

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra parazitologie



Dizertační práce

Permisivní a specifictí vektorů:  
rozdílné molekulární mechanismy interakce  
*Leishmania - Phlebotomus*

Jitka Myšková (roz. Pecková)

Školitel  
Prof. RNDr. Petr Volf, CSc.

## **Poděkování:**

V první řadě chci poděkovat svému školiteli Petru Volfovi za připomínky, nápady a rady, které se netýkaly jen experimentů, ale i sepsování práce.

Můj velký dík patří také Mileně Svobodové za ochotu kdykoliv konzultovat cokoli a také Heleně Kulíkové za všechno, co pro nás dělá.

Všem lidem z našeho kolektivu za vytváření příjemného pracovního prostředí, především pak Ivě, Jitce H., Aničce a Soně. Děkuji také Honzovi Dvořákovi za pomoc při některých experimentech.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé své rodině za podporu při studiu. Děkuji hlavně Oldovi Myšákovi.

## Obsah

Členění dizertační práce.....	4
Úvod do problematiky.....	5
1. Životní cyklus leishmanie v přenašeči .....	5
2. Specifičtí vs. permissivní vektorů.....	7
2.1. Specifičtí vektorů.....	9
2.1.1. LPG teorie.....	9
2.1.2. Receptor pro LPG ve střevě flebotoma.....	12
2.2. Permissivní vektorů.....	16
2.2.1. Glykoproteiny krevsajících vektorů .....	16
2.2.2. Potenciální receptor pro střevní glykoproteiny.....	19
3. <i>Leishmania tropica</i> .....	22
3.1. <i>Leishmania tropica</i> a její přenašeči.....	22
3.2. Kožní leishmanióza v Izraeli a na Blízkém východě.....	23
Cíle dizertační práce.....	26
Výsledky.....	27
Výsledky a diskuze.....	29
Souhrn.....	37
Seznam použité literatury.....	39
Přílohy.....	53

## Členění dizertační práce

Práce se skládá z těchto částí: první je **úvod do problematiky** a je následován vytyčenými **cíli dizertační práce**. **Výsledková část** je tvořena seznamem pěti publikací se stručnou charakteristikou řešeného problému. Čtyři z nich jsou již publikované a jedna je připravena k publikaci. V kapitole **výsledky a diskuze** jsou jednotlivé výsledky popsány podrobněji s návazností na literaturu. Práce je zakončena stručným **souhrnem** celé dizertační práce a **seznamem použité literatury**. Texty jednotlivých článků jsou zařazeny na konec dizertační práce jako **příloha**.

## Úvod do problematiky

Tato kapitola se věnuje rozdílům mezi permisivními a specifickými druhy flebotomů. Hlavním tématem jsou rozdíly v molekulárních interakcích mezi permisivními resp. specifickými flebotomy a leishmaniemi. Samostatná kapitola je věnována původci kožní leishmaniózy *Leishmania tropica*, která je v přírodě přenášena jak permisivním tak specifickým druhem flebotoma.

### 1. Životní cyklus leishmanie v přenašeči

Prvoci rodu *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) způsobují lidské onemocnění leishmaniózu. Tato onemocnění se projevují velmi širokým spektrem klinických příznaků, od nejčastějších kožních a spontánně se hojících forem, přes kožně slizniční, až po nejzávažnější smrtelné viscerální onemocnění. Typ leishmaniózy je dán především druhem parazita, ale také imunologickým pozadím hostitele a patrně i druhem přenašeče, který infikuje hostitele při sání. Parazit je přenášen samicemi flebotomů rodů *Phlebotomus* nebo *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). Výskyt leishmaniózy je dán rozšířením vhodného vektora.

Vývoj ve vektorovi je omezen na trávicí trakt. Leishmanie začínají svůj životní cyklus ve flebotomovi nasáním krve s infikovanými fagocyty do oblasti abdominálního mesenteronu. Transformací amastigotních forem vznikají bičíkatá promastigotní procyklická stádia. Ta se později mění v dlouhé štíhlé nektomonádní formy. Po překonání peritrofické matrix, která obaluje krevní tráveninu, se promastigoti přichycují k mikrovilární vrstvě střevního epitelu. Zabrání tím svému vyloučení z trávicího traktu při defekaci nestrávených zbytků krve samicí flebotoma. Později se opět uvolňují do střevního obsahu a migrují do hrudní části mesenteronu a kolonizují oblast stomodeální valvy. Pro úspěšný přenos do dalšího hostitele je nutná transformace v drobná a rychle se pohybující metacyklická stádia s velmi dlouhým bičíkem. Tato stádia jsou vysoce infekční pro obratlovčího hostitele.

Leishmanie lze rozdělit podle místa vývoje na Hypopylaria, Peripylaria a Suprapylaria. Popsaný životní cyklus je typický pro Suprapylaria. Leishmanie ze

skupiny Hypopylaria se vyvíjejí v zadním střevě (proctodeu) a přenášejí se kontaminativně při defekaci samice. Peripylaria se také vyvíjejí v zadním střevě, ale migrují anteriorně a přenášejí se inokulativně, stejně jako Suprapylaria, při sání flebotoma (přehled viz Killick-Kendrick, 1979, 1988, 1990a).

## 2. Specifičtí vs. permissivní vektorů

Některé druhy flebotomů podporují vývoj pouze jednoho druhu leishmanie a to toho, kterého přenášejí v přírodě. Naproti tomu existují druhy, ve kterých se úspěšně vyvíjejí různé druhy leishmanií. Podle míry specifity vůči leishmaniím můžeme flebotomy rozdělit na specifické a permissivní vektory.

Před defekací samice se leishmanie většinou vyvíjejí v jakémkoli vektorovi. Rozdíl nastává při vypuzování zbytků nestrávené krve z trávicího traktu. Ve specifických přenašečích tento krok přečkává pouze jeden druh leishmanie. Infekce ostatními druhy se během defekce ztratí. V permissivních vektorech se infekce jakéhokoli druhu leishmanie udržuje i po defekaci (viz tab. 1).

Předpokládá se, že ve všech druzích flebotomů je obranou leishmanie proti vypuzení při defekaci vazba na střevní epitel (viz kap. 1). Rozdílný molekulární mechanismus této interakce je zřejmě klíčový pro druhovou specifitu nebo permissivitu flebotoma vůči leishmaniím. Schopnost leishmanií udržet se v trávicím traktu permissivního flebotoma však ještě nezaručuje, že daný vektor je schopen leishmanie úspěšně přenést do dalšího hostitele. Tento proces je závislý na mnoha dalších faktorech jako jsou například sliny a potravní preference flebotoma.

Druh flebotoma	Parazit přenášený v přírodě	Experimentálně testované druhy	Úspěšné laboratorní infekce
<i>P. (Paraphlebotomus) sergenti</i>	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i> <i>L. major</i> <i>L. donovani</i>	<i>L. tropica</i>
Al-Zarani et al. 1988 , Guilvard et al., 1991, Kamhawi et al., 2000			
<i>P. (Phlebotomus) papatasi</i>	<i>L. major</i>	<i>L. major</i> <i>L. donovani</i> <i>L. tropica</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. panamensis</i>	<i>L. major</i>
Killick-Kendrick 1990b, Killick-Kendrick et al., 1994, 1995, Heyneman, 1963, Walters, 1992, 1993, Pimenta et al., 1994			
<i>P. (Phlebotomus) duboscqi</i>	<i>L. major</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>
Killick-Kendrick 1990b, Beach et al., 1984, Lawyer et al., 1990, Killick-Kendrick et al., 1994			
<i>P. (Adlerius) halepensis</i>	?	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>
Sádlová et al., 2003			
<i>P. (Euphlebotomus) argentipes</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i> <i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. donovani</i> <i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. amazonensis</i>
viz Shortt et al., 1931 v Adler a Theodor, 1957, Pimenta et al., 1994, Sacks et al., 2000			
<i>P. (Larrousius) perniciosus</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. tropica</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. tropica</i>
Killick-Kendrick 1990, Svobodová, nepubl. data			
<i>Lu. longipalpis</i>	<i>L. chagasi</i> (= <i>L. infantum</i> )	<i>L. chagasi</i> <i>L. major</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. chagasi</i> <i>L. major</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i>
Killick-Kendrick et al., 1977, Killick-Kendrick, 1990b, Rogers et al., 2002, Sádlová et al., 2003			

Tab. 1: Přehled některých přirozených a nepřirozených kombinací vektor-parazit

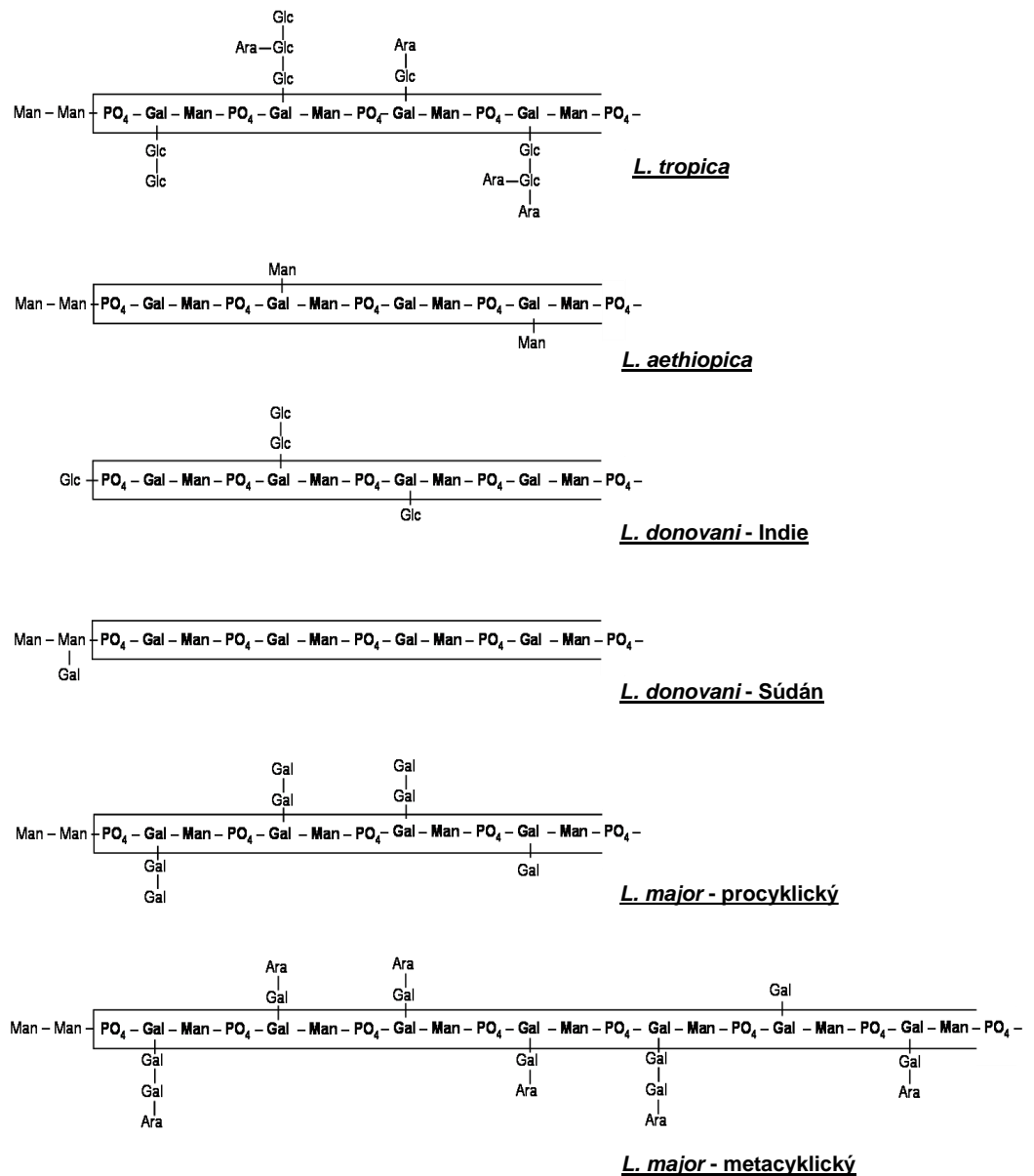


## 2.1. Specifičtí vektorů

Jak je patrné z tabulky 1, mezi specifické vektory lze zahrnout především *P. papatasi*, přenašeče *L. major* a *P. sergenti*, přenašeče *L. tropica*. U druhu *P. duboscqi* je situace poněkud nejasná (podrobněji viz kap. 2.1.2.).

### 2.1.1. LPG teorie

Jednou z teorií, která vysvětluje molekulární podstatu přichycení leishmanií k mikrovilární vrstvě epitelu, je interakce povrchového lipofosfoglykanu (LPG) a lektinu ve stěvě flebotoma. Lipofosfoglykan je majoritním glykokonjugátem na povrchu promastigotních leishmanií a pokrývá celou buňku včetně bičíku. Jeho konzervovaná část sestává z fosfodisacharidové kostry, která obsahuje opakující se jednotky (-Gal-Man-PO<sub>4</sub>-). Tato kostra je spojena s lipidickou kotvou fosforylovaným hexasacharidem (přehled viz Turco a Descoteaux 1992). Další součástí jsou sacharidové boční řetězce s druhově specifickou strukturou. V galaktose opakujících se fosfodisacharidových jednotek je uhlík C-3 u *L. major* plně substituován sacharidovými řetězci s terminální galaktosou, zatímco u *L. tropica* glukosou a arabinosou. *Leishmania aethiopica* má tyto jednotky substituovány jen částečně manosou a *L. donovani* se dokonce liší i vnitrodruhově. Súdánský kmen *L. donovani* žádné boční řetězce nemá, zatímco indický má ke galaktose připojeny glukosové oligosacharidy (viz obr.1) (Turco, 1988, McConville et al., 1990, McConville et al., 1995, přehled viz Sacks a Kamhawi, 2001).



Obr. 1: Schematické znázornění druhově a stadiálně variabilních částí LPG.

