

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

katedra parazitologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Blanka Ferencová

Využití rekombinantních proteinů a syntetických peptidů při studiu protilátkové odpovědi proti *Phlebotomus orientalis*

Recombinant proteins and synthetic peptides as tools for studies on antibody response against *Phlebotomus orientalis*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Petr Volf, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Michal Šíma, PhD.

Praha, 2018

Prohlášení:

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

V Praze dne: 4.1.2018

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména svému školiteli, prof. RNDr. Petru Volfovi, CSc. za vedení mé práce, trpělivost při jejím sepisování a zejména ochotu s čímkoli poradit. Můj velký dík patří také Michalu Šimovi, který mě zasvětil do experimentální činnosti a přispíval cennými radami v průběhu celého magisterského studia. V neposlední řadě chci poděkovat celému laboratornímu kolektivu za skvělou atmosféru, a hlavně podporu v časech, kdy pokusy nechodily, jak bych si představovala. Zejména si vážím skutečnosti, že jsem se po celou dobu s Vámi mohla bez obav na kohokoli obrátit s prosbou (jakkoli hloupou), a Vy jste neváhali pomoci, což rozhodně není samozřejmostí. Obrovský dík pak patří také mé současné i budoucí rodině, která mi celé studium umožnila, a i ve chvílích, kdy to nebylo jednoduché, stála za mnou. Tímto Vám všem moc děkuji.

SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
Ag5rp	antigen5-related protein
AGI	index antigenicity
AMP	adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
BSA	bovinní sérum albumin
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina (z angl. complementary DNA)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
D7rp	D7-related protein
ELISA	z angl. Enzyme-linked immunosorbent assay
gSG6	z angl. salivary gland protein 6
Ig	imunoglobulin
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
kDNA	kinetoplastová DNA
Kf	korelační koeficient
MRJP	z angl. major royal jelly protein
NK	negativní kontrola
NPV	negativní prediktivní hodnota (z angl. negative predictive value)
OD	optická denzita
Pi	fosfát
PPV	pozitivní prediktivní hodnota (z angl. positive predictive value)
RNA	ribonukleová kyselina
SGH	homogenát slinných žláz (z angl. salivary gland homogenate)
Tsal1	z angl. Tsetse salivary gland protein 1
Tsgf1	z angl. Tse tse growth factor 1
VL	viscerální leishmanióza
Yrp	Yellow-related protein

ABSTRAKT

Sliny flebotomů obsahují proteiny a peptidy, které mají důležitou roli při sání krve. Některé z těchto proteinů jsou zároveň antigenní a v opakovaně poštípaném hostiteli se proti nim vytvářejí protilátky. Pomocí imunoblotu s psími séry jsme identifikovali antigenní proteiny slinných žláz *Phlebotomus orientalis*, který je hlavním přenašečem viscerální leishmaniózy v Súdánu a Etiopii. Pět nejnadějnějších proteinů bylo připraveno v rekombinantní formě v bakteriích *E. coli* a použito jako antigen v ELISA testech se séry domácích zvířat z Etiopie a myši z chovu, které byly vystaveny poštípání *P. orientalis*. Jako pozitivní kontrola byl použit homogenát slinných žláz (SGH).

Nejlepší antigenní vlastnosti prokázaly dva rekombinantní proteiny Yellow-related protein PorSP24 a ParSP25-like protein PorSP65. Protilátková odpověď proti těmto proteinům vysoce korelovala s odpovědí proti SGH, zejména v testech s ovčími a psími séry. V testech s psími séry však byla u obou antigenů detekována také nespecifická vazba protilátek. Dále bylo zjištěno, že v testech s SGH a rekombinantními proteiny slinných žláz *P. orientalis* nedochází ke zkříženým reakcím se séry myši poštípaných *P. papatasi* a *Sergentomyia schwetzi*.

Z obou výše zmíněných slinných proteinů byly následně navrženy a syntetizovány peptidy, které by měly být totožné s epitopy rozpoznávanými protilátkami proti slinám *P. orientalis*. Tyto peptidy byly rovněž testovány jako antigeny v ELISA testech s výše zmíněnými séry. V porovnání s rekombinantními proteiny jsme v testech s peptidy dosáhli významného zvýšení specifity u psů i u ovcí. Oba peptidy odvozené ze struktury Yellow-related proteinu (PorSP24 Pep1 a PorSP24 Pep2) je možné na základě dobrých korelací s SGH i vysokých hodnot testovaných statistických veličin považovat za vhodné markery expozice pro psy, navíc PorSP24 Pep2 také pro ovce. Oba peptidy odvozené ze struktury PorSP65 vykazovaly vysokou antigenicitu v testech s psími a kozími séry.

Klíčová slova: *Phlebotomus orientalis*, ELISA, slinné žlázy, rekombinantní proteiny, peptidy

ABSTRACT

Sand fly saliva contains proteins and peptides that have an important role in bloodfeeding. Some of those proteins are antigenic and repeated sand fly bites result in a specific antibody response of the bitten host. Antigenic salivary proteins of *Phlebotomus orientalis*, main vector of visceral leishmaniasis in Sudan and Ethiopia, were identified using immunoblot with dog sera. The 5 most promising antigens were expressed in an *E. coli* bacterial system. Subsequently, these proteins were tested in ELISA with sera of domestic animals from Ethiopia naturally exposed to *P. orientalis*, and with sera of mice bitten experimentally by this sand fly species. Salivary gland homogenate (SGH) was used as the positive control.

The best antigenic properties were detected in two recombinant proteins, Yellow-related protein PorSP24 and ParSP25-like protein PorSP65, especially in tests with sheep and dog sera. However, nonspecific binding of dog sera was also detected using both antigens. In addition, we proved that sera of mice repeatedly bitten by *P. papatasi* and *Sergentomyia schwetzi* do not crossreact with SGH and the tested recombinant proteins of *P. orientalis*.

In a second part of this thesis we designed peptides representing epitopes recognized by specific anti-saliva antibodies. Two peptides were derived from each above mentioned salivary protein and tested in ELISA using sera of domestic animals from Ethiopia and experimentally bitten mice. In comparison to recombinant proteins, peptides revealed much higher specificity with dog and sheep sera. Both peptides deriving from PorSP24 could be considered as good markers of exposure to *P. orientalis* bites in dogs, one of them (PorSP24 Pep2) also in sheep. Both peptides deriving from PorSP65 revealed high antigenicity in tests with dog and goat sera.

Key words: *Phlebotomus orientalis*, ELISA, salivary glands, recombinant proteins, peptides

OBSAH

1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1 Slinné žlázy flebotomů	3
2.2 Významné rodiny slinných proteinů <i>P. orientalis</i> a jejich antigenní vlastnosti	4
2.3 Protilátková odpověď proti slinným proteinům a její použití v praxi	8
2.4 Rekombinantní proteiny jako markery expozice	11
2.4.1 Apyrázy	13
2.4.2 D7-related proteiny	14
2.4.3 Yellow-related proteiny	15
2.4.4 Antigen-5 related proteiny	18
2.4.5 ParSP25-like proteiny	18
2.5 Peptidy jako markery expozice	18
3. MATERIÁL A METODIKA	22
3.1. Slinné žlázy flebotomů druhu <i>P. orientalis</i> a jejich pitvy	22
3.2 Použitá séra	22
3.3 Identifikace antigenních slinných proteinů <i>P. orientalis</i>	23
3.4 Rekombinantní proteiny	23
3.4.1 Exprese rekombinantních proteinů z bakteriálního systému <i>E. coli</i>	24
3.4.2 Purifikace rekombinantních proteinů	24
3.4.3 SDS-PAGE elektroforéza a imunoblot s anti-polyHis protilátkou	25
3.4.4 Měření koncentrace rekombinantních proteinů	25
3.4.5 Zhodnocení antigenicity rekombinantních proteinů s částí sér všech druhů testovaných zvířat	26
3.4.6 ELISA testy se všemi dostupnými séry vybraných zvířat	28
3.4.7 Testování zkřížených reakcí rekombinantních proteinů <i>P. orientalis</i>	29
3.5 Peptidy	30
3.5.1 Navržení peptidů	30
3.5.2 Zhodnocení antigenicity peptidů s částí sér testovaných zvířat	32
3.5.3 ELISA testy s větším množstvím sér vybraných druhů zvířat	34
3.5.4 Testování zkřížených reakcí peptidů <i>P. orientalis</i>	34
3.6 Kvantifikace specifických IgG u myši poštípaných různým počtem flebotomů ..	34
3.6.1 Sání myší	35
3.6.2 ELISA test	35

3.7 Použitá média a roztoky.....	35
4. VÝSLEDKY	38
4.1 Identifikace antigenů ve slinách <i>P. orientalis</i>	38
4.2 Exprese a ověření kvality rekombinantních proteinů	38
4.3 Stanovení IgG odpovědi zvířat proti SGH <i>P. orientalis</i>	39
4.4 Apyráza rPorSP15.....	41
4.4.1 Zhodnocení antigenicity s částí sér všech testovaných druhů zvířat	41
4.4.2 Finální ELISA se všemi dostupnými séry psů a koz	41
4.5 Yellow-related protein rPorSP24.....	42
4.5.1 Zhodnocení antigenicity s částí sér všech testovaných druhů zvířat	42
4.5.2 Finální ELISA se všemi dostupnými séry psů, ovcí a koz	43
4.6 ParSP25-like protein rPorSP65.....	44
4.6.1 Zhodnocení antigenicity s částí sér všech testovaných druhů zvířat	44
4.6.2 Finální ELISA se všemi dostupnými séry psů a ovcí	45
4.7 D7-related protein rPorSP67.....	46
4.7.1 Zhodnocení antigenicity s částí sér všech testovaných druhů zvířat	46
4.7.2 Finální ELISA se všemi dostupnými séry koz.....	47
4.8 Antigen5-related protein rPorSP76.....	47
4.8.1 Zhodnocení antigenicity s částí sér všech testovaných druhů zvířat	47
4.9 Testování zkřížených reakcí rekombinantních proteinů <i>P. orientalis</i>	48
4.10 Peptidy Yellow-related proteinu PorSP24	49
4.10.1 Zhodnocení antigenicity s částí sér všech testovaných druhů zvířat	49
4.10.2 ELISA s větším počtem sér psů, ovcí a koz.....	50
4.11 Peptidy ParSP25-like proteinu PorSP65	52
4.11.1 Zhodnocení antigenicity s částí sér všech druhů testovaných zvířat	52
4.11.2 ELISA s větším počtem sér psů, ovcí a koz.....	53
4.12 Testování zkřížených reakcí peptidů <i>P. orientalis</i>	55
4.13 Detekce IgG protilátkové odpovědi na poštípání různým počtem flebotomů	56
5. DISKUZE	58
6. SHRUTÍ A ZÁVĚR.....	64
7. REFERENCE.....	65

1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Viscerální leishmanióza (VL) patří mezi významná infekční onemocnění sužující lidi ve východní Africe, včetně Etiopie. Jejím původcem jsou parazitičtí prvoci rodu *Leishmania*, kteří jsou přenášeni samicemi flebotomů (Diptera: Phlebotominae). V Etiopii každoročně onemocní VL 4500–5000 lidí (FMOH 2006) a 3,2 miliónů lidí žije v riziku nákazy (Tsegaw et al. 2013). Díky nedostatečnému hlášení jsou však obě čísla považována za velmi podhodnocená (shrnuto v Leta et al. 2014).

Současná kontrolní opatření probíhající v endemických lokalitách Etiopie zahrnují zejména léčbu leishmaniózy již nakažených a recidivujících pacientů, kteří tvoří jediný potvrzený rezervoár infekce v daných oblastech. Intervence, které omezují kontakt přenašeče s člověkem, jsou převážně napojené na programy zaměřené na boj s malárií. Mezi takováto opatření patří použití ložních moskytiér napuštěných insekticidy, které jsou účinné i vůči flebotomům (shrnuto v Leta et al. 2014) a které se již osvědčily jako efektivní nástroj snížení rizika nákazy VL v Etiopii (Argaw et al. 2013).

Samice flebotomů během sání krve injikují do hostitele sliny. Antigenní slinné proteiny vyvolávají u hostitele protilátkovou odpověď, kterou lze v kontrolních studiích využít jako marker expozice flebotomům u lidí či zvířat žijících v endemických oblastech. Studie Rohoušová et al. (2015) prokázala, že séra odebraná z různých druhů domácích zvířat v Etiopii obsahují protilátky proti slinným proteinům *Phlebotomus orientalis*, který je hlavním přenašečem VL v severní polovině Etiopie (shrnuto v Elnaiem 2011). Přítomnost těchto protilátek vede k hypotéze, že testované druhy zvířat by mohly tvořit potenciální rezervoár VL či přinejmenším častý zdroj krve pro přenašeče. Obě informace jsou potřebné pro další plánování programů zaměřených na kontrolu flebotomů.

Pro kvantifikaci protilátkové odpovědi vytvářející se po bodnutí flebotomem lze použít homogenát celých slinných žláz, vhodně vybrané rekombinantně připravené slinné proteiny, nebo jejich antigenní části-peptidy. V rekombinantní formě byly proto připraveny antigenní slinné proteiny *P. orientalis* a z nich dále navrženy syntetické peptidy.

Cíle mé diplomové práce byly následující:

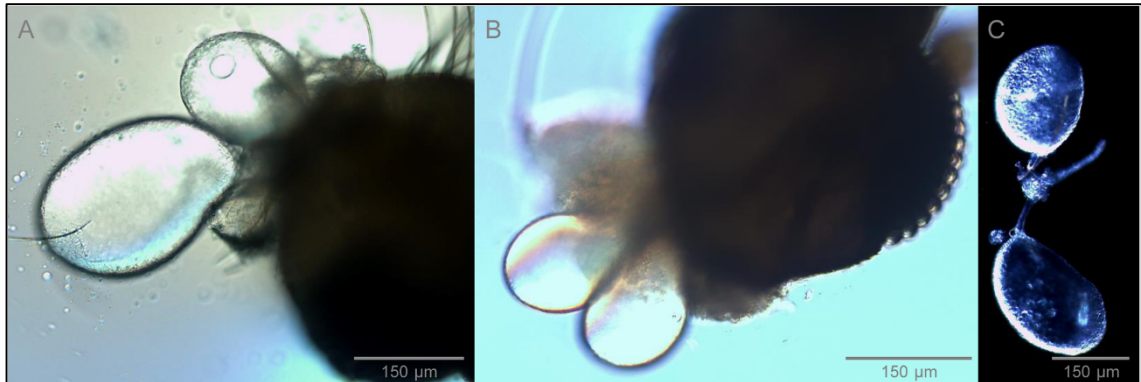
- 1) Srovnat antigenní vlastnosti homogenátu slinných žláz a rekombinantních slinných proteinů druhu *P. orientalis* na sérech domácích zvířat z Etiopie
- 2) Pomocí stejných sér prostudovat antigenní vlastnosti slinných peptidů druhu *P. orientalis*
- 3) Zjistit, zda dochází ke zkříženým reakcím homogenátu slinných žláz, rekombinantních proteinů a peptidů *P. orientalis* s dalšími druhy flebotomů, kteří se vyskytují ve studované oblasti (*Sergentomyia schwetzi*, *P. papatasi*)

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Slinné žlázy flebotomů

Slinné žlázy flebotomů mají oválný tvar a jsou párové (obr. 1); v závislosti na druhu flebotoma se mohou jednotlivé žlázy v rámci páru tvarově i velikostně lišit (Adler a Theodor 1926). Složení proteinů slin se liší podle stáří, pohlaví, druhu, ale i u kolonií žijících v odlišných lokalitách, či chovaných za různých laboratorních podmínek (Warburg et al. 1994; Volf et al. 2000; Černá et al. 2002; Vlková et al. 2014; Ramalho-Ortigão et al. 2015). Primární funkcí slinných proteinů je zajištění úspěšného sání na hostiteli obranou proti zánětu a hemostázi v místě bodnutí. Imunomodulační vlastnosti některých proteinů ovlivňují imunitní odpověď hostitele, zatímco některé slinné proteiny působí antigenně a indukují tak specifickou protilátkovou odpověď (shrnutí v Ribeiro a Francischetti 2003; Gomes a Oliveira 2012).

Slinné proteiny flebotomů byly dle příbuznosti seskupeny do tzv. proteinových rodin. Významné rodiny, jejichž sekvence byly nalezeny v cDNA knihovně *P. orientalis*, budou podrobněji popsány v následující kapitole.



Obr. 1: Slinné žlázy flebotomů

(A) Pár morfologicky heterogenních žláz *P. duboscqi*. (B) Morfologicky homogenní žlázy *Lutzomyia longipalpis*. (C) Slinné žlázy *P. duboscqi* s použitím kontrastní mikroskopie. Převzato z review Leštinová et al. (2017)

2.2 Významné rodiny slinných proteinů *P. orientalis* a jejich antigenní vlastnosti

V práci Vlková et al. (2014) byly popsány cDNA knihovny slinných žláz kolonií *P. orientalis* pocházející ze dvou etiopských lokalit Addis Zemen a Melka Werer. V této diplomové práci bude diskutována pouze cDNA knihovna kolonie z oblasti Melka Werer, jelikož v navazující praktické části bylo pracováno pouze se slinnými žlázami pitvanými ze samic této kolonie.

Zmíněný transkriptom *P. orientalis* popisuje proteiny ze 13 proteinových rodin. V následujícím textu jsou popsány nejvýznamnější z nich; důraz je kladen na antigenní vlastnosti, jež byly u některých proteinů prokázány, a které jsou pro tuto diplomovou práci zásadní.

Prvními z významných slinných komponentů, jež se účastní sání, jsou **hyaluronidázy**. Jedná se o enzymy, které štěpí hyaluronan a některé další glykosaminoglykany, které jsou součástí extracelulární matrix pokožky (Volfová et al. 2008). Enzymatická aktivita těchto proteinů byla prokázána u různých druhů flebotomů (Charlab et al. 1999; Černá et al. 2002; Hostomská et al. 2009; Rohoušová et al. 2012; Vlková et al. 2014).

Apyrázy patří mezi fosfatázy, které hydrolyzují ATP a ADP na AMP a Pi. Tvoří zásadní antihemostatickou složku slinných žláz, která brání fyziologickému signálu poškozených buněk a tkání. Jejich význam při sání krve dokládá skutečnost, že jsou přítomny ve slinách všech dosud studovaných skupin krevsajících členovců (shrnuto ve Francischetti 2010). Apyrázy krevsajícího hmyzu se dělí na 3 rodiny: 5'-nukleotidázovou, CD-39 nukleotidázovou a Cimex rodinu apyráz (shrnuto v Ribeiro et al. 2010); do poslední jmenované rodiny spadají všechny apyrázy popsané u flebotomů (Charlab et al. 1999; Anderson et al. 2006; Kato et al. 2006; Oliveira et al. 2006). V transkriptomu i proteomu slinných žláz *P. orientalis* byly identifikovány dva homology s molekulovou hmotností 33,3 a 35,6 kDa, které jsou si sekvenčně podobné pouze ze 66 %. Významné antigenní vlastnosti potvrdily oba homology v imunoblotu se séry myši experimentálně poštipaných samicemi *P. orientalis* (Vlková et al. 2014). Antigenicita apyráz s myšimi, křeččími či králíčími séry byla popsána také u druhů *P. arabicus*, *P. argentipes*, *P. papatasi*, *P. perniciosus* a *P. tobbi* (Hostomská et al. 2009; Martín-Martín et al. 2012; Rohoušová et al. 2012; Vlková et al. 2012; Martín-Martín et al. 2013a).

Při studiu kinetiky protilátkové odpovědi u myši a králíků proti slinám *P. perniciosus* bylo zjištěno, že různé apyrázy mohou mít vliv na vznik imunitní

odpovědi v různých fázích imunizace. V případě experimentálně poštípaných myší se 35 kDa apyráza podílela na vzniku imunitní odpovědi již v prvních týdnech pravidelné expozice, zatímco k reakci s 37 kDa apyrázou došlo až o několik týdnů později. U pobodaných králíků naopak 37 kDa apyráza reagovala se séry již v počáteční fázi imunizace (Martín-Martín et al. 2015). Apyrázy byly rozpoznány séry psů poštípaných flebotomy druhů *P. perniciosus* (Vlková et al. 2011) a *Lu. longipalpis* (Hostomská et al. 2008). U druhu *P. papatasi* byla identifikována antigenicita apyrázy s lidskými séry z endemických oblastí kožní leishmaniózy (Marzouki et al. 2011). Skutečnost, že tentýž protein nereagoval se séry poštípaných myší, značí možnou druhovou specifitu tvorby protilátek vůči tomuto slinnému proteinu (Rohoušová et al. 2005).

Ve slinných žlázách *P. orientalis* se dále vyskytují **D7-related proteiny (D7rp)** a **PpSP15-like proteiny**, obojí patří do rodiny tzv. Odorant-vazebných proteinů. D7rp byly nalezeny u řady krevsajících členovců včetně flebotomů (Valenzuela et al. 2002). Jejich schopnost vázat biogenní aminy a leukotrieny byla potvrzena pouze u komárů (Mans et al. 2007), nicméně přítomnost cysteinyl leukotrien vazebné domény u různých druhů flebotomů naznačuje možnost úlohy v potlačení koagulační kaskády (Rohoušová et al. 2012). Experimentálně však tato funkce nebyla dosud ověřena. V transkriptomu *P. orientalis* byly identifikovány 4 různé D7r proteiny ($M_r = 26,7\text{--}27,3$ kDa), pouze tři z nich byly nalezeny také v proteomu. Tyto tři D7rp *P. orientalis* reagovaly se séry myší poštípaných zmíněným druhem, je ale třeba podotknout, že ne všechna pozitivní séra byla všemi proteiny rozpoznána (Vlková et al. 2014). V některých studiích séra myší či králíků exponovaných *P. papatasi* a *P. perniciosus* s D7rp pozitivně reagovaly (Vlková et al. 2012; Martín-Martín et al. 2015), nicméně ve studii Martín-Martín et al. (2012) reagoval D7rp slinných žláz *P. perniciosus* pouze s křeččími a nikoli myšími séry. Se séry přirozeně i experimentálně poštípaných psů reagovaly D7rp *P. perniciosus* a *Lu. longipalpis*, přičemž D7rp *P. perniciosus* rozpoznala pouze některá pozitivní séra (Bahia et al. 2007; Hostomská et al. 2008; Vlková et al. 2011).

PpSP15-like proteiny jsou, podobně jako D7rp, v rámci rodů *Phlebotomus* a *Lutzomyia* velmi hojné a strukturně rozmanité. U druhu *P. orientalis* to jsou vůbec nejpočetněji zastoupené proteiny s 5 homology ($M_r = 13,9\text{--}14,9$ kDa). Vysokou divergenci lze vidět z porovnání sekvencí PpSP15-like proteinů známých druhů podrodu *Larrousius*, kde podobnost mezi proteiny činila pouze 24 % (Vlková et al. 2014). Funkce PpSP15-like proteinů je doposud neznámá.

Yellow-related proteiny (Yrp) patří mezi proteiny charakterizované přítomností MRJP (major royal jelly protein) domény. Běžně se vyskytují v transkriptomu všech studovaných flebotomů (shrnutí ve Vlková et al. 2014). Struktura Yrp je vysoce mezidruhově konzervovaná, druhy flebotomů se však mohou lišit počtem homologů (Šíma et al. 2016).

V cDNA knihovně i proteomu *P. orientalis* byly identifikovány 2 Yrp (Mr = 41,5; 42,3 kDa). Ty se rozdělily do dvou větví, mezi nimiž je podobnost 77 % (Vlková et al. 2014). Toto rozdělení do dvou skupin je typické pro druhy v rámci podrodu *Larroussi* (Šíma et al. 2016). U Yrp *Lu. longipalpis* byla prokázána schopnost vázat biogenní aminy jako jsou histamin, serotonin a katecholaminy (Xu et al. 2011). Vazba těchto aminů brání hemostázi a vzniku zánětu v pokožce hostitele. Stejná vazebná doména byla nalezena také u druhů *Lu. ayacuchensis*, *Lu. intermedia*, *P. orientalis*, *P. tobbi*, *P. ariasi* a *P. perniciosus* (Hostomská et al. 2008; Kato et al. 2013; Vlková et al. 2014). Protizánětlivé účinky Yrp u těchto druhů však nejsou ověřené.

Vlastnost, která je naopak u Yrp intenzivně studována, je jejich antigenicita a silná reakce se séry opakovaně poštípaných zvířat. Na imunoblotu s myšími séry obsahujícími protilátky proti slinným proteinům *P. orientalis* představovaly oba homology Yrp silně a specificky reagující antigeny (Vlková et al. 2014). Podobně intenzivně reagovaly Yrp druhu *P. perniciosus* se séry experimentálně poštípaných myší, křečků, či přirozeně exponovaných králíků a zajíců (Martín-Martín et al. 2012, 2014). U druhu *P. perniciosus* bylo také zjištěno, že různé homology Yrp se mohou, podobně jako apyrázy, podílet na vzniku imunity v různých fázích imunizace. Například u myší vzniká imunitní odpověď proti oběma Yrp až po několika týdnech pravidelné expozice. Naopak u králíků lze detekovat jeden z proteinů již v počátcích, zatímco druhý protein až v pozdější fázi imunizace (Martín-Martín et al. 2015). Výborné antigenní vlastnosti Yrp *P. perniciosus* byly prokázány také v testování sér experimentálně poštípaných psů (Vlková et al. 2011). Tento výsledek vedl k pozdější produkci Yrp v rekombinantní formě a jeho použití v terénních studiích (Košťálová et al. 2015 a 2017).

Protilátky proti SGH byly dále detekovány v myších či králíčích sérech pomocí Yrp *P. arabicus*, *P. papatasi* a *P. tobbi* (Rohoušová et al. 2005; Hostomská et al. 2009; Rohoušová et al. 2012; Vlková et al. 2012). U druhu *P. papatasi* byl Yrp identifikován

jako jeden z proteinů reagujících se séry lidí z endemických oblastí kožní leishmaniózy (Marzouki et al. 2011).

