Phlebotomus argentipes* and *Phlebotomus papatasi*, vectors of *Leishmania*. *Journal of medical entomology* 47, 743–747.
- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N., Gradoni, L., 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and veterinary entomology*.
- Mathis, A., Depaquit, J., Dvořák, V., Tuten, H., Bañuls, A.-L., Halada, P., Zapata, S., Lehrter, V., Hlavačková, K., Prudhomme, J., Volf, P., Sereno, D., Kaufmann, C., Pflüger, V., Schaffner, F., 2015. Identification of phlebotomine sand flies using one MALDI-TOF MS reference database and two mass spectrometer systems. *Parasites & vectors* 8, 1–9.
- Mayr, E., 1942. *Systematics and the origin of species*. Columbia University press, New York.
- Minter, L.M., Yu, T., Florin, D.A., Nukmal, N., Brown, G.C., Zhou, X., 2013. Molecular identification of sand flies (Diptera: Psychodidae) in eastern north America by using PCR-RFLP. *Journal of medical entomology* 50, 920–924.
- Mukhopadhyay, J., Ghosh, K., Braig, H.R., 2000. Identification of cutaneous leishmaniasis vectors, *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi* using random amplified polymorphic DNA. *Acta Tropica* 76, 277–283.
- Mukhopadhyay, J., Ghosh, K.N., 1997. Diagnostic importance of female external genital structure of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) as observed by scanning electron microscopy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 92, 57–61.
- Muller, F., Depaquit, J., Léger, N., 2007. *Phlebotomus (Euphlebotomus) mascomai* n. sp. (Diptera-Psychodidae). *Parasitology research* 101, 1597–1602.
- Müller, P., Pflüger, V., Wittwer, M., Ziegler, D., Chandre, F., Simard, F., Lengeler, C., 2013. Identification of cryptic *Anopheles* mosquito species by molecular protein profiling. *PLoS ONE* 8.
- Nadim, A., Javadian, E., 1976. Key to species identification of sandflies. *Iranian journal of public health* 5, 36 – 44.
- Naucke, T.J., Menn, B., Massberg, D., Lorentz, S., 2008. Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitology research* 103.



- Nzulu, C.O., Cáceres, A.G., Arrunátegui-Jiménez, M.J., Lañas-Rosas, M.F., Yañez-Trujillano, H.H., Luna-Caipó, D. V., Holguín-Mauricci, C.E., Katakura, K., Hashiguchi, Y., Kato, H., 2015. DNA barcoding for identification of sand fly species (Diptera: Psychodidae) from leishmaniasis-endemic areas of Peru. *Acta tropica* 145, 45–51.
- Parvizi, P., Taherkhani, H., Ready, P.D., 2010. *Phlebotomus caucasicus* and *Phlebotomus mongolensis* (Diptera: Psychodidae): indistinguishable by the mitochondrial cytochrome b gene in Iran. *Bulletin of entomological research* 100, 415–420.
- Passerat de Silans, E.G., Picot, M.C., Lebbe, J., Dedet, J.-P., 1996. Wing morphometry of *Phlebotomus* laboratory population. *Annals of tropical medicine and parasitology* 90, 543–550.
- Pérez-Doria, A., Bejarano, E.E., Sierra, D., Vélez, I.D., 2008. Molecular evidence confirms the taxonomic separation of *Lutzomyia tihuilensis* from *Lutzomyia pia* (Diptera: Psychodidae) and the usefulness of pleural pigmentation patterns in species identification. *Journal of medical entomology* 45, 653–659.
- Pesson, B., Ready, J.S., Benabdennbi, I., Martín-Sánchez, J., Esseghir, S., Cadi-Soussi, M., Morillas-Marquez, F., Ready, P.D., 2004. Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: Mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif. *Medical and veterinary entomology* 18, 25–37.
- Prober, J.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zagursky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M. a, Baumeister, K., 1987. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238, 336–341.
- Randrianambinintsoa, F.J., Depaquit, J., 2013. Phlebotomine sand flies from Madagascar (Diptera: Psychodidae). VIII - *Phlebotomus (Anaphlebotomus) vincenti* n. sp. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 106, 206–211.
- Randrianambinintsoa, F.J., Depaquit, J., Brengues, C., Dhondt, C., Yahaya, I., Ouledi, A., Leger, N., Robert, V., 2012. First record of Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in the Comoros Archipelago with description of *Sergentomyia (Vattieromyia) pessonii* n. sp. and *S. (Rondanomyia) goodmani comorensis* n. ssp. *Parasite* 19, 195–206.
- Randrianambinintsoa, F.J., Léger, N., Robert, V., Depaquit, J., 2013. Phlebotomine sand flies from Madagascar (Diptera: Psychodidae). VII. An identification key for *Phlebotomus* with the description of *Phlebotomus (Anaphlebotomus) vaomalalae* n. sp. *Parasite* 20, 6.
- Ready, P.D., Smith, D.F., Killick-Kendrick, R., 1988. DNA hybridizations on squash-blotted sandflies to identify both *Phlebotomus papatasi* and infecting *Leishmania major*. *Medical and veterinary entomology* 2, 109–116.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4, 406–425.
- Salomón, O.D., Araki, A.S., Hamilton, J.G.C., Acardi, S.A., Peixoto, A.A., 2010. Sex pheromone and period gene characterization of *Lutzomyia longipalpis sensu lato* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae) from Posadas, Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105, 928–930.