Druhová jedinečnost struktury bočních řetězců LPG je patrně příčinou specifity některých druhů flebotomů k leishmaniím. V devadesátých letech bylo popsáno, že je LPG zodpovědný za přichycení nektomonádních stádií leishmanií na střevní epitel flebotoma (Pimenta et al, 1992, Pimenta et al, 1994, Sacks a Kamhawi 2001, Sacks et al., 2000, Ilg 2001, Soares et al., 2002, Kamhawi et al., 2004). Nejjasněji tuto druhově specifickou interakci ukázal Pimenta et al.(1994) na kombinaci *P. papatasi* - *L. major*.

Předpokládá se, že při metacyklogenezi jsou promastigoti schopni uvolnit se z vazby ke střevu flebotoma a migrovat do předních částí trávicího traktu díky změně struktury LPG. Při transformaci leishmanií v infekční metacyklická stádia se přibližně dvojnásobně prodlužují repetitivní sekvence LPG. Navíc dochází ke změnám v terminálních sacharidech (Pimenta et al., 1992, Sacks et al., 1995a, Mahoney et al., 1999). Modifikace v metacyklickém LPG se u různých druhů leishmanií liší. Nejlépe byl tento proces objasněn u *L. major*, která během metacyklogeneze nahrazuje postranní terminální galaktosy za arabinosy (McConville et al., 1992) a tím je patrně schopna se od střevního receptoru odpoutat.

U ostatních druhů leishmanií, na rozdíl od *L. major*, nebyl mechanismus vazby ke střevu flebotoma a následného uvolnění během metacyklogeneze dostatečně vysvětlen a jednotlivé hypotézy si často protirečí. U *L. donovani*, která postrádá boční řetězce, se předpokládala vazba ke střevu terminální galaktosovou čepičkou. Ta by měla být při metacyklogenezi překryta prodlouženým fosfoglykanem (Sacks et al., 1995a). Pimenta et al. (1994) vysvětlují permisivitu *P. argentipes* receptorem pro konzervativní část LPG. V takovém případě by však překrytí specifických terminálních galaktosových zbytků u súdánského kmene *L. donovani* nemělo mít vliv na vazbu leishmanie ke střevnímu epitelu a její uvolnění. Vazbu promastigotů *L. chagasi* na střevo přirozeného přenašeče *Lu. longipalpis* inhibovali *in vitro* Soares et al. (2002) pomocí fosfoglykanu procyklických promastigotů stejného druhu leishmanie. Oproti tomu Pinto-da-Silva et al. (2005) pozoroval druhově nespécifickou vazbu *in vitro* čtyř různých druhů leishmanií (*L. chagasi*, *L. amazonensis*, *L. donovani* a *L. major*) na střevo *Lu. longipalpis*. Chavez et al. (2003) vytvořili protilátku proti procyklickému LPG *L. amazonensis* 3A1-La. S její pomocí oddělili procyklická stádia od metacyklických, přičemž pozorovali u metacyklických promastigotů pouze asi 3 % schopnost vazby ke střevu *L. longipalpis in vitro* oproti procyklickým stádiím. Tyto pokusy ukazují na druhovou nespécifčnost vazby LPG ke střevu flebotoma, protože *Lu. longipalpis* je přirozený přenašeč *L. chagasi* a nikoli *L. amazonensis*.

Tyto rozpory mohou být z velké části dány použitou metodikou. Většina těchto autorů využívá počítačící komůrku k určování množství promastigotů ve střevě při experimentálních infekcích a také k určení počtu leishmanií při vazbě ke střevu *ex vivo*. Bohužel tato metoda je natolik pracná, že není možné vyšetřit větší množství střev.

Obvykle se počty pohybují kolem 10 kusů, což je příliš málo na následnou statistickou analýzu.

Zajímavou tématikou jsou hybridy leishmanií a role jejich LPG v interakci s přenašečem. Přestože jsou leishmanie známy jako organismy bez sexuální části životního cyklu, nebyla u nich nikdy vyloučena možnost výměny genetické informace. V přírodě jsou běžné smíšené infekce jak v přenašeči tak v člověku, což dává příležitost k mezidruhové interakci. V průběhu let byly několikrát popsány nálezy chimerických kmenů. V Novém Světě se jednalo především o blízkce příbuzné z podrodu *Viannia*. V Nikaragui byl nalezen hybridní izolát *L. panamensis/L. brasiliensis* (Belli et al., 1994), ve Venezuele *L. guyanensis/L. brasiliensis* (Delgado et al., 1997) a v Peru *L. peruviana/L. brasiliensis* (Dujardin et al., 1995). Ve všech těchto oblastech se vyskytovaly i původní druhy, jejichž charakteristiky tyto hybridy nesou. Ve Starém světě byl popsán hybrid *L. major/L. arabica* (Kelly et al., 1991). V nedávné době Ravel et al. (2006) popsali 2 hybridní kmeny *L. major/L. infantum* ze středomořské oblasti. Hybridy byli izolováni z HIV pozitivních pacientů užívajících intravenózně drogy. *Leishmania major* a *L. infantum* jsou fylogeneticky vzdálené druhy. Ve středomoří jsou přenášeny naprosto odlišnými vektory. Pro *L. major* to je *P. papatasi* což je, jak bylo řečeno dříve, typický specifický vektor. *Leishmania infantum* zde přenáší *P. perniciosus* a další druhy podrodu *Larrousius*. *Phlebotomus perniciosus* je podle předběžných experimentů permisivním vektorem (Svobodová, nepubl.). V této souvislosti je zajímavá otázka vektorové specifity a s tím související účast molekul zodpovědných za interakci leishmanie s flebotomem.

### **2.1.2. Receptor pro LPG ve střevě flebotoma**

Receptor flebotoma pro LPG byl velmi intenzivně zkoumán. Vzhledem k tomu, že musí vázat sacharidovou část LPG, uvažovalo se především o molekule s lektinovou aktivitou. Wallbanks et al. (1986) a Svobodová et al. (1996) zjistili, že lyzáty flebotomů aglutinuje promastigoty leishmanií a tuto aglutinaci je možno zainhibovat specifickými sacharidy. Další důkazy o lektinové aktivitě byly zjištěny pomocí aglutinace krvinek

lyzátem střev, kde byla sacharidy inhibovatelná hemaglutinační aktivita nalezena u různých druhů flebotomů v různých tkáních (Wallbanks et al., 1986, Volf, 1993, Volf et al., 1994, Palánová a Volf, 1997, Volf et al., 2000). U druhu *P. papatasi* ji bylo možno zainhibovat lipofosfoglykanem z procyklických promastigotů *L. major*. Při použití metacyklického LPG byla inhibice této aktivity 10x nižší (Palánová a Volf, 1997). Hemaglutinační aktivita se lišila mezi samci a samicemi; u samic byla cca 50x vyšší, a zvyšovala se po sání krve, což ukazovalo na možnou interakci s leishmanii (Volf a Killick-Kendrick, 1996).

Přes tyto dílčí úspěchy se jednotlivé práce lišily efektem inhibičních sacharidů. Hemaglutinační aktivitu bylo možné zainhibovat zejména galaktosaminem a pak dalšími aminocukry, heparinem, fetuinem a lipopolysacharidem *E. coli* (Volf, 1993, Palánová a Volf, 1997), ale i turanosou a trehalosou (Wallbanks et al., 1986). Oproti tomu aglutinace promastigotů byla inhibována pouze manosaminem a N-acetylglukosaminem (Svobodová et al., 1996). Efekt galaktosaminu, jednoho ze sacharidů inhibujícího hemaglutinační aktivitu, byl popsán také *in vivo* po přidání galaktosaminu do sáté krve. Galaktosamin signifikantně zvýšil intenzitu infekce *L. major* v *P. duboscqi* po defekaci samice (Volf et al., 1998). Tento vliv byl však později vysvětlen inhibicí proteázové aktivity ve střevě flebotoma (Volf et al., 2001).

Lektin, který Volf et al. (2002a) izolovali ze střeva *P. duboscqi* má molekulovou váhu 42-44 kDa. Je sekvenčně velmi podobný proteinu nalezenému v cDNA slinných žláz *P. papatasi*, Yellow proteinu slinných žláz *Lu. longipalpis*, proteinu mateří kašičky *Apis mellifera* a Yellow-B proteinu *Drosophila melanogaster* (Valenzuela et al., 2001). Tento lektin není specifický pro střevo flebotoma, je přítomen především ve slinách. Přesto je tato molekula zodpovědná za střevní hemaglutinační aktivitu, neboť hemaglutinace purifikovanou frakcí byla inhibovatelná stejnými sacharidy jako hemaglutinace lyzátem celých střev. Funkce Yellow proteinu jako receptoru LPG však nebyla testována.

Vazbou leishmanií na střevo flebotomů se zabývali i další autoři. Warburg et al. (1989) zkoumali vazbu bičíků dvou druhů leishmanií ke střevu *P. papatasi*. Zjistili, že tato vazba není lektinového charakteru, ale zároveň není ani druhově specifická, protože se na střevo vázaly bičíky jak *L. major*, tak i *L. panamensis*, která se v *P. papatasi* není schopna vyvíjet. Dillon a Lane (1999) popsali 65 kDa protein *P. papatasi*,

který v denaturovaném stavu vázal LPG *L. major*. Tento experiment se ale nikdy nepodařilo zopakovat. Je to dáno patrně experimentální chybou v postupu. Autoři totiž použili k zablokování blotovací membrány bovinní albumin na který se nespecificky váže fosfoglykan leishmanií (Svobodová a Turco, nepubl. data).

Teorie o nezbytnosti LPG při vazbě na střevo flebotoma vyvrcholila až prací Kamhawi et al. (2004), v níž byl u *Phlebotomus papatasi* popsán cca 35 kDa receptor pro LPG, střevní galektin PpGalec. Galektiny jsou široce rozšířenou skupinou lektinů. U hmyzu, kde jsou podrobněji prostudovány u komárů a octomilky, se účastní imunitních reakcí a diferenciací buněk a orgánů (přehled viz Pace a Baum, 2004).

Galektin PpGalec je exprimován v nízkých koncentracích během celého života flebotoma, od larválních stádií přes kuklu až po dospělé. Jeho exprese je však podstatně zvýšena v dospělých samicích a je omezena na střevní tkáň. Protilátky připravené imunizací myši pomocí rekombinantního PpGalec byly schopny rozpoznávat protein ze střev *P. papatasi* a *P. duboscqi*, kteří si jsou blízce příbuzní a patří do téhož podrodu *Phlebotomus*. Oproti tomu nedetekovaly žádný protein ze střev *P. sergenti*, *P. argentipes*, *P. perniciosus* nebo *Lu. longipalapis*, což jsou zástupci jiných podrodů.

Leishmanie tento galektin využívají pro druhově specifickou interakci s vektorem. *Leishmania major* vázala rekombinantní galektin *P. papatasi*, zatímco jiné druhy jako *L. donovani* a *L. tropica* nikoli. Laboratorní infekce flebotomů navíc potvrdily účast galektinu na interakci s leishmaniemi *in vivo*. Po přidání protilátky anti-PpGalec do sítě krve došlo k významnému snížení počtu promastigotů *L. major* ve střevě *P. papatasi* v pozdní fázi infekce (Kamhawi et al., 2004).

Přestože tento typ galektinu má ve střevě i *P. duboscqi*, je jeho úloha při vazbě *L. major* nejistá. *Phlebotomus duboscqi* patří do stejného podrodu jako *P. papatasi* a je stejně jako on přirozeným přenašečem *L. major* (Beach et al., 1984, Lawyer et al., 1990). Experimentální infekce tohoto druhu flebotoma však ukázaly, že se v něm vyvíjela LPG-deficientní *L. major* i v pozdních fázích infekce po defekaci samice. Nicméně infekce měly nižší intenzitu v porovnání s flebotomy nakaženými původní linií *L. major* (Boulanger et al., 2004). Navíc Killick-Kendrick et al. (1994) provedl úspěšnou nákazu *P. duboscqi* amastigotními formami *L. tropica*. Ve srovnání s *P. papatasi* byla intenzita infekce *L. tropica* po defekaci u některých samic mnohonásobně vyšší. Po několikaletém úsilí se Killick-Kendrickovi a jeho spolupracovníkům podařilo

vyselektovat linie tohoto druhu náchylné a rezistentní k *L. tropica*. Linie však nebyly stabilní a projekt skončil aniž by byla objasněna molekulární podstata tohoto jevu (Volf, ústní sdělení). Tato permisivita *P. duboscqi* pro jiné druhy leishmanií než je *L. major* odporuje druhově specifické účasti galektinu při interakci s LPG leishmanií.

Přesto práce Kamhawi et al. (2004) potvrzuje původní hypotézu o nezbytnosti LPG při vazbě na střevo samice flebotoma a o druhové specifčnosti této vazby. Jedná se však pouze o prověřenou kombinaci galektin PpGalec *P. papatasi* a LPG *L. major*. Navíc se ukazuje, že se LPG teorie vztahuje především k druhově specifické struktuře lektinu ve střevě flebotoma a že *L. tropica* a *L. major* mohou nakazit i jiné, permisivní druhy flebotomů.

Struktura LPG tedy není zárukou druhově specifického přenosu. Je to dobře patrné na případě *L. tropica*, která je specifickým parazitem *P. sergenti* a tento druh flebotoma nepodporuje vývoj jiné leishmanie. Naopak *L. tropica* je schopna vývoje nejen v *P. sergenti*, ale také v *P. arabicus* a *P. guggisbergi* (Jacobson et al., 2003b, Lawyer et al., 1991). Takže přestože *L. tropica* se svým druhově specifickým LPG prospívá v *P. sergenti* s druhově specifickým receptorem, vyvíjí se také v nepříbuzných druzích flebotomů podrodů *Adlerius* a *Larrousius*. Podrobněji je tomuto tématu věnovaná kapitola 3. Obdobným způsobem se dokáže v různých druzích flebotomů vyvíjet i *L. major* (viz tab.1).