Dalším druhem flebotoma, u nějž byla dokázána antigenicita Yrp, je *Lu. longipalpis*. Protilátky proti slinám rozpoznávané tímto slinným proteinem byly nalezeny například v sérech poštípaných myši a kuřat (Rohoušová et al. 2005; Soares et al. 2013). Opakovaná detekce těchto protilátek v sérech experimentálně či přirozeně poštípaných psů, lišek a lidí žijících v endemických oblastech výskytu *Lu. longipalpis* (Gomes et al. 2002; Bahia et al. 2007; Gomes et al. 2007; Hostomská et al. 2008; Teixeira et al. 2010) pak rovněž vedla k přípravě těchto proteinů v rekombinantní formě (Teixeira et al. 2010).

Antigen-5-related proteiny (Ag5rp) patří do CAP rodiny proteinů, jež dále zahrnuje skupiny Cystein-rich secretory proteinů a Pathogenesis-related proteinů. Antigen-5-related proteiny se hojně vyskytují v jedových žlázách blanokřídlých, např. vos a mravenců (Hoffman 1993; King and Spangfort 2000), či slinných žlázách krevsajících členovců včetně flebotomů (Anderson et al. 2006; Oliveira et al. 2006; Ameri et al. 2008; Hostomská et al. 2009; Rohoušová et al. 2012). U zákeřnice rodu *Triatoma* byla u jednoho z Ag5rp proteinů zjištěna superoxid dismutázová aktivita spojená s anti-neutrofilovou aktivitou (Assumpção et al. 2013). U flebotomů zůstává funkce těchto proteinů neznámá.

V transkriptomu i proteomu *P. orientalis* byly popsány dva Ag5rp s podobnou molekulovou hmotností 28,8 kDa. Sekvenčně jsou nejbližší druhům *P. perniciosus* a *P. tobbi*. Antigen-5-related proteiny patří mezi další významné antigenní proteiny slinných žláz flebotomů. Se séry myši poštípaných *P. orientalis* velmi intenzivně reagovaly oba proteiny (Vlková et al. 2014). Podobné výsledky ukazují imunoblotty se séry exponovaných myši, jejichž protilátky rozpoznávají Ag5rp slinných žláz *P. arabicus* (Hostomská et al. 2009) a *P. papatasi* (Vlková et al. 2012) nebo křečků či králíků poštípaných druhy *P. argentipes* (Martín-Martín et al. 2013a) a *P. tobbi* (Rohoušová et al. 2012). Stejně antigenní vlastnosti potvrdily i Ag5rp *P. perniciosus* se séry experimentálně i laboratorně poštípaných psů (Vlková et al. 2011).

pSP32-like protein byl poprvé popsán v transkriptomu *P. papatasi* (Valenzuela et al. 2001). Později se zjistilo, že se tyto proteiny vyskytují i ve slinách dalších druhů studovaných flebotomů, včetně *P. orientalis* (Vlková et al. 2014). U jiných organismů dosud nebyl pSP32-like protein zaznamenán a jeho funkce zůstává neznámá. Antigenní vlastnosti tohoto proteinu jsou zřejmě závislé na druhu flebotoma, ze kterého pocházejí.

Zatímco pSP32-like protein slinných žláz *P. papatasi* je zřetelně rozpoznáván protilátkami v sérech exponovaných myší (Marzouki et al. 2011), v případě pSP32-like proteinů *P. orientalis* k žádné reakci s myšími séry nedošlo (Vlková et al. 2014).

ParSP25-like protein je výlučným proteinem podrodu *Larroussius*. Nebyl nalezen ve slinách žádného novosvětského druhu flebotomů a jeho funkce je dosud neznámá. U druhu *P. orientalis* má molekulovou hmotnost 27,6 kDa a se séry poštípaných myší nereaguje (Vlková et al. 2014). Naopak ParSP25-like protein blízkého příbuzného druhu *P. perniciosus* se séry opakovaně exponovaných myší, křečků a psů reaguje (Vlková et al. 2011; Martín-Martín et al. 2012). V reakci s myšími séry byl detekován jako antigenní již v počáteční fázi imunizace (Martín-Martín et al. 2015). Tentýž protein byl také detekován na imunoblotu se séry přirozeně exponovaných zajíců a králíků (Martín-Martín et al. 2014).

Lufaxin-like protein patří mezi další unikátní proteiny slinných žláz flebotomů. V transkriptomu *P. orientalis* je charakterizován velikostí 18,8 kDa a je strukturně velmi podobný Lufaxin-like proteinům *P. perniciosus* a *P. tobbi*. Jeho funkce, objevená u *Lu. longipalpis*, spočívá v inhibici alternativní dráhy komplementu přímou vazbou prokonvertázy C3b-B. Lufaxin tak zřejmě chrání flebotoma během sání před účinky anafylatoxinů a ukládání komplementu v poškozené tkáni (Mendes-Sousa et al. 2017).

Mezi enzymy přítomné ve slinách flebotomů patří také **endonukleáza**. Protein obsahující NUC Smart motiv, který je typický pro endonukleázy a fosfodiesterázy štěpící nespecificky DNA nebo RNA. Stejný enzym byl přítomen také v transkriptomu dalších flebotomů a jiných krevsajících členovců (Ribeiro et al. 2004; Valenzuela et al. 2004; Anderson et al. 2006). V cDNA knihovně *P. orientalis* byla nalezena jedna sekvence kódující protein o molekulové hmotnosti 41,7 kDa (Vlková et al. 2014), její funkce není známá.

2.3 Protilátková odpověď proti slinným proteinům a její použití v praxi

Protilátková odpověď hostitele, která vzniká po opakovaném sání krve a tedy inokulaci slin do kůže hostitele, je tvořena různými skupinami imunoglobulinů (Ig) (Ribeiro a Francischetti 2003). Nejčastěji identifikovanými imunoglobuliny jsou IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4, jež byly v různém zastoupení a hladinách detekovány v sérech myší, psů a lidí poštípaných starosvětskými i novosvětskými druhy flebotomů (Oliveira et al. 2006; Vinhas et al. 2007; Hostomská et al. 2008; Marzouki et al. 2011; Vlková et al. 2011, 2012; Martín-Martín et al. 2015). U části IgG pozitivních sér lidí exponovaných

P. papatasi či *Lu. longipalpis*, byly detekovány také specifické IgE protilátky (Marzouki et al., 2011; Vinhas et al., 2007). Tentýž typ imunoglobulinů byl detekován také v sérech psů exponovaných *Lu. longipalpis*, nicméně jejich hladina nekorelovala s intenzitou poštípání (Hostomská et al. 2008). Přítomnost IgM v sérech experimentálně poštípaných králíků byla testována ve studii Martín-Martín et al. (2015). Signifikantní rozdíl mezi hladinami těchto protilátek u jedinců exponovaných pobodání *P. perniciosus* a negativními kontrolami však pozorován nebyl.

Protilátková IgG odpověď proti slinným proteinům flebotomů je druhově specifická (Volf a Rohoušová 2001; Rohoušová et al. 2005; Thiakaki et al. 2005) a pozitivně koreluje s intenzitou expozice hostitelů (Vlková et al. 2011, 2012; Martín-Martín et al. 2015). K detekci její hladiny v epidemiologických studiích se užívá značená antiprotilátka (= konjugát) namířená proti celkovým IgG, která rozpoznává většinu IgG subtypů (Clements et al. 2010; Gidwani et al. 2011; Košťálová et al. 2015; Košťálová et al. 2017).

Dynamika specifické IgG odpovědi byla studována u různých druhů zvířat experimentálně vystavených opakovanému pobodání flebotomy (Hostomská et al. 2008; Vlková et al. 2012; Martín-Martín et al. 2015). U všech testovaných druhů (myši, králíci a psi) došlo ke vzniku specifické protilátkové odpovědi v rozmezí 2.–5. týdne od první expozice, přičemž v průběhu každotýdenních sání se hladina protilátek dále zvyšovala. Následující průběh kinetiky IgG se po skončení imunizace u různých kombinací hostitel-přenašeč mírně lišil. U myši a králíků imunizovaných *P. perniciosus* zůstala hladina IgG po řadu týdnů vysoká (Martín-Martín et al. 2015). Hladiny IgG BALB/c myši exponovaných poštípání *P. papatasi* po skončení imunizace nadále rostly (Vlková et al. 2012), zatímco u psů poštípaných *Lu. longipalpis* došlo poměrně rychle k jejich výraznému poklesu. I přesto, zůstala hladina IgG v krvi psů v porovnání s negativními kontrolami signifikantně vyšší ještě 19 týdnů po poslední expozici flebotomům (Hostomská et al. 2008), což nám umožňuje detekovat protilátky proti slinám *P. perniciosus* vytvořené v jedné sezóně i na začátku sezóny nadcházející (Hostomská et al. 2008; Košťálová et al. 2015).

Existence paměťových B-lymfocytů byla prokázána u myši poštípaných *P. papatasi* a myši a králíků pobodaných *P. perniciosus*, kteří byli po několika týdnech bez expozice opět vystaveni poštípání. Hladina IgG po opětovné expozici u všech zmíněných zvířat signifikantně stoupla; u myši poštípaných *P. papatasi* došlo k nárůstu o 43 % (Vlková et al. 2012; Martín-Martín et al. 2015).

Výsledky předešlých experimentálních studií byly dále ověřeny i v terénní studii Clements et al. (2010). Pacientům s VL hospitalizovaným 30 dní v nemocnici klesly hladiny specifických IgG proti slinám *P. papatasi* a *P. argentipes* v průměru o 15 %. Po propuštění byli pacienti znovu vystaveni poštípání flebotomů. Hladiny protilátek detekovaných u těchto lidí po půl roce dosahovaly ještě vyšších hodnot, než byly hodnoty naměřené před hospitalizací. Podobná kinetika IgG byla stanovena pro *P. papatasi* i *P. argentipes* (Clements et al. 2010).

Skutečnost, že hladiny IgG kolísají v závislosti na přítomnosti či absenci expozice poštípání, značí, že IgG jsou vhodným nástrojem k testování efektivity ochranných opatření proti nedávné expozici flebotomům (Clements et al. 2010). Tento poznatek byl užitečný v terénních studiích testujících použití insekticidních sítí v domácnostech v ohniscích VL v Indii a Nepálu (Dinesh et al. 2008; Gidwani et al. 2011). Ačkoli ve studii Dinesh et al. (2008) k zabránění poštípání lidí nedošlo, v následující práci Gidwani et al. (2011) bylo během dvou let zaznamenáno snížení hladiny protilátek proti slinám o 9–12 % v porovnání se skupinou, jež insekticidní sítě nepoužívala.

Anti-SGH IgG protilátky mohou být též využity jako marker rizika kožní leishmaniózy. Zvýšené hladiny protilátek oproti zdravým jedincům byly detekovány u lidí nakažených druhem *Le. tropica* v Turecku (Rohoušová et al. 2005), *Le. braziliensis* v Brazílii (de Moura et al. 2007) a *Le. major* v Tunisku (Marzouki et al. 2011). Naproti tomu, u VL je situace složitější. Některé studie ukázaly, že hladina IgG koreluje s rizikem vzniku VL u lidí a psů infikovaných *Le. infantum* (syn. *chagasi*) (Gomes et al. 2002; Aquino et al. 2010; Vlková et al. 2011). Ve studii Košťálová et al. (2015) se naopak u psů prokázala pozitivní korelace mezi anti-SGH odpovědí a aktivní leishmaniovou infekcí.

Dalším a pro tuto práci podstatným uplatněním specifické protilátkové odpovědi proti slinám je také identifikace hostitelských druhů, jež mohou sloužit jako častý zdroj krve pro flebotomy či jako eventuální rezervoár leishmanií.

Takovýmto hostitelem a potenciálním rezervoárem infekce v okolí endemické lokality VL v Brazílii je např. liška *Cerdocyon thous*. Séra všech testovaných zvířat vykazovala vysokou hladinu protilátek proti SGH *Lu. longipalpis* a je tedy možné, že v dané lokalitě dochází k sylvatickému cyklu VL nezávislému na přítomnosti tradičních rezervoárových hostitelů. U lišek nebyly detekovány protilátky proti *Le. chagasi*, nicméně pomocí PCR, přímé detekce z kostní dřeně či pitvy nakažených flebotomů byla

u tří z jedenácti vzorků prokázána přítomnost výše zmíněných parazitů (Gomes et al. 2007).

Divocí králíci a zajíci byli identifikováni jako rezervoároví hostitelé VL v jihozápadní části Madridu. Detekce vysoké hladiny protilátek v sérech odchycených zvířat, stejně jako nízká protilátková odpověď v sérech psů, jež byli dříve považováni za jediný rezervoár infekce VL v jižní Evropě (Alvar et al. 2004), naznačuje významnou úlohu zajícovců ve vzniku epidemie VL v tomto ohnisku (Martín-Martín et al. 2014).

Ve studii Rohoušová et al. (2015), se kterou částečně souvisí i má diplomová práce, bylo zjištěno, že ačkoli je přenos VL způsoben komplexem *Le. donovani* v Etiopii považován za antroponotický (shrnutí v Chappuis et al. 2007), séra všech testovaných druhů domácích zvířat (ovce, krávy, kozy, psi a osli) obsahují protilátky proti slinám předpokládaného přenašeče infekce *P. orientalis* (Elnaiem 2011; Šeblová et al. 2013), stejně jako protilátky proti parazitu z komplexu *Le. donovani*. Konkrétněji, celková séroprevalence IgG protilátek etiopských zvířat proti slinám *P. orientalis* činila 23,1 %. Nejvíce pozitivních jedinců bylo zastoupeno mezi psy, ovci a osly (57,1-66,7 %). Psi byli taktéž druhem s nejčastěji diagnostikovanou pozitivní protilátkovou odpovědí proti *Le. donovani* (55,9 %), přičemž celková séroprevalence všech etiopských zvířat činila 18,9 %. Pozitivně korelovaly hladiny protilátek proti *Le. donovani* a SGH *P. orientalis* u ovcí, kde korelační koeficient dosáhl hodnoty 0,65; o něco nižší pak byly korelace u krav a koz ($K_f = 0,37$ pro oba druhy).

Zmíněné druhy domácích zvířat byly také testovány na přítomnost kinetoplastové DNA (kDNA) leishmanií. Pouze 5,9 % z celkového počtu 546 testovaných zvířat bylo kDNA pozitivních. Nejvyšší zastoupení pozitivních vzorků bylo mezi osly (10 %), psy, kozami a ovci (5,9–6,7 %). U žádného z testovaných zvířat nebyly pozorovány známky onemocnění VL. Z těchto výsledků je zřejmé, že uvedené druhy domácích zvířat patrně neslouží jako rezervoár infekce VL, ale vzhledem k vysokým procentům jedinců s protilátkami proti slinám *P. orientalis*, jsou tato zvířata pravidelným zdrojem krve pro přenašeče (Rohoušová et al. 2015).

2.4 Rekombinantní proteiny jako markery expozice

Ve slinných žlázách *P. orientalis* se nachází celé spektrum antigenních proteinů (Vlková et al. 2014). Přesto je homogenát slinných žláz (SGH) jako biomarker expozice flebotomům z několika důvodů nevhodný. Proteinové složení slin může být ovlivněno několika faktory, například stářím samic (Volf et al. 2000; Prates et al. 2008). Zejména

však dlouhodobý chov kolonií vyžaduje prostor, specifické podmínky a vyškolené pracovníky, jež jsou schopni slinné žlázy pitvat v množstvích dostačujících i pro použití v rozsáhlých epidemiologických studiích (Košťálová et al. 2017).

Většina dosud testovaných rekombinantních proteinů slinných žláz flebotomů byla exprimována v bakteriálním systému *E. coli* (Hamasaki et al. 2009; Vlková et al. 2012; Martín-Martín et al. 2013b; Drahota et al. 2014). Ačkoli se jedná o systém, ve kterém lze proteiny produkovat rychle, levně a efektivně, velkou nevýhodou je neschopnost bakterií proteiny posttranslačně modifikovat (shrnutí v Yin et al. 2007). V tomto kontextu je často zmiňovanou modifikací zejména glykosylace. Absence glykosylačních úprav může vést ke snížení enzymatické aktivity a špatnému sbalení proteinů, jež může mít vliv na expozici povrchových epitopů (Hofinger et al. 2007).

Vliv posttranslační glykosylace na antigenicitu slinných proteinů flebotomů dosud nebyl studován. Poměrně mnoho studií se však věnovalo vlivu glykosylací na antigenicitu a imunogenicitu proteinů virových obalů či bakteriálních kapsulí (Ansari et al. 2006; Dowling et al. 2007; Børud et al. 2010; Gavrilov et al. 2011). V některých studiích došli autoři k závěru, že jednotlivé glykany na povrchu virů prostorově omezují přístup neutralizačních protilátek k epitopům proteinů, a tudíž dochází k nižšímu rozpoznávání protilátkami (Fournillier et al. 2001; Wei et al. 2003). Naopak v práci Gavrilov et al. (2011) se ukázalo, že deglykosylované virové proteiny vážou nižší hladiny neutralizačních protilátek v porovnání s plně glykosylovanými proteiny. Vzhledem ke komplikované situaci a možným vedlejším účinkům absence glykosylací se proto při výběru proteinů pro expresi v rekombinantní formě stanovuje kromě antigenicity také potenciální přítomnost N- a O-glykosylací jednotlivých proteinů. Preferenčně jsou vybírány ty proteiny, jejichž míra glykosylace je v nativní formě co nejnižší, a tedy i riziko ovlivnění jejich antigenicity vlivem posttranslační modifikace je minimální.

Alternativou bakteriálního systému jsou hmyzí a savčí expresní systémy. Výroba proteinů v těchto systémech je časově i finančně náročnější a výtěžek produktu je většinou nižší (shrnutí v Yin et al. 2007). Oba systémy jsou schopny všech posttranslačních modifikací, nicméně hmyzí buňky jsou limitovány v tvorbě některých N-glykosylačních úprav; konkrétně v místech, kde savčí buňky syntetizují terminálně sializované N-glykany, vznikají v hmyzích buňkách glykany zakončené paucimanóзовým zbytkem (Shi a Jarvis 2007). Ačkoli se zdá být použití hmyzích buněk pro přípravu slinných proteinů flebotomů nejpřirozenější způsob exprese, dosud

žádný z publikovaných slinných proteinů flebotomů takto exprimován nebyl. Naopak rekombinantní proteiny určené primárně k testování lidských sér byly vyrobeny v savčím expresním systému (Teixeira et al. 2010). I u savčích buněk je třeba zohlednit, že jednotlivé linie buněk se liší mírou glykosylace, která by měla odpovídat nativním proteinům (Croset et al. 2012). V případě buněčných linií, u nichž dochází k hyperglykosylacím, by mohlo dojít k překrývání antigenních míst proteinů cukernými řetězci.

V následujících podkapitolách bych se ráda blíže věnovala rodinám slinných proteinů flebotomů, jež byly připraveny v rekombinantní formě a testovány se séry hostitelů přirozeně či experimentálně pobodaných flebotomy. S ohledem na rozsah této práce jsou zmíněny pouze rodiny, jež jsou relevantní pro navazující praktickou část.

2.4.1 Apyrázy

V bakteriálním expresním systému *E. coli* byly za denaturujících či nativních podmínek exprimovány dvě slinné apyrázy rSP01B a rSP01 ze slinných žláz *P. perniciosus*, které specificky reagovaly se séry experimentálně pobodaných psů a myši na imunoblotu i v ELISA testu. Protilátková odpověď myši i psů proti oběma apyrázám exprimovaným v denaturované formě silně korelovala s IgG protilátkovou odpovědí proti celým slinným žlázám. Míra korelace se vyjadřuje pomocí korelačního koeficientu (Kf), který pro oba proteiny dosahoval velmi vysokých hodnot (Kf = 0,89-0,91).

Odpověď proti nativně exprimované apyráze korelovala s odpovědí proti SGH pouze v testech s myšími séry. Při použití psích sér u tohoto proteinu dosahoval korelační koeficient hodnoty pouze 0,24. Rozdíl mezi výsledky Kf denaturované a nativní formy téhož proteinu je pravděpodobně způsoben různou expozicí epitopů vzniklou při změně konformace (Drahota et al. 2014).

Imunogenním vlastnostem apyrázy rSP01B exprimované v nativním prostředí se věnuje také práce Martín-Martín et al. (2013b), antigenicita byla testována s myšími a křeččími séry, se kterými protein rSP01B specificky reagoval (Martín-Martín et al. 2013b). Stejný protein byl použit při testování kinetiky protilátek proti slinám u experimentálně poštipaných myši. Kinetika celkových IgG protilátek proti rSP01B a celým slinným žlázám byla velmi podobná, ačkoli vznik protilátkové odpovědi proti rSP01B byl pozorován o týden dříve. Křivky popisující hladinu IgG1 se u obou antigenů téměř shodovaly. Zajímavý výsledek pak bylo možno spatřit při detekci IgG2a

protilátkové odpovědi proti rSP01B. U některých z myši došlo k její tvorbě v intervalech a hladinách srovnatelných s tvorbou IgG a IgG1, zatímco u ostatních myši se křivka podobala spíše neexponovaným kontrolám (Martín-Martín et al. 2015).

Rekombinantní apyráza rSP01B exprimovaná v nativním prostředí byla použita také v terénní studii, ve které byly detekovány protilátky proti slinám *P. perniciosus* v sérech divokých králíků a zajíců z ohniska VL ve Španělsku. Použitelnost rSP01B jako markeru expozice pro tyto zajícovce dokazuje vysoká korelace se slinami v případě obou testovaných druhů ($Kf_{\text{zajíci}} = 0,71$; $Kf_{\text{králíci}} = 0,67$), stejně jako reakce sér pozitivních pro SGH s rSP01B na imunoblotu. Podobně byla využita antigenicita apyrázy rSP01 a nativně purifikované rSP01B v testování účinnosti ochranných opatření zaměřených proti poštípání psů samicemi *P. perniciosus*. I zde byla nalezena silná korelace se slinami ($Kf = 0,86$ pro oba proteiny) (Martín-Martín et al. 2014).

Rekombinantní apyráza *P. duboscqi* rPduApy 2 byla taktéž exprimována v bakteriálním systému *E. coli* (Hamasaki et al. 2009). Reagovala se sérem poštípané myši na imunoblotu, je ale třeba zmínit, že v této práci bylo použito sérum pouze jedné myši, a pro dosažení komplexní informace o antigenicitě zmíněného rekombinantního proteinu by bylo záhodno provést testování s větším množstvím sér.

Rekombinantním proteinem testovaným na přirozeně poštípaných psech je apyráza rLJL23 slinných žláz *Lu. longipalpis*. Tento protein exprimovaný v savčím systému byl rozpoznáván protilátkami psů z ohniska VL. Při testování rLJL23 s lidskými séry ze stejné oblasti však nedošlo na imunoblotu k žádné viditelné reakci (Teixeira et al. 2010).

2.4.2 D7-related proteiny

Vlková et al. (2012) testovala dva rekombinantní D7-related proteiny *P. papatasi* se séry myši experimentálně poštípaných tímto druhem. U rekombinantního PpSP30 D7rp byla silná reakce na imunoblotu pozorována u 4 z 5 exponovaných myši. Druhý rekombinantní D7rp, PpSP28, nebyl rozpoznán žádným z použitých myších sér (Vlková et al. 2012).

Rozdílné výsledky v testování antigenicity byly zjištěny u rekombinantního D7rp proteinu *P. perniciosus*. Protein rSP04 exprimovaný v bakteriálním systému v nativní formě nebyl na imunoblotu rozeznán myšími ani psími séry. Při testování myších sér v ELISA testu některé ze zvířat s rSP04 slabě reagovaly, avšak hladina

protilátek se blížila hodnotám negativních kontrol. Obdobného výsledku bylo dosaženo také v ELISA testu s psími séry (Drahota et al. 2014). Na druhou stranu totožný protein rSP04 ve studii Martín-Martín et al. 2013b na imunoblotu spolehlivě rozeznával séra křečků i myši experimentálně exponovaných poštípání *P. perniciosus*. Odpovídající nativní slinný D7rp, byl však při použití celých slinných žláz jako antigenu, rozpoznán pouze křeččími, nikoli myšími séry. Jedno z možných vysvětlení je rozdílné schéma imunizace použitých myši (Martín-Martín et al. 2013b).

Rekombinantní rSP04 byl též použit k testování kinetiky protilátek u BALB/c myši. Vznik a nárůst hladin IgG i IgG1 proti rSP04 byl pomalejší než pro hladiny anti-SGH protilátek a jejich nejvyšší hodnoty byly detekovány v pozdějších intervalech imunizace (Martín-Martín et al. 2015).

V savčím systému exprimovaný rekombinantní D7rp LJL13 slinných žláz *Lu. longipalpis* byl rozpoznáván séry experimentálně i přirozeně poštípaných psů. Se séry lidí exponovaných bodnutí tomuto přenašeči LJL13 nereagoval (Teixeira et al. 2010).

2.4.3 Yellow-related proteiny

Yellow-related proteiny patří mezi rodinu vysoce antigenních slinných proteinů a jsou nejčastěji testovaným antigenem v řadě experimentálních i terénních studií (Souza et al., 2010).

Prvními z uměle exprimovaných Yrp proteinů slinných žláz flebotomů byly rLJM17, rLJM11 a rLJM111 *Lu. longipalpis*. Tyto proteiny produkované v savčím expresním systému byly testovány jako antigeny se séry psů, lišek a lidí žijících v endemických oblastech VL. Nejlepší antigenní vlastnosti prokázal rLJM17, který byl rozeznán IgG protilátkami obsaženými v sérech všech zmíněných hostitelů. Yellow-related protein rLJM11 byl rozpoznán séry psů a lidí, zatímco rLJM111 pozitivně reagoval pouze s lidskými séry (Teixeira et al. 2010).