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National academy of sciences of the United States of America* 74, 5463–5467.
- Scarpassa, V.M., Alencar, R.B., 2013. Molecular taxonomy of the two *Leishmania* vectors *Lutzomyia umbratilis* and *Lutzomyia anduzei* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian Amazon. *Parasites & vectors* 6, 258.
- Secombe, A.K., Ready, P.D., Huddlestone, L.M., 1993. A catalogue of Old World Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae).
- Seng, P., Rolain, J.-M., Fournier, P.E., La Scola, B., Drancourt, M., Raoult, D., 2010. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future microbiology* 5, 1733–1754.
- Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F., Hajibabaei, M., 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular ecology* 21, 1794–1805.
- Souza, N.A., Vigoder, F.M., Araki, A.S., Ward, R.D., Kyriacou, C.P., Peixoto, A.A., 2004. Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil. *Journal of medical entomology* 41, 906–913.
- Taylor, H.R., Harris, W.E., 2012. An emergent science on the brink of irrelevance: A review of the past 8 years of DNA barcoding. *Molecular ecology resources* 12, 377–388.
- Terayama, Y., Kato, H., Gomez, E.A., Uezato, H., Calvopiña, M., Iwata, H., Heshiguchi, Y., 2008. Molecular typing of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from areas endemic for Leishmaniasis in Ecuador by PCR-RFLP of 18S ribosomal RNA gene. *The journal of veterinary medical science* 70, 907–913.
- Testa, J. M., Montoya-Lerma, J., Cadena, H., Oviedo, M., Ready, P. D., 2002. Molecular identification of vectors of *Leishmania* in Colombia: Mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townsendi* series. *Acta tropica* 84, 205–218.
- Theodor, O., 1948. Classification of the Old World species of the subfamily Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). *Bulletin of entomological research* 39, 85–115.
- Theodor, O., Mesghali, A., 1964. On the Phlebotominae of Iran. *Journal of medical entomology* 1, 285–300.
- Tipu, H.N., Shabbir, A., 2015. Evolution of DNA sequencing. *Journal of the College of physicians and surgeons Pakistan* 25, 210–215.
- Tiwary, P., Kumar, D., Rai, M., Sundar, S., 2012. PCR-RFLP based method for molecular differentiation of sand fly species *Phlebotomus argentipes*, *Phlebotomus papatasi*, and *Sergentomyia babu* found in India. *Journal of medical entomology* 49, 1515–8.
- Townsend, B.C., Boorman, J.P.T., Pont, A.C., Chainey, J.E., Lane, R.P., Crosskey, R.W., Lowry, C.A., 1990. A catalogue of the types of bloodsucking flies in the British museum (Natural history). London.

- Uhlmann, K.R., Gibb, S., Kalkhof, S., Arroyo-Abad, U., Schulz, C., Hoffmann, B., Stubbins, F., Carpenter, S., Beer, M., von Bergen, M., Feltens, R., 2014. Species determination of *Culicoides* biting midges via peptide profiling using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Parasites & vectors* 7, 392.
- Vigoder, F.M., Araki, A.S., Bauzer, L.G.S.R., Souza, N.A., Brazil, R.P., Peixoto, A.A., 2010. Lovesongs and period gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. *Infection, genetics and evolution* 10, 734–739.
- Vigoder, F.M., Souza, N.A., Brazil, R.P., Bruno, R. V., Costa, P.L., Ritchie, M.G., Klaczko, L.B., Peixoto, A.A., 2015. Phenotypic differentiation in love song traits among sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in Brazil. *Parasites & vectors* 8, 290.
- Vincze, T., Posfai, J., Roberts, R.J., 2003. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic acids research* 31, 3688–3691.
- WHO, World Health Organization., 2010. Control of the Leishmaniasis. WHO Technical Report Series 949.
- Will, K.W., Rubinoff, D., 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics* 20, 47–55.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S. V, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research* 18, 6531–6535.
- Yan-Jia, L., Zhi-Cheng, Y., 1983. The taxonomy of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of Sichuan province, China, with descriptions of two species, *Phlebotomus (Adlerius) sichuanensis* sp. n. and *Sergentomyia (Neophlebotomus) zhengiiani* sp. n. *Annals of tropical medicine and parasitology* 77, 421 – 431.
- Young, D.G., Duncan, M. a, 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the west Indies, central and south America (Diptera: Psychodidae), *Memoirs of the American entomological institute*.
- Yssouf, A., Socolovschi, C., Flaudrops, C., Ndiath, M.O., Sougoufara, S., Dehecq, J.S., Lacour, G., Berenger, J.M., Sokhna, C.S., Raoult, D., Parola, P., 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry: An emerging tool for the rapid identification of mosquito vectors. *PLoS ONE* 8, 1–10.
- Zhang, L., Ma, Y., Xu, J., 2013. Genetic differentiation between sandfly populations of *Phlebotomus chinensis* and *Phlebotomus sichuanensis* (Diptera: Psychodidae) in China inferred by microsatellites. *Parasites & vectors* 6, 1–10.