## 2.2. Permisivní vektorů

Kromě výše uvedených dvou druhů flebotomů, *P. papatasi* a *P. sergenti*, není do této doby znám jiný specifický přenašeč leishmanií. Mezi ověřené permisivní druhy můžeme zařadit *Lu. longipalpis*, která je přenašečem *L. chagasi* (= *L. infantum*), *P. argentipes*, který v přírodě přenáší *L. donovani* a *P. halepensis*, jehož výskyt koresponduje s výskytem viscerální *L. infantum* a náchylnost vůči *L. major* a *L. tropica* byla potvrzena experimentálně (viz tab. 1).

Specifita *P. papatasi* (a případně *P. sergenti*) byla vysvětlena druhově specifickou strukturou povrchového lipofosfoglykanu leishmanií a jejím receptorem ve střevě vektora (Pimenta et al., 1994, Sacks et al., 2000, Kamhawi et al., 2004). Nikdy však nebyl přesvědčivě vysvětlen mechanismus vazby leishmanií na střevo permisivních vektorů. Z předběžných experimentů v naší laboratoři jsme stanovili hypotézu, že molekuly zodpovědné za druhově nspecifickou vazbu leishmanie ke střevu permisivního vektora jsou střevní glykoproteiny flebotoma a lektiny leishmanie.

### 2.2.1. Glykoproteiny krevsajících vektorů

Parazitičtí prvoci jsou nuceni během svého životního cyklu překonávat ve vektorovi řadu bariér. Často přitom interagují s glykoproteiny na povrchu buněk i s glykoproteiny v nebuněčných strukturách přenašeče. První překážkou parazita po nasátí krevsajícím hmyzem je obvykle peritrofická matrix. U plasmodia spočívá interakce ookinetu s peritrofickou matrix v rozpoznávání sacharidových epitopů lektinovou aktivitou parazita. Autoři se však velmi liší v závěrech týkajících se typu sacharidu (Rudin a Haecker, 1989, Ramasamy et al., 1997). Následná penterace peritrofické matrix je spojena se sekrecí chitinolytických enzymů (Huber et al, 1991, Valchou et al., 2006).

Životní cyklus plasmodia v komárovi není vázán pouze na trávicí trakt přenašeče. Ookinet musí překonat střevní stěnu střeva a dostat se do slinných žláz odkud je injikován spolu se slinami do dalšího hostitele.



Po úniku z endoperitrofického prostoru neinteraguje plasmodium rovnou se střevními buňkami. Musí překonat síť tvořenou jemnými vlákny pokrývající mikrovilární vrstvu střevního epitelu. Poté ookinet invaduje střevní buňky, které po průniku plasmodia brzy odumírají (Zieler et al., 1998, Zieler a Dvorak, 2000). Invazi střevních buněk předchází přichycení parazita k jejich povrchu. Tuto interakci někteří autoři připisují vazbě ookinetu na sacharidové epitopy (Ramsamy et al., 1997). Deglykosylace střevního epitelu vedla ke snížení množství ookinetů navázaných na střevo *ex vivo* (Zieler et al. 1999). Kandidátem pro ligand ookinetu je molekula mucinového typu, tvořená ve střevech dospělců *An. gambiae*. Autoři se domnívají, že by tato molekula mohla chránit střevní tkáň komára před účinky proteáz a nevyklučují jeho interakci s plasmodiem (Shen et al., 1999).

Další glykoprotein, který se podílí na interakci s plasmodiem je laminin, hlavní součást bazální laminy střeva komára. Jeho receptorem je povrchový proteinem plasmodia P25 a zřejmě může hrát velkou roli při vývoji oocysty a její obrany před imunitním systémem komára (Vlachou et al., 2001).

K úspěšnému přenosu do dalšího hostitele je nutná invaze slinných žlaz komára sporozoity plasmodia. Velká část parazitů je však degradována v tělní dutině přenašeče a asi pouze 20 % sporozoitů proniká do slinných žlaz (Hillyer et al., 2007). Slinné žlázy komára rodu *Anopheles* jsou tvořeny dvěma laterálními a jedním mediálním lalokem. Buňky jednotlivých částí slinných žlaz se liší jak anatomií tak fyziologickou funkcí. Sporozoiti využívají pro průnik pouze mediální lalok a distální části laterálních laloků, jejichž specifita k lektinům je odlišná od ostatních regionů slinných žlaz (přehled viz Rodriguez et al., 2004). Některé lektiny, rozpoznávající jejich povrch, zablokovaly průnik plasmodia do slinných žlaz. (Barreau et al., 1995). Je tedy zřejmé, že jejich rozpoznávání plasmodiem je zprostředkováno specifickými interakcemi sporozoitů se sacharidovými epitopy přenašeče.

Obecně lze říci, že u komárů i dalších bezobratlých je podstatně častější N-typ glykosylace proteinů. To znamená, že vazba glykanu na peptidový řetězec je N-glykosidická; sacharid se váže přes NH<sub>2</sub> skupinu asparaginu. O-glykosylace, při které se váže sacharid přes OH skupinu serinu nebo threoninu, nebo přes ethanolamin fosfát, není u komárů tak běžná (Wilkins a Billingsley, 2001).

Zásadní účast O-glykoproteinů při interakci parazita a vektora podpořili svojí prací s monoklonálními protilátkami MG96 Dinglasan et al. (2003). Tyto protilátky, původně namířené proti střevním antigenům *Aedes aegypti*, zkříženě reagovaly se střevními glykoproteiny *Anopheles stephensi* a *An. gambiae*, a to jak u dospělců obou pohlaví, tak u larev a kulek. Zároveň byly schopny inhibovat infekci *Anopheles stephensi* plasmodiem přidáním do infikované krve před sáním komára (Dinglasan et al., 2003). Tyto protilátky zároveň rozpoznávají střevní glykoproteiny i dalších krevsajících členovců (*Triatoma pallidipennis*, *Glossina morsitans*, *Ctenocephalides felis*, *Dermacentor variabilis*), což podle autorů ukazuje na určitou univerzálnost interakce patogenu a hostitele a na potenciální možnost vytvoření vakcíny blokující přenos patogena (Dinglasan et al., 2005).

Možnost vytvoření vakcíny blokující přenos patogena je často skloňovaným tématem při objevení jakékoli molekuly hrající roli v interakci mezi komárem a plasmodiem. Jako další příklad lze uvést chitinázu tvořenou ve střevě samic *Anopheles gambiae*. Autoři spekulují o využití protilátek proti tomuto komářímú enzymu k zablokování průniku ookinetu peritrofickou matrix (PM). Domnívají se, že nepřítomnost chitinázy komára vede k větší tloušťce PM a tím k obtížnějšímu průniku plasmodia (Shen a Jacobs-Lorena et al., 1997).

Obdobné protilátky jako Dinglasan et al. (2003, 2005) připravili i Lal et al. (2001). Tyto protilátky blokovaly infekce plasmodiem. Navíc snižovaly fekunditu a schopnost přežití komárů. Také tito autoři diskutují jejich možné využití v praxi jako vakcíny blokující přenos. Je ovšem sporné jakým způsobem by bylo možné takové protilátky v komárovi exprimovat a zda by takoví komáři měli nějakou selekční výhodu oproti přirozenému druhu. V tomto případě by naopak snížení fekundity, které popisují Lal et al. (2001), mělo kontroverzní účinek.

Slibnější výsledky přinesli Gosh et al. (2001), kteří vytvořili peptid SM1 vázající se na distální části slinných žláz a lumenální stranu střeva komára. Tento peptid inhiboval jak průnik plasmodia do slinných žláz, tak i formování a průnik ookinetu střevní stěnou. V návaznosti na tuto práci použili Ito et al. (2002) komáry *Anopheles stephensi* transgenní v tomto peptidu k experimentálním infekcím. Komáři exprimovali peptid SM1 po sání krve a díky tomu byli méně vnímaví k infekci *Plasmodium berghei*. Navíc rapidně klesla jejich schopnost přenést plasmodium do dalšího hostitele.

Výhodou je, že exprese SM1 neovlivňuje životnost ani fekunditu komára. Vazba SM1 na střevo a slinné žlázy komára brání interakci plasmodia s povrchem patrně sterickým mechanismem, nikoli blokováním specifických epitopů. Nicméně tyto experimenty nijak nevyvracejí studie, které ukazují na interakci plasmodia s cukernými epitopy ve střevě komára (Ramsamay et al., 1997, Zieler et al. 1999, Shen et al., 1999).

U flebotomů nebyla střevním glykoproteinům věnována taková pozornost. Evangelista a Leite (2002) detekovali na mikrovilární vrstvě střevního epitelu *Lu. longipalpis* sacharidové epitopy pomocí *Helix pomatia* aglutininu (HPA). Tento lektin specifický pro N-acetylgalaktosamin může rozpoznávat O-glykany (Cummings, 1997). Evangelista a Leite (2002) spekulují u možnosti, že se jedná o součást receptoru pro LPG *L. chagasi*. Vzhledem k tomu, že se množství N-acetylgalaktosaminu během trávení flebotoma neměnilo, nejde o součást lektinu, jehož exprese vzrůstá po sání krve (Volf a Killick-Kendrick, 1996). Evangelista a Leite (2002) nijak nediskutují možnost přímé účasti N-acetylgalaktosaminových zbytků při vazbě *L. chagasi* na střevo *Lu longipalpis*. Nicméně vzhledem k zásadní funkci střevních glykoproteinů komárů při interakci s plasmodiem nelze vyloučit podobný mechanismus ani u flebotomů.

### **2.2.2. Potenciální receptor pro střevní glykoproteiny**

Pokud hledáme u leishmanií receptor rozpoznávající sacharidové epitopy ve střevě flebotoma, je třeba hledat lektin na povrchu promastigotů. Lektinovou aktivitou leishmanií se zabývala řada prací. Především byl studován vztah k savčím hostitelským buňkám. To znamená, že byla sledována přítomnost lektinového receptoru na metacyklických promastigotních a amastigotních stádiích. Nicméně ne všichni autoři studující vztah leishmanií a savčích hostitelských buněk použili ke svým pokusům vhodné morfologické stádium parazita, tzn. pouze metacyklické promastigoty nebo amastigoty. Proto nelze vyloučit účast takové lektinové aktivity ani při interakci s vektorem.

Jedna z prvních prací zabývajících se interakcí lektin-sacharid popisuje u promastigotů vazebnou aktivitu k makrofágům inhibovatelnou N-acetylglukosaminem a

glukosaminem (Bray, 1983). Specifitu k N-acetylglukosaminu potvrzovaly i následující pokusy (Hernández et al., 1986). Ty navíc pomocí preinkubace se lektinem z pšeničných klíčků (WGA) ukázaly, že přítomnost lektinové aktivity je skutečně i na straně leishmanií a ne jen makrofágů, jak již dříve publikoval Chang (1981). K obdobným výsledkům dospěl i Schottelius (1992), který pomocí neoglykoproteinů detekoval na povrchu promastigotů lektinovou aktivitu se specifitou k N-acetylglukosaminu a N-acetylgalaktosaminu. Interakci s hostitelskými buňkami studovali také Gosh et al. (1999) a Bandyopadhyay et al. (2001). Našli povrchový 67 kDa protein leishmanie, který je specifický pro laminin a účastní se interakce v savčím hostiteli.

Mukhopadhyay et al. (1989) a Butcher et al. (1990, 1992) našli na povrchu promastigotů i amastigotů *L. donovani* protein se specifitou k heparinu. Jeho množství na povrchu promastigotů se zvyšovalo v souvislosti s metacyklogenezí, což ukazuje na jeho funkci při interakci v savčím hostiteli. Tento protein zřejmě napomáhá počáteční fázi interakce s makrofágy. Heparin zde funguje jako přemostění mezi tímto proteinem a povrchovým heparinovým receptorem hostitelské buňky. Love et al. (1993) detekovali u amastigotů podobnou aktivitu, ale patrně odlišného původu. Pomocí ní se amastigoti vážali přímo na savčí hostitelské buňky exprimující proteoglykany s heparansulfátem. Heparin zde tedy nefungoval jako spojka mezi dvěma heparinovými receptory. Autoři se domnívají, že se jedná o jinou molekulu, než popisují Butcher et al. (1990, 1992).

Svobodová et al. (1997a) našli lektinovou aktivitu na povrchu promastigotních stádií leishmanií zprostředkovávající vazbu k lidským monocytům se specifitou ke galaktosaminu. V následující studii se Svobodová et al. (1997b) systematicky zaměřili na rozdíly v lektinové aktivitě u odlišných morfologických stádií pomocí metody aglutinace červených krvinek. Hemaglutinační aktivita byla inhibovatelná širším spektrem sacharidů, než je popsáno výše, a byla silnější u amastigotních stádií, což ukazuje na funkci v savčím hostiteli.

Je tedy zřejmé, že ač je lektinová aktivita na povrchu leishmanií přítomna, není zcela jasné, zda je za ní zodpovědná jedna nebo více molekul s odlišnými funkcemi buď v přenašeči nebo v savčím hostiteli. Pokud je mi známo, žádná taková molekula umožňující vazbu ke střevu flebotoma nebyla dosud izolována ani charakterizována.

Další molekulou leishmanií, která by mohla být zajímavá z hlediska zprostředkování vazby neelektinového typu ke střevu flebotoma je proteáza gp63, známá též jako leishmanolysin. Je to jedna z hlavních povrchových molekul leishmanií přítomná hlavně u stádií vyskytujících se ve vektorovi (Bouvier et al., 1995).

Zástupci nižších trypanosomatid (*Herpetomonas*, *Crithidia*, *Phytomonas*) exprimují molekulu s proteázovou aktivitou, která zkříženě reaguje s protilátkami proti gp63 leishmanií (Elias et al., 2006). Tato molekula se účastní vazby *ex vivo* prvoků rodu *Crithidia* a *Phytomonas* na střevo *Ae. aegypti*. Schopnost vazby na střevo komárů se zhruba o polovinu snížila oproti kontrole v případě preinkubace prvoků s protilátkami proti gp63. Navíc se schopnost vazby prvoků významně snížila i preinkubací střeva s purifikovanou gp63 (d'Alvia-Levy et al., 2006). Proteáza *Herpetomonas megaseliidae* je kotvena, stejně jako gp63, pomocí glykofosfatidylinositolové kotvy. Preinkubace s protilátkou anti-gp63 a fosfolipázou C významně snížila vazbu parazita na střevo hostitele mouchy *Megaselia scalaris* (de Melo et al., 2006).