Antigenicita proteinů rLJM17 a rLJM11 byla dále testována se séry dětí žijících v oblasti VL, u kterých byla při opakovaných odběrech krve zjištěna sérokonverze IgG protilátek proti slinným žlázám. Oba proteiny zachytily sérokonverzi v různém počtu vzorků, kombinací proteinů se počty pozitivních sér zvýšily, nicméně nedosáhly počtů pozitivních sér detekovaných pomocí SGH. Imunoblot s vybranými séry ukázal, že rLJM17 rozpoznal séra, která rLJM11 nerozpoznal a naopak. Použití obou proteinů by

tedy mělo vést ke zvýšení senzitivity testování. Kombinace těchto proteinů byla proto dále použita v hlavní studii s 1074 séry. Ačkoli korelace s SGH byla pouhých 38 %, senzitivita testů s použitím SGH jako standardu činila 77 % a specifita 88 % (Souza et al. 2010).

K testování potenciálních zkřížených reakcí rLJM17 a rLJM11 se slinnými proteiny *Lu. intermedia* byla použita séra lidí pocházejících z endemických oblastí kožní leishmaniózy, kde je hlavním přenašečem *Lu. intermedia*, a oblastí s výskytem VL, za jejíž přenos je zodpovědná *Lu. longipalpis*. Ve studii Teixeira et al. (2010) reagovaly oba rekombinantní proteiny pouze se séry z oblastí výskytu *Lu. longipalpis*. V navazující práci Souza et al. (2010) se navíc ukázalo, že použití rLJM17 a rLJM11 jako antigenů vede v porovnání s SGH k identifikaci menšího počtu zkřížených reakcí mezi *Lu. longipalpis* a *Lu. intermedia*, a tedy vyšší specifitě imunologického testování. Je však třeba zmínit, že druhy *Lu. longipalpis* a *Lu. intermedia* žijí v jiných ekosystémech a pouze výjimečně jsou lidé poštípani oběma druhy současně (Souza et al. 2010).

Dosud jedinou prací zabývající se detekcí protilátek u domácích zvířat s cílem zjistit, které areály jsou pro člověka rizikové z hlediska poštípání *Lu. longipalpis*, je studie Soares et al. (2013). V této práci byly detekovány hladiny IgY protilátek proti slinám a rekombinantním Yrp u domácích kuřat. Protein rLJM11 rozpoznával všechna séra kuřat exponovaných *Lu. longipalpis*, přičemž korelační koeficient se slinami činil 0,42. Yellow-related protein rLJM17 detekoval 86,6 % kuřecích sér pozitivních na SGH, nicméně jeho korelace se slinami nabývala záporných hodnot ($K_f = -0,33$). Test s použitím rLJM17 jako antigenu se tedy ukázal jako nefunkční (Soares et al. 2013).

Dalším druhem flebotoma, jehož Yrp byly použity zejména v terénních studiích, je *P. perniciosus*. Antigenicita rekombinantního SP03B byla nejprve otestována v imunoblotu se séry experimentálně poštípaných myší a psů. V ELISA testu pak bylo pro oba druhy zvířat dosaženo vysokého korelačního koeficientu s odpovědí proti slinným žlázám ($K_{f_{myši}} = 0,93$; $K_{f_{psi}} = 0,89$) (Drahota et al. 2014).

Díky silné antigenitě odpovídající SGH byl protein rSP03B a také kombinace proteinů rSP03B a apyrázy rSP01 využito ke sledování distribuce a dynamiky protilátkové odpovědi u 56 psů přirozeně poštípaných *P. perniciosus*, kterým byla opakovaně odebírána krev. Korelační křivky rekombinantních proteinů a celých slinných žláz demonstrující dvě sezóny tvorby a poklesu IgG protilátek jsou si velmi podobné. Konkrétněji, korelace protilátkové odpovědi mezi slinným homogenátem

a proteinem rSP03B činila 77 %, zatímco korelační koeficient SGH s rSP03B+rSP01 dosáhl 65 %. Vzájemná korelace rekombinantů rSP03B a rSP03B+rSP01 nabývala 75 %. Z těchto výsledků lze soudit, že kombinace Yrp rSP03B s rekombinantní apyrázou v tomto případě není přínosná, zatímco samotný Yrp rSP03B je slibným kandidátem na marker expozice pro druh *P. perniciosus* (Košťálová et al. 2015).

Předmětem další práce Košťálové et al. (2017) bylo porovnat hladiny protilátek u psů ze tří různých endemických lokalit výskytu VL a zjistit, zda protein rSP03B lze používat v celém areálu rozšíření *P. perniciosus*, od Itálie až po Portugalsko. U 118 psů z jižní Itálie korelace IgG protilátek proti rSP03B a slinám dosahovala 73 %. U 96 psích sér ze střední Itálie byl Kf trochu nižší (56 %), zatímco protilátková odpověď sér 341 psů z metropolitní oblasti portugalského Lisabonu se mezi zmíněnými antigeny shodovala v 81 %.

Zároveň byla pomocí imunoblotu testována podobnost antigenních epitopů Yrp slinných žláz a rekombinantního Yrp SP03B. Inhibiční test ukázal, že všechny IgG protilátky specifické pro nativní Yrp se během preinkubace se séry váží na rekombinantní formu téhož proteinu, a během vyvolání barevné reakce dojde ke kompletnímu vymizení odpovídajícího pruhu na imunoblotu. Antigenní epitopy nativní formy v celých žlázách i na rekombinantní formě proteinu tedy rozeznávají stejné protilátky obsažené v psích sérech. Pro ověření specifity tohoto inhibičního testu byla použita rekombinantní forma jiného, neantigenního Yrp (42kDa SP03). IgG protilátky vytvořené v sérech poštípaných psů z různých oblastí výskytu *P. perniciosus* tedy specificky reagují s testovaným rekombinantním Yrp rSP03B (Košťálová et al. 2017). Žádná kauzalita ale nebyla nalezena mezi hladinou protilátek proti rSP03B a akutním onemocněním psů nakažených VL, proto se jako marker rizika onemocnění zdá být zmíněný rekombinantní protein nevhodný (Košťálová et al. 2015).

Yellow-related protein rSP03B byl taktéž (podobně jako apyráza) využit k detekci protilátek v krvi divokých zajíců a králíků v endemické oblasti VL v Madridu. V této studii byly zjištěny vysoké korelace protilátek proti rSP03B s protilátkami proti SGH v sérech obou druhů zajícovců ($Kf_{\text{zajíci}} = 0,9$; $Kf_{\text{králíci}} = 0,71$). Imunogenicita rSP03B se séry těchto zvířecích druhů byla prokázána také na imunoblotu. Detekovaná protilátková odpověď proti SGH i rSP03B vedla autory k hypotéze, že divocí králíci i zajíci mohou v Madridu sloužit jako potenciální zdroj nákazy VL přenášené *P. perniciosus* (Martín-Martín et al. 2014).

V rekombinantní formě byly exprimovány také 2 Yrp druhu *P. papatasi*.

Proteiny rPpSP44 a rPpSP42 byly testovány na imunoblotu se séry přirozeně exponovaných myší. Ačkoli zejména protilátková reakce s rPpSP44 byla velmi silná, oba proteiny byly rozpoznány pouze třemi z pěti použitých sér (Vlková et al. 2012).

2.4.4 Antigen-5 related proteiny

Rekombinantní Ag5rp byl dosud studovaný pouze Drahotou et al. (2014): protein rSP07 ze slinných žláz druhu *P. perniciosus* exprimovaný v buňkách bakterie *E. coli* byl testován se séry experimentálně poštípaných psů a myší. K rozpoznání rSP07 jako antigenu však nedošlo ani v ELISA testu ani na imunoblotu (Drahota et al. 2014).

2.4.5 ParSP25-like proteiny

Drahota et al. (2014) se ve své práci zabýval také testováním antigenních vlastností ParSP25-like proteinů. Rekombinantní protein rSP08 slinných žláz *P. perniciosus* byl exprimován v nativní formě v bakteriálním systému *E. coli* a následně testován se séry experimentálně poštípaných psů a myší. Na imunoblotu se séry obou druhů zvířat byla zaznamenána pozitivní reakce, avšak v ELISA testu se výsledky lišily. S použitím myších sér dosáhl rSP08 100% korelace se slinnými žlázami, naopak u psích sér nebyla korelace anti-rSP08 IgG s protilátkami proti celým slinám signifikantní. Odlišné chování rSP08 s psími séry v ELISA testu a na imunoblotu je zřejmě způsobeno různou expozicí antigenních epitopů v těchto testech (Drahota et al. 2014).

2.5 Peptidy jako markery expozice

Syntetické peptidy představují typ molekuly schopné napodobit antigenní místa (B-buněčné epitopy) proteinů, na něž se váží protilátky. Mohou být generovány jako přesné kopie fragmentů proteinu nebo jako sekvence aminokyselin obsahující chemické modifikace (Groß et al. 2016).

Výhodou syntetických peptidů je v porovnání s rekombinantními proteiny především jejich výroba ve velkém množství. Ve slinách flebotomů se vyskytuje řada proteinů, které jsou si strukturně značně podobné (viz podkapitola 2.2). Proto i při použití rekombinantních proteinů v sérologických testech vzniká riziko zkřížených reakcí. Výběrem sekvencí peptidů specifických pouze pro konkrétní druh lze docílit i zvýšení specifity v imunologických testech. Naopak k možnému snížení senzitivity

detekce poštipaných hostitelů může přispívat fakt, že ne všichni jedinci exponovaní hmyzímu přenašeči produkují protilátky zaměřené na jeden konkrétní epitop slinného proteinu, jenž byl vybrán k syntéze peptidu. Studie Vlková et al. (2012) prokázala, že použití rekombinantních proteinů místo celých slinných žláz vede k nižší hladině detekce protilátek v sérech myši experimentálně poštipaných druhem *P. papatasi*. Ačkoli u všech myši došlo k produkci protilátek proti SGH, žádný ze čtyř testovaných rekombinantních proteinů nebyl rozpoznáván všemi séry. Redukce několika epitopů, vyskytujících se na slinném proteinu, na pouze jeden epitop peptidu tedy vede k dalšímu snížení senzitivity. Tento problém je možno částečně vyřešit současným použitím několika peptidů (Dama et al. 2013).

U flebotomů dosud nebyly antigenní vlastnosti peptidů publikovány, avšak výsledky, kterých bylo dosaženo u komárů a much tse tse, se zdají být velmi slibné. Prozatím největších úspěchů bylo dosaženo s peptidem gSG6-P1 ze slinných žláz komplexu *Anopheles gambiae*, jež se osvědčil jako antigenní biomarker expozice v řadě terénních studií (Poinsignon et al. 2009; Drame et al. 2010; Sagna et al. 2013; Londono-Renteria et al. 2015). Tento peptid byl navržen podle sekvence slinného proteinu gSG6 (salivary gland protein 6), který je exprimován pouze u dospělých samic komárů rodu *Anopheles* (Poinsignon et al. 2008; Lombardo et al. 2009). Peptid gSG6-P1 obsahuje doménu konzervovanou mezi různými druhy rodu *Anopheles*, což umožňuje jeho použití pro širší spektrum druhů, ale zároveň znemožňuje odlišení jednotlivých druhů od sebe. Reakce s IgG protilátkami lidských sér byla zaznamenána u starosvětských (*A. funestus*, *A. gambiae*) i novosvětských (*A. albimanus*, *A. darlingi*, *A. punctimacula*) druhů (Poinsignon et al. 2008, 2010; Londono-Renteria et al. 2015).

Ve studii Poinsignon et al. (2009) byla testována séra dětí pocházejících z oblastí Senegalu s nízkým výskytem komárů. Ačkoli bylo v daných oblastech tradičními entomologickými metodami odchyceny pouze malé počty samic *Anopheles*, IgG odpověď proti gSG6-P1 v průběhu sezóny signifikantně stoupala. Použití tohoto peptidu by tedy mohlo nahradit běžné odchytové metody a zvýšit účinnost měření výskytu komárů (Poinsignon et al. 2009). Díky svojí vysoké senzitivitě, mají gSG6-P1 peptidy velmi výrazný potenciál při kontrole ochranných opatření proti přenosu malárie (Drame et al. 2010). Po dvou měsících, kdy byly aplikovány deltamethrinem ošetřené moskytiéry se snížilo procento lidí s pozitivní anti-gSG6-P1 protilátkovou odpovědí z relativně konstantních 64-81 % na 5 %. Takovýto rychlý pokles IgG protilátek po použití insekticidem napuštěných sítí se zdá být unikátní vlastností protilátkové

odpovědi proti gSG6-P1, která je krátkodobá, nedochází-li k pravidelné antigenní stimulaci. Tato vlastnost je velmi důležitá při kontrole efektivity kontroly přenašečů (Drame et al. 2010).

V porovnání s homogenátem slinných žláz a rekombinantním proteinem gSG6, je peptid gSG6-P1 rozpoznáván lidskými IgG s daleko vyšší senzitivitou. Je tedy možné, že pro vytvoření anti-gSG6-P1 protilátkové odpovědi je dostačující expozice s nízkou frekvencí poštípání, zatímco protilátky proti celým proteinům se vytváří až po mnoha pravidelných sáních. Peptid gSG6-P1 se tedy zdá být vhodným markerem expozice zejména v oblastech s nízkou denzitou komárů rodu *Anopheles* (Poinsignon et al. 2009).

Skutečnost, že hladiny protilátek korelující s frekvencí poštípání komáry rodu *Anopheles*, by měla umožnit identifikovat oblasti s vyšší pravděpodobností přenosu malárie (Badu et al. 2012; Sagna et al. 2013). Tento předpoklad byl potvrzen také ve studii Londono-Renteria et al. (2015), kde bylo zjištěno, že účastníci studie s vysokou anti-gSG6-P1 protilátkovou odpovědí měli 20,24 x vyšší pravděpodobnost nákazy malárie oproti lidem s nízkými titry protilátek. Naproti tomu v některých oblastech Kolumbie, kde se vyskytuje velké množství komárů rodu *Anopheles* a tudíž dochází k přenosu malárie často, nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi anti-gSG6-P1 hladinami protilátek malárií nakaženými a zdravými jedinci. V hyperendemických oblastech, kde je s vysokou frekvencí komáry poštípána většina populace nelze tudíž tento marker expozice využít pro stanovení rizika nákazy. Pro tyto studie je třeba nalézt specifitější biomarker. Obdobně nelze tento marker použít v oblastech, kde je pouze část komárů *Anopheles* schopna přenosu plasmodií (Londono-Renteria et al. 2015).

Dalším druhem komára, u něhož byly bioinformaticky navrženy a syntetizovány peptidy slinných proteinů, je *Aedes aegypti*. Nejlepších antigenních vlastností dosáhl N-term-34 kDa peptid, jenž byl použit k testování lidských sér z endemických oblastí jižního Beninu. V průběhu dvou let hladiny IgG protilátek kolísaly dle sezóny a pozitivně korelovaly s intenzitou období dešťů (Ndille et al. 2012).

U lidí pobodaných glosinami je nejslibnějším peptidem epitop slinných žláz Tse tse growth factor 1, podle něhož byl syntetizován peptid Tsgf1₁₈₋₄₃. Protilátková odpověď proti Tsgf1₁₈₋₄₃ byla měřena ve dvou afrických populacích exponovaných glosinám. V obou z nich byla hladina anti-Tsgf1₁₈₋₄₃ IgG signifikantně vyšší než v kontrolních skupinách. Naproti tomu homogenát slinných žláz byl rozpoznáván také séry z oblasti bez výskytu glosin, kteří dle použití peptidů spadali do skupiny

negativních kontrol. Z toho lze usuzovat, že detekce anti-Tsgf1₁₈₋₄₃ protilátek je specifičtější a jedná se o vhodný biomarker expozice. Vyšší protilátková odpověď proti slinnému epitopu Tsgf1₁₈₋₄₃ u pacientů trpících spavou nemocí oproti zdravým jedincům navíc nasvědčuje tomu, že daný peptid lze využít také ke zhodnocení rizika infekce spavou nemocí v endemických oblastech Afriky (Dama et al. 2013). Stejný peptid byl použit ke zhodnocení efektivity kontrolního programu, jehož součástí bylo zavedení insekticidem napuštěných panelů v okolí vesnic na pobřeží Guiney. Již po prvním roce instalace byl vidět signifikantní pokles anti-Tsgf1₁₈₋₄₃ IgG protilátek, naopak ve vesnicích bez jakékoli kontroly přenašečů došlo naopak k mírnému zvýšení protilátkové odpovědi (Courtin et al. 2015).

Dosud jediným publikovaným peptidem hodnotícím expozici domácích zvířat, konkrétně skotu, vůči bodnutí much tse-tse je peptid Tsall₅₂₋₇₅ pocházející ze sekvence Tsetse salivary gland proteinu 1 druhu *Glossina morsitans morsitans*. Antigenní vlastnosti tohoto peptidu byly prokázány při detekci specifických protilátek v séru přirozeně poštípaného skotu. Potenciální nespecifické reakce byly vyloučeny v ELISA testech se séry skotu z kontrolních skupin z oblastí bez výskytu glosin stejně jako ve skupinách exponovaných ovádům, bodalkám, komárům a klíšťatům. K dalšímu testování peptidu Tsall₅₂₋₇₅ byla použita séra experimentálně poštípaného skotu. Séra byla rozdělena do dvou skupin dle míry expozice. Na jedincích v první skupině šlo 10 glosin jednou týdně a již po třech týdnech bylo možno pozorovat nárůst hladiny anti-Tsall₅₂₋₇₅ protilátek, které přetrvaly po dobu 11-ti týdnů pravidelné expozice. Podobná kinetika protilátek byla prokázána i při použití celých slinných žláz jako antigenu. Naopak ve skupině vystavené bodnutí 50ti glosin dvakrát týdně se protilátky vytvořily pouze proti proteinům celých slinných žláz a u antigenu Tsall₅₂₋₇₅ nebyla zaznamenána téměř žádná protilátková odpověď. Na základě tohoto výsledku autoři předpokládají, že peptid Tsall₅₂₋₇₅ lze použít jako marker expozice pouze u zvířat žijících v oblastech s nízkou expozicí glosin a není vhodný pro měření intenzity expozice (Somda et al. 2016).

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Slinné žlázy flebotomů druhu *P. orientalis* a jejich pitvy

Jako standard, se kterým byly srovnávány testované antigeny (rekombinantní proteiny a peptidy), byl použit SGH druhu *P. orientalis*. Kolonie tohoto druhu pochází z lokality Melka Werer na severozápadu Etiopie a je od roku 2008 držena v laboratorních podmínkách katedry Parazitologie, PřF UK. Péče o ni je obstarávána dle instrukcí uvedených v publikaci Volf a Volfová (2011). Pro pitvu slinných žláz se používaly samice flebotomů staré 3–5 dní. Po znehybnění na ledu a odtržení nohou byly pitvány na podložním sklíčku v kapce Tris-NaCl pufru. Pod binokulární lupou jim byla pomocí pitevních nástrojů odtržena hlava s párem slinných žláz. Aby došlo k co největšímu očištění žláz od tekutin uvolněných z roztrženého těla, byla hlava se žlázami převedena do nové kapky, v níž byly žlázy odděleny od hlavy a přeneseny do mikrozkuhavky s připraveným 10x zředěným Tris-NaCl pufrem (standardní poměr 1 žláza / 1 μ l pufru). Žlázy byly nadále uchovávány při teplotě -20 °C.

3.2 Použitá séra

K testování rekombinantních proteinů a peptidů jako možných antigenů byla užitá séra domácích zvířat z lokalit Addis Zemen, Sheraro a Humera ze severu a severozápadu Etiopie. Dané lokality se překrývají s areálem výskytu *P. orientalis* (Gebresilassie et al., 2015). Pomocí ELISA testů s SGH jako antigenem bylo zjištěno, že významné množství sér obsahuje protilátky proti slinným proteinům tohoto druhu flebotoma (Košťálová (2012)). Proto byla tato séra vyhodnocena jako vhodná také k detekci protilátek pomocí rekombinantních proteinů a peptidů. Celkem bylo použito 36 psích, 179 ovčích, 34 kravských a 233 kozích sér. Odběr a jejich zpracování je popsáno v publikaci Rohoušová et al. (2015). Jako negativní kontroly sloužila séra zvířat z České republiky (Fakulta veterinárního lékařství v Brně – 20 ovčích, 2 kozí séra; Státní veterinární ústav v Praze – 10 ovčích, 13 kozích sér) a laboratorních chovů v Německu (Bayer Animal Health, 14 psích sér). Myší séra (14 pozitivních, 9 negativních) byla získána z laboratorních chovů katedry Parazitologie, PřF UK. Každá z pozitivních myší byla alespoň 11x poštipaná více než sto samicemi *P. orientalis*.

3.3 Identifikace antigenních slinných proteinů *P. orientalis*

Slinné proteiny *P. orientalis* byly separovány na SDS-PAGE elektroforéze a poté identifikovány pomocí hmotnostní spectrometrie v laboratoři OMICS Proteomika (Biocev) nebo byla pomocí imunoblotu s psími séry testována jejich antigenicita, viz dále.

3.3.1 SDS-PAGE elektroforéza

Byla použita vertikální aparatura Mini-Protean 3 (Bio-Rad) a separace probíhala na 12% gelu za neredukujících podmínek. Homogenát slinných žláz *P. orientalis* byl v poměru 2:1 smíchán s neredukujícím vzorkovým pufrem, 3 min povařen a nanesen v objemech po 60 μ l do tří jamek pětijamkového hřebenu. Do čtvrté jamky bylo nanášeno 12 μ l standardu (BenchMark Protein Ladder, Invitrogen). Elektroforéza probíhala asi 45 min při limitním napětí 200 V.

3.3.2 Imunoblot s psími séry

Rozdělené proteiny byly následně přebloťovány na nitrocelulózovou membránu a jejich přítomnost potvrzena reverzibilním barvením Ponceau červení. Poté byla membrána rozřezána na proužky, které se nejprve inkubovaly v blokovacím médiu (5% odtučněné mléko ředěné v Tris-Tween) přes noc ve 4 °C. Poté byly proužky 3 x 5 min promyty v Tris-Tween a inkubovány 1 hod se směsným vzorkem pěti psích sér ředěných 1 : 50 v Tris-Tween. Dva ze vzorků obsahovaly séra etiopských psů exponovaných *P. orientalis*, zatímco třetí vzorek byl tvořen kontrolními séry psů z Německa. Po opětovném promytí (3x5 min v Tris-Tween) následovala 1 hodinová inkubace s peroxidázou s navázanou sekundární protilátkou ředěnou 1 : 3000 v Tris-Tween. Po skončení inkubace byly proužky opět promyty (2x5 min v Tris-Tween a 1 x 5 min v Tris-NaCl pufre). K vizualizaci antigenních proteinů byl použit roztok s Tris-NaCl s diaminobenzidinem a peroxidem vodíku. Vzniklá reakce byla asi po 10 min inkubace ve tmě zastavena promytím destilovanou vodou.

3.4 Rekombinantní proteiny

Celkem bylo testováno 5 rekombinantních proteinů: D7-related protein rPorSP67, apyráza rPorSP15, antigen 5-related protein rPorSP76, yellow-related protein rPorSP24 a ParSP25-like protein rPorSP65. Všechny tyto proteiny byly v rámci dlouhodobého

výzkumu v naší laboratoři identifikovány jako antigeny (pomocí imunoblotu se slinami *P. orientalis*, cDNA knihovny a proteomu) a exprimovány zaklonované v pET-42 plazmidu v expresním systému *Escherichia coli* (*E. coli* BL21 (DE3) gold (Agilent)).

3.4.1 Exprese rekombinantních proteinů z bakteriálního systému *E. coli*

Bakterie obsahující plazmidy s daným rekombinantním proteinem byly uchovávány při teplotě -80 °C. Pomocí 100 µl pipety bylo hrotem špičky odebráno přibližně 10–20 µl zmražených bakterií, které byly přeneseny do zkumavky s 10 ml tekutého LB média. K nim bylo přidáno 10 µl širokospektrálního antibiotika kanamycinu, jež zabránilo růstu cizím bakteriálním kmenům v médiu. Tato směs se inkubovala přes noc v 37 °C za trvalého třepání. Druhého dne byla směs ze zkumavek s bakteriemi přenesena do Erlenmayerových baněk s 200 ml LB média. Inkubace pokračovala za stejných podmínek do doby, než optická denzita narostlých bakterií dosáhla hodnoty 0,6–0,8. Poté byla přidáním isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosidu (IPTG) indukována exprese proteinů. Po 4 hodinách inkubace bylo médium s namnoženými bakteriemi centrifugováno (15 min, 4500 RPM). Pro finální přečištění byl pelet resuspendován v 5 ml 10 x zředěného Tris/NaCl pufru a za stejných podmínek byly zkumavky stočeny ještě jednou. Vzniklý pelet byl uložen v -20 °C. Po rozmrazení bylo do peletu přidáno 5 ml pufru B a vzniklá směs byla pomocí pipety resuspendována. Buněčná stěna bakterií byla na ledu rozrušena sonikací po dobu 3 min, lyzát byl centrifugován 35 min (40 tis. RPM; 4 °C) a poté byl odebrán supernatant s exprimovanými proteiny.

3.4.2 Purifikace rekombinantních proteinů

Purifikace rekombinantních proteinů značených His-tag probíhala na kolonách za denaturujících podmínek v prostředí 8M močoviny. Kolony se uchovávaly s malým množstvím 20% ethanolu v lednici ve 4 °C. Před použitím byl ethanol vypuštěn a kolona několikrát promyta destilovanou vodou. Poté byl na kolonu převeden supernatant obsahující bakteriální proteiny společně s Ni-NTA agarózou, která má na sobě navázanu kyselinu nitrilotrioctovou s iontem niklu. Nikl disponuje dvěma volnými vazebnými elektrony, jimiž reaguje s polyhistidinovou značkou (His-tag), jež je součástí rekombinantních proteinů. Zatímco balastní proteiny byly promyty elučními pufrů s postupně se snižujícím pH (viz. Tab. 1), tagované rekombinantní proteiny interagovaly s niklovým filmem na koloně a k jejich odmytí (zrušení vazby His-Ni)

došlo až při použití elučního pufru s nejnižším použitým pH = 4,5 (výjimečně 5,9). Systém promývání a jímání frakcí je znázorněn v Tab. 1.