Experimentální infekce liniemi leishmanií s nulovou nebo sníženou expresí gp63 ale ukázaly, že vývoj leishmanie ve flebotomovi tato metaloproteáza neovlivňuje vůbec u *L. major* (Joshi et al., 2002) nebo ovlivňuje, ale pouze slabě v časně fázi infekce, nikoli v pozdní fázi po defekaci samice u *L. amazonensis* (Hajmová et al., 2004).

### 3. *Leishmania tropica*

#### 3.1. *Leishmania tropica* a její přenašeči

*Leishmania tropica* je jedním z původců kožní leishmaniózy ve Starém světě. Tento parazit je rozšířen v Maroku a Tunisu, na Blízkém východě v Turecku, Sýrii, Jordánsku a Izraeli. Dále na východ jej můžeme nalézt v Jemenu a v oblasti Perského zálivu v Saudské Arábii, Iránu a Iráku, ve Střední Asii v Turkmenistánu, Afghánistánu, Pákistánu a v západní části Indie. V Africe se, kromě mediteránu, vyskytuje *L. tropica* v subsaharské oblasti, např. v Keni (přehled viz Jacobson, 2003a) .

Klinické projevy onemocnění způsobené tímto druhem leishmanie jsou obvykle ohraničené kožní léze, které se ale na rozdíl od *L. major* hojí mnohem déle, v některých případech i více let. Méně obvyklé formy se spontánně nehojí vůbec (přehled viz Jacobson, 2003a). Magill et al.(1993) dokonce identifikovali *L. tropica* jako původce viscerální formy leishmaniózy u několika vojáků účastnících se operace Pouštní bouře v Saúdské Arábii. Viscerální leishmanióza Kala azar způsobená *L. tropica* byla popsána také v Indii, kde je obvykle tento typ onemocnění vázán na *L. donovani* (Sacks et al., 1995b).

Zatímco kutánní leishmanióza způsobená druhem *L. major* je typickou zoonoózou, *L. tropica* byla většinou zařazena mezi antroponózy. To znamená, že se v jejím koloběhu neúčastní rezervoárový hostitel. Klasická ohniska *L. tropica* s velkým výskytem nakažených obyvatel byla hlášena hlavně z městských oblastí jako je Kábul v Afghánistánu (Hewit et al., 1998), nebo Sanliurfa v Turecku (Volf et al., 2002b). Přesto byla zaznamenána i venkovská ohniska např. v Saúdské Arábii (Al-Zahrani et al., 1988, 1989) nebo v Jordánsku (Kamhawi et al., 1995). Další případy s podobným výskytem *L. tropica* byly zaznamenány v subsaharské Africe (Lawyer et al., 1991, přehled viz Jacobson, 2003a). Vzhledem k nízké incidenci onemocnění u lidí v těchto ohniscích se uvažovalo o zoonotickém cyklu. Za možný rezervoár byli považováni živočichové žijící v těsné blízkosti člověka. Přestože však byla *L. tropica* izolována ze psa, zdá se, že tento hostitel nemá v jejím koloběhu větší význam a patrně se jedná o náhodné nákazy (Guessous-Idrissi et al., 1997, Dereure et al., 1991). V některých rurálních oblastech je přesto pravděpodobnější přenos spíše zoonotický než

antroponotický, protože se často jedná o nově osídlená místa, kde musel parazit již předtím v přírodě kolovat bez účasti člověka v divoce žijících zvířatech. V roce 1975 byla v Namibii izolována leishmanie z damana (*Procapra capensis*) avšak bez druhového určení (Grove a Ledger, 1975) a daman byl jako možný rezervoárový hostitel *L. tropica* popsán také v Keni (Sang et al., 1992, 1994). Následně se ukázalo, že damani se zřejmě významně podílejí na cyklu *L. tropica* i u jezera Kinneret v Izraeli (Jacobson et al., 2003b, Svobodová et al., 2006). Je tedy zřejmé, že *L. tropica* není vždy omezena na antroponotický přenos. Může využívat rezervoárové živočichy, díky nimž koluje v přírodě i bez lidského hostitele. Člověk se v těchto případech nakazí spíše náhodně a nehraje v epidemiologii onemocnění významnou roli.

Vektorem *L. tropica* je nejčastěji *P. sergenti* (Al-Zahrani et al. 1988, Guilvard et al., 1991). První experimentální přenos z *P. sergenti* na hostitele provedli až Svobodová a Votýpka (2003). Přestože výskyt kožní leishmaniózy způsobené *L. tropica* často koresponduje s rozšířením *P. papatasi*, ukázalo se, že *P. papatasi* není schopen tento druh leishmanie přenášet (Killick-Kendrick et al., 1994). V některých, zejména zoonotických ohniscích se na přenosu *L. tropica* podílejí i další druhy flebotomů. V Keni je vektorem *P. (Larrousius) guggisbergi* (Lawyer et al., 1991). V severním Izraeli byla *L. tropica* izolována z *P. (Adlerius) arabicus* (Jacobson et al., 2003b). Potenciálními vektory mohou být i jiní flebotomové patřící do permissivní skupiny například *P. halepensis*, který se často vyskytuje v oblastech s *L. tropica* a parazit je schopen v něm úspěšně dokončit vývoj (Sádlová et al., 2003).

### **3.2. Kožní leishmanióza v Izraeli a na Blízkém východě**

V Izraeli, na palestinském území a okolí, stejně jako jinde v mediteránní oblasti, se vyskytuje jak kožní leishmanióza, jejímž původcem je *L. major* nebo *L. tropica*, tak i viscerální forma způsobená *L. infantum*. Bohužel někteří autoři popisující ohniska kutánní leishmaniózy nebrali na zřetel původce ani přenašeče. Není tedy jasné, kdy se jednalo o *L. tropica* a kdy o *L. major* (viz Anis et al., 2001 v Jacobson et al., 2003b). Nicméně případy způsobené *L. major* byly poměrně dobře popsány a definovány jako zoonotické nákazy, kdy rezervoárovým hostitelem jsou hlodavci *Psammomys obesus* nebo *Meriones crassus* a přenašečem *P. (Phlebotomus) papatasi*. Tato ohniska se

vyskytla především ve střední části údolí Jordánu, kolem Mrtvého moře a v jižní části Izraele v oblasti pouště Negev (Schlein et al., 1984, Wasserberg et al., 2002, přehled viz Jaffe et al., 2004).

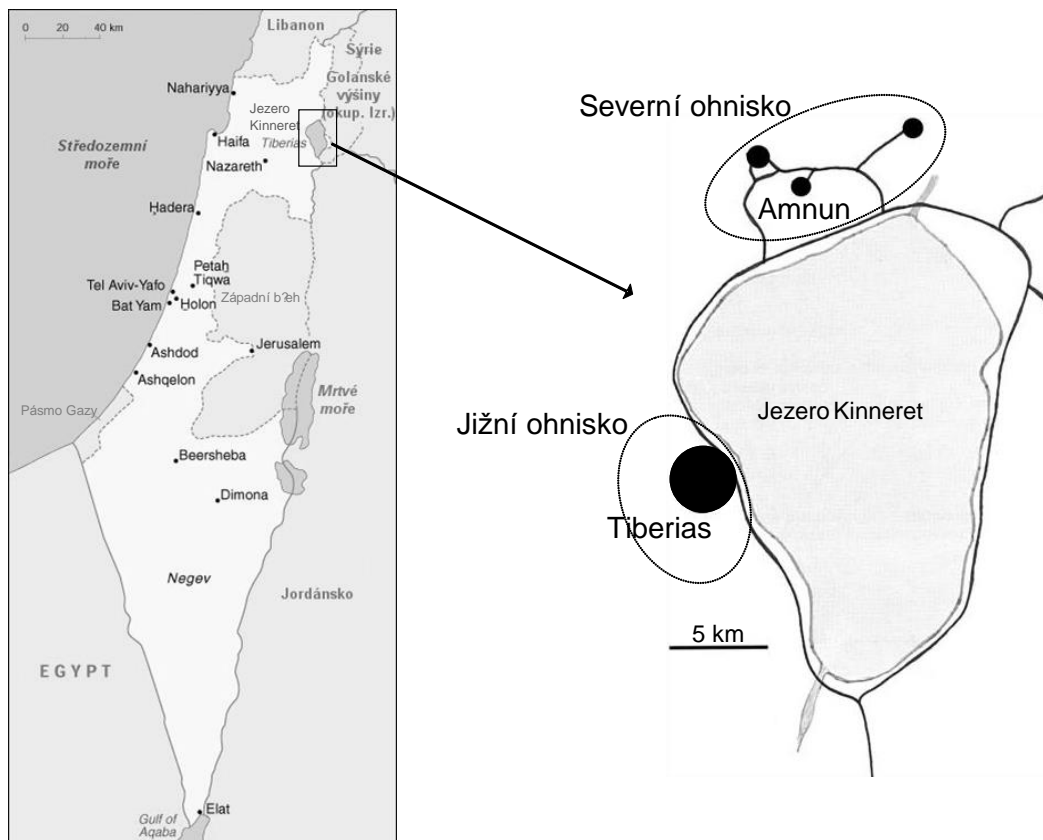
Do roku 1993 byly v Jordánsku známy případy kožní leishmaniózy způsobené pouze *L. major*. Onemocnění způsobené *L. tropica* bylo poprvé zaznamenáno ve vesnicích poblíž Mrtvého moře. Vzhledem k sporadickému výskytu u lidí se předpokládá zoonotický přenos (Saliba et al., 1993, 1997). V roce 1994 byla ve stejné oblasti provedena faunistika flebotomů, nicméně přenašeč nebyl indentifikován (Saliba et al., 1997). Ani v ohnisku na severu země, kde izolovali Kamhawi et al. (1995) *L. tropica* z lézí pacientů, nebyl vektor nalezen. Identifikace rezervoáru i vektora se podařila až později v Izraeli (viz dále).

V nedávné době se Izraeli vyskytla ohniska onemocnění způsobená *L. tropica* na Západním břehu Jordánu, v Judské poušti poblíž Jeruzaléma a u jezera Kinneret v galilejské oblasti. Tato ohniska jsou jak rurální tak urbánní, nicméně domy, kde se onemocnění vyskytlo, většinou sousedí s otevřenou krajinou (přehled viz Jaffe et al., 2004). *Leishmania tropica* byla v těchto ohniscích izolována jak z typického přenašeče *P. (Paraphlebotomus) sergenti* (Schnur et al., 2004, Jacobson et al., 2003b), tak i z druhu, který nikdy předtím za vektora *L. tropica* nebyl považován, *P. (Adlerius) arabicus* (Jacobson et al., 2003b, Svobodová et al., 2006).

Ohnisko v galilejské oblasti lze rozdělit na severní a jižní část (viz obr. 2). Severní ohnisko na pobřeží jezera Kinneret zahrnuje vesnice v okolí obce Amnun. *Leishmania tropica* izolovaná z pacientů a flebotomů z této oblasti byla antigenně podobná *L. major*, narušila od *L. tropica*, která byla izolována z pacientů v jižní oblasti (Jacobson et al., 2003b). Povrchový lipofosfoglykan izolátů ze severního ohniska měl odlišnou strukturu postranních sacharidových řetězců oproti izolátu z jižního ohniska i oproti referenčnímu kmeni *L. tropica* (Soares et al., 2004). V severním ohnisku byly leishmanie opakovaně nalezeny v *P. arabicus*. V tomto druhu se jednalo o zralé infekce v již defekovaných samicích. V *P. sergenti* severního ohniska byly leishmanie nalezeny pouze jedenkrát v samici se zbytky nestrávené krve. V takovém případě ale nelze uvažovat o schopnosti flebotoma leishmanii přenést (Jacobson et al., 2003b).



Jako rezervoár v tomto ohnisku byli vytipováni damani, vzhledem k jejich dlouhověkosti a tomu, že se vyskytují v blízkosti domů pozitivních pacientů. PCR z biopsií těchto živočichů byla pozitivní (Jacobson et al., 2003b). Pomocí experimentálních infekcí z damana na přenašeče se prokázalo, že je *P. arabicus* schopen infekce na asymptomatickém rezervoárovém hostiteli (Svobodová et al., 2006).



Obr. 2. Mapa ohniska výskytu *L. tropica* u jezera Kinneret (upraveno podle Svobodová et al., 2006)

## **Cíle dizertační práce:**

Cílem dizertační práce bylo studium interakce permisivních vektorů s leishmaniemi. Vzhledem k častému využití experimentálních infekcí bylo nejprve třeba pro tyto pokusy vybrat nejvhodnější metodu kvantifikace parazitů. Hlavním těžištěm celé práce ale měla být identifikace mechanismů, které umožňují vazbu leishmanie ke střevu permisivního přenašeče. Tyto poznatky pak měly být aplikovány na dva konkrétní případy: přenos *Leishmania tropica* v přirozených ohniscích a studium hybridních leishmanií v různých přenašečích. Celou práci lze tedy tématicky rozdělit do čtyř cílů.

1. Zjistit nejvhodnější metodický postup při určování intenzity infekce laboratorně nakažených flebotomů
2. Objasnit účast povrchového lipofosfoglykanu leishmanií a dalších molekul při interakci parazitů s permisivními a specifickými druhy flebotomů.
3. Porovnat životní cykly různých kmenů *Leishmania tropica* v ohniscích kožní leishmaniózy na severu Izraele.
4. Prostudovat vývoj hybridů *L. major/L. infantum* v různých přenašečích a ověřit roli jejich lipofosfoglykanu v interakci s flebotomem.

## Výsledky

1. **Jitka Myšková**, Jan Votýpka and Petr Volf. *Leishmania* in sand flies: comparison of quantitative PCR with other techniques to determine the intensity of infection.

Tato práce byla zaměřena na posouzení vhodnosti různých metod při zjišťování intenzity infekce ve flebotomech. Různými infekčními dávkami a různými kombinacemi vektor-parazit bylo zajištěno co nejširší spektrum intenzity infekce před a po defekaci samice. Pomocí tří metod jsme vyhodnocovali sílu infekce flebotoma a diskutovali za jakých okolností a pro jaké účely je daná metoda nejvhodnější

2. **Jitka Myšková**, Milena Svobodová, Stephen M. Beverley and Petr Volf 2007. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes and Infection* 9: 317-324

Tato práce zjišťovala účast povrchového lipofosfoglykanu leishmanií v různých přenašečích a ověřovala permisivnost nově kolonizovaného druhu *P. arabicus*. Pomocí elektroforetických a fluorescenčních metod byly detekovány molekuly O-glykoproteinu, které se účastní vazby leishmanií na střevo permisivních druhů flebotoma.

3. Petr Volf and **Jitka Myšková** 2007. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends in Parasitology* 23: 91-92

V této práci jsou shrnuty nejnovější poznatky týkající se interakcí mezi leishmaniemi a oběma typy přenašečů, jak permisivních, tak specifických. Zatímco u specifických přenašečů je přichycení leishmanií na střevo zprostředkováno lipofosfoglykanem parazita a lektinem přenašeče, u permisivních druhů mají klíčovou roli O-glykoproteiny střeva vektora.

4. Milena Svobodová, Jan Votýpka, **Jitka Pecková**, Vít Dvořák, Abedelmajeed Nasereddin, Gad Baneth, Julia Sztern, Vasiliy Kravchenko, Amnon Orr, David Meir, Lionel F. Schnur, Petr Volf, and Alon Warburg 2006. Distinct transmission cycles of

*Leishmania tropica* in 2 adjacent foci, Northern Israel. Emerging Infectious Diseases  
12: 1860-1868

Tato studie měla dvě části: laboratorní a terénní. V rámci obou částí jsme porovnávali různé aspekty životního cyklu *Leishmania tropica* ve dvou ohniscích na pobřeží jezera Kinneret v severním Izraeli.

5. Petr Volf, Ivana Benková, **Jitka Myšková**, Jovana Sádlová, Lenea Campino and Christophe Ravel 2007. Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids. International Journal for Parasitology 37:589-593

Zjišťovali jsme schopnost vývoje hybridů *L. major/L. infantum* v přenašečích *P. papatasi* a *Lu. longipalpis* ve srovnání s *L. major* a *L. infantum*. Zaměřili jsme se na zjištění typu povrchového lipofosfoglykanu u jednotlivých hybridů pomocí specifické protilátky proti lipofosfoglykanu *L. major*.

## Výsledky a diskuse

### Metodický postup při určování intenzity infekce laboratorně nakažených flebotomů

Experimentální infekce flebotomů se používají při nejrůznějších studiích, od terénních a epidemiologických určujících vektorovou specifitu, až po testování molekulární podstaty interakce mezi flebotomem a leishmanií. Tyto pokusy vyžadují přesné určení počtu infikovaných flebotomů a lokalizace infekce v různých fázích životního cyklu leishmanie. Naše práce byla proto zaměřena na výběr nejvhodnějšího postupu při určování intenzity infekce.

Použili jsme tři metody. Mikroskopický odhad intenzity infekce ve vypitvaném střevě flebotoma, určení počtu promastigotů ve střevě pomocí počítací komůrky a kvantitativní PCR z vypitvaného střeva za použití primerů kDNA. První dvě metody jsou běžně používány při infekcích flebotomů (Butcher et al., 1996, Sacks et al., 2000, Killick-Kendrick et al. 1994, 1995, Sádlova et al., 2003). Třetí metoda byla použita pro identifikaci infekce v pacientech (Mary et al., 2004, Francino et al., 2006). U infikovaných flebotomů dosud použita nebyla. Abychom získali co nejširší spektrum intenzity infekce, provedli jsme tři odlišné modelové infekce s různou infekční dávkou. Dosáhli jsme tak slabých i silných infekcí před i po defekaci samice.

Z výsledků můžeme říci, že by výběr metody měl záviset na účelu experimentu. Odhad infekce je nejvhodnější v případech, že nás zajímá především stav infekce po defekaci samice. Hlavní výhodou je možnost určení lokalizace. Pro případné posouzení schopnosti vektora přenést leishmanie do dalšího hostitele je důležitějším faktem znalost lokalizace infekce, než přesné určení počtu promastigotů ve střevě. Na druhou stranu, v případě, že experimentátora zajímá přesný počet promastigotů před defekací, je tato metoda nevhodná, neboť velké množství erytrocytů znemožňuje objektivní odhadnutí počtu leishmanií. V tomto případě je vhodné využít buď počítání leishmanií v hemocytometru nebo kvantitativní PCR. První ze dvou možností je jednoznačně levnější, ale zároveň velmi pracná a neumožňuje vyšetření dostatečného počtu střev pro následnou statistickou analýzu. Tento nedostatek je patrný u prací využívajících hemocytometr, kdy 8 až 10 střev ve skupině je počet příliš malý pro obecnější závěr

(Sacks et al., 2000, Kamhawi et al., 2000). Kvantitativní PCR je podle našich výsledků zřejmě nejvhodnější metodou pro přesné určení počtu leishmanií ve střevě. Její výhodou je menší časová náročnost oproti počítání v komůrce a díky tomu i možnost vyššího počtu vyšetřených flebotomů. Dalším přínosem je podstatně vyšší citlivost v případě nízkých infekcí oproti hemocytometru. Relativně vysoká cena této metody zatím bohužel neumožňuje její využití v rutinních experimentech.

Závěrem lze říci, že pro úplnou a správnou informaci o intenzitě a lokalizaci infekce by bylo nejvhodnější zkombinovat metody dvě. Nejprve zjistit lokalizaci promastigotů v různých částech trávicího traktu a následně stejné střevo podrobit kvantitativní PCR. Tento postup však lze ztěžít doporučit, neboť je velmi obtížné střevo již vyšetřené pod mikroskopem kvantitativně přenést do ependorfky pro další experiment. Zřejmě právě proto byl podobný postup dosud použit jen jednou v práci Nieves and Pimenta (2000). V této studii po určení lokalizace použili stejné střevo k počítání promastigotů v hemocytometru. Nejlepší možností je tedy zvolit takovou metodu, která je v dané situaci nejvhodnější. To závisí na schopnostech experimentátora, zavedené metody v dané laboratoři a účelu pro který je pokus prováděn.

### **Účast povrchového lipofosfoglykanu leishmanií v permissivních druzích flebotomů.**

Osm druhů flebotomů (*P. papatasi*, *P. sergenti*, *P. halepensis*, *P. arabicus*, *P. argentipes*, *P. perniciosus* a *Lu. longipalpis*) bylo otestováno značenými lektiny pomocí afinoblottingu na přítomnost a typ střevní glykosylace. N-glykosylované i O-glykosylované molekuly jsme detekovali u pěti druhů *P. halepensis*, *P. arabicus*, *P. argentipes*, *P. perniciosus* a *Lu. longipalpis*. Dva druhy *P. papatasi* a *P. sergenti* měli ve střevě pouze N-glykany. Zároveň jsme pomocí trypsinového štěpení ověřili, že O-glykokonjugát ve střevě flebotomů je proteinového původu.

Přítomnost N-acetylgalaktosaminových epitopů na povrchu střevního epitelu *Lu. longipalpis* popsali už Evangelista a Leite (2002). Tito autoři se domnívali, že *L. chagasi* (= *L. infantum*) využívá střevní molekulu u flebotoma, která tyto epitopy nese, jako receptor svého lipofosfoglykanu (LPG). Tyto domněnky však nebyly podloženy

žádnými experimenty. Jde pouze o aplikaci této situace na spekulace Pimenty et al. (1994) a Sackse et al. (1995a) o mechanismu permisivnosti *P. argentipes* (viz kap. 2.1.1.).

Porovnáme-li naše výsledky afinoblottingu s permisivností nebo specifíčností těchto vektorů, zjistíme, že většina druhů, kteří mají ve střevě O-glykosylované proteiny jsou zároveň popsáni jako permisivní přenašeči leishmanií. V *P. halepensis* se vyvíjí *L. tropica* a *L. major*, v *Lu. longipalpis* se kromě *L. chagasi* (= *L. infantum*) úspěšně vyvíjejí další tři druhy leishmanií a v *P. argentipes* je potvrzen vývoj čtyř druhů leishmanií (Sádlová et al., 2003, viz Shortt et al., 1931 v Adler a Theodor, 1957, Pimenta et al., 1994, Sacks et al., 2000, viz Deane, 1956, Lainson et al., 1977, Goncalves et al., 1985 v Killick-Kendrick, 1990b, Killick-Kendrick et al., 1977, Rogers et al., 2002). Navíc *P. perniciosus* je zřejmě také permisivním vektorem, protože kromě *L. infantum* podporuje vývoj i *L. tropica* (Svobodová, nepubl. data). V rámci naší práce jsme experimentálně potvrdili, že permisivním vektorem se střevním O-glykoproteinem je také *P. arabicus*. Tento nově kolonizovaný druh je přenašečem *L. tropica* v galilejské oblasti severního Izraele. My jsme v něm ale potvrdili i úspěšný vývoj *L. major* a *L. infantum*, před a po defekci samice.

Naproti tomu *P. sergenti* a *P. papatasi*, u kterých jsme prokázali pouze N-tyr glykosylace, jsou druhově specifíční přenašeči. *Phlebotomus sergenti* je přirozený vektor *L. tropica*. Experimentální infekce *P. sergenti* byly prováděny se třemi druhy leishmanií, ale úspěšný vývoj byl zaznamenán pouze s *L. tropica* (Al-Zarani et al. 1988, Guilvard et al., 1991, Kamhawi et al., 2000). *Phlebotomus papatasi* v přírodě přenáší *L. major*. Laboratorní infekce byly prováděny s pěti druhy leishmanií, úspěšný byl však pouze vývoj *L. major* (Killick-Kendrick, 1990b, Killick-Kendrick et al., 1994, 1995, Heyneman, 1963, Walters, 1992, 1993, Pimenta et al., 1994).

Detekce O-glykoproteinů ve střevě flebotomů tedy přesvědčivě koreluje se schopností vektora podporovat vývoj různých druhů leishmanií. Nicméně jsme schopnost interakce O-glykoproteinu s povrchem leishmanie ověřili inkubací *L. major* fixovaných na podložní sklo se střevním lyzátem *Lu. longipalpis*. Značeným lektinem *Helix pomatia* agglutininem (HPA-FITC) jsme zjistili, že se O-glykosylované proteiny z *P. halepensis* na povrch leishmanie vážou. Tuto interakci jsme byli schopni specificky zainhibovat N-acetylgalaktosaminem, který je ligandem HPA.

Další výsledky prokazují, že povrchový lipofosfoglykan není nutný pro vývoj leishmanií v permissivním vektrovi. Dva druhy spadající do kategorie permissivních přenašečů (*Lu. longipalpis* a *P. arabicus*) a jeden specifický přenašeč (*P. papatasi*) byly použity k experimentálním infekcím linií *L. major* defektní v expresi LPG. *Phlebotomus papatasi*, který je přirozeným přenašečem *L. major* podporoval vývoj této LPG-deficientní leishmanie pouze do defekace samice. Poté byla infekce zaznamenána pouze u přibližně 20 % flebotomů a to především v nízkých intenzitách. Oproti tomu ve flebotomech *P. arabicus* i *Lu. longipalpis* se infekce LPG deficientních leishmanií udržela i po defekaci. U těchto permissivních flebotomů byly ve většině případů nalézány zralé infekce kdy docházelo ke kolonizaci stomodeální valvy.

Naše výsledky nijak nevyvracejí LPG teorii, která vysvětluje specifčnost vektorů k leishmaniím vazbou LPG prvoka ke střevu přenašeče během defekace (Pimenta et al., 1992, 1994, Kamhawi et al., 2004). Poukazují však na skutečnost, že je tato teorie omezena pouze na specifické vektory a že u ostatních druhů flebotomů funguje jiný mechanismus vazby leishmanie na střevo.

### ***Leishmania tropica* ve dvou ohniscích kutánní leishmaniózy na severu Izraele.**

V posledních letech se Izraeli vyskytla ohniska kožního onemocnění způsobeného *L. tropica* u jezera Kinneret v galilejské oblasti. Jednou z podmínek úspěšného koloběhu leishmaniózy v přírodě je dostatek vhodných přenašečů. Flebotomové ze dvou ohnisek na pobřeží jezera Kinneret v severním Izraeli byli chytáni do světelných pastí. V jižním ohnisku se vyskytoval především *P. (Paraphlebotomus) sergenti* ostatní druhy představovaly náhodné nálezy nepřesahující 5 % z celkového množství. *Phlebotomus sergenti* zde byl vhodným kandidátem jako přenašeč *L. tropica*. V severní oblasti tato jasná převaha jednoho druhu nebyla. Jak popsali již Jacobson et al. (2003b) kromě *P. (Paraphlebotomus) sergenti* se zde ve velkém množství nacházel i *P. (Adlerius) arabicus*, *P. (Adlerius) simici* a *P. (Larrousius) tobbi*.



Odchycené živé samice flebotomů byly v terénu vypitvány a byla určena prevalence infikovaných samic. Izoláty leishmanií byly kultivovány a použity pro experimentální infekce flebotomů. V severní oblasti byla infekce prokázána u 7 % samic *P. arabicus* a v jižním u 10 % samic *P. sergenti*. V obou případech se jednalo o *L. tropica*. Přestože nebyla tato ohniska od sebe výrazně vzdálena, fungoval v jednotlivých případech odlišný životní cyklus *L. tropica* využívající jiného přenašeče.