Tabulka 1: **Postup jímání frakcí při purifikaci rekombinantních proteinů**

Pufr B pH = 8,0	1 jímaná frakce (1ml)
Pufr C pH = 6,3	2 jímané frakce (2 x 1 ml)
Pufr D pH = 5,9	4 jímané frakce (4 x 0,5 ml)
Pufr E pH = 4,5	4 jímané frakce (4 x 0,5 ml)

3.4.3 SDS-PAGE elektroforéza a imunoblot s anti-polyHis protilátkou

Pro potvrzení, že se daný rekombinantní protein nachází v očekávané frakci, byla využita vertikální SDS-PAGE elektroforéza a imunoblot. Vzorky z každé jímané frakce byly naředěny v poměru 4 : 1 s neredukujícím vzorkovým pufrem a povařeny 3 min. Celkem 11 vzorků z každého rekombinantního proteinu bylo nanášeno do 12% 15-ti jamkového gelu v množství 15 μ l na jamku. Pro správnou identifikaci vzniklých pruhů byl použit standard v množství 7 μ l na jamku. Dělení proteinů probíhalo v neredukujícím prostředí při limitním napětí 200 V v Mini-Protean 3 aparatuře (Bio-Rad). Rozdělené proteiny byly přebloťovány na nitrocelulózovou membránu 6 x 8 cm a obarveny Ponceau červení. Po odmytí Ponceau červeně byla nitrocelulózová membrána přenesena do nádobek s 5% odtučněným mlékem ředěným v Tris-Tween a inkubována přes noc ve 4 °C. Druhého dne byla promyta promývacím roztokem (Tris-Tween, 3 x 5 min) a přenesena do fólie zatavené ze tří stran. Zbývajícím otvorem byly přidány 3 ml anti-polyHis protilátky ředěné do Tris-Tween v poměru 1 : 1000. Poté byla zatavena i tato strana a po dobu 1 hod se membrána s protilátkou inkubovala na otáčivé třepačce. Po vyjmutí z fólie byla membrána opět promyta (2 x 5 min v Tris-Tween a 1 x 5 min v Tris-NaCl) a inkubována se substrátovým roztokem. K zastavení reakce byla použita destilovaná voda.

3.4.4 Měření koncentrace rekombinantních proteinů

Koncentrace rekombinantních proteinů byla měřena metodou Lowry. K vytvoření standardní křivky byla použita ředící řada bovinního sérového albuminu (BSA); bylo využito dvou variant měření lišících se jeho koncentrací. V nízko koncentrační variantě byla vytvořena ředící řada s rozptylem koncentrací 9,38–300 μ g/ml. Vysoko koncentrační varianta detekovala koncentraci v rozmezí 300–1500 μ g/ml. V obou variantách byly přítomny kontroly neobsahující protein, tzv. blank. Všechny standardy

byly ředěny v pufru, do kterého byly eluovány dané frakce rekombinantních proteinů (pufr D nebo pufr E). Jelikož oficiální protokol metody Lowry nedovoluje přítomnost 8M močoviny v pufru, bylo potřeba eluční pufr před použitím 4x naředit, aby molarita močoviny klesla na 2M. Ze stejného důvodu byly v destilované vodě 4x naředěny i testované vzorky rekombinantních proteinů. Standardy ředící řady i rekombinantní proteiny byly v kvadrupletech naneseny do jamek mikrotitrační destičky Costar 9017 (Sigma). Po přidání činidel A a B vznikla barevná reakce, která byla pomocí fluorometru (Tecan Infinite M200) kvantifikována při 750 nm. Ředící řada BSA byla vynesena do křivky lineární regrese, na základě jejíž rovnice byla spočtena hodnota koncentrace jednotlivých vzorků rekombinantních proteinů. Z důvodu 4x ředění proteinů bylo potřeba zjištěnou koncentraci 4x vynásobit. Změřené frakce rekombinantních proteinů byly dále uchovávány v -20 °C.

3.4.5 Zhodnocení antigenicity rekombinantních proteinů s částí sér všech druhů testovaných zvířat

Prostřednictvím metody Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) byly na malém vzorku sér z každého druhu zvířete (psi, ovce, kozy, krávy, myši) testovány antigenní vlastnosti všech pěti rekombinantních proteinů (rPorSP67, rPorSP15, rPorSP76, rPorSP24 a rPorSP65). Jako zlatý standard, se kterým byly výsledky srovnávány, sloužil SGH *P. orientalis*. Samotným testům předcházela řada optimalizací metody, z čehož bylo dosaženo výsledného postupu.

Slinné žlázy byly zhomogenizovány čtyřnásobným zmrazením a rozmrazením v tekutém dusíku a naředěny v koncentraci 1/5 žlázy (cca 40 ng proteinů) na 100 µl navazovacího roztoku. Rekombinantní proteiny byly naředěny v koncentraci 0,5 µg proteinu na 100 µl navazovacího roztoku a inkubovány v mikrotitrační destičce Immulon 4 HBX (TermoFisher Scientific) přes noc ve 4 °C. Po dvojnásobném promytí promývacím pufrům (PBS/Tween) byly jamky inkubovány hodinu ve 37 °C s 6% blokovacím médiem ředěným v PBS/Tween (blokovací médium se lišilo v závislosti na druhu zvířete, viz Tab. 2). Po trojnásobném promytí byla v duplikátech nanesena zvířecí séra ředěná do 2% blokovacího média. Séra byla inkubována 60 min ve 37 °C, koncentrace sér se opět lišila v závislosti na konkrétním zvířecím druhu (viz Tab. 2). Následovalo 5x promytí promývacím roztokem, inkubace s navázanou sekundární protilátkou s peroxidázou (60 min ve 37 °C) a 6x promytí. Barevná reakce byla vyvolána přidáním substrátového roztoku s ortho-fenyldiaminem a peroxidem vodíku.

Tabulka 2: Použitá séra, blokovací média, konjugáty a jejich ředění v ELISA testech s SGH a rekombinantními proteiny

Zvíře	Počet exponovaných zvířat v předpokusech/finálních pokusech	Počet neexponovaných (kontrolních) zvířat v předpokusech/finálních pokusech	Blokovací médium	Ředění sér		Konjugát	Ředění konjugátu
Ovce	35/179	8/30	6% mléko (BioRad)	2% mléko	1:50	Rabbit anti-Sheep IgG (Bio-Rad)	1:10 000
Kozy	10/233	3/15	6% králičí sérum (Vector)	2% králičí sérum	1:50	Rabbit anti-Goat IgG (Bio-Rad)	1:5000
Krávy	34/nd	8/nd	6% slepičí sérum (Vector)	2% slepičí sérum	1:200	Goat anti-Bovine IgG (Bio-Rad)	1:10 000
Psi	10/36	3/14	6% mléko (BioRad)	2% mléko	1:200	Sheep anti-Dog IgG (Bio-Rad)	1:3000
Myši	10/nd	3/nd	6% mléko (BioRad)	2% mléko	1:100	Goat anti-Mice IgG (Bio-Rad)	1:750

Pozn.: U krav a myši nebyly finální pokusy dělány (nd), důvody jsou uvedeny v textu.

Reakce probíhala za tmy 5–7 min v pokojové teplotě a byla zastavena 10% kyselinou sírovou. Barevná změna byla kvantifikována jako hodnota optických denzit měřením absorbance jednotlivých vzorků pomocí fluorometru (Tecan Infinite M200) při 492 nm. Všechny roztoky byly do jamek nanášeny v objemu 100 μ l na jamku.

Výsledky byly vyhodnoceny statisticky. U každé kombinace antigenů s jednotlivými druhy zvířat byl vypočten průměr OD negativních kontrol (NK) a standardní odchylka mezi vzorky NK. Z těchto hodnot pak mohla být určena hodnota cut-off, rozdělující jednotlivá séra na pozitivní a negativní skupinu sér. Výpočet hodnoty cut-off je dán vzorcem:

$$\text{cut - off} = \text{průměr OD NK} + 3 \times \text{směrodatná odchylka NK}$$

Všechny testované vzorky s hodnotou vyšší než hodnota cut-off byly považovány za pozitivní.

Dále byla zjištěna korelace mezi vzorky jednotlivých druhů zvířat s použitím jednotlivých rekombinantních proteinů a homogenátu slinných žláz. Tuto korelaci popisuje korelační koeficient (Kf), jež nabývá hodnot 0–1, přičemž hodnota 1 odpovídá 100% korelaci. K výpočtu korelačního koeficientu a tvorbě grafů byl užit neparametrický Spearman-Rank Correlation Matrix test a Spearman test ve statistickém programu GraphPad Prism version 6.

Zásadní informací, která rozhodovala o tom, zda budou jednotlivé rekombinantními proteiny použity do dalších pokusů se všemi dostupnými séry, bylo dosažení minimální hodnoty Kf alespoň 0,7 a hodnoty cut-off < 1.

3.4.6 ELISA testy se všemi dostupnými séry vybraných zvířat

Rekombinantní proteiny, které splnily výše zmíněná kritéria, byly použity v ELISA testech se všemi dostupnými séry daného druhu zvířete. Myší séra nebyla dále použita v testech s žádným rekombinantním proteinem z důvodu malého objemu vzorků, kterými disponujeme. Metodika těchto ELISA testů byla totožná s metodikou popsanou v kapitole 3.4.5. Počty testovaných zvířat, použitá blokovácí média, konjugáty a jejich ředění jsou uvedeny v Tab. 2.

Podobně jako v předpokusech s malým množstvím sér, byla ze získaných hodnot optických denzit u testovaných zvířat spočítána hodnota cut-off a korelační koeficient. Hodnota cut-off byla dále použita k výpočtu dalších statistických veličin (senzitivity, specificity, pozitivní prediktivní hodnoty a negativní prediktivní hodnoty), jež blíže popisují přesnost testu a možné použití jednotlivých rekombinantních proteinů v praxi.

Stejně jako při výpočtu korelačního koeficientu byly i k výpočtu těchto veličin použity vzorky testované s SGH jako antigenem jako zlatý standard.

Senzitivita testu značí schopnost testu správně identifikovat séra, jež jsou podle SGH označena jako pozitivní. Nabývá hodnot 0–1, přičemž hodnota 1 značí 100% senzitivitu testu. Je dána výpočtem:

$$\text{senzitivita} = \frac{\text{počet skutečně pozitivních}}{\text{počet skutečně pozitivních} + \text{počet falešně negativních}}$$

Specificita testu naopak vyjadřuje schopnost označit séra, jež byla dle SGH označena jako negativní za negativní i s použitím jiného antigenu. Taktéž nabývá hodnot 0–1. Lze ji vypočítat takto:

$$\text{specificita} = \frac{\text{počet skutečně negativních}}{\text{počet skutečně negativních} + \text{počet falešně pozitivních}}$$

Pozitivní prediktivní hodnota (PPV) je pravděpodobnost, že testovaná séra jsou skutečně pozitivní, pokud tak bylo určeno testovaným antigenem.

$$\text{PPV} = \frac{\text{počet skutečně pozitivních}}{\text{počet skutečně pozitivních} + \text{počet falešně pozitivních}}$$

Negativní prediktivní hodnota nám naopak určuje pravděpodobnost, že testovaná séra určena za negativní jsou opravdu negativní.

$$\text{NPV} = \frac{\text{počet skutečně negativních}}{\text{počet skutečně negativních} + \text{počet falešně negativních}}$$

3.4.7 Testování zkřížených reakcí rekombinantních proteinů *P. orientalis*

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda jsou testované rekombinantní proteiny natolik specifické, že vážou pouze protilátky vytvořené proti slinným proteinům *P. orientalis*. Pro tento pokus byla použita séra myši opakovaně poštípaných *P. orientalis*, *P. papatasi* a *Sergentomyia schwetzi* (pro každý druh flebotoma vždy 4 myši poštípané). Čtyři naivní myši sloužily jako negativní kontroly. Uvedené druhy flebotomů byly použity z důvodu sympatrického výskytu s *P. orientalis* v některých lokalitách na území Etiopie (Gebresilassie et al. 2015). Prostřednictvím ELISA testu byly testovány se třemi rekombinantními proteiny rPorSP67, rPorSP76 a rPorSP24, které byly vybrány na základě signifikantní korelace se slinnými žlázami v předchozích ELISA testech s myšimi séry. Zároveň byl testován i homogenát slinných žláz.

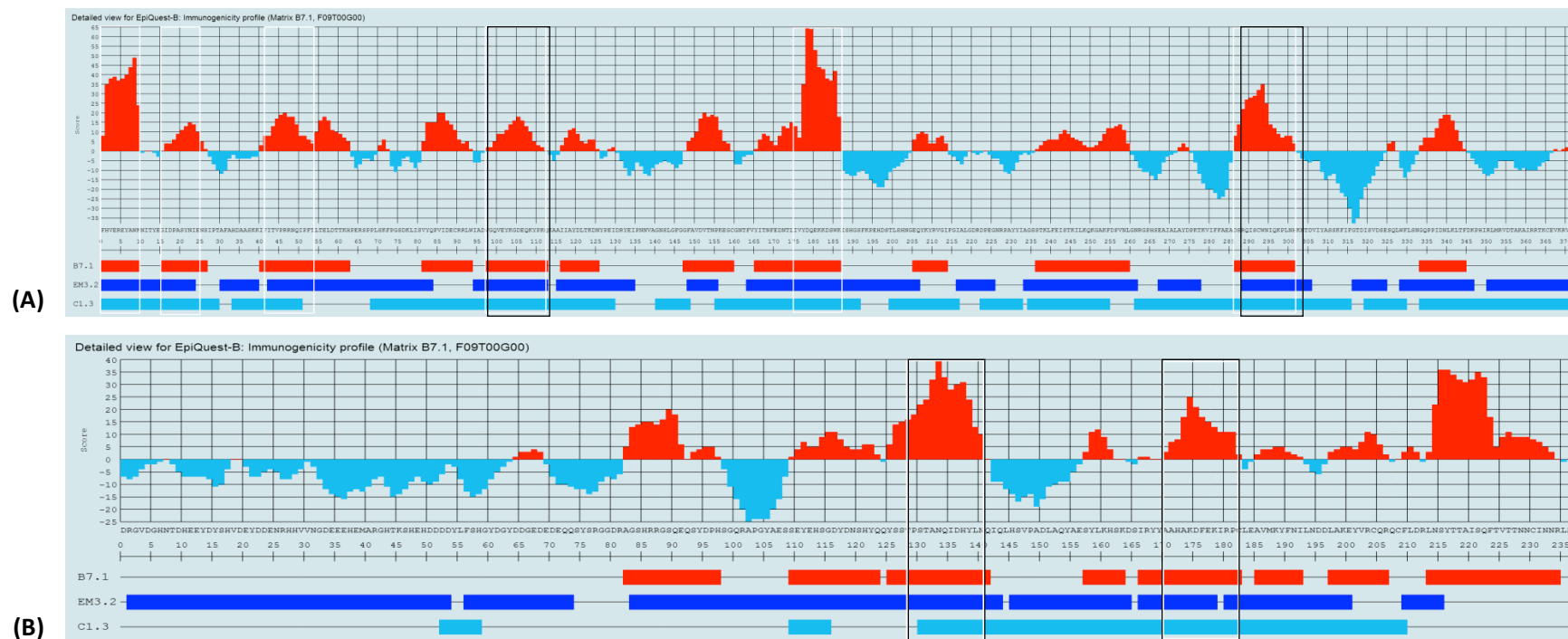
3.5 Peptidy

3.5.1 Navržení peptidů

Druhým typem antigenu, jenž byl testován v rámci mé diplomové práce jsou peptidy (lineární B-buněčné epitopy). Na základě předchozích ELISA testů s rekombinantními proteiny se séry různých etiopských zvířat byly vybrány dva slinné proteiny (PorSP24 a PorSP65), jež dosahovaly nejvyšších korelací se slinnými žlázami, a z těchto proteinů byly pomocí komerčního programu Epiquest B z Aptum Biologics Ltd (Southampton, Hampshire, UK) navrženy 4 peptidy (PorSP24 Peptid 1, PorSP24 Peptid 2, PorSP65 Peptid 1 a PorSP65 Peptid 2).

Epiquest B užívá software, který na základě aminokyselinové sekvence vybere potencionálně imunodominantní lineární peptidy a určí jejich index antigenicity (AGI). Index antigenicity je vypočítán na základě tří různých algoritmů určujících imunogenicitu epitopu, jeho přístupnost protilátkám v přirozeně sbaleném proteinu a jedinečnost v rámci molekuly proteinu. S rostoucí hodnotou AGI se zvyšuje imunodominance daného epitopu a pravděpodobnost vzniku reakce s protilátkami v séru (obr. 2).

Takto vygenerované sekvence (Tab. 3) byly poslány do servisní laboratoře Genosphere Biotechnologies (Francie), kde byly peptidy syntetizovány a pro použití v ELISA testech doplněny o dvě molekuly polyethylenglykolu a 1 molekulu biotinu (obr. 3). Biotin umožňuje vazbu peptidu na ELISA destičku s navázaným avidinem prostřednictvím avidin-biotin vazby. Polyethylenglykol plní funkci spaceru, jež oddálí sekvenci peptidu od povrchu destičky, a tím usnadní jeho přístup k protilátkám. Peptidy se po naředění sterilním PBS pufrem na koncentraci 1 mg/ml uchovávaly při teplotě -80 °C.

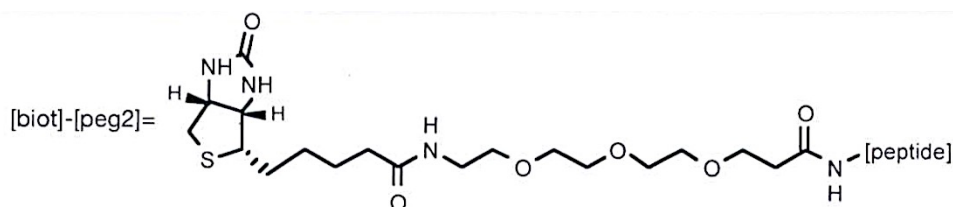


Obr. 2: Vyhodnocení antigenicity rekombinantních proteinů PorSP24 a PorSP65 programem Epiquest B

Graf v horní části obrázku zobrazuje profil imunogenicity proteinu. Sekvence zbarvené červeně jsou potenciálně imunodominantní. Světle modře zbarvené úseky znázorňují sekvence, jež se s velkou pravděpodobností na vazbě protilátek nepodílí. Ve spodní části se vyskytuje srovnání tří různých vlastností proteinů: imunogenicity (červeně), prostorové přístupnosti protilátkám (tmavě modře) a komplexity (jedinečnosti sekvence v rámci molekuly proteinu) (světle modře). Sekvence, jež mají vysokou hladinu imunogenicity a zároveň splňují i další zmíněná kritéria dosahují nejvyšších hodnot indexu antigenicity a byly vyhodnoceny jako B-epitopy daných proteinů.

(A) Vyhodnocení antigenicity Yellow-related protein PorSP24 programem Epiquest B. V černých rámečcích jsou zobrazeny sekvence peptidů PorSP24 Pep1 a PorSP24 Pep2

(B) Vyhodnocení antigenicity ParSP25-like proteinu PorSP65 programem Epiquest B. V černých rámečcích jsou zobrazeny sekvence peptidů PorSP65 Pep1 a PorSP65 Pep2



Obr. 3: Grafické zobrazení struktury peptidů (Informační manuál o dodaných peptidech; Genosphere biotechnologies)

Tabulka 3: Struktura peptidů

Název peptidu	'N'	Sekvence peptidu	'C'
PorSP24 Peptid 1	[biot]-[peg2]	GVGQVEYKGDDEQKYPKGC	COOH
PorSP24 Peptid 2	[biot]-[peg2]	GDSRQISCWNIQKPLNHGC	COOH
PorSP65 Peptid1	[biot]-[peg2]	GTPSTANQIDHYLNQIGC	COOH
PorSP65 Peptid 2	[biot]-[peg2]	DRGVDGHNTDHEEYDYSC	COOH

Riziko zkřížených reakcí s druhy flebotomů sympatricky žijících s *P. orientalis*, bylo vyvráceno porovnáním sekvencí všech výše zmíněných peptidů s non-redundant GenBank CDS databází užitím programu BLASTP 2.7.1 (Altschul et al. 1997). Pouze PorSP24 Peptid 2 byl z 86 % identický s proteinem SP44 *P. papatasi* (E value = 0,002).

3.5.2 Zhodnocení antigenicity peptidů s částí sér testovaných zvířat

Podobně jako v experimentech s rekombinantními proteiny, byly peptidy zpočátku testovány v ELISA testech s malým množstvím sér psů, ovcí, krav a koz z Etiopie a myši. Ve všech pokusech byl použit SGH jako kontrola a zlatý standard pro výpočty statistických veličin. V porovnání s ELISA testy s rekombinantními proteiny a SGH bylo třeba upravit některé podmínky testu.

Na mikrotitrační destičku byl navázán avidin v koncentraci 5 µg proteinu na 100 µl navazovacího roztoku, poté se inkubovala přes noc ve 4 °C. Po trojnásobném promytí v PBS/Tween bylo do každé z jamek nanášeno 200 µl blokovacího média ředěného v PBS a destička se nechala inkubovat v 37 °C po dobu 2 hod. Následovalo dvojí promytí v PBS/Tween a nanášení peptidů, ředěných do 2% blokovacího média v PBS/Tw v koncentraci 50 µg/ml. Destička s peptidy se 1 hod inkubovala ve 37 °C a poté byla 3x promyta. Zbytek protokolu se shoduje s podkapitolou 3.4.5. Použitá blokovací média, konjugáty a jejich ředění jsou uvedena v Tab. 4.

Tabulka 4: Použitá séra, blokovací média, konjugáty a jejich ředění v ELISA testech s peptidy

Zvíře	Počet exponovaných zvířat v předpokusech/finálních pokusech	Počet neexponovaných (kontrolních) zvířat v předpokusech/finálních pokusech	Blokovací médium	Ředění sér		Konjugát	Ředění konjugátu
Ovce	15/40	5/10	6% mléko (BioRad)	2% mléko	1 : 50	Rabbit anti-Goat IgG (Bio-Rad)	1 : 5000
Kozy	14/94	6/20	6% králičí sérum (Vector)	2% králičí sérum	1 : 100	Rabbit anti-Goat IgG (Bio-Rad)	1 : 7000
Krávy	14/nd	6/nd	6% slepičí sérum (Vector)	2% slepičí sérum	1 : 200	Goat anti-Bovine IgG (Bio-Rad)	1 : 10 000
Psi	15/30	5/10	6% mléko (BioRad)	2% mléko	1 : 200	Sheep anti-Dog IgG (Bio-Rad)	1 : 5000
Myši	14/nd	9/nd	6% mléko (BioRad)	2% mléko	1 : 50	Goat anti-Mice IgG (Bio-Rad)	1 : 750

Pozn.: U krav a myši nebyly finální pokusy dělány (nd), důvody jsou uvedeny v textu.

Podobně jako v pokusech s rekombinantními proteiny byla u získaných hodnot optických denzit vypočtena hodnota cut-off a korelační koeficient s SGH. Peptidy, jejichž Kf byl vyšší než 0,7 a maximální hodnota cut-off nižší než 1, byly zařazeny do dalších pokusů s větším množstvím sér.

3.5.3 ELISA testy s větším množstvím sér vybraných druhů zvířat

Reakci peptidů bylo třeba ověřit na větším množství sér. Pro každý peptid a zvířecí druh byly spočítány stejné statistické veličiny jako ve finálních ELISA testech s rekombinantními proteiny (cut-off, Kf, senzitivita, specificita, PPV a NPV). Jejich bližší popis je zmíněn v podkapitole 3.4.6. Navíc byly v těchto testech počítány korelace mezi peptidy a rekombinantními proteiny, z jejichž sekvence byly peptidy navrženy.

3.5.4 Testování zkřížených reakcí peptidů *P. orientalis*

Metodika tohoto experimentu je totožná s metodikou ELISA testů s použitím peptidů jako antigenů uvedenou v podkapitole 3.5.2. V těchto testech byla opět použita séra myši opakovaně poštípaných *P. orientalis*, *P. papatasi* a *Sergentomyia schwetzi*. Počet sér byl navýšen na 6 sér u poštípaných a 6 u kontrolních myši. Pro tento experiment byly použity všechny čtyři peptidy.

3.6 Kvantifikace specifických IgG u myši poštípaných různým počtem flebotomů

Pro objektivní zhodnocení, který z antigenů nejlépe detekuje dynamiku vzrůstu protilátek vytvořených v pobodaném zvířeti v závislosti na počtu flebotomů na něm sátech, byl navržen pokus založený na experimentálním sání tří skupin myši (samice BALB/c), přičemž každá skupina byla opakovaně sáta jiným počtem (25, 50, 100) samic flebotomů *P. orientalis* (podrobněji viz níže). Poté byly tyto myši vykřveny a jejich sérum testováno na protilátky proti SGH, čtyřem rekombinantním proteinům (D7-rp, antigen5-rp, Yrp a ParSP25-like protein) a dvěma peptidům (PorSP24 Pep1, PorSP65 Pep1). Apyráza byla vyloučena z tohoto pokusu, jelikož v předpokusu s myšimi séry nereagovala. Reakce všech čtyř peptidů byly v předchozím pokusu s myšimi séry podobné, proto bylo k tomuto testování vybráno pouze po jednom peptidu z každého slinného proteinu.

3.6.1 Sání myší

Před začátkem vlastního experimentu byla každé z myší odebrána krev. Z nastříhnutého konce ocásku byly krví naplněny dvě heparinizované kapiláry, které byly po zatavení na jednom konci centrifugovány při 6000 otáčkách/min po dobu 5 min. Poté se kapilára nařízla pomocí diamantové tužky na rozhraní krvinek a séra, zlomila a sérum bylo pomocí gumového balónku vyfouknuto do mikrozkušavky. Séra byla poté skladována v -20 °C.