Tato vektorová odlišnost byla vysvětlena strukturou povrchového lipofosfoglykanu (LPG) u severních a jižních izolátů. Zatímco LPG jižního izolátu měl typickou strukturu *L. tropica* s bočními glukosovými a arabinosovými epitopy, severní izolát se lišil ve struktuře bočních sacharidových řetězců a podobal se LPG *L. major* s galaktosovými zbytky (Soares et al., 2004). V naší práci byly provedeny experimentální infekce vektorů z obou ohnisek s izoláty jak typické tak atypické *L. tropica*. Ty prokázaly, že *P. sergenti* není schopen podporovat infekce izolátů *L. tropica* ze severní oblasti po defekaci samice. Oproti tomu v *P. arabicus* se úspěšně vyvíjely infekce leishmanií jak ze severního tak z jižního ohniska. Tyto výsledky naznačovaly, že *L. tropica* není závislá na struktuře svého lipofosfoglykanu při vazbě ke střevnímu epitelu *P. arabicus*. Zároveň tyto experimenty podpořili LPG teorii pro specifické vektory jako je *P. sergenti* (Pimenta et al, 1992, Pimenta et al, 1994, Sacks a Kamhawi 2001, Sacks et al., 2000, Ilg 2001, Soares et al., 2002, Kamhawi et al., 2004). Přestože je *P. sergenti* nečastějším přenašečem *L. tropica* (Al-Zahrani et al. 1988, Guilvard et al., 1991) byl v Africe popsán jako vektor i *P. guggisbergi* (Lawyer et al., 1991). Mechanismus interakce *L. tropica* se střevním epitelem tohoto druhu flebotoma patřícího do podrodu *Larroussius* by mohl být shodný s mechanismem *P. arabicus*. Předpokládáme totiž, že druhy flebotomů podrodu *Larroussius* spadají do permisivní skupiny vektorů vzhledem k úspěšným experimentálním infekcím *P. perniciosus* *L. tropica* (Svobodová, nepubl. data). *Phlebotomus perniciosus* je přirozeným přenašečem *L. infantum* (přehled viz Killick-Kendrick, 1990b). Navíc jsme zjistili, že i další zástupce podrodu *Larroussius*, *P. tobbi*, má ve střevě O-glykosylované proteiny stejně jako ostatní permisivní vektorů (Hlavačková a Myšková, nepubl. data).

Jak bylo uvedeno výše, ověřili jsme permisivnost *P. arabicus* experimentálními infekcemi s *L. major* a *L. infantum*. Dalším krokem bylo porovnat typ glykosylace vektorů v jednotlivých ohniscích. Pomocí afinoblottingu se specifickými lektiny (viz

kap. 5.1.) jsme zjistili, že *P. sergenti* odchycený v Izraeli a nově kolonizovaný v naší laboratoři má ve střevě pouze N-typ glykosylace, zatímco v *P. arabicus* jsme kromě N-glykanů detekovali i O-glykosylované proteiny. Pomocí fluorescenčně značeného specifického lektinu HPA jsme detekovali N-acetylgalaktosaminové glykoproteiny pouze na lumenální straně střeva *P. arabicus*. Neschopnost *P. sergenti* přenášet atypickou *L. tropica* ze severní oblasti je tedy dána nepřítomností O-glykosylovaných proteinů ve střevě. Oproti tomu *P. arabicus*, který tyto střevní O-glykany má, je schopen podpořit vývoj nejen odlišných kmenů *L. tropica*, ale i jiných druhů leishmanií. Opět jsme zde ukázali, že interakce O-glykanů a receptoru leishmanií je druhově nespecifická.

Antroponotický cyklus v této oblasti je velmi nepravděpodobný vzhledem k nízké incidenci onemocnění u lidí. Naše data doplnila informace o damanovi jako rezervoárovém hostiteli, které již předeslaly studie Jacobson et al. (2003b) a Svobodová et al. (2006). Byli odchytáváni živočichové žijící v blízkosti lidských obydlí: damani, krysy a myši bodlinaté. V obou ohniscích byli nalezeni damani infikovaní *L. tropica*. Kultivace však byla úspěšná pouze u jednoho izolátu z damana ze severního ohniska. Krysy ani myši bodlinaté nebyly ani v jednom případě pozitivní. Damani v této oblasti žijí mezi navršenými balvany obklopující lidská sídla. Tyto valy tvoří ideální místo pro život přenašeče. Velká část odchytů flebotomů byla prováděna právě zde. Spící damani, kteří mají denní aktivitu, jsou ideálním zdrojem potravy pro samice flebotomů, které vyhledávají potravu v noci a za soumraku. Izolát *L. tropica* z damana ze severního ohniska se shodoval s izoláty z flebotomů a z pacientů. Tento izolát byl použit pro úspěšné experimentální infekce a laboratorní životní cyklus mezi přenašečem *P. arabicus* a damanem (Svobodová et al., 2006).

### **Účast povrchového lipofosfoglykanu hybridů *L. major/L. infantum* v různém typu přenašeče.**

*L. infantum* a *L. major* mají odlišnou životní strategii, vektora, klinické projevy i rezervoárového hostitele. Hybridní leishmanie *L. major/L. infantum* byly nalezeny v imunosuprimovaných pacientech, ve kterých způsobují viscerální onemocnění (Ravel et al., 2006). V této práci jsme se zaměřili na schopnost vývoje hybridů v různých

vektorech a na účast povrchového lipofosfoglykanu (LPG) v přenašeči v porovnání s původními druhy.

Experimentálními infekcemi permisivního druhu *Lu. longipalpis* a specifického druhu *P. papatasi* jsme zjistili, že oba hybridi se, stejně jako oba původní druhy leishmanií *L. major* a *L. infantum*, vyvíjejí úspěšně v permisivním druhu flebotoma i po defekaci samice. Tato pozorování se shodují s výsledky našich experimentů, které se týkaly vývoje infekcí různých druhů leishmanií v permisivních druzích (viz výše). Oproti tomu vývoj ve specifickém hostiteli, kterým byl *P. papatasi*, se u různých druhů leishmanií lišil. Podle očekávání se infekce *L. infantum* po defekaci samice vytratila. *Leishmania infantum* není pro *P. papatasi* specifickým druhem a ani v předchozích experimentech nebylo možné tohoto flebotoma nakazit jiným druhem leishmanie než *L. major* (Killick-Kendrick, 1990b, Kendrick R. et al, 1994, 1995, Heyneman, 1963, Walters, 1992, 1993, Pimenta et al., 1994). V tomto vektorovi hrají při přichycení leishmanií velkou roli druhově specifické sacharidové řetězce povrchového LPG *L. major*, které fungují jako ligand pro galektin ve střevě *P. papatasi*. Pokud nedojde k interakci LPG s tímto lektinem, jsou leishmanie během defekace samice vypuzeny ze střeva spolu se zbytky strávené krve (Kamhawi et al., 2004).

Hybridní leishmanie se vyvíjely v *P. papatasi* i po defekaci samice, nicméně procento nakažených samic bylo nižší v porovnání s infekcemi *L. major*. Infekce *L. major* dosáhly stomodeální valvy v asi 90 % případů, zatímco u hybridů se jednalo o 50-60 %. Desátý den po infekci tvořil u *L. major* podíl metacyklických stádií asi 20 % a u obou hybridů asi 10 %.

Vyjdeme-li z LPG teorie pro *P. papatasi*, můžeme z těchto výsledků usoudit, že povrchový lipofosfoglykan hybridů je podobný lipofosfoglykanu *L. major*, ale ne zcela shodný. Pro ověření tohoto tvrzení jsme použili specifickou protilátku proti LPG *L. major* WIC 79.3. Ta rozpoznává druhově specifické sacharidové řetězce připojené k fosfodisacharidové kostře LPG *L. major*. Pomocí míry aglutinace hybridů, *L. major* a *L. infantum* touto protilátkou jsme posuzovali míru podobnosti LPG jednotlivých druhů. *Leishmania infantum* neaglutinovala ani při nejvyšších koncentracích protilátky. *Leishmania major* i oba hybridy v její přítomnosti aglutinovali, nicméně *L. major* aglutinovala při nižších koncentracích oproti oběma hybridům.

Pomocí fluorescenční metody jsme navíc prokázali, že se tato protilátka WIC 79.3 na hybridy váže, ale v menší míře než na *L. major*, zatímco na *L. infantum* se neváže vůbec. Je tedy zřejmé, že alespoň část LPG má u hybridů obdobné sacharidové epitopy jako *L. major*.

Přestože není jisté, zda jsou tyto hybridy v přírodě přenášeni vektorem, nebo pouze injekčními stříkačkami drogově závislých, je evidentní, že kombinace dvou genomů zvyšuje adaptabilitu leishmanií jak v člověku, tak v případném přenašeči. Díky schopnosti vývoje jak v *P. papatasi*, tak v permissivních vektorech, zvětšují hybridy svůj možný areál výskytu a tím se zvyšuje i jejich epidemiologická významnost. *Phlebotomus papatasi* je velmi hojný druh s rozšířením v Evropě, Africe i Asii, kde je hlavním přenašečem *L. major* způsobující kutánní leishmaniózu. Jeho schopnost podporovat vývoj viscerotropní leishmanie je zajímavý i z důvodu šířící se epidemie AIDS v asijských a afrických zemích.

## Souhrn

- Porovnali jsme jednotlivé metody sloužící ke zjišťování síly infekce v střevě flebotoma: mikroskopický odhad síly infekce ve vypitvaném střevě, stanovení počtu promastigotů pomocí počítací komůrky a kvantitativní PCR (Q-PCR). Mikroskopický odhad je nejvhodnější pro určování síly infekce po defekaci samice, kdy je důležité určit lokalizaci. Hemocytometr je nejvhodnější pro určení přesného počtu promastigotů před defekací, kdy je odhad znemožněn velkým množstvím krve. Počítání v počítací komůrce je ale velice pracný postup a nedovoluje vyšetřit větší počet střev. Q-PCR se zdá být nejpřesnější metodou, která je méně pracná než hemocytometr. Tato metoda však není příliš vhodná pro rutinní pokusy vzhledem ke své ceně. Každá ze tří metod má tedy své výhody a nevýhody a jejich volba by se měla odvíjet od účelu pokusu a schopností experimentátora.

- Prokázali jsme, že podle vnímavosti flebotomů vůči různým druhům leishmanií můžeme tyto vektory rozdělit na specifické a permissivní. Specifičtí vektorů podporují vývoj ve svém trávicím traktu pouze jednoho druhu leishmanie, zatímco v permissivních se úspěšně vyvíjejí leishmanie více druhů. Nově kolonizovaný druh *P. arabicus* je stejně jako *P. halepensis*, *P. argentipes*, *P. perniciosus* a *Lu. longipalpis* permissivním druhem. Tyto druhy flebotomů mají kromě N-glykoproteinů ve svém střevě i O-glykosylované proteiny a leishmanie které se v nich vyvíjejí je využívají pro vazbu ke střevu flebotoma. Tato vazba není druhově specifická a umožňuje vývoj širokého spektra leishmanií v permissivním druhu flebotoma. Leishmanie v permissivních vektorech nevyužívají při vazbě ke stěně střeva flebotoma povrchový lipofosfoglykan. Takovou interakci využívají pouze leishmanie vyvíjející se ve specifických vektorech.

- *Leishmania tropica* způsobující kožní leishmaniózu ve dvou ohniscích na pobřeží jezera Kinneret je přenášena v každém ohnisku jiným vektorem. V jižním ohnisku se jedná o běžného přenašeče tohoto druhu *P. (Paraphlebotomus) sergenti*, který je typickým specifickým vektorem. V severním ohnisku se jedná o *P. (Adlerius) arabicus*, který je permissivním vektorem. *Phlebotomus sergenti* a *P. arabicus* se liší v typu střevní glykosylace. *Phlebotomus sergenti* má ve střevě pouze N-glykoproteiny,

zatímco *P. arabicus* má kromě N-glykanů i O-glykoproteiny. Rozdíl v glykosylaci střev vektorů koreluje s rozdíly v LPG přenášených kmenů *Leishmania tropica*. V jižním ohnisku se jedná o typickou *L. tropica*. Severní izolát vykazuje antigenní podobnost s *L. major*. Boční sacharidové řetězce obsahují místo glukosy a arabinosy galaktosu. V tomto severním ohnisku tedy leishmanie nemohla využít vektora se specifickým receptorem pro LPG typické *L. tropica*. Pro vazbu ke střevní stěně *P. arabicus* využívá leishmanie O-glykoproteiny flebotoma.

- Hybridi *L. major/L. infantum*. Vyvíjejí se jak v permissivním druhu flebotoma *Lu. longipalpis*, tak ve druhu *P. papatasi*, který je specifický pouze pro *L. major*. V tomto druhu flebotoma hybridní tvoří zralé infekce dosahující stomodeální valvy a také jsou přítomna metacyklická stádia infekční pro dalšího hostitele. Ukázalo se, že tyto hybridní leishmanie mají obdobný povrchový lipofosfoglykan jako *L. major*, a proto jsou schopny vývoje i v přenašeči specifickém pouze pro *L. major*. Schopnost vyvíjet se v *P. papatasi* rozšiřuje značným způsobem jejich možný areál výskytu.

## 7. Seznam použité literatury

**Al-Zahrani, M. A., W. Peters, D. A. Evans, C. Chin, V. Smith, and R. P. Lane 1988.** *Phlebotomus sergenti*, a vector of *Leishmania tropica* in Saudi Arabia. Trans R Soc Trop Med Hyg 82:416.

**Al-Zahrani, M. A., W. Peters, D. A. Evans, V. Smith, and I. C. Chin 1989.** *Leishmania* infecting man and wild animals in Saudi Arabia. 6. cutaneous leishmaniasis of man in the south-west. Trans R Soc Trop Med Hyg 83:621-628.

**Adler, S., and O. Theodor 1957.** Transmission of disease agents by phlebotomine sand flies. Ann Rev Entom 2:203-226.

**Bandyopadhyay, K., Karmakar, S., Gosh, A. and Das, P., K. 2001** Role of 67 kDa cell surface laminin binding protein of *Leishmania donovani* in pathogenesis. J Biochem 130:141-148

**Barreau, C., M. Touray, P. F. Pimenta, L. H. Miller, and K. D. Vernick 1995.** *Plasmodium gallinaceum*: Sporozoite invasion of *Aedes aegypti* salivary glands is inhibited by anti-gland antibodies and by lectins. Exp Parasitol 81:332-343.

**Beach, R., G. Kiilu, L. Hendricks, C. Oster, and J. Leeuwenburg 1984.** Cutaneous *leishmaniases* in Kenya – transmission of *Leishmania major* to man by bite of naturally infected *Phlebotomus duboscqi*. Trans R Soc Trop Med Hyg 78:747-751.

**Belli, A. A., M. A. Miles, and J. M. Kelly 1994.** A putative *Leishmania panamensis/Leishmania braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. Parasitology 109:435-442.

**Boulanger, N., C. Lowenberger, P. Volf, R. Ursic, L. Sigutova, L. Sabatier, M. Svobodova, S. M. Beverley, G. Spath, R. Brun, B. Pesson, and P. Bulet 2004.** Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. Infect Immun 72:7140-7146.

**Bouvier, J., Schneider, P. and Etges, R. 1995.** Leishmanolysin: surface metalloproteinase of *Leishmania*. *Methods Enzymol* 248:614-633

**Bray, R. S. 1983.** *Leishmania mexicana mexicana*: attachment and uptake of promastigotes to and by macrophages *in vitro*. *J Protozool* 30:314-323.

**Butcher, B. A., K. Shome, L. W. Estes, J. Choay, M. Petitou, P. Sie, and R. H. Glew 1990.** *Leishmania donovani*: Cell-surface heparin receptors of promastigotes are recruited from an internal pool after trypsinization. *Exp Parasitol* 71:49-59.

**Butcher, B. A., L. A. Sklar, L. C. Seamer, and R. H. Glew 1992.** Heparin enhances the interaction of infective *Leishmania donovani* promastigotes with mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 148:2879-2886.

**Butcher, B. A., S. J. Turco, B. A. Hilty, P. F. Pimenta, M. Panunzio, and D. L. Sacks 1996.** Deficiency in beta 1,3-galactosyltransferase of a *Leishmania major* lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania* sand fly interaction. *J Biol Chem* 271:20573-20579.

**Chang, K. P. 1981.** *Leishmania donovani*-macrophage binding mediated by surface glycoproteins/antigens: characterization *in vitro* by a radioisotopic assay. *Mol Biochem Parasitol* 4:67-76.

**Chaves, C. S., D. C. Soares, R. P. Da Silva, and E. M. Saraiva 2003.** Characterization of the species- and stage-specificity of two monoclonal antibodies against *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol* 103:152-159.

**Cummings R.D., 1997.** Lectins as tools for glycoconjugate purification. In *glycosciences* (ed. Gabius H.J. et Gabius S.), Chapman and Hall, Weinheim, 191-199.

**d'Avila-Levy, C. M., F. C. D. Dias, A. C. N. de Melo, J. L. Martins, A. H. D. C. Lopes, A. L. S. dos Santos, A. B. Vermelho, and M. H. Branquinha 2006.** Insights into the role of gp63-like proteins in lower trypanosomatids. *FEMS Microbiol Let* 254:149-156.



**de Melo, A. C., C. M. Avila-Levy, F. A. Dias, J. L. A. Armada, H. D. Silva, A. H. C. S. Lopes, A. L. S. Santos, M. H. Branquinha, and A. B. Vermelho 2006.** Peptidases and gp63-like proteins in *Herpetomonas megaseliae*: Possible involvement in the adhesion to the invertebrate host. *Int J Parasitol* 36:415-422.

**Delgado, O., E. Cupolillo, R. Bonfante-Garrido, S. Silva, E. Belfort, G. Grimaldi, and H. Momen 1997.** Cutaneous leishmaniasis in Venezuela caused by infection with a new hybrid between *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92:581-582.

**Dereure, J., J. A. Rioux, A. Khiami, F. Pratlong, J. Perieres, and A. Martini 1991.** Ecoepidemiology of leishmaniasis in Syria. Presence of *Leishmania tropica* (Wright) – (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in dog. *Ann Parasitol Hum Comp* 66:252-255.

**Dillon, R. J., and R. P. Lane 1999.** Detection of *Leishmania* lipophosphoglycan binding proteins in the gut of the sandfly vector. *Parasitology* 118:27-32.

**Dinglasan, R. R., I. Fields, M. Shahabuddin, A. F. AZAD, and J. B. Sacci 2003.** Monoclonal antibody MG96 completely blocks *Plasmodium yoelii* development in *Anopheles stephensi*. *Infect Immun* 71:6995-7001.

**Dinglasan, R. R., J. G. Valenzuela, and A. F. AZAD 2005.** Sugar epitopes as potential universal disease transmission blocking targets. *Insect Biochem Mol Biol* 35:1-10.

**Dujardin, J. C., A. L. Banuls, A. Llanoscuentas, E. Alvarez, S. Dedoncker, D. Jacquet, D. Leray, J. Arevalo, and M. Tibayrenc 1995.** Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Trop* 59:293-307.

**Elias, C. G. R., F. M. Pereira, B. A. Silva, C. S. Alviano, R. M. A. Soares, and A. L. S. Santos 2006.** Leishmanolysin (gp63 metallopeptidase)-like activity extracellularly released by *Herpetomonas samuelpessoai*. *Parasitology* 132:37-47.

**Evangelista, L. G., and A. C. R. Leite 2002.** Histochemical localization of N-Acetyl-Galactosamine in the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera :

Psychodidae). J Med Entomol 39:432-439.

**Francino, O., L. Altet, E. Sanchez-Robert, A. Rodriguez, L. Solano-Gallego, J. Alberola, L. Ferrer, A. Sanchez, and X. Roura 2006.** Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. Vet Parasitol 137:214–221.

**Ghosh, A., K. Bandyopadhyay, L. Kole, and P. K. Das 1999.** Isolation of a laminin-binding protein from the protozoan parasite *Leishmania donovani* that may mediate cell adhesion. Biochem J 337:551-558.

**Gosh, A., K., Ribolla P., E., M., Jacobs-Lorena M. 2001.** Targeting *Plasmodium* ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. Proc Nat Acad Sci USA 6:13278-13281

**Grove, S., S. and Ledger, J., A. 1975.** Leishmania from hyrax in South West Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg 69:523-524

**Guessousidrissi, N., B. Berrag, M. Riyad, H. Sahibi, M. Bichichi, and A. Rhalem 1997.** Short report: *Leishmania tropica*: Etiologic agent of a case of canine visceral leishmaniasis in northern Morocco. Am J Trop Med Hyg 57:172-173.

**Guilvard, E., J. A. Rioux, M. Gallego, F. Pratlong, J. Mahjour, E. Martinezortega, J. Dereure, A. Saddiki, and A. Martini 1991.** *Leishmania tropica* in Morocco .3. Identification of 89 Isolates from the Vector *Phlebotomus-sergenti*. Ann Parasitol Hum Comp 66:96-99.

**Hajmova, M., K. P. Chang, B. Kolli, and P. Volf 2004.** Down-regulation of gp63 in *Leishmania amazonensis* reduces its early development in *Lutzomyia longipalpis*. Microb Infect 6:646-649.

**Hernandez, A. G., N. Rodriguez, D. Stojanovic, and D. Candelle 1986.** The localization of a lectin-like component on the *Leishmania* cell surface. Mol Biol Rep 11:149-153.

**Heyneman, D. 1963.** 12. Comparison of experimental *Leishmania donovani*

infection. Am J Trop Med Hyg 12:725-740.

**Hewitt, S., H. Reyburn, R. Ashford, and M. Rowland 1998.** Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan: vertical distribution of cases in apartment blocks. Trans R Soc Trop Med Hyg 92:273-274.

**Hillyer, J., F., Barreau, C., Vernick, K., D. 2007.** Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel. Int J Parasitol 37:673-681

**Hubber, M., Cabib, E and Miller, L., H. 1991.** Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. Proc Nat Acad Sci USA 88:2807-2810

**Ilg, T. 2001.** Lipophosphoglycan of the protozoan parasite *Leishmania*: stage- and species-specific importance for colonization of the sandfly vector, transmission and virulence to mammals. Med Microbiol Immunol 190:13-17.

**Ito, J., Gosh., A., Moreira L., A., Wimmer, E., A., Jacobs-Lorena, M. 2002.** Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. Nature 417: 452-455

**Jacobson, R. L., C. L. Eisenberger, M. Svobodova, G. Baneth, J. Sztern, J. Carvalho, A. Nasereddin, M. El Fari, U. Shalom, P. Volf, J. Votypka, J. P. Dedet, F. Pratlong, G. Schonian, L. F. Schnur, C. L. Jaffe, and A. Warburg 2003.** Outbreak of cutaneous leishmaniasis in northern Israel. J Infect Dis 188:1065-1073.

**Jacobson, R. L. 2003.** *Leishmania tropica* (Kinetoplastida : Trypanosomatidae) - a perplexing parasite. Folia Parasitol 50:241-250.

**Jaffe, C. L., G. Baneth, Z. A. Abdeen, Y. Schlein, and A. Warburg 2004.** Leishmaniasis in Israel and the Palestinian authority. Trends Parasitol 20:328-332.

**Joshi, P. B., B. L. Kelly, S. Kamhawi, D. L. Sacks, and W. R. McMaster 2002.** Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a

virulence factor. *Mol Biochem Parasitol* 120:33-40.

**Kamhawi, S., S. K. Abdelhafez, and A. Arbaji 1995.** A new focus of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in northern Jordan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89:255-257.

**Kamhawi, S., G. B. Modi, P. F. P. Pimenta, E. Rowton, and D. L. Sacks 2000.** The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology* 121:25-33.

**Kamhawi, S., M. Ramalho-Ortigao, V. M. Pham, S. Kumar, P. G. Lawyer, S. J. Turco, C. Barillas-Mury, D. L. Sacks, and J. G. Valenzuela 2004.** A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* 119:329-341.

**Kelly, J. M., J. M. Law, C. J. Chapman, G. J. J. M. Van Eys, and D. A. Evans 1991.** Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 46:253-264.

**Killick-Kendrick, R., A. J. Leaney, P. D. Ready, and D. H. Molyneux 1977.** *Leishmania* in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. *Proc R Soc Lond [Biol]* 196:105-115.

**Killick-Kendrick, R. 1979.** The biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In *Biology of Kinetoplastida* (ed. Lumsden, W., H., R. and Evans, D., A) 395-460. Academic Press, London.

**Killick-Kendrick, R., 1988.** Host-parasite relationships: *Leishmania* in sandflies. *Proceedings of the International Workshop on Research on Control Strategies for the Leishmaniases*, 302-304. Ottawa 1-4 June.

**Killick-Kendrick, R. 1990a.** The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp* 65:37-42.

**Killick-Kendrick, R. 1990b.** Phlebotominae vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 4:1-24.

**Killick-Kendrick, R., M. Killick-Kendrick, and Y. Tang 1994.** Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan: The low susceptibility of *Phlebotomus papatasi* to *Leishmania tropica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88:252-253.

**Killick-Kendrick, R., M. Killick-Kendrick, and Y. Tang 1995.** Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan: The high susceptibility of *Phlebotomus sergenti* to *Leishmania tropica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89:477.

**Lal, A., A., Patterson P., S., Sacci J., B., Vaughan J., A., Paul, C., Collins W., E., Wirtz R., A. and Azad A., F. 2001.** Anti-mosquito midgut antibodies block development of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in multiple species of *Anopheles* mosquitoes and reduce vector fecundity and survivorship. *Proc Nat Acad Sci USA* 98:5228-5233

**Lawyer, P. G., J. I. Githure, C. O. Anjili, J. O. Olobo, D. K. Koech, and G. D. F. Reid 1990.** Experimental transmission of *Leishmania major* to vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*) by bites of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84:229-232.

**Lawyer, P. G., Y. B. Mebrahtu, P. M. Ngumbi, J. P. Mwanyumba, J. Mbugua, G. Kiilu, D. Kipkoech, J. Nzouu, and C. O. Anjili 1991.** *Phlebotomus guggisbergi* (Diptera: Psychodidae), a vector of *Leishmania tropica* in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 44:290-298

**Love, D. C., J. D. Esko, and D. M. Mosser 1993.** A Heparin-Binding Activity on *Leishmania* Amastigotes Which Mediates Adhesion to Cellular Proteoglycans. *J Cell Biol* 123:759-766.

**Magill, A. J., M. Grogl, R. A. Gasser, S. Wellington, and C. N. Oster 1993.** Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of operation desert storm. *N Engl J Med* 328:1383-1387.

**Mahoney, A. B., D. L. Sacks, E. Saraiva, G. Modi, and S. J. Turco 1999.** Intra-

species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. *Biochemistry* 38:9813-9823.

**Mary, C., F. Faraut, L. Lascombe, and H. Dumon 2004.** Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* 42:5249–5255.

**Mcconville, M. J., J. E. Thomas-Oates, M. A. J. Ferguson, and S. W. Homans 1990.** Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. *J Biol Chem* 265:19611-19623.

**Mcconville, M. J., S. J. Turco, M. A. J. Ferguson, and D. L. Sacks 1992.** Developmental Modification of Lipophosphoglycan During the Differentiation of *Leishmania major* Promastigotes to an Infectious Stage. *EMBO J* 11:3593-3600.

**Mcconville, M. J., L. F. Schnur, C. Jaffe, and P. Schneider 1995.** Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: Inter- and intra-specific polymorphism in old world species. *Biochem J* 310:807-818.

**Mukhopadhyay, N. K., K. Shome, A. K. Saha, J. R. Hassell, and R. H. Glew 1989.** Heparin binds to *Leishmania donovani* promastigotes and inhibits protein phosphorylation. *Biochem J* 264:517-525.