Každá myš byla uspána a umístěna do samostatné sítě s flebotomy celkem pětkrát v týdenních intervalech. Samice flebotomů, které se na zvířeti nasály, byly ihned ze sítě odebrány a pokus pro dané zvíře končil ve chvíli, kdy počet odebraných samic dovršil finální množství (25, 50, 100) v závislosti na skupině, ke které myš patřila.

Týden po posledním sání byly všechny myši vykrveny. Mikrozkušavky s odebranou krví byly uloženy na 10 min do 4 °C a poté po dobu 5 min centrifugovány při 6000 otáčkách/min. Separované krevní sérum bylo přeneseno do čistých mikrozkušavek a skladováno v -20 °C.

3.6.2 ELISA test s myšími séry

ELISA s myšími séry byla provedena dle postupů odlišných pro jednotlivé antigeny. Protokol pro SGH a rekombinantní proteiny je uveden v podkapitole 3.4.5. Protokol s použitím peptidů jako antigenů popisuje podkapitola 3.5.2.

3.7 Použitá média a roztoky

Tabulka 5: Použitá média a roztoky

Pitvy slinných žláz	zásobní Tris/NaCl pufr: 200 mM Tris (Sigma); 1500mM NaCl; pH = 7,6
Expese rekombinantních proteinů	LB médium (Sigma) kanamycin (30 mg/ml) (Thermofisher scientific) 0,1M IPTG (Sigma) zásobní roztok Tris/NaCl: 200mM Tris (Sigma); 1,5M NaCl; pH = 7,6 Pufr B: 100 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (MW = 137,99 g/mol); 10 mM Tris·Cl (MW = 121,1 g/mol); 8M močovina (MW = 60,06 g/mol); pH = 8,0

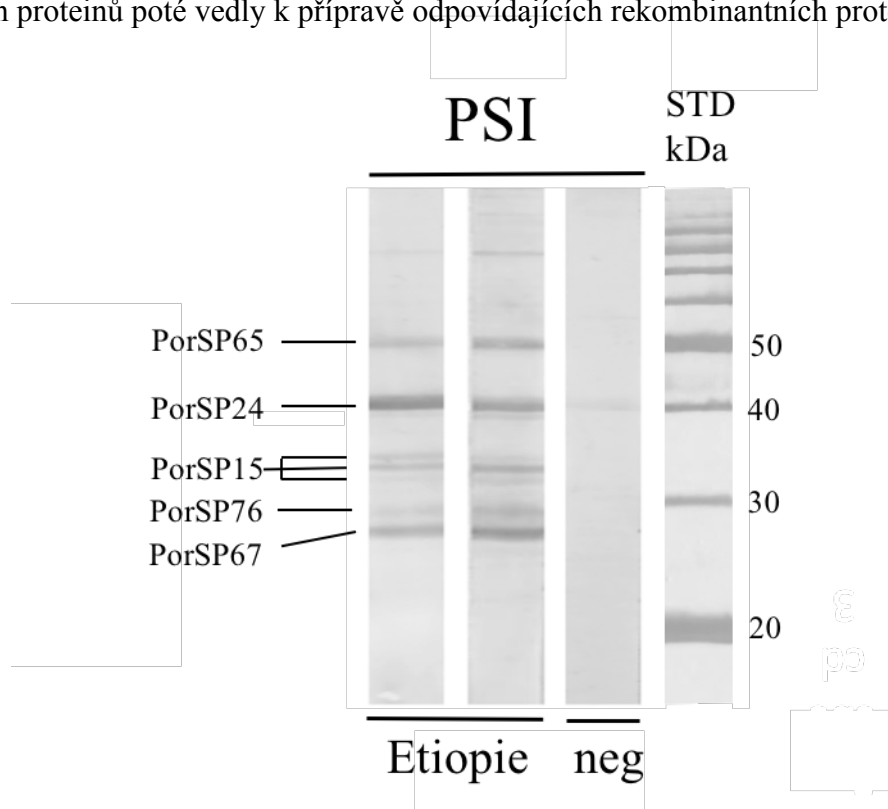
<p>Purifikace rekombinantních proteinů</p>	<p>Pufr B: 100mM NaH₂PO₄·H₂O (MW = 137,99 g/mol); 10mM Tris·Cl (MW = 121,1 g/mol); 8M močovina (MW = 60,06 g/mol); pH = 8,0 Promývací pufr (C): složení viz Pufr B; pH = 6,3 Eluční pufr (D): složení viz Pufr B; pH = 5,9 Eluční pufr (E): složení viz Pufr B; pH = 4,5 purifikační kolony (Bio-Rad) Ni-NTA agaróza (Invitrogen) dH₂O 20% ethanol</p>
<p>SDS-PAGE elektroforéza</p>	<p>neredukující vzorkový pufr: 1 MTris-HCl (pH 6,8); 50% glycerol; 10% SDS; 1% bromfenolová modř; 1,4 ml dH₂O roztok A: 40% akrylamid, bis-akrylamid (Bio-Rad) roztok B: 75 ml 2MTris-HCl (pH 8,8); 4 ml 10% SDS; 21 ml dH₂O roztok C: 50 ml 1MTris-HCl (pH 6,8); 4 ml 10% SDS; 46 ml dH₂O roztok G: 10% ammonium persulfát startovací gel (4%): 0,4 ml roztoku A; 1 ml roztoku C; 2,6 ml dH₂O; 5 µl TEMED (AppliChem); 50 µl roztoku G separační gel (12,5%): 2,5 ml roztoku A; 2 ml roztoku B; 3,5 ml dH₂O; 5 µl TEMED (AppliChem); 50 µl roztoku G SDS pufr: Tris/Glycin/SDS pufr (Bio-Rad); 25 mM Tris; 192 mM glycin; 0,1% SDS; pH 8,3 Ponceau: 0,2% Ponceau S (Sigma); 3% kyselina octová</p>
<p>Imunoblot</p>	<p>Odtučněné sušené mléko - Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad) Tris-Tween: 20mM Tris; 150mM NaCl; 0,05% Tween 20 (Serva) Tris pufr: 200mM Tris (Sigma); 1,5MNaCl; pH = 7,6 Monoklonální anti-polyhistidinová peroxidázová protilátka (Sigma) Anti-dog IgG peroxidázová protilátka (Bethyl Laboratories) Substrátový roztok: Tris pufr, DAB (3,3'-diaminobenzidin tetrachlorid-hydrát; H₂O₂ dH₂O</p>

Lowry	<p>Pufř D: 100mM NaH₂PO₄·H₂O (MW 137,99 g/mol); 10mM Tris·Cl (MW 121,1 g/mol); 8M močovina (MW 60,06 g/mol); pH = 5,9</p> <p>Pufř E: složení viz pufř D, pH = 4,5</p> <p>BSA (bovine serum albumin); (Sigma)</p> <p>dH₂O</p> <p>Činidlo A: alkalický roztok mědi a tartrátu (Bio-Rad DC™ Protein assay); vysokokontrační varianta: 25 µl na jamku nizkokontrační varianta: 10 µl na jamku</p> <p>Činidlo B: Folin–Ciocalteu činidlo (sodium 1,2-naftochinon-4-sulfonát); (Bio-Rad DC™ Protein assay); vysokokontrační varianta: 200 µl na jamku nizkokontrační varianta: 80 µl na jamku</p> <p>mikrodestička COSTAR 90.17 (Sigma)</p>
ELISA	<p>Navazovací roztok: 20mM Na₂CO₃-NaHCO₃; pH 9,0</p> <p>PBS: 150mM NaCl; 3mM KCl; 8mM Na₂HPO₄·12 H₂O; 1mM KH₂PO₄; pH = 7,2</p> <p>PBS-Tween: 10x zředený PBS; 0,05% Tween 20 (Serva); pH = 7,2</p> <p>Substrátový roztok (McIlweina fosfát-citrát): 0,11M Na₂HPO₄·12H₂O; 0,5M kyselina citrónová; pH = 5,5</p> <p>těsně před použitím přidáno 5 mg OPD (o-fenylendiamin, Sigma) a 10 µl H₂O₂ do 10 ml fosfát-citrátového pufřu</p> <p>Immulon 4HBX mikrotitrační destička (VWR, USA)</p> <p>Nanášení všech medií a roztoků na destičku: 100µl/jamku (výjimka uvedená v podkap. 3.5.2)</p>
Sání myši	<p>Anesteze: 2% xylazin (Rometar; Spofa); 10% ketamin (Narketan; Vétoquinol);</p> <p>Intraperitoneální dávkování: 150 mg/kg xylazinu + 15 mg/kg ketaminu sterilní fyziologický roztok (150 mM NaCl)</p>

4. VÝSLEDKY

4.1. Identifikace antigenů ve slinách *P. orientalis*

K určení slinných antigenů *P. orientalis* byly použity 2 směsné vzorky sér psů z Etiopie exponovaných poštipání tomuto druhu flebotoma. Protilátky ze sér exponovaných hostitelů reagovaly s 5 antigenními proteiny určenými jako apyráza PorSP15, Yellow-related protein PorSP24, ParSP25-like protein PorSP65, D7-related protein PorSP67 a antigen5-related protein PorSP76 (obr. 4). Antigenní vlastnosti zmíněných slinných proteinů poté vedly k přípravě odpovídajících rekombinantních proteinů.



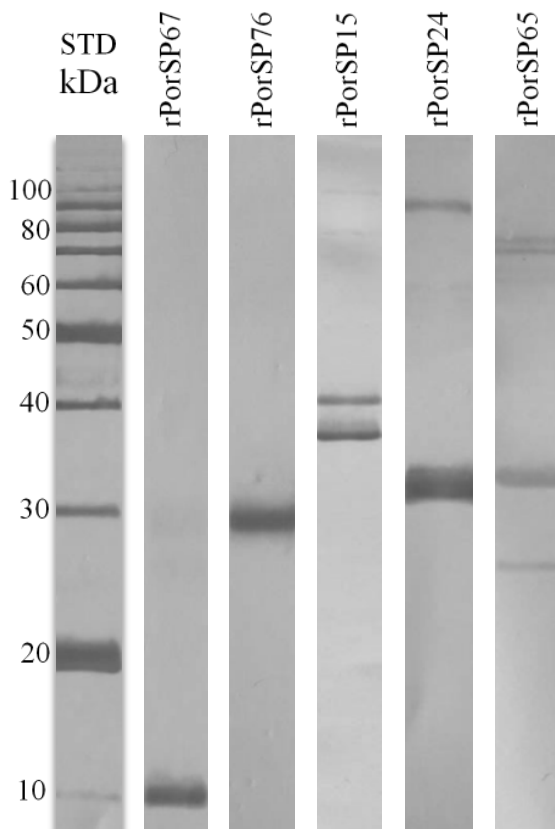
Obr. 4: Imunoblot slinných žláz *P. orientalis* s psími séry

Protilátky v sérech psů z Etiopie reagovaly s pěti antigenními proteiny slinných žláz *P. orientalis*. Séra psů použitých jako negativní kontroly s těmito proteiny nereagovala. Proteiny byly rozděleny na 12% gelu za neredukujících podmínek. STD = standard (Benchmark Protein Ladder, Invitrogen).

4.2 Exprese a ověření kvality rekombinantních proteinů

Proteiny exprimované v bakteriálním systému *E. coli* byly purifikovány za denaturujících podmínek a detekovány na imunoblotu s anti-His protilátkou (obr. 5). Žádné bakteriální proteiny či jiné kontaminace, jež ve své sekvenci His tag nemají, by na imunoblotu neměly být viditelné. Předpokládáme, že více pruhů vzniklých na

membráně u proteinů rPorSP15, rPorSP24 a rPorSP65 je způsobeno rozpadnutím či dimerizací jednotlivých proteinů na více částí. Velmi nízká hmotnost rPorSP67 (oproti předpokládané hmotnosti 27 kDa) je patrně způsobena nepřítomností glykosylací u bakteriálně exprimovaného proteinu na rozdíl od nativního proteinu, který je dle predikčních serverů N i O-glykosylován ((NetOGlyc 4.0 Steentoft et al., 2013; NetNGlyc 1.0 Gupta et al., 2004).



Obr. 5: **Rekombinantní proteiny slinných žláz *P. orientalis***

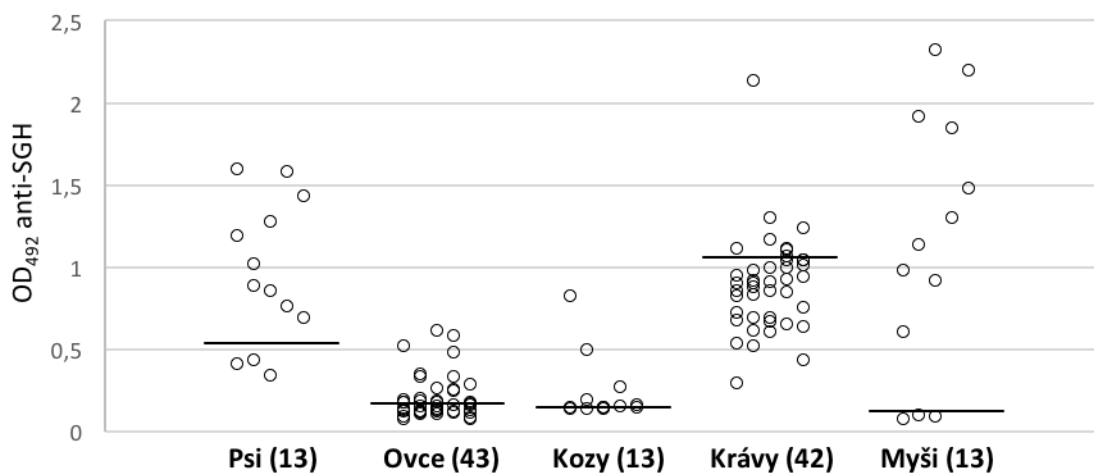
Proteiny byly analyzovány na 12% gelu za neredukujících podmínek a imunoblotu s anti-His protilátkou. STD = standard (BenchMark Protein Ladder, Invitrogen).

4.3 Stanovení IgG odpovědi zvířat proti SGH *P. orientalis*

Reakce sér domácích zvířat (psi, ovce, kozy, krávy) z Etiopie, BALB/c myši z laboratorních chovů poštípaných *P. orientalis* a příslušných negativních kontrol byla testována v ELISA testu s rekombinantními proteiny, peptidy a zároveň i slinnými žlázami *P. orientalis*. Předmětem pokusu s SGH bylo zjistit hladiny IgG protilátek proti slinám *P. orientalis* prezentované hodnotou OD v každém jednotlivém séru a následně

tyto hodnoty porovnat s hodnotami OD totožných sér s použitím rekombinantních proteinů či peptidů. Na základě tohoto porovnání byla spočítána korelace mezi IgG odpovědí daných antigenů (Kf). Zároveň jsme tímto pokusem zjistili hodnotu cut-off, jež nám rozdělila etiopská séra jednotlivých druhů zvířat na skupinu pozitivních sér, tedy těch, ve kterých se vyskytují protilátky proti slinným proteinům *P. orientalis*, a skupinu negativních sér, jež tyto specifické protilátky neobsahují. Toto rozdělení bylo považováno za zlatý standard a následně nám umožnilo spočítat hodnoty jednotlivých statistických veličin (senzitivitu, specificitu, PPV a NPV) popisujících vlastnosti testů s rekombinantními proteiny a peptidy.

Z důvodu přehledného znázornění výsledků jsou zde reakce zvířecích sér s SGH a jednotlivými proteiny uvedeny zvlášť (Graf 1). Nicméně všechny ELISA testy s SGH se u jednotlivých zvířat prováděly zároveň s testovaným rekombinantním proteinem či peptidem, aby byly výsledky lépe porovnatelné.



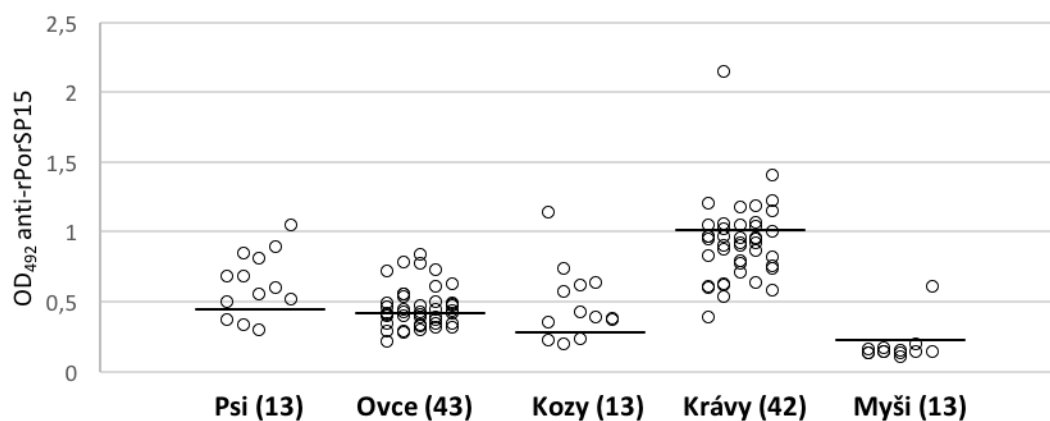
Graf 1: Detekce IgG protilátkové odpovědi zvířat z Etiopie a myši z chovu proti SGH *P. orientalis*

Počet sér je pro každý druh zvířete uveden v závorce. Jednotlivé skupiny jsou dle hodnoty cut-off rozděleny linkou na část sér s pozitivní a negativní protilátkovou odpovědí.

4.4 Apyráza rPorSP15

4.4.1 Zhodnocení antigenicity s částí sér všech testovaných druhů zvířat

Apyráza rPorSP15 byla otestována s malým množstvím sér všech druhů etiopských zvířat a myší z chovu v ELISA testu (Graf 2). Protilátky byly tímto proteinem detekované u všech testovaných druhů zvířat, nicméně hodnoty Kf = 0,7, stanovené jako mezník pro testování s větším množstvím vzorků, dosáhla pouze séra psů (Kf = 0,83), krav (0,71) a koz (0,80). Z důvodu vysoké hladiny cut-off byla z následujícího pokusu vyloučena i kravská séra.



Graf 2: Detekce IgG protilátkové odpovědi proti *P. orientalis* pomocí rPorSP15 u zvířat z Etiopie a myší z chovu

Počet sér je pro každý druh zvířete uveden v závorce. Jednotlivé skupiny jsou dle hodnoty cut-off rozděleny linkou na část sér s pozitivní a negativní protilátkovou odpovědí.

4.4.2 Finální ELISA se všemi dostupnými séry psů a koz

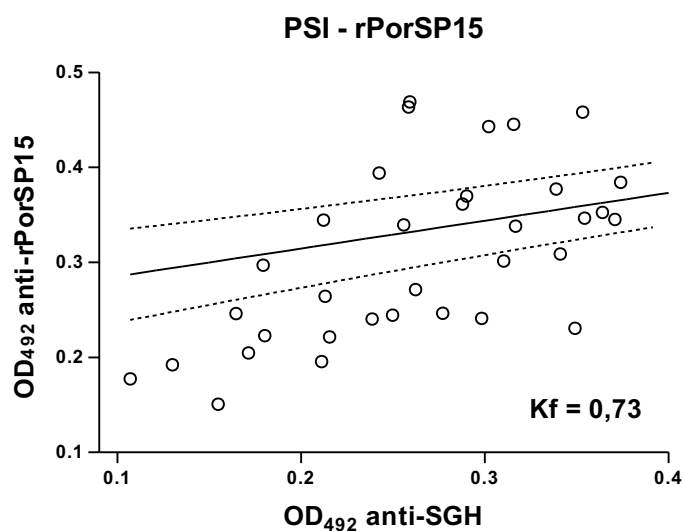
Apyráza rPorSP15 nejsilněji reagovala s psími séry. Korelační koeficient se slinami oproti předběžnému pokusu mírně klesl, nicméně dosáhl poměrně vysoké hodnoty Kf = 0,73. Střední hodnota OD testovaných vzorků byla výrazně vyšší než hladina cut-off a mezi jednotlivými séry je vidět velké rozdíly v intenzitě reakce IgG protilátek (Graf 3).

U kozích sér spadá velké množství etiopských vzorků pod hladinu cut-off. Senzitivita i Kf nedosahují vysokých hodnot, nicméně detekce IgG protilátek kozích sér apyrázou PorSP15 se zdá být velmi specifická. Podrobněji viz Tab. 6.

Tabulka 6: Statistické vyhodnocení finálních ELISA testů s rPorSP15

Statistické veličiny	Psi	Kozy
Počet sér (etiop/neg)	36/14	233/15
Cut-off	0,38	0,43
SH ± SO	0,43 ± 0,14	0,40 ± 0,10
Kf	0,73	0,51
Senzitivita	0,68	0,48
Specificita	0,59	0,84
PPV	0,65	0,70
NPV	0,63	0,67

Pozn. SH = Střední hodnota OD. SO = Standardní odchylka



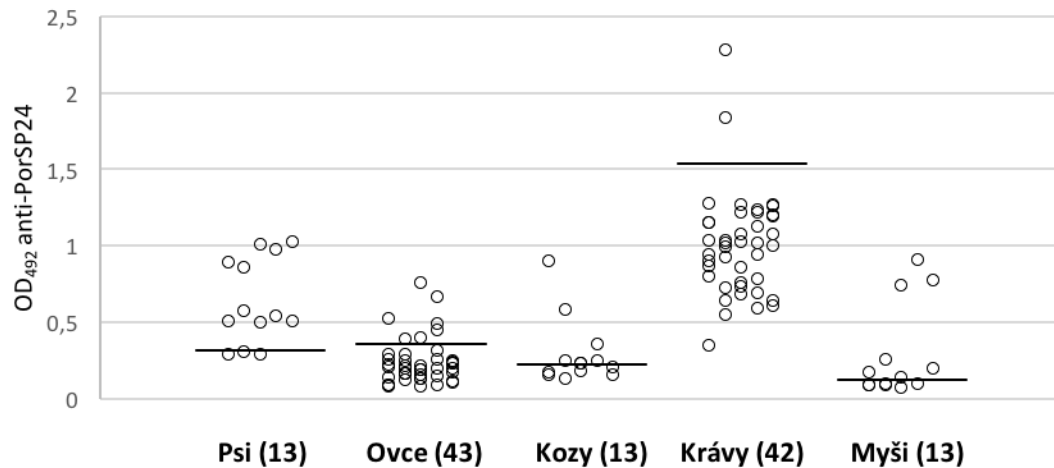
Graf 3: Korelace IgG protilátkové odpovědi psů proti SGH a apyráze rPorSP15

Korelace mezi těmito antigeny byla signifikantní (p value < 0,0001) a Kf dosahoval hodnoty 0,73.

4.5 Yellow-related protein rPorSP24

4.5.1 Zhodnocení antigenicity s částí sér všech testovaných druhů zvířat

Yellow-related protein rPorSP24 reagoval s anti-SGH protilátkami všech druhů testovaných zvířat (Graf 4), přičemž Kf popisující korelaci IgG odpovědi proti tomuto proteinu a SGH překročil hodnotu 0,7 u psů (Kf = 0,87), ovcí (Kf = 0,81), koz (Kf = 0,84) a myši (Kf = 0,72).



Graf 4: Detekce IgG protilátkové odpovědi proti *P. orientalis* pomocí rPorSP24 u zvířat z Etiopie a myši z chovu

Počet sér je pro každé zvíře uveden v závorce. Jednotlivé skupiny jsou dle hodnoty cut-off rozděleny linkou na část sér s pozitivní a negativní protilátkovou odpovědí.

4.5.2. Finální ELISA se všemi dostupnými séry psů, ovcí a koz

Yellow-related protein rPorSP24 intenzivně reagoval zejména se séry psů (Graf 5a). Rozpoznávání protilátek tímto proteinem bylo 100% senzitivní, zato méně specifické. Hladina cut-off byla srovnatelná s hladinou detekovanou SGH a střední hodnota OD testovaných sér ji výrazně překročila. Pomocí rPorSP24 lze také s velkou pravděpodobností říct, že vzorky označené tímto antigenem jako negativní, jsou skutečně negativní.

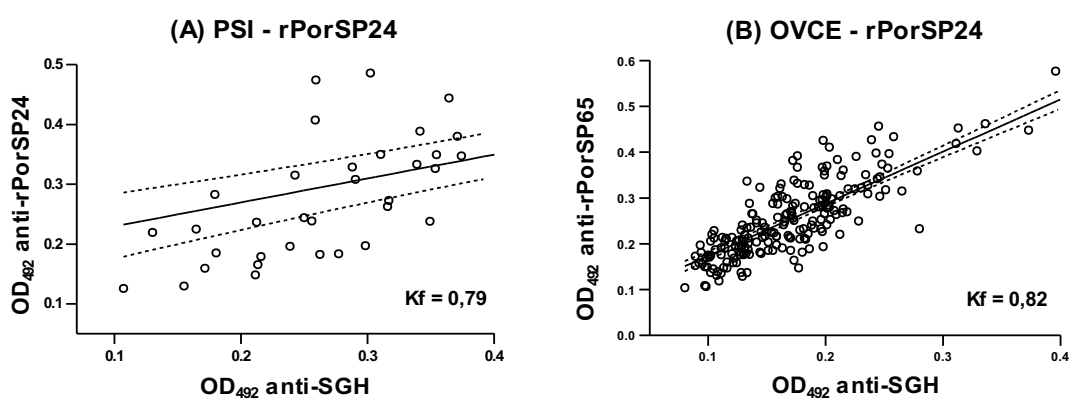
V testech s ovčími séry dosáhl rPorSP24 vysoké korelace se slinami (Graf 5b), jejíž hodnota je totožná s Kf zjištěným v předpokusu s malým množstvím sér. Oproti výsledkům s psími séry bylo v testování vzorků ovcí dosaženo vyšší specificity, nicméně hodnota popisující senzitivitu se významně snížila.

Nejnižší korelace anti-rPorSP24 protilátek s protilátkami proti SGH byla zjištěna v testu s kozími séry. Reakce těchto sér s PorSP24 je velmi specifická, nicméně hodnoty popisující další statistické veličiny jsou nízké. Podrobněji viz Tab. 7.