**Nieves E. and Pimenta P. F. P. 2000.** Development of *Leishmania (Viannia) brasiliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Entomol Soc Am* 37: 134–140.

**Pace, K. E., and L. G. Baum 2002.** Insect galectins: Roles in immunity and development. *Glycoconjugate J* 19:607-614.

**Palanova, L., and P. Volf 1997.** Carbohydrate-binding specificities and physico-chemical properties of lectins in various tissue of phlebotomine sandflies. *Folia Parasitol* 44:71-76.

**Pimenta, P. F. P., S. J. Turco, M. J. Mcconville, P. G. Lawyer, P. V. Perkins, and D. L. Sacks 1992.** Stage-Specific Adhesion of *Leishmania* Promastigotes to the Sandfly Midgut. *Science* 256:1812-1815.

**Pimenta, P. F., M. Touray, and L. Miller 1994.** The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary gland. *J Eukaryot Microbiol* 41:608-624.

**Pinto-da-Silva, L., H., Fampa, P., Soares, D., C., Oliveira, S., M., P., Souto-Padron, T., and Saraiva E., M. 2005.** The 3A1-La monoclonal antibody reveals key features of *Leishmania (L) amazonensis* metacyclic promastigotes and inhibits procyclics attachment to the sand fly midgut. *Int J Parasitol* 35:757-764

**Ramasamy, M. S., R. Kulasekera, I. C. Wanniarachchi, K. A. Srikrishnaraj, and. Ramasamy, R 1997.** Interactions of human malaria parasites, *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*, with the midgut of *Anopheles mosquitoes*. *Med Vet Entomol* 11:290-296.

**Ravel, C., Cortes, S., Pratlong, F., Morio, F., Dedet, J.-P., Campino, L. 2006.** First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *Int J Parasitol* 36:1383-1388.

**Rodriguez, M. H., and F. D. Hernandez-Hernandez 2004.** Insect-malaria parasites interactions: the salivary gland. *Insect Biochem Mol Biol* 34:615-624.

**Rogers, M. E., M. L. Chance, and P. A. Bates 2002.** The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 124:495-507.

**Rudin, W., and H. Hecker 1989.** Lectin-binding sites in the midgut of the mosquitoes *Anopheles stephensi* Liston and *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 75:268.

**Sacks, D. L., P. F. P. Pimenta, M. J. Mcconville, P. Schneider, and S. J. Turco 1995a.** Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* 181:685-697.

**Sacks, D. L., R. T. Kenney, R. D. Kreutzer, C. L. Jaffe, A. K. Gupta, M. C. Sharma, S. P. Sinha, F. A. Neva, and R. Saran 1995b.** Indian kala-azar caused by *Leishmania tropica*. *Lancet* 345:959-961.

**Sacks,D.,L., Modi,G., Rowton,E., Spath,G., Epstein,L., Turco,S.,J., Beverley,S.,M. 2000.** The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. Mem. Inst Oswaldo Cruz Suppl II 95:23.

**Sacks, D., and S. Kamhawi 2001.** Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. Ann Rev Microbiol 55:453-483.

**Sadlova, J., M. Hajmova, and P. Volf 2003.** *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* vector competence for *Leishmania major* and *Le. tropica*. Med Vet Entomol 17:244-250.

**Saliba E.; Saleh,N.; Bisharat,Z.; Oumeish,O.; Khoury,S. 1993.** Gramicicia,M.; Gradoni,L.Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica* in Jordan. Trans R Soc Trop Med Hyg 87:633.

**Saliba,E.K.; Saleh,N.; Oumeish,O.Y.; Khoury,S.; Bisharat,Z.; Alouran,R. 1997.** The endemicity of *Leishmania tropica* (zymodeme MON-137) in the Eira-Yarqa area of Salt District, Jordan. Ann Trop Med Parasitol 91:453-9.

**Sang, D. K., W. K. Njeru, and R. W. Ashford 1992.** A Possible Animal Reservoir for *Leishmania tropica* sl in Kenya. Ann Trop Med Parasitol 86:311-312.

**Sang, D. K., W. K. Njeru, and R. W. Ashford 1994.** A zoonotic focus of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica* at Utut, Rift Valley Province, Kenya. Trans R Soc Trop Med Hyg 88:35-37.

**Schlein, Y., A. Warburg, L. F. Schnur, S. M. LEBLANCQ, and A. E. Gunders 1984.** Leishmaniasis in Israel – reservoir hosts, sandfly vectors and strains in The Negev, Central Arava and along The Dead Sea. Trans R Soc Trop Med Hyg 78:480-484.

**Schnur, L., F, Nasereddin, A., Eisenberger, C, L, Jaffe,C.,L., El Fari, M., Azmi, K., Anders,G., Killick-Kendrick, M., Killick-Kendrick, R., Dedet, J.,P., Pralong, F., Kanaan, M., Grossman,T., Jacobson, R.,L., Schonian,G., Warburg, A. 2004.** Multifactorious characterization of *Leishmania tropica* from a Judean desert focus, exposing intraspecific diversity and incriminating *Phlebotomus*



*sergenti* as its vector. Am J Trop Med Hyg 70:364-72.

**Schottelius, J. 1992.** Neoglycoproteins as tools for the detection of carbohydrate-specific receptors on the cell surface of *Leishmania*. Parasitol Res 78:309-315.

**Shen, Z. and Jacobs-Lorena, M. 1997.** Characterization of a novel gut-specific chitinase gene from the human malaria vector *Anopheles gambiae*. J Biol Chem 272:28895-28900.

**Shen, Z., Dimopoulos, G., Kafatos, F., C. and Jacobs-Lorena, M. 1999.** A cell surface mucin specifically expressed in the midgut of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Proc Nat Acad Sci USA 96:5610-5615.

**Soares, R. P. P., M. E. Macedo, C. Ropert, N. F. Gontijo, I. C. Almeida, R. T. Gazzinelli, P. F. P. Pimenta, and S. J. Turco 2002.** *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. Mol Biochem Parasitol 121:213-224.

**Soares, R. P. P., T. Barron, K. McCoy-Simandle, M. Svobodova, A. Warburg, and S. J. Turco 2004.** *Leishmania tropica*: intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different *Phlebotomus* species. Exp Parasitol 107:105-114.

**Svobodova, M., P. Volf, and R. Killick-Kendrick 1996.** Agglutination of *Leishmania* promastigotes by midgut lectins from various species of phlebotomine sandflies. Ann Trop Med Parasitol 90:329-336.

**Svobodova, M., C. Capo, and J. M. Mege 1997a.** A biological role for haemagglutination activity of *Leishmania* promastigotes and amastigotes. Parasite 4:245-251.

**Svobodova, M., P. A. Bates, and P. Volf 1997b.** Detection of lectin activity in *Leishmania* promastigotes and amastigotes. Acta Trop 68:23-35.

**Svobodova, M. and Votypka, J.** Experimental transmission of *Leishmania tropica* to hamsters and mice by the bite of *Phlebotomus sergenti* 2003. Microb Infect

5:471-4.

**Svobodova, M., P. Volf, and J. Votypka 2006.** Experimental transmission of *Leishmania tropica* to hyraxes (*Procavia capensis*) by the bite of *Phlebotomus arabicus*. *Microb Infect* 8:1691-1694.

**Turco, S. J. 1988.** The lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Parasitol Today* 4:255-257.

**Turco, S. J., and A. Descoteaux 1992.** The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Ann Rev Microbiol* 46:65-94.

**Valchou, D., Lycett, G., Sidén-Kiamos, I., Blass, C., Sinden, R., E., Louis, C. 2001.** *Anopheles gambiae* laminin interacts with the P25 surface protein of *Plasmodium berghei* ookinets. *Mol Biochem Parasitol* 112:229-237.

**Valchou, D., Schlegelmilch, T., Runn, E., Mendes, A. and Kafatos, F., C. 2006.** The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Current opinion in genetic and development* 16:384-391

**Valenzuela, J. G., Y. Belkaid, M. K. Garfield, S. Mendez, S. Kamhawi, E. D. Rowton, D. L. Sacks, and J. M. C. Ribeiro 2001.** Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: Characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med* 194:331-342.

**Volf, P. 1993.** Lectin Activity in the Gut Extract of Sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Folia Parasitol* 40:155-156.

**Volf, P., R. Killick-Kendrick, and P. A. Bates 1994.** Comparison of the haemagglutination activities in gut and head extracts of various species and geographical populations of phlebotomine sandflies. *Ann Trop Med. Parasitol* 88:337-340.

**Volf, P., and R. Killick-Kendrick 1996.** Post-engorgement dynamics of haemagglutination activity in the midgut of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* 10:247-250.

**Volf, P., A. Kiewegova, and M. Svobodova 1998.** Sandfly midgut lectin: effect of galactosamine on *Leishmania major* infections. *Med Vet Entomol* 12:151-154.

**Volf, P., P. Tesarova, and E. Nohynkova 2000.** Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. *Med Vet Entomol* 14:251-256.

**Volf, P., M. Svobodova, and E. Dvorakova 2001.** Bloodmeal digestion and *Leishmania major* infections in *Phlebotomus duboscqi*: effect of carbohydrates inhibiting midgut lectin activity. *Med Vet Entomol* 15:281-286.

**Volf, P., S. Skarupova, and P. Man 2002a.** Characterization of the lectin from females of *Phlebotomus duboscqi* sand flies. *Eur J Biochem* 269:6294-6301.

**Volf, P., Y. Ozbel, F. Akkafa, M. Svobodova, J. Votypka, and K. P. Chang 2002b.** Sand flies (Diptera: Phlebotominae) in Sanliurfa, Turkey: Relationship of *Phlebotomus sergenti* with the epidemic of anthroponotic cutaneous leishmaniasis. *J Med Entomol* 39:12-15.

**Warburg, A., R. B. Tesh, and D. McMahon-Pratt 1989.** Studies on the attachment of *Leishmania* flagella to sand fly midgut epithelium. *J Protozool* 36:613-617.

**Wallbanks, K. R., G. A. Ingram, and D. H. Molyneux 1986.** The agglutination of erythrocytes and *Leishmania* parasites by sandfly gut extracts: evidence for lectin activity. *Trop Med Parasitol* 37:409-413.

**Walters, L. I., K. P. Irons, G. B. Modi, and R. B. Tesh 1992.** Refractory barriers in the sandfly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to infection with *Leishmania panamensis*. *Am J Trop Med Hyg* 46:211-228.

**Walters, L. I. 1993.** *Leishmania* Differentiation in Natural and Unnatural Sand Fly Hosts. *J Eukaryot Microbiol* 40:196-206.

**Wasserberg, G., Z. Abramsky, G. Anders, M. El-Fari, G. Schoenian, L. Schnur, B. P. Kotler, I. Kabalo, and A. Warburg 2002.** The ecology of cutaneous

leishmaniasis in Nizzana, Israel: infection patterns in the reservoir host, and epidemiological implications. *Int J Parasitol* 32:133-143.

**Wilkins, S., and P. F. Billingsley 2001.** Partial characterization of oligosaccharides expressed on midgut microvillar glycoproteins of the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston. *Insect Biochem Mol Biol* 31:937-948.

**Zieler, H., C. F. Garon, E. R. Fischer, and M. Shahabuddin 1998.** Adhesion of *Plasmodium gallinaceum* ookinetes to the *Aedes aegypti* midgut: sites of parasite attachment and morphological changes in the ookinete. *J Eukaryot Microbiol* 45:512-520.

**Zieler, H., Nawrocki, J., P. and Shahabuddin, M. 1999.** *Plasmodium gallinaceum* ookinetes adhere specifically to the midgut epithelium of *Aedes aegypti* by interaction with a carbohydrate ligand. *J Exp Biol* 202:485-495

**Zieler, H., and J. A. Dvorak 2000.** Invasion *in vitro* of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 97:11516-11521.

## Přílohy

1. Jitka Myšková, Jan Votýpka and Petr Volf. *Leishmania* in sand flies: comparison of quantitative PCR with other techniques to determine the intensity of infection.

2. Jitka Myšková, Milena Svobodová, Stephen M. Beverley and Petr Volf 2007. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes and Infection* 9: 317-324

3. Petr Volf and Jitka Myšková 2007. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends in Parasitology* 23: 91-92

4. Milena Svobodová, Jan Votýpka, Jitka Pecková, Vít Dvořák, Abedelmajeed Nasereddin, Gad Baneth, Julia Sztern, Vasiliy Kravchenko, Amnon Orr, David Meir, Lionel F. Schnur, Petr Volf, and Alon Warburg 2006. Distinct transmission cycles of *Leishmania tropica* in 2 adjacent foci, Northern Israel. *Emerging Infectious Diseases* 12: 1860-1868

5. Petr Volf, Ivana Benková, Jitka Myšková, Jovana Sádlová, Lenea Campino and Christophe Ravel 2007. Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids. *International Journal for Parasitology* 37:589-593

- 1. Jitka Myšková, Jan Votýpka and Petr Volf. *Leishmania* in sand flies: comparison of quantitative PCR with other techniques to determine the intensity of infection.**

2. **Jitka Myšková, Milena Svobodová, Stephen M. Beverley and Petr Volf**  
**2007. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in**  
**permissive sand flies. *Microbes and Infection* 9: 317-324**

3. **Petr Volf and Jitka Myšková 2007. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. Trends in Parasitology 23: 91-92**



- 4. Milena Svobodová, Jan Votýpka, Jitka Pecková, Vít Dvořák, Abedelmajeed Nasereddin, Gad Baneth, Julia Sztern, Vasiliy Kravchenko, Amnon Orr, David Meir, Lionel F. Schnur, Petr Volf, and Alon Warburg 2006. Distinct transmission cycles of *Leishmania tropica* in 2 adjacent foci, Northern Israel. *Emerging Infectious Diseases* 12: 1860-1868**

5. Petr Volf, Ivana Benková, Jitka Myšková, Jovana Sádlová, Lenea Campino and Christophe Ravel 2007. Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids. *International Journal for Parasitology* 37:589-593