Tabulka 7: Statistické vyhodnocení finálních ELISA testů s rPorSP24

Statistické veličiny	Psi	Ovce	Kozy
Počet sér (etiop/neg)	36/14	179/30	233/15
Cut-off	0,31	0,27	0,26
SH ± SO	0,42 ± 0,18	0,28 ± 0,10	0,23 ± 0,09
Kf	0,79	0,82	0,52
Senzitivita	1	0,68	0,40
Specifická	0,41	0,90	0,89
PPV	0,66	0,93	0,73
NPV	1	0,58	0,67

Pozn. SH = Střední hodnota OD. SO = Standardní odchylka



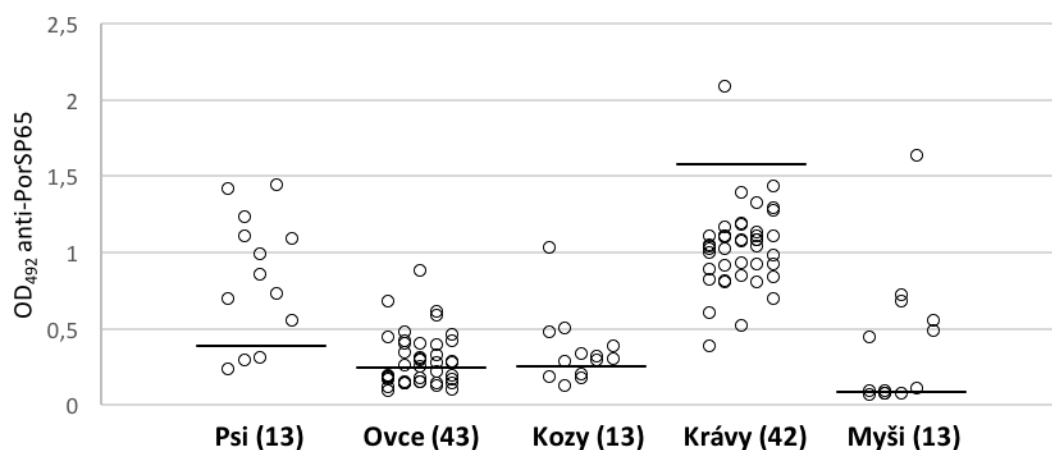
Graf 5: Korelace IgG protilátkové odpovědi proti SGH a rPorSP24 u psích (A) a ovčích (B) sér

Korelace mezi těmito antigeny je u obou zvířat signifikantní (p value < 0,0001). Kf dosahoval hodnoty 0,79 v testech s psími séry a hodnoty 0,82 v testech s ovčími séry.

4.6 ParSP25-like protein rPorSP65

4.6.1 Zhodnocení antigenicity s částí sér všech testovaných druhů zvířat

Rekombinantní PorSP65 detekoval anti-SGH protilátky všech testovaných druhů zvířat (Graf 6). Hodnoty Kf = 0,7, nutné pro zařazení zvířat do dalších pokusů, dosáhli psi (Kf = 0,85) a ovce (Kf = 0,78).



Graf 6: Detekce IgG protilátkové odpovědi proti *P. orientalis* pomocí rPorSP65 u zvířat z Etiopie a myši z chovu

Počet sér je pro každý druh uveden v závorce. Jednotlivé skupiny jsou dle hodnoty cut-off rozděleny na část sér s pozitivní a negativní protilátkovou odpovědí.

4.6.2 Finální ELISA se všemi dostupnými séry psů a ovcí

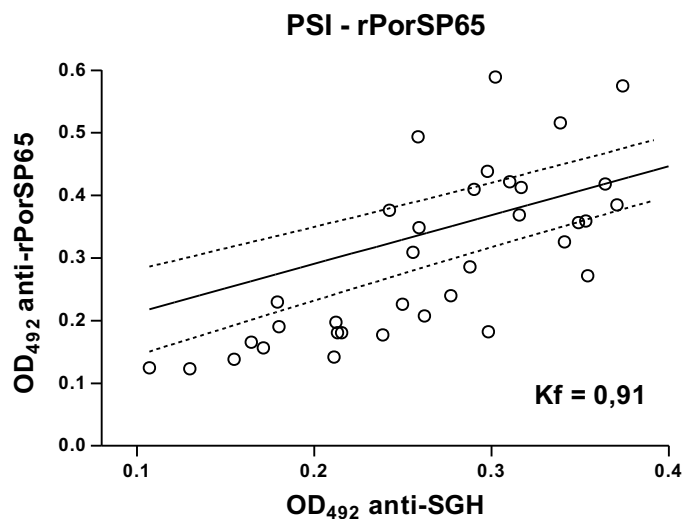
Vysoká korelace se slinami, zjištěná v předpokusu s psími séry, byla s použitím většího počtu vzorků navýšena na hodnotu Kf = 0,91 (Graf 7). Rekombinantní PorSP65 reagoval se vzorky velmi senzitivně, nicméně u něj vzniká velké riziko nespecifické vazby protilátek.

V ELISA testech s ovčími séry dosáhl rPorSP65 Kf = 0,68; hodnoty popisující senzitivitu i specificitu jsou relativně vysoké. Podrobněji viz Tab. 8.

Tabulka 8: Statistické vyhodnocení finálních ELISA testů s PorSP65

Statistické veličiny	Psi	Ovce
Počet sér (etiop/neg)	36/14	179/30
Cut-off	0,28	0,27
SH ± SO	0,57 ± 0,28	0,33 ± 0,14
Kf	0,91	0,68
Senzitivita	0,95	0,73
Specificita	0,12	0,68
PPV	0,55	0,82
NPV	0,67	0,57

Pozn. SH = Střední hodnota OD. SO = Standardní odchylka

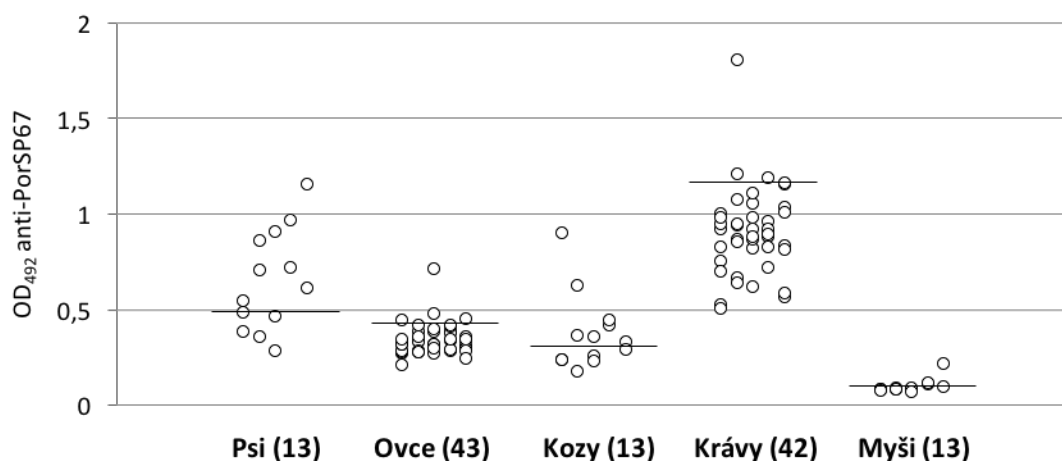


Graf 7: Korelace IgG protilátkové odpovědi proti SGH a rPorSP65 u psích sér
Korelace se slinami je signifikantní (p value < 0,0001) a Kf dosahoval hodnoty 0,91.

4.7 D7-related protein rPorSP67

4.7.1 Zhodnocení antigenicity s částí sér všech testovaných druhů zvířat

Se všemi druhy testovaných zvířat rPorSP67 reagoval (Graf 8). Dostatečně vysokého Kf dosáhl pouze v testu s kozími séry (Kf = 0,80), jež byla použita v následujícím pokusu.



Graf 8: Detekce IgG protilátkové odpovědi proti *P. orientalis* pomocí rPorSP67 u zvířat z Etiopie a myši z chovu

Počet sér je pro každý druh zvíře uveden v závorce. Jednotlivé skupiny jsou dle hodnoty cut-off rozděleny linkou na část sér s pozitivní a negativní protilátkovou odpovědí.

4.7.2 Finální ELISA se všemi dostupnými séry koz

Při použití většího množství kozích sér v ELISA testu s rPorSP67 klesla hodnota Kf = 0,8 zjištěného v předpokusu, na pouhých 0,28. Taktéž ostatní hodnoty statistických veličin byly nízké, viz Tab. 9.

Tabulka 9: Statistické vyhodnocení finálních ELISA testů s rPorSP67

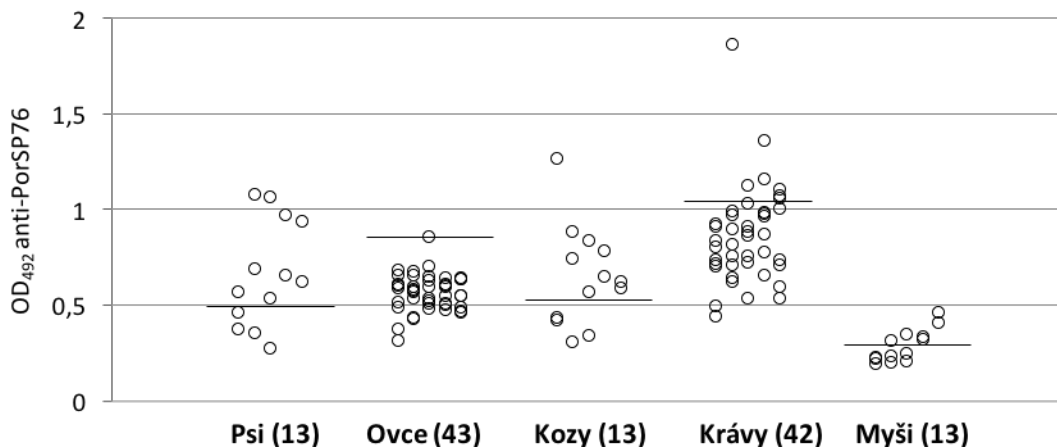
Statistické veličiny	Kozy
Počet sér (etiop/neg)	233/15
Cut-off	0,41
SH ± SO	0,43 ± 0,11
Kf	0,28
Senzitivita	0,58
Specifická	0,48
PPV	0,45
NPV	0,60

Pozn. SH = Střední hodnota OD. SO = Standardní odchylka

4.8 Antigen5-related protein rPorSP76

4.8.1 Zhodnocení antigenicity s částí sér všech testovaných druhů zvířat

Antigenicita rPorSP76 se projevila u sér všech testovaných zvířat, nicméně Kf byly s výjimkou kravských (0,82) a myších (0,76) sér u všech druhů nízké (Graf 9). Z důvodu vysoké hodnoty cut-off byla i kravská séra z dalších pokusů vyloučena.

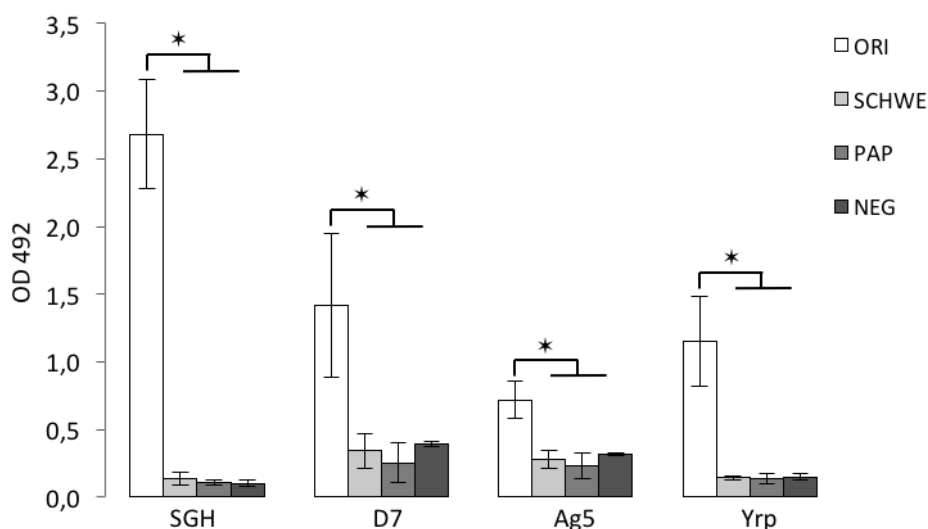


Graf 9: Detekce IgG protilátkové odpovědi proti *P. orientalis* pomocí rPorSP76 u zvířat z Etiopie a myši z chovu

Počet sér je pro každé zvíře uveden v závorce. Jednotlivé skupiny jsou dle hodnoty cut-off rozděleny linkou na část sér s pozitivní a negativní protilátkovou odpovědí.

4.9 Testování zkřížených reakcí rekombinantních proteinů *P. orientalis*

Rekombinantní proteiny rPorSP24, rPorSP67 a rPorSP76, které v předchozích pokusech s myšími séry signifikantně korelovaly s SGH, byly testovány se séry myši opakovaně poštípaných flebotomy *P. orientalis*, *P. papatasi* a *S. schwetzi*. Jak je vidět z Grafu 10, všechny proteiny specificky reagovaly pouze se séry myši poštípanými *P. orientalis*, zatímco reakce rekombinantních proteinů se séry myši exponovaných druhům *P. papatasi* a *S. schwetzi* dosahovaly stejných či dokonce nižších hodnot OD, než jsou hodnoty OD negativních kontrol.



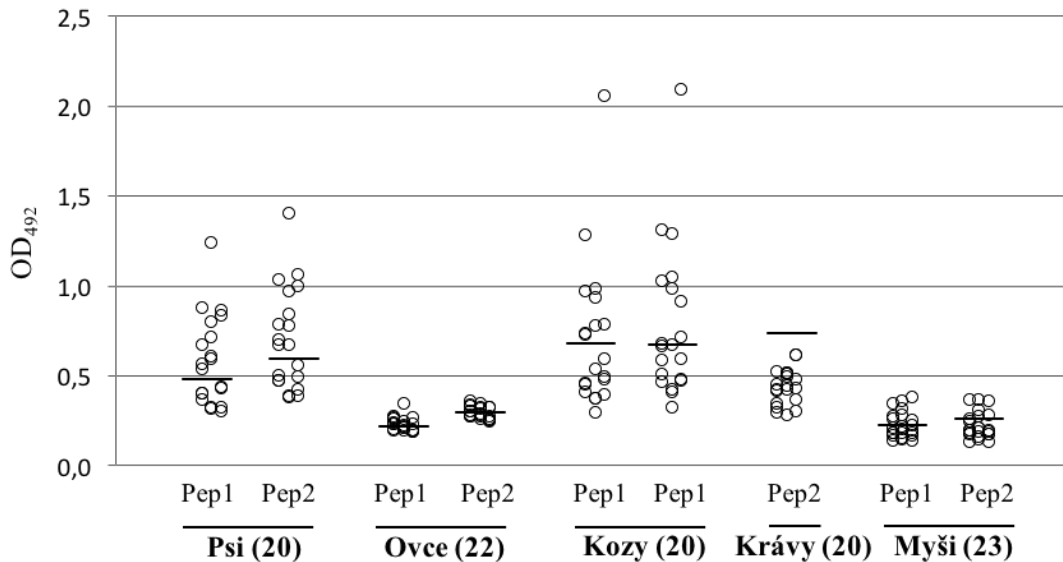
Graf 10: Specificita rekombinantních proteinů *P. orientalis*

U všech testovaných antigenů byl signifikantní rozdíl (p value < 0,05; neparametrický test Wilcoxon Rank-Sum) mezi hladinami IgG protilátek myši poštípaných *P. orientalis* a myši exponovaných poštípaní *P. papatasi* a *S. schwetzi*. Negativní kontroly (NEG) odpovídají sérum myši, které nebyly nikdy v kontaktu s flebotomy. ORI = *P. orientalis*, SCHWE = *S. schwetzi*, PAP = *P. papatasi*

4.10 Peptidy Yellow-related proteinu PorSP24

4.10.1 Zhodnocení antigenicity s částí sér všech testovaných druhů zvířat

PorSP24 Pep1 a PorSP24 Pep2 navržené ze sekvence Yellow-rp PorSP24 byly testovány se vzorky psů, ovcí a koz z Etiopie a poštípaných myši z chovu. PorSP24 Pep2 byl navíc použit k testování kravských sér. Jak je vidět z Grafu 11, reakce obou peptidů s jednotlivými druhy zvířat jsou si velmi podobné. Nejlepších korelací se slinami dosáhly peptidy s ovčimi ($Kf_{P1} = 0,92$; $Kf_{P2} = 0,86$), kozími ($Kf_{P1} = 0,88$; $Kf_{P2} = 0,78$) a psími ($Kf_{P1} = 0,76$; $Kf_{P2} = 0,79$) séry. Se slinami signifikantně korelovala také protilátková odpověď proti oběma peptidům u myši ($Kf_{P1} = 0,69$; $Kf_{P2} = 0,52$), nicméně hodnoty OD těchto sér v reakcích s peptidy v porovnání se slinami byly velmi nízké a žádná optimalizace protokolu nepomohla jejich zvýšení. Kravská séra s PorSP24 Pep2 nereagovala.



Graf 11: IgG protilátková odpověď zvířat z Etiopie a myši z chovu na peptidy PorSP24 Pep1 a PorSP24 Pep2

Jednotlivé skupiny jsou dle hodnoty cut-off rozděleny linkou na část sér s pozitivní a negativní protilátkovou odpovědí. Pep1 = PorSP24 Pep1; Pep2 = PorSP24 Pep2

4.10.2 ELISA s větším počtem sér psů, ovcí a koz

Do pokusu s větším množstvím vzorků byla zařazena séra psů, ovcí a koz, jež splnila kritéria (cut-off < 1; Kf s SGH > 0,7) u obou peptidů PorSP24 Pep1 a PorSP24 Pep2.

PorSP24 Pep1 dosáhl nejlepších výsledků v testech s psími séry (Graf 12a); korelace protilátkové odpovědi proti zmíněnému peptidu a slinám sice není příliš vysoká, nicméně se ukázalo, že silně koreluje s odpovědí proti rekombinantnímu proteinu PorSP24, z jehož sekvence byl navržen. Dále bylo zjištěno, že PorSP24 Pep1 je velmi senzitivní a s vysokou pravděpodobností správně určí, zda jsou testovaná séra pozitivní či negativní. Nevýhodou použití tohoto peptidu u psů je jeho o poznání nižší specificita.

Naopak 100% specificitu projevil PorSP24 Pep1 v reakcích s ovčími séry (Graf 12b). S velkou spolehlivostí správně určil, zda jednotlivé vzorky patří do skupiny pozitivních či negativních sér a pozitivně koreloval s SGH i rPorSP24. Skutečnost, že je velmi málo senzitivní, však snižuje pravděpodobnost jeho případného použití v praxi.

Nejslabších výsledků dosáhl PorSP24 Pep1 v ELISA testech s kozími séry. Korelační koeficient s SGH je relativně nízký, stejně jako korelace protilátkových

odpovědi proti rPorSP24 i peptidu PorSP24 Pep2. Navzdory vysoké specificitě je detekce protilátkové odpovědi s použitím tohoto peptidu velmi málo senzitivní.

Podobně jako PorSP24 Pep1, také PorSP24 Pep2 pozitivně koreloval se slinami v ELISA testu s psími séry a ukázal, že detekce protilátek tímto peptidem je velmi senzitivní, avšak málo specifická. Vysoké hodnoty Kf pak dosáhl s použitím rPorSP24 jako antigenu (Graf 12c). PorSP24 Pep2 také s vysokou pravděpodobností správně určil, zda skutečně negativní sérum spadá mezi vzorky, které neobsahují protilátky proti danému peptidu.

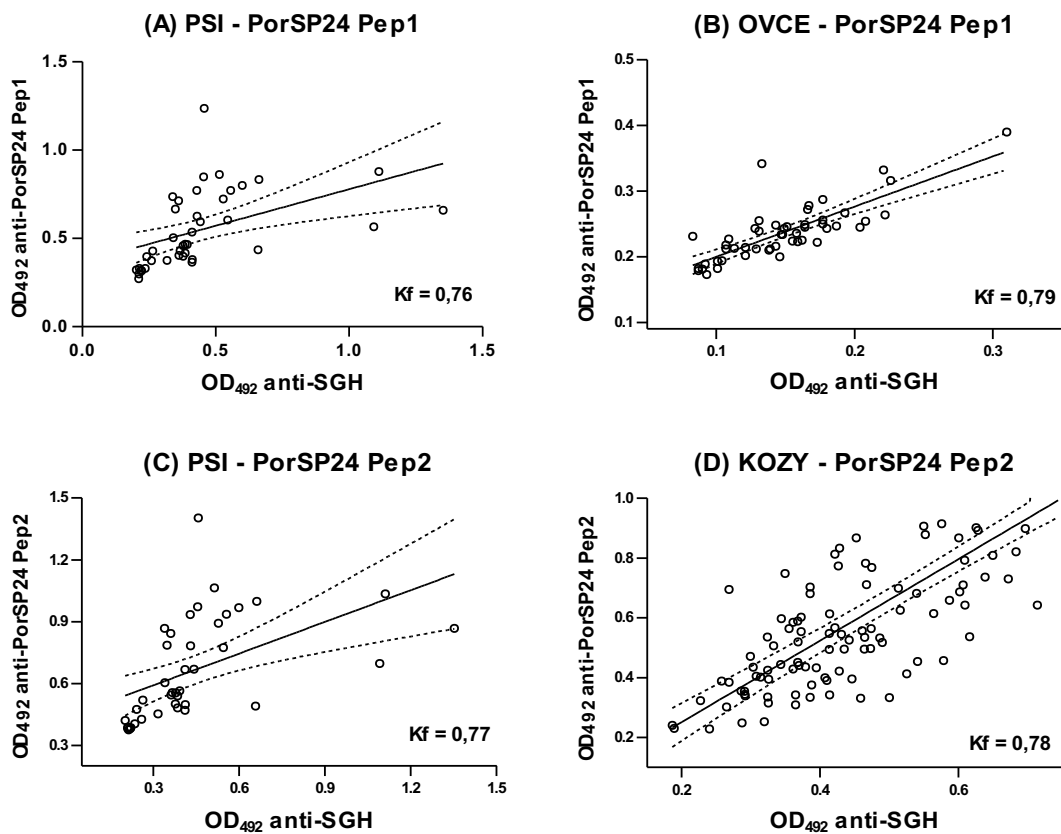
Vysokou míru specificity i senzitivity projevily PorSP24 Pep2 také v testu s ovčími séry. Dále se ukázalo, že je schopen s velkou pravděpodobností správně detekovat negativní séra. Korelace s protilátkovou odpovědí proti SGH je však nízká.

Detekce protilátkové odpovědi peptidem PorSP24 Pep2 u kozích sér je velmi specifická, avšak o poznání méně senzitivní. PorSP24 Pep2 dosahuje vysoké korelace s SGH (Graf 12d) a zároveň s velkou pravděpodobností správně označí skutečně negativní i skutečně pozitivní vzorek. Podrobněji viz Tab. 10.

Tabulka 10: Statistické vyhodnocení finálních ELISA testů s PorSP24 Pep1 a PorSP24 Pep2.

	PorSP24 Pep 1			PorSP24 Pep 2		
	PSI	OVCE	KOZY	PSI	OVCE	KOZY
Počet sér (etiop/neg)	30/10	40/10	94/20	30/10	40/10	94/20
Cut-off	0,48	0,35	0,55	0,59	0,30	0,81
SH ± SO	0,36±0,04	0,23±0,04	0,34±0,07	0,43±0,05	0,25±0,02	0,43±0,13
Kf (SGH)	0,76	0,79	0,64	0,77	0,42	0,78
Kf (rp)	0,85	0,74	0,5	0,85	0,36	0,67
Senzitivita	0,93	0,25	0,58	0,93	0,75	0,58
Specificita	0,67	1	0,73	0,67	0,83	0,95
PPV	0,73	1	0,63	0,73	0,33	0,88
NPV	0,91	0,92	0,77	0,91	0,97	0,77

Pozn.: SH = Střední hodnota. SO = Standardní odchylka. Kf (SGH) popisuje korelaci IgG odpovědi proti konkrétnímu peptidu a SGH. Kf (rp) popisuje korelaci mezi IgG odpovědi proti konkrétnímu peptidu a rPorSP24.



Graf 12: Korelační grafy peptidů PorSP24 Pep1 a PorSP24 Pep2 s vybranými druhy zvířat z Etiopie

Korelační křivky peptidů, u nichž K_f se slinami u daného druhu zvířete dosahoval vyšší hodnoty než 0,7. PorSP24 Pep1 a PorSP24 Pep2 s SGH s psími séry ($K_f = 0,76$; $0,77$) (A) a (C); PorSP24 Pep1 s SGH s ovčími séry ($K_f = 0,79$) (B); PorSP24 Pep2 s SGH s kozími séry ($K_f = 0,78$) (D). Všechny korelace jsou signifikantní ($p = 0,0001$).

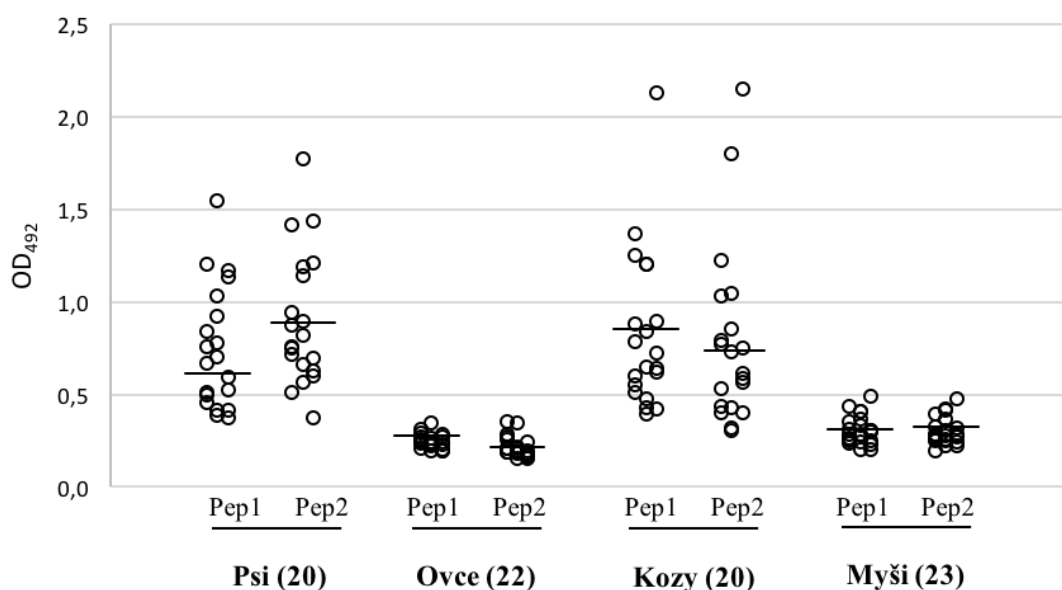
4.11 Peptidy ParSP25-like proteinu PorSP65

4.11.1 Zhodnocení antigenicity s částí sér všech druhů testovaných zvířat

Jak vyplývá z Grafů 11 a 13, protilátková odpověď proti peptidům PorSP24 Pep1, PorSP24 Pep2, PorSP65 Pep1 a PorSP65 Pep 2 je podobná, a to u všech testovaných druhů zvířat.

S peptidy PorSP65 Pep1 a PorSP65 Pep 2 byla testována séra zvířat z Etiopie (psi, ovce a kozy) a séra myši experimentálně poštípaných *P. orientalis*. Signifikantních korelací protilátkové odpovědi proti SGH a daným peptidům dosáhly všechny testované druhy zvířat. Nejvyšší hodnoty K_f byly zjištěny u ovce ($K_{f(P1)} = 0,88$; $K_{f(P2)} = 0,92$), koz ($K_{f(P1)} = 0,85$; $K_{f(P2)} = 0,86$) a psů ($K_{f(P1)} = 0,80$; $K_{f(P2)} = 0,74$). O poznání nižších K_f

dosáhly myši ($Kf_{(P3)} = 0,70$; $Kf_{(P4)} = 0,56$). Kromě myši byly všechny zmíněné druhy zařazeny do pokusů s větším počtem sér.



Graf 13: IgG protilátková odpověď etiopských zvířat a myši z chovu na peptidy PorSP65 Pep1a PorSP65 Pep2

Graf znázorňuje hodnoty OD vzorků testovaných psů ($n = 20$), ovcí ($n = 22$), koz ($n = 20$) a myši ($n = 23$) s peptidy PorSP65 Pep1 a PorSP65 Pep2. Jednotlivé skupiny jsou dle hodnoty cut-off rozděleny linkou na část sér s pozitivní a negativní protilátkovou odpovědí. Pep1 = PorSP65Pep1; Pep2 = PorSP65Pep2.

4.11.2 ELISA s větším počtem sér psů, ovcí a koz

Nejlepší korelace s SGH dosáhl PorSP65 Pep1 se séry psů (Graf 14a). Ještě vyšší hodnoty Kf však dosáhl s odpovídajícím proteinem rPorSP65. Detekce psích sér byla pomocí tohoto peptidu velmi senzitivní, nicméně málo specifická. Dále lze s vysokou pravděpodobností tvrdit, že skutečně negativní séra budou zařazena i v testu s tímto antigenem do skupiny negativních sér.

Podobně vysoké korelace s SGH dosáhl PorSP65 Pep1 také u ovcí (Graf 14b). Navzdory vysoké specifitě byla detekce testovaných ovčích sér velmi málo senzitivní. S vysokou pravděpodobností však určil jako negativní všechna skutečně negativní séra.

Nejslabšího výsledku dosáhl PorSP65 Pep1 s kozími séry. Detekce protilátek u těchto zvířat byla velmi specifická, nicméně ostatní statistické veličiny nabývaly nízkých hodnot.

V reakcích peptidu PorSP65 Pep2 s protilátkami obsaženými v sérech psů dosáhly všechny počítané statistické veličiny vysokých hodnot, korelace se slinami je však o poznání nižší.

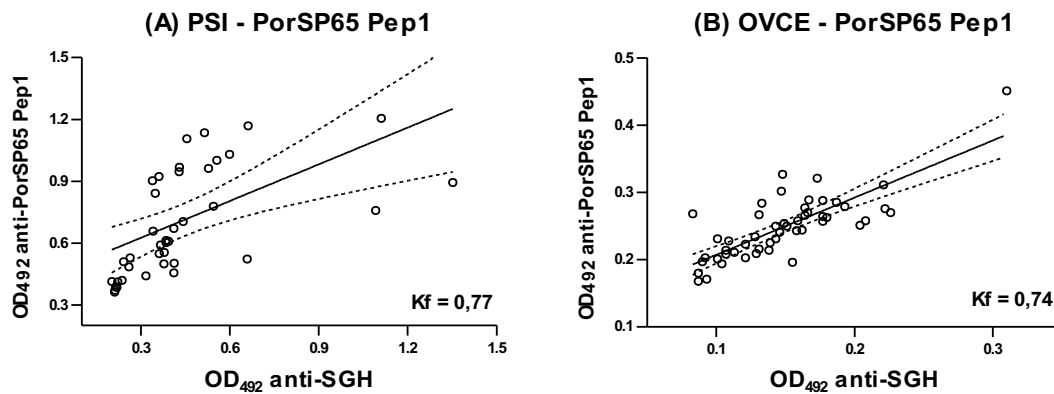
Podobný výsledek lze u tohoto peptidu vidět i v reakcích s ovčími séry. Korelační koeficient s SGH je nízký, nicméně PorSP65 Pep2 s testovanými vzorky dosáhl 100% specifity a s velkou jistotou je schopen správně rozpoznat negativní od pozitivních sér. Senzitivita testu s použitím PorSP65 Pep2 je však nízká.

Také v ELISA testech s kozími séry bylo dosaženo vysoké senzitivity a specifity na úkor nízké hodnoty Kf s SGH. Podrobněji viz Tab 11.

Tabulka 11: Statistické vyhodnocení finálních ELISA testů s PorSP65Pep 1 a PorSP65Pep 2

	PorSP24 Pep 1			PorSP24 Pep 2		
	PSI	OVCE	KOZY	PSI	OVCE	KOZY
Počet sér (etiop/neg)	30/10	40/10	94/20	30/10	40/10	94/20
Cut-off	0,61	0,31	1,19	0,88	0,32	0,53
SH ± SO	0,45±0,05	0,23±0,03	0,56±0,21	0,66±0,08	0,21±0,04	0,32±0,07
Kf (SGH)	0,77	0,74	0,57	0,66	0,57	0,67
Kf (rp)	0,83	0,59	x	0,70	0,48	x
Senzitivita	0,93	0,25	0,43	0,82	0,5	0,79
Specifita	0,53	0,94	0,84	0,80	1	0,7
PPV	0,67	0,33	0,64	0,82	1	0,64
NPV	0,89	0,92	0,69	0,80	0,95	0,83

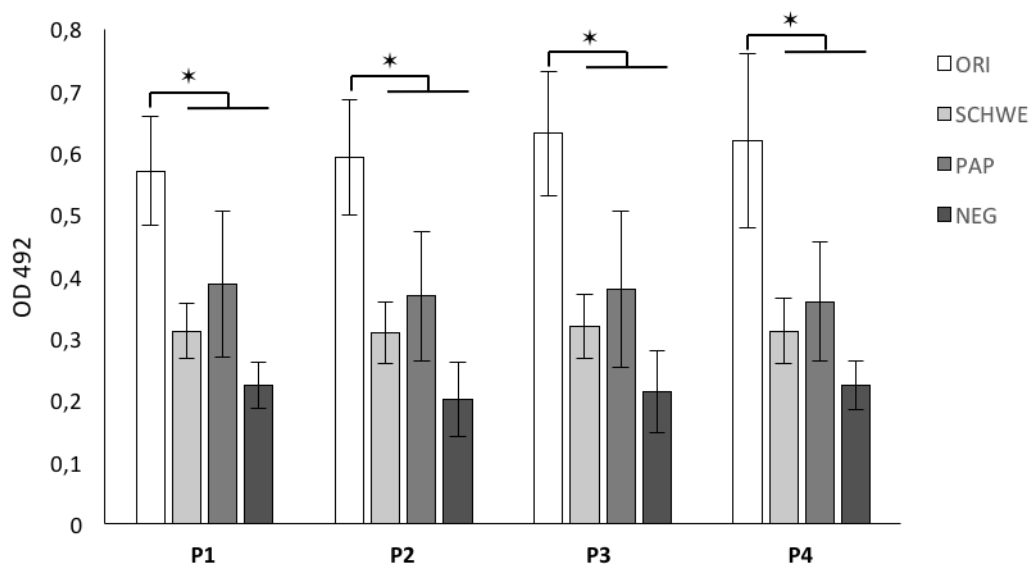
Pozn.: Korelace protilátkové odpovědi proti peptidům PorSP65 Pep1, PorSP65 Pep2 a rPorSP65 nebyla v testech s kozími testována. SH = Střední hodnota. SO = Standardní odchylka. Kf (SGH) popisuje korelaci IgG odpovědi proti konkrétnímu peptidu a SGH. Kf (rp) popisuje korelaci IgG odpovědi proti konkrétnímu peptidu a rPorSP65.



Graf 14: Korelační grafy peptidů PorSP65 Pep1 a PorSP65 Pep2 s vybranými druhy etiopských zvířat. Graficky znázorněny byly korelační křivky peptidů, u nichž Kf se slinami u daného druhu zvířete dosahoval vyšší hodnoty než 0,7. PorSP65 Pep1 s SGH u psů (Kf = 0,77) (A); PorSP65 Pep1 s SGH u ovcí (Kf = 0,74) (B). Obě korelace jsou signifikantní (p value = 0,0001).

4.12 Testování zkřížených reakcí peptidů *P. orientalis*

Peptidy PorSP24 Pep1, PorSP24 Pep2, PorSP65 Pep1 a PorSP65 Pep2 byly testovány se séry myši opakovaně poštípaných *P. orientalis*, *P. papatasi* a *S. schwetzi*. U peptidu PorSP24 Pep2 a obou peptidů ze sekvence proteinu PorSP65 byl signifikantní rozdíl v hladinách protilátek (p value < 0,05) mezi séry myši poštípaných *P. orientalis* a myši poštípaných jinými druhy flebotomů. Reakce peptidu PorSP24 Pep1 se séry myši poštípaných *P. papatasi* byla na hraně signifikance (p value = 0,05), se séry myši poštípaných *S. schwetzi* byl již však rozdíl signifikantní. Hladiny protilátek u myši poštípaných *P. papatasi* a *S. schwetzi* byly u všech peptidů vyšší než protilátková odpověď negativních kontrol.

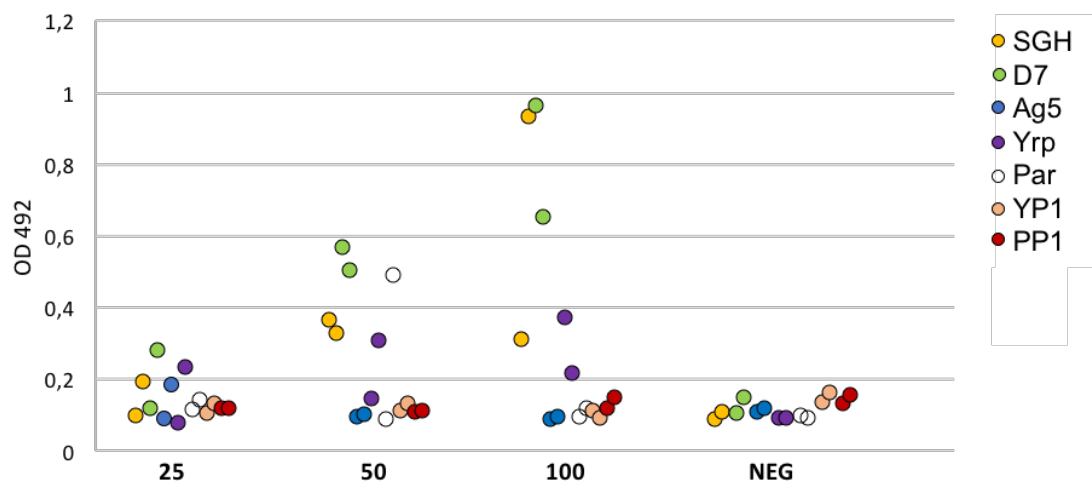


Graf 15: Zkřížené reakce peptidů *P. orientalis*

Signifikantně vyšší hladina protilátek (p value $\leq 0,05$, neparametrický Kruskal-Wallis rank sum test) byla detekována peptidy P2, P3 a P4 v sérech myši exponovaných poštípání *P. orientalis* (ORI), oproti sérum myši poštípaných *S. schwetzi* (SCHWE) a *P. papatasi* (PAP). PorSP24 Pep1 = P1, PorSP24 Pep2 = P2, PorSP65 Pep1 = P3 a PorSP65 Pep2 = P4. Negativní kontroly (NEG) odpovídají sérum myši, které nebyly nikdy v kontaktu s flebotomy.

4.13 Detekce IgG protilátkové odpovědi na poštípání různým počtem flebotomů

Celkem tři skupiny myši byly 5x v týdenních intervalech opakovaně sáty různým počtem (25, 50, 100) samic *P. orientalis*. Týden po poslední expozici flebotomům byly myši vykrceny a jejich sérum testováno na protilátky proti slinným antigenům pomocí SGH, rekombinantních proteinů a peptidů (Graf 16). Vyšší hladina protilátek v závislosti na vzrůstajícím počtu sátých flebotomů byla detekována pouze antigenem D7rp rPorSP67. Podobný trend byl spatřen také u SGH, nicméně hladina protilátek v séru jedné myši sáte 100 flebotomy je v porovnání s oběma séry myši sátymi 50 flebotomy nižší. V případě testování sér s Yrp rPorSP24 byl detekován velký rozdíl mezi hladinami protilátek u myši v rámci jedné skupiny; mírně vzrůstající trend hladin protilátek mezi testovanými skupinami byl nicméně také patrný. V testu s ostatními rekombinantními proteiny ani peptidy nebyly ve skupinách sátých větším množstvím flebotomů vyšší hladiny protilátek detekovány.



Graf 16: Detekce protilátkové odpovědi na poštipání různým počtem flebotomů

Celkem tři skupiny myši byly sáté 25, 50 a 100 samicemi *P. orientalis*. Každá skupina zahrnuje dvě myši, které byly testovány s celkem 7 antigeny; SGH, 4 rekombinantními proteiny (D7-related protein = D7, antigen5-related protein = Ag5, Yellow-related protein = Yrp a ParSP25-like protein = Par) a dvěma peptidy (PorSP24 Pep1 = YP1, PorSP65 Pep1 = PP1). Negativní kontroly (NEG) = testované myši, kterým bylo odebráno krevní sérum před první expozicí flebotomům.

5. DISKUZE

Předmětem mé práce bylo zjistit, zda lze nahradit celé slinné žlázy *P. orientalis*, používané jako markery expozice flebotomům, konkrétními slinnými proteiny nebo jejich specifickými B-epitopy, které se dané antigen-protilátkové interakce přímo účastní.

Pomocí imunoblotu bylo detekováno pět slinných proteinů *P. orientalis* (apyráza PorSP15, Yellow-related protein PorSP24, ParSP25-like protein PorSP65, D7-related protein PorSP67 a antigen5-related protein PorSP76), které specificky reagovaly se dvěma směsnými vzorky psů z Etiopie. Tento pokus potvrdil antigenicitu daných proteinů, která byla poprvé detekována imunoblotem se séry experimentálně poštípaných myší (Vlková et al. 2014). Pět proteinů bylo poté připraveno v rekombinantní formě v systému *E. coli* a následně testováno se séry psů, ovcí, koz a krav z Etiopie a myší poštípaných *P. orientalis*.

Prvním z testovaných rekombinantních proteinů byla **apyráza rPorSP15**. Nejlepších výsledků dosáhl tento protein v testech s psími séry. Korelace se slinami, stejně jako další statistické veličiny (senzitivita, specificita, PPV a NPV) dosahovaly hodnot kolem 0,6–0,7. Ačkoli se nejedná o hodnoty nijak vysoké, žádná z testovaných veličin se extrémně nepropadla a rPorSP15 je proto vhodným kandidátem při použití psích sér. Antigenicitu slinných apyráz pro psy potvrdily také studie na jiných druzích flebotomů. Apyrázy *P. perniciosus* (rSP01 a rSP01B) dosáhly v ELISA testu vysoké korelace se slinami (Kf = 0,9) (Drahota et al. 2014; Martín-Martín et al. 2014), pozitivní reakce apyrázy rLJL23 byla detekována také na imunoblotu se séry psů poštípanými *Lu. longipalpis* (Teixeira et al., 2010).

Při použití kozích sér nedosáhla apyráza vysokých hodnot v žádné z počítaných statistických veličin, s výjimkou vysoké specificity. Proto byla vyhodnocena pro tento druh zvířete jako nevhodný antigen. S ovčími, kravskými a myšími séry apyráza vůbec nereagovala nebo byl Kf s SGH příliš nízký. Tato skutečnost byla vcelku překvapivá, jelikož apyrázy rSP01 a rSP01B druhu *P. perniciosus* s myšími séry na imunoblotu i v ELISA testu pozitivně reagovaly (Martín-Martín et al. 2013; Drahota et al. 2014; Martín-Martín et al. 2015); v práci Drahota et al. (2014) dosáhly dokonce vysokého Kf = 0,9.

D7-related protein rPorSP67 nedosáhl požadovaných hodnot statistických veličin u žádného z testovaných domácích zvířat a taktéž téměř nereagoval s myšími

séry. Tato skutečnost se shoduje s poznatky o antigenicitě D7rp různých druhů flebotomů se séry hlodavců obecně. Ve studii Vlková et al. (2012) reagoval D7rp rPpSP30 *P. papatasi* pouze s částí testovaných myších sér, zatímco antigenní vlastnosti rSP04 D7rp druhu *P. perniciosus* se lišily v závislosti na použitém testu (ELISA, imunoblot) či studii, ve které byla antigenicita tohoto proteinu testována (Martín-Martín et al. 2013b; Drahota et al. 2014).

Antigen5-related protein rPorSP76 se také neosvědčil. Žádný testovaný druh zvířete z Etiopie nedosáhl v předpokusu s malým počtem sér dostatečně vysoké korelace s SGH, a proto byl rPorSP76 označen jako antigen, jež je pro další testování nevhodný. Podobný výsledek uvádí studie Drahota et al. (2014), ve které antigen5-rp rSP07 *P. perniciosus* nereagoval se séry experimentálně poštipaných psů ani myší.

Jedním z možných vysvětlení "neúspěchu" obou proteinů (D7-rp a antigen5-rp) v našich testech je absence glykosylačních úprav v bakteriálním systému, v němž byly všechny testované rekombinantní proteiny *P. orientalis* exprimovány. Vzhledem ke skutečnosti, že nedisponujeme stejnými proteiny exprimovanými v jiném (hmyzím či savčím) systému, lze se jen dohadovat, zda slabá reakce sér některých druhů zvířat s některými rekombinantními proteiny je způsobena absencí těchto glykosylací, či zda se jedná o vlastnost daného proteinu. Naprostá většina dosud připravených rekombinantních slinných proteinů různých druhů flebotomů byla exprimována taktéž v bakteriích (Hamasaki et al. 2009; Vlková et al. 2012; Martín-Martín et al. 2013; Drahota et al. 2014) a tedy ani srovnání s jinými studii nám v tomto ohledu nepomůže.

Yellow-related proteiny flebotomů jsou známy svými antigenními vlastnostmi. Silnou antigenicitu jsme potvrdili také u Yrp rPorSP24 *P. orientalis*. Nejvyšších korelací s SGH dosáhl rPorSP24 s ovčími séry; hodnoty všech testovaných veličin byly taktéž poměrně vysoké, a proto rPorSP24 je možné považovat za vhodný marker expozice pro tento druh zvířete.

Podobně vysokých korelací dosáhl tento protein také při testování psích sér. Po statistickém zhodnocení se však ukázalo, že ačkoli rozeznal všechna pozitivní séra se 100% senzitivitou, míra nespecificity, jež se v reakcích s testovanými vzorky projevila, je alarmující a před použitím rPorSP24 v rozsáhlejších studiích by bylo vhodné jej otestovat s dalšími vzorky přirozeně exponovaných psů. Přitom u jiných druhů flebotomů se rekombinantní Yrp v reakcích se séry podobaných psů velmi osvědčily.

SP03B *P. perniciosus* koreloval s SGH v testech se séry, které byly odebrány psům z různých lokalit jižní Evropy, a prokázal tak, že jeho použití jako markeru expozice lze aplikovat na různé populace tohoto druhu flebotoma (Drahota et al. 2014; Košťálová et al. 2015, 2017). S psími séry také pozitivně reagoval Yrp rLJM17 a rLJM11 *Lu. longipalpis*, korelace s SGH u tohoto druhu však nebyly testovány (Teixeira et al., 2010).

S kozími séry reagoval rPorSP24 velmi specificky, nicméně hodnoty všech ostatních veličin včetně korelací s SGH byly natolik nízké, že byl rPorSP24 vyhodnocen jako nevhodný marker expozice pro tento druh zvířete. Lehce nad hodnotu 0,7 se dostal Kf rPorSP24 s SGH u myší. Podobné antigenní vlastnosti se projevíly také u SP03B *P. perniciosus*, který však dosáhl u tohoto druhu ještě vyššího Kf = 0,9 (Drahota et al., 2014).

ParSP25-like protein PorSP65 můžeme považovat za vhodný antigen pouze u ovcí. Zjištěná korelace se slinami nebyla nijak zvlášť vysoká (0,7), nicméně všechny testované statistické veličiny dosahují podobných hodnot v rozmezí 0,6–0,8. V testech s psími séry jsme narazili na podobný problém, jako u proteinu rYrp: senzitivita i korelace se slinami byla velmi vysoká, nicméně v reakcích s tímto proteinem dochází k nespecifické vazbě protilátek.

ParSP25-like protein byl dosud studován v rekombinantní formě pouze u *P. perniciosus* u psích sér, kde nedosáhl signifikantní korelace s SGH (Drahota et al., 2014). Tato skutečnost je však spíše přisuzována faktu, že rSP08 byl purifikován v nativních podmínkách, přičemž přirozená konformace proteinu může zakrýt B-epitopy, které váží protilátky proti slinám tohoto druhu.

Výrazná nespecificita reakcí rekombinantních ParSP25-like proteinu a Yrp v ELISA testech s psími séry nás vedla k hypotéze, zda by nebylo možné tento problém vyřešit redukcí antigenních míst na povrchu proteinů pouze na jeden vytipovaný B-epitop, jež by byl specifický pro daný protein a specificky vázal pouze protilátky proti slinným žlázám *P. orientalis*. Z každého ze zmíněných proteinů byly navrženy a následně testovány dva takovéto peptidy (PorSP24 Pep 1, PorSP24 Pep 2, PorSP65 Pep 1 a PorSP65 Pep 2).

Specifická protilátková odpověď detekovaná peptidy korelovala s odpovědí proti proti rekombinantním proteinům, podle jejichž sekvence byly peptidy navrženy.

Korelace není u žádné kombinace rekombinantní protein-peptid 100%, jelikož na každém z proteinů se vyskytuje více B-epitopů, které na sebe mohou protilátky vázat.

K předpokládanému zvýšení specifity v porovnání s testy s rekombinantními proteiny došlo u všech čtyřech peptidů v ELISA testech s psími séry, u třech s ovčími séry a jednoho s kozími séry. U PorSP24 Pep2 se při testování ovčích sér specifita nezvýšila, nicméně její hodnota byla jen o trochu nižší než v testech s rekombinantním PorSP24. Porovnání hodnot ostatních statistických veličin či korelací s SGH v testech s peptidy a příslušnými rekombinantními proteiny se v závislosti na testovaných druzích zvířat liší a bude proto diskutováno zvlášť.

K celkovému zlepšení statistického vyhodnocení výsledků s peptidy PorSP24 Pep 1 a PorSP24 Pep 2 oproti testům s rekombinantním proteinem rPorSP24 došlo pouze u psů. Hodnoty senzitivity a NPV jsou sice o trochu nižší v porovnání s rPorSP24, nicméně došlo k výraznému zvýšení již zmíněné specifity a PPV. Korelace jednotlivých peptidů s SGH je srovnatelná s korelací rPorSP24 s SGH. Reakce obou peptidů je téměř identická a pravděpodobně se oba B-epitopy podílí na antigenicitě proteinu PorSP24 stejnou měrou.

Zajímavý fenomén poskytuje srovnání výsledků PorSP24 Pep 1 a PorSP24 Pep 2 v testech s ovčími séry. Zatímco PorSP24 Pep 1 silně koreluje s rekombinantním PorSP24, senzitivita testu s tímto peptidem je relativně nízká. V případě použití PorSP24 Pep 2 je výsledek naprosto opačný. Možným vysvětlením je, že epitop peptidu PorSP24 Pep 1 je vysoce specifický, nicméně neváže takové množství protilátek, které vážou jiná antigenní místa na povrchu proteinu. Epitop PorSP24 Pep 2 je naopak vysoce senzitivní, avšak jeho sekvence je ve struktuře proteinu blokována jinou částí téhož proteinu. Ani v případě jednoho z peptidů nedošlo ke zvýšení hodnot Kf s SGH či PVV a NPV v porovnání s rPorSP24, nicméně všechny zmíněné hodnoty zůstaly vysoké (s výjimkou nízké PPV u PorSP24 Pep 2).

V testech s kozími séry byla u obou peptidů, v porovnání s rPorSP24, navýšena hodnota Kf s SGH i senzitivita testu. Peptid PorSP24 Pep 2 dále zvedl také hodnotu PPV, specifitu a lépe koreloval s rPorSP24.

Také u peptidů navržených ze sekvence rPorSP65 bylo dosaženo dobrých výsledků zejména s psími séry. Korelace s SGH je v testech s peptidy sice o něco nižší než v testech s rekombinantními proteiny, nicméně se podařilo významně zvýšit specifitu reakce z hodnoty 0,1 v testech s rPorSP65 na hodnotu 0,5 a 0,8 s použitím

zmíněných peptidů. Současně v testech s oběma peptidy došlo k zachování vysoké senzitivity a navýšení hodnot PPV a NPV.

Výrazného zvýšení specificity i NPV bylo dosaženo také v testech s ovčími séry, na rozdíl od testů se psy však poklesla senzitivita. Korelace obou peptidů se slinami byla téměř shodná s korelací mezi SGH a rPorSP65.

Pro hodnocení výsledků s rekombinantními proteiny a peptidy je důležité mít k dispozici údaje o specifitě a senzitivě testu. Jak je více popsáno v podkapitolách 2.4 a 2.5, existuje řada studií zabývajících se zhodnocením antigenicity rekombinantních proteinů či peptidů. Ve většině z nich je však uvedena pouze informace, zda jednotlivé antigeny s danými séry reagovaly (v případě použití imunoblotu) či nikoli (Teixeira et al. 2010; Vlková et al. 2012; Martín-Martín et al. 2013; Martín-Martín et al. 2015); u některých je spočítána také hodnota Kf s SGH (Soares et al. 2013; Drahota et al. 2014; Martín-Martín et al. 2014; Košťálová et al. 2015; Košťálová et al. 2017), pouze ojediněle je však zmíněna také specifita a senzitivita testu (Souza et al., 2010). Výsledky této diplomové práce však ukazují, že v mnoha testech s rekombinantními proteiny či peptidy hodnota Kf s SGH nabývala vysokých hodnot, ale reakce daného antigenu s anti-SGH protilátkami byla nespecifická či málo senzitivní. U jiných antigenů zase došlo k situaci, že test projevil vysokou míru senzitivity, ale reagoval naprosto nespecificky. Všechny tyto varianty a jim podobné jsou nepřijatelné a použití takovýchto antigenů v terénních studiích by mohlo vést k výraznému zkreslení výsledků. Je tedy třeba usilovat o to, aby byly všechny hodnoty zmíněných statistických veličin včetně Kf s SGH co možná nejvyšší, ale také vyrovnané.

V další části této diplomové práce jsme chtěli zjistit, který z antigenů je schopen detekovat rozdíl v hladině protilátek vytvořených ve třech skupinách myší, jež byly opakovaně poštípané různým počtem samic *P. orientalis*. Mezi čtyřmi rekombinantními proteiny byl očekáván rozdíl detekován pouze pomocí D7rp rPorSP67. Reakce s tímto rekombinantním proteinem byla velmi překvapivá, neboť v předchozích ELISA testech s myšími séry téměř nereagoval. V testech s SGH a Yrp rPorSP24 vznikl velký rozdíl mezi hladinou protilátek u jednotlivých myší ze stejné skupiny, nicméně trend vzrůstu protilátek v závislosti na větším počtu sátých flebotomů byl i u těchto antigenů patrný.

Naproti tomu u peptidů není negativní výsledek překvapením, neboť v předchozích pokusech s peptidy špatně reagovala séra i u myši, které byly více poštipány.

Důvodem, proč však rozdíl v hladinách protilátek nebyly schopny detekovat také ostatní rekombinantní proteiny, je pravděpodobně nízký počet sání. V předchozích ELISA testech, ve kterých jsme zjišťovali korelaci s SGH, byla použita séra myši z kolonie, jež byly sáte minimálně 15x 100–150 samicemi flebotomů. V tomto experimentu byly myši sáte pouze pětkrát 25, 50 nebo 100 samicemi flebotomů. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli upravit plán imunizace a pokus zopakovat. Navýšili jsme počty myši v rámci každé skupiny a prodloužili dobu sání z pěti na deset týdnů. Nedostatek flebotomů v kolonii a jejich nechuť sát na myších nás však donutil tento pokus předčasně ukončit. Přesto si myslíme, že experimenty tohoto typu by mohly lépe ukázat, který z antigenů je schopen rozeznat rozdíly v hladinách protilátek vytvořené sáním různého počtu flebotomů a lépe kvantifikovat expozici hostitelů vůči flebotomům v případných terénních studiích.

Posledním cílem této práce bylo otestovat, zda SGH, rekombinantní proteiny a syntetické peptidy ze slinných žláz *P. orientalis* zkříženě reagují se dvěma druhy flebotomů, *P. papatasi* a *S. schwetzi*, kteří se sympatricky vyskytují v lokalitách obývaných *P. orientalis*. Oba druhy flebotomů nejsou blíže příbuzné druhu *P. orientalis*. Zjištění, že SGH ani žádný z testovaných rekombinantních proteinů se séry myši poštipaných *P. papatasi* a *S. schwetzi* nereaguje, je tudíž v souladu s předešlými studiemi Volf a Rohoušová (2001) a Rouhoušová et al. (2005), které prokázaly, že ke zkříženým reakcím mezi různými druhy flebotomů dochází pouze u blíže příbuzných druhů.

U peptidů je situace o něco složitější. Ačkoli byl rozdíl mezi hladinami protilátek ve vzorcích myši poštipaných *P. orientalis* a dvěma zmíněnými druhy flebotomů u všech testovaných peptidů signifikantní či na hraně signifikance, hladiny protilátek u myši poštipaných *P. papatasi* a *S. schwetzi* byly u všech peptidů vyšší než protilátková odpověď negativních kontrol. Významný problém tkví v tom, že při použití peptidů jako antigenů s myšimi séry, je i u silně exponovaných myši detekovaná hladina protilátek nízká. Oproti testům s rekombinantními proteiny a SGH nejsou rozdíly mezi pozitivními a negativními séry natolik výrazné. Tyto výsledky je navíc složitější porovnávat s literárními údaji, neboť antigenními vlastnostmi slinných B-epitopů se u flebotomů dosud nikdo nezabýval.

6. SHRnutí A ZÁVĚR

- Zjistili jsme, že testované rekombinantní proteiny slinných žláz *P. orientalis* reagují se séry zvířat z Etiopie i myší z chovu, které byly vystavené poštipání tomuto druhu flebotoma a lze je využít jako antigeny v ELISA testu
- Yellow-related protein rPorSP24 a ParSP25-like protein rPorSP65 dosáhly v ELISA testech vysokých korelací s SGH i dobrého statistického zhodnocení v testech s ovčími a psími séry a lze je použít jako marker expozice; v ELISA testech s psími séry však reagovaly velmi nespecificky
- Peptidy PorSP24 Pep1, PorSP24 Pep2, PorSP65 Pep 1 a PorSP65 Pep2, navržené ze slinných proteinů PorSP24 a PorSP65 *P. orientalis*, detekovaly protilátky proti slinám v sérech laboratorně i přirozeně exponovaných zvířat a lze je použít jako antigeny v ELISA testech
- Při použití peptidů v ELISA testech bylo dosaženo stejné nebo vyšší hodnoty specifity v porovnání s rekombinantní formou příslušného slinného proteinu
- Oba peptidy odvozené od proteinu PorSP24 lze na základě vysoké korelace s SGH a hodnot senzitivity, specifity, PPV a NPV použít jako marker expozice v testech s psími séry a jeden z nich, PorSP24 Pep2, s kozími séry. Oba peptidy odvozené od proteinu PorSP65 pak lze využít jak se psími tak i s kozími séry
- V testech s SGH a rekombinantními proteiny slinných žláz *P. orientalis* nedochází ke zkříženým reakcím s druhy *P. papatasi* a *S. schwetzi*. V testech s peptidy je situace složitější: vznik zkřížených reakcí je diskutabilní a definitivní závěry by bylo možné formulovat až na základě dalších experimentů

Výsledky popisující antigenní vlastnosti rekombinantních proteinů byly publikovány v článku: Šíma, M., Ferencová, B., Warburg, A., Rohoušová, I., Volf, P. (2016). Recombinant salivary proteins of *Phlebotomus orientalis* are suitable antigens to measure exposure of domestic animals to sand fly bites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3).

7. REFERENCE

- Adler, S., a Theodor, O. (1926). The mouthparts, alimentary tract, and salivary apparatus of the female in *Phlebotomus papatasi*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 20, 109–142.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids research*, 25(17), 3389–3402.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 57(4), 1–88.
- Ameri, M., Wang, X., Wilkerson, M. J., Kanost M. R., Broce, A. B. (2008). An immunoglobulin binding protein (Antigen 5) of the stable fly (Diptera: Muscidae) salivary gland stimulates bovine immune responses. *Journal of Medical Entomology*, 45(1), 94–101.
- Anderson, J. M., Oliveira, F., Kamhawi, S., Mans, B. J., Reynoso, D., Seitz, et al. (2006). Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics*, 7, 52, 1–23.
- Ansari, I. H., Kwon, B., Osorio, F. A., & Pattnaik, A. K. (2006). Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *Journal of Virology*, 80(8), 3994–4004.
- Aquino, D. M. C., Caldas, A. J. M., Miranda, J. C., Silva, A. A. M., Barral-Netto, M., Barral, A. (2010). Short report: Epidemiological study of the association between anti-*Lutzomyia longipalpis* saliva antibodies and development of delayed-type hypersensitivity to *Leishmania* antigen. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(4), 825–827.
- Argaw, D., Mulugeta, A., Herrero, M., Nombela, N., Teklu, T., Tefera, T., et al. (2013). Risk factors for visceral Leishmaniasis among residents and migrants in Kafta-Humera, Ethiopia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(11), 1-9.
- Assumpção, T. C. F., Ma, D., Schwarz, A., Reiter, K., Jaime M Santana, Andersen, J. F., et al. (2013). Salivary antigen-5/CAP Family members are Cu²⁺-dependent antioxidant enzymes that scavenge O₂. and inhibit collagen-induced platelet aggregation and neutrophil oxidative burst. *Journal of Biological Chemistry*, 288(20), 14341–14361.
- Badu, K., Siangla, J., Larbi, J., Lawson, B. W., Afrane, Y., Ong'Echa, J., et al. (2012). Variation in exposure to *Anopheles gambiae* salivary gland peptide (gSG6-P1) across different malaria transmission settings in the western Kenya highlands. *Malaria Journal*, 11, 1–9.
- Borud, B., Aas, F. E., Vik, Å., Winther-Larsen, H. C., Egge-Jacobsen, W., Koomey, M. (2010). Genetic, structural and antigenic analyses of glycan diversity in the O-linked protein glycosylation systems of human *Neisseria* species. *Journal of bacteriology*, 192(11), 2816–2829.

- Bahia, D., Gontijo, N. F., León, I. R., Perales, J., Pereira, M. H., Oliveira, G., et al. (2007). Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology Research*, 100(3), 449–454.
- Černá, P., Mikeš, L., Volf, P. (2002). Salivary gland hyaluronidase in various species of phlebotomine sand flies (Diptera: psychodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(12), 1691–1697.
- Clements, M. F., Gidwani, K., Kumar, R., Hostomska, J., Dinesh, D. S., Kumar, V., et al. (2010). Measurement of recent exposure to *Phlebotomus argentipes*, the vector of indian visceral leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(5), 801–807.
- Courtin, F., Camara, M., Rayaisse, J. B., Kagbadouno, M., Dama, E., Camara, O., et al. (2015). Reducing human-tsetse contact significantly enhances the efficacy of sleeping sickness active screening campaigns: A promising result in the context of elimination. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(8), 1–12.
- Croset, A., Delafosse, L., Gaudry, J. P., Arod, C., Glez, L., Losberger, C., et al. (2012). Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *Journal of Biotechnology*, 161(3), 336–348.
- Dama, E., Cornelie, S., Camara, M., Somda, M. B., Poinsignon, A., Ilboudo, H., et al. (2013). In silico identification of a candidate synthetic peptide (Tsgf1 18 – 43) to monitor human exposure to Tsetse flies in West Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(9), 3–10.
- de Moura, T. R., Oliveira, F., Novais, F. O., Miranda, J. C., Clarêncio, J., Follador, I., et al. (2007). Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following pre-exposure to sandfly saliva. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 1(2).
- Dinesh, D. S., Das, P., Picado, A., Davies, C., Speybroeck, N., Ostry, B., et al. (2008). Long-lasting insecticidal nets fail at household level to reduce abundance of sandfly vector *Phlebotomus argentipes* in treated houses in Bihar (India). *Tropical Medicine and International Health*, 13(7), 953–958.
- Dowling, W., Thompson, E., Badger, C., Mellquist, J. L., Garrison, A. R., Smith, J. M., et al. (2007). Influences of glycosylation on antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of Ebola virus GP DNA vaccines. *Journal of Virology*, 81(4), 1821–1837.
- Drahota, J., Martín-Martín, I., Sumová, P., Rohoušová, I., Jimenez, M., Molina, R., Volf, P. (2014). Recombinant antigens from *Phlebotomus perniciosus* saliva as markers of canine exposure to visceral leishmaniasis vector. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(1), 45.
- Drame, P. M., Poinsignon, A., Besnard, P., Cornelie, S., Mire, J. Le, Simondon, F., et al. (2010). Human antibody responses to the *Anopheles* salivary gSG6-P1 peptide : A novel tool for evaluating the efficacy of ITNs in malaria vector control. *PLoS ONE*, 5(12), 1–8.
- Elnaiem, D. E. A. (2011). Ecology and control of the sand fly vectors of *Leishmania donovani* in East Africa, with special emphasis on *Phlebotomus orientalis*. *Journal of Vector Ecology*, 36(SUPPL.1), 23–31.

- FMOH (2006). Visceral Leishmaniasis: Diagnosis & Treatment Guideline for Health Workers in Ethiopia.
- Fournillier, A., Wychowski, C., Boucreux, D., Baumert, T. F., Meunier, J. C., Jacobs, D., et al. (2001). Induction of hepatitis C virus E1 envelope protein-specific immune response can be enhanced by mutation of N-glycosylation sites. *Journal of Virology*, 75(24), 12088–12097.
- Francischetti, I. M. (2010). Hematophagy and inhibition of platelet aggregation. In: Kini, R., Clementson, K., Markland, F., McLane, N., Morita, T. (eds) *Toxins and Hemostasis*, Springer, Dordrecht. ISBN: 978-90-481-9294-6
- Gavrilov, B. K., Rogers, K., Fernandez-Sainz, I. J., Holinka, L. G., Borca, M. V., Risatti, G. R. (2011). Effects of glycosylation on antigenicity and immunogenicity of classical swine fever virus envelope proteins. *Virology*, 420(2), 135–145.
- Gebresilassie, A., Kirstein, O. D., Yared, S., Aklilu, E., Moncaz, A., Tekie, H., ... Gebre-Michael, T. (2015). Species composition of phlebotomine sand flies and bionomics of *Phlebotomus orientalis* (Diptera: Phlebotomidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Tahtay Adiyabo district, Northern Ethiopia. *Parasites & Vectors*, 8(1), 248.
- Gidwani, K., Picado, A., Rijal, S., Singh, S. P., Roy, L., Volfova, V., et al. (2011). Serological markers of sand fly exposure to evaluate insecticidal nets against visceral leishmaniasis in India and Nepal: A cluster-randomized trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(9).
- Gomes, R. B., Brodskyn, C., de Oliveira, C. I., Costa, J., Miranda, J. C., Caldas, A., et al. (2002). Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* Delayed-Type Hypersensitivity. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(10), 1530–1534.
- Gomes, R. B., Mendonça, I. L., Silva, V. C., Ruas, J., Silva, M. B., Cruz, M. S. P., et al. (2007). Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(2), 127–133.
- Gomes, R., a Oliveira, F. (2012). The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on *Leishmania* immunity. *Frontiers in Immunology*, 3(110), 1–8.
- Groß, A., Hashimoto, C., Sticht, H., & Eichler, J. (2016). Synthetic Peptides as Protein Mimics. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3(211).
- Hamasaki, R., Kato, H., Terayama, Y., Ywatta, H., Valenzuela, J. G. (2009). Functional characterization of a salivary apyrase from the sand fly, *Phlebotomus dubosqi*, a vector of *Leishmania major*. *Journal of Insect Physiology*, 55(11), 1044–1049.
- Hoffman, D. R. (1993). Allergens in Hymenoptera venom XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 92(5), 707–716.

- Hofinger, E. S., Spickenreither, M., Oschmann, J., Bernhardt, G., Rudolph, R., Buschauer, A. (2007). Recombinant human hyaluronidase Hyal-1: insect cells versus *Escherichia coli* as expression system and identification of low molecular weight inhibitors. *Glycobiology*, 17(4), 444–453.
- Hostomská, J., Rohoušová, I., Volfová, V., Stanneck, D., Mencke, N., Volf, P. (2008). Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 8(4), 443–450.
- Hostomská, J., Volfová, V., Mu, J., Garfield, M., Rohoušová, I., Volf, P. et al. (2009). Analysis of salivary transcripts and antigens of the sand fly *Phlebotomus arabicus*. *BMC Genomics*, 10(282) 1–17.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., et al. (2007). Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, 5(11), 873–882.
- Charlab, R., Valenzuela, J. G., Rowton, E. D., Ribeiro, J. M. (1999). Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 15155–15160.
- Kato, H., Anderson, J. M., Kamhawi, S., Oliveira, F., Lawyer, P. G., Pham, V. M., et al. (2006). High degree of conservancy among secreted salivary gland proteins from two geographically distant *Phlebotomus duboscqi* sandflies populations (Mali and Kenya). *BMC Genomics*, 7(7), 226.
- Kato, H., Jochim R. C., Gomez E. A., Uezato, H., Mimori, T., Korenaga, M. et al. (2013). Analysis of salivary gland transcripts of the sand fly *Lutzomyia ayacuchensis*, a vector of Andean-type cutaneous leishmaniasis. *Infection, Genetics and Evolution*, 13 : 10.10.16
- King, T. P., Spangfort, M. D. (2000). Structure and biology of stinging insect venom allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 123(2), 99–106.
- Košťálová, T. (2012). Protílátky proti slinám flebotomov u domácich zvierat z endemických oblastí viscerálnej leishmaniózy. *Diplomová Práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká Fakulta, Katedra Parazitologie*.
- Košťálová, T., Leštinová, T., Sumová, P., Vlková, M., Rohoušová, I., Berriatua, E., et al. (2015). Canine antibodies against salivary recombinant proteins of *Phlebotomus perniciosus*: A longitudinal study in an endemic focus of canine leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(6), 1–15.
- Košťálová, T., Leštinová, T., Maia, C., Sumová, P., Vlkova, M., Willen, L., et al. (2017). The recombinant protein rSP03B is a valid antigen for screening dog exposure to *Phlebotomus perniciosus* across foci of canine leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, 31(1), 88–93.
- Leštinová, T., Rohoušová, I., Šíma, M., Oliveira, C. I. De., Volf, P. (2017). Insights into the sand fly saliva : Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), 1–26.
- Leta, S., Dao, T. H. T., Mesele, F., Alemayehu, G. (2014). Visceral Leishmaniasis in Ethiopia : An Evolving Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(86), 1–7.

- Londono-Renteria, B., Drame, P. M., Weitzel, T., Rosas, R., Gripping, C., Cardenas, J. C., et al. (2015). An . gambiae gSG6-P1 evaluation as a proxy for human-vector contact in the Americas : a pilot study. *Parasites & Vectors*, 8(533), 4–11.
- Mans, B. J., Calvo, E., Ribeiro, M. C., Andersen, J. F. (2007). The crystal structure of D7r4, a salivary biogenic amine-binding protein from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Journal of biological chemistry*, 282(50), 36626–36633.
- Martín-Martín, I., Molina, R., Jiménez, M. (2012). An insight into the *Phlebotomus perniciosus* saliva by a proteomic approach. *Acta Tropica*, 123(1), 22–30.
- Martín-Martín, I., Molina, R., Jiménez, M. (2013a). Identifying salivary antigens of *Phlebotomus argentipes* by a 2DE approach. *Acta Tropica*, 126(3), 229–239.
- Martín-Martín, I., Molina, R., Jiménez, M. (2013b). Molecular and immunogenic properties of apyrase SP01B and D7-related SP04 recombinant salivary proteins of *Phlebotomus perniciosus* from Madrid, Spain. *BioMed Research International*, 2013.
- Martín-Martín, I., Molina, R., Rohoušová, I., Drahota, J., Volf, P., & Jiménez, M. (2014). High levels of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in different vertebrate hosts from the re-emerging leishmaniosis focus in Madrid, Spain. *Veterinary Parasitology*, 202(3–4), 207–216.
- Martín-Martín, I., Molina, R., Jiménez, M. (2015). Kinetics of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in experimentally bitten mice and rabbits. *PLoS ONE*, 10(11), 1–15.
- Marzouki, S., Ben Ahmed, M., Boussoffara, T., Abdeladhim, M., Ben Aleya-Bouafif, N., Namane, A., et al. (2011). Characterization of the antibody response to the saliva of *Phlebotomus papatasi* in people living in endemic areas of cutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(5), 653-661.
- Mendes-Sousa, A. F., Vale, V. F., Silva, N. C. S., Guimarães-Costa, A. B., Pereira, M. H., Sant’anna, M. R. V., et al. (2017). The sand fly salivary protein lufaxin inhibits the early steps of the alternative pathway of complement by direct binding to the proconvertase c3b-B. *Frontiers in Immunology*, 8, 1065.
- Ndille, E. E., Doucoure, S., Damien, G., Drame, M., Cornelie, S., Noukpo, H., et al. (2012). First attempt to validate human IgG antibody response to Nterm-34kDa salivary peptide as biomarker for evaluating exposure to *Aedes aegypti* bites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11), 2–8.
- Oliveira, F., Kamhawi, S., Seitz, A. E., Pham, V. M., Guigal, P. M., Fischer, L., et al. (2006). From transcriptome to immunome: Identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine*, 24(3), 374–390.
- Poinsignon, A., Cornelie, S., Ba, F., Boulanger, D., Sow, C., Rossignol, M., et al. (2009). Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immunological tool for evaluating low-level exposure to *Anopheles* bites. *Malaria Journal*, 8(198), 1–8.

- Poinsignon, A., Cornelie, S., Lanfrancotti, A. (2008). Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles* bites. *PLoS ONE*, 3(6).
- Poinsignon, A., Samb, B., Doucoure, S., Drame, P., Sarr, J. B., Cornelie, S., et al. (2010). First attempt to validate the gSG6-P1 salivary peptide as an immuno-epidemiological tool for evaluating human exposure to *Anopheles funestus* bites. *Tropical Medicine & International Health*, 15(10), 1198–1203.
- Prates, A. D. B., Santos, L. D., Miranda, J. C., Souza, A. P. A., & Barral, A. (2008). Changes in amounts of total salivary gland proteins of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera : Psychodidae) according to age and diet. *Journal of medical entomology*, 45(3), 409–413.
- Ramalho-Ortigão, M., Coutinho-abreu, I. V., Balbino, V. Q., Alberto, C., Jr, S. F., Mukbel, R., Dayem, H., et al. (2015). *Phlebotomus papatasi* SP15 : mRNA expression variability and amino acid sequence polymorphisms of field populations. *Parasites & Vectors* 8(298), 1–14.
- Ribeiro, J. M. C., a Francischetti, I. M. B. (2003). Role of arthropod saliva in blood feeding : sialome and post-sialome perspectives. *Annual Review of Entomology*, 48(1), 73–88.
- Ribeiro, J. M. C., Charlab, R., Pham, V. M., Garfield, M., Valenzuela, J. G. (2004). An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34 (6), 543–563.
- Ribeiro, J. M. C., Mans, B. J., Arca, B. (2010). An insight into the sialome of blood feeding Nematocera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(11), 767-784.
- Rohoušová, I., Ozensoy, S., Ozbel, Y., Volf, P. (2005). Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology*, 130 (Pt 5), 493–499.
- Rohoušová, I., Subrahmanyam, S., Volfová, V., Mu, J., Volf, P., Valenzuela, J. G., et al. (2012). Salivary gland transcriptomes and proteomes of *Phlebotomus tobbi* and *Phlebotomus sergenti*, vectors of leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(5), 19–21.
- Rohoušová, I., Talmi-Frank, D., Košťálová, T., Polanská, N., Leštinová, T., Kassahun, A., et al. (2015). Exposure to *Leishmania* spp. and sand flies in domestic animals in northwestern Ethiopia. *Parasites & Vectors*, 8(1), 360.
- Sagna, A. B., Sarr, J. B., Gaayeb, L., Drame, P. M., Ndiath, M. O., Senghor, S., et al. (2013). GSG6-P1 salivary biomarker discriminates micro-geographical heterogeneity of human exposure to *Anopheles* bites in low and seasonal malaria areas. *Parasites and Vectors*, 6(1).
- Šeblová, V., Volfová, V., Dvořák, V., Pružinová, K., Votýpka, J., Kassahun, A., et al. (2013). *Phlebotomus orientalis* sand flies from two geographically distant Ethiopian localities: Biology, genetic analyses and susceptibility to *Leishmania donovani*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(4), 1–8.

- Shi, X., Jarvis, D. L. (2007). Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system. *Current Drug Targets*, 8(10), 1116–25.
- Soares, B. R., Souza, A. P. A., Prates, D. B., de Oliveira, C. I., Barral-Netto, M., Miranda, J. C., Barral, A. (2013). Seroconversion of sentinel chickens as a biomarker for monitoring exposure to visceral Leishmaniasis. *Scientific Reports*, 3(1), 2352.
- Somda, M. B., Cornelie, S., Bengaly, Z., Mathieu-Daudé, F., Poinsignon, A., Dama, E., et al. (2016). Identification of a Tsal₁₅₂₋₇₅salivary synthetic peptide to monitor cattle exposure to tsetse flies. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–12.
- Souza, A. P., Andrade, B. B., Aquino, D., Entringer, P., Miranda, J. C., Alcantara, R. et al. (2010). Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral leishmaniasis endemic areas. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(3), 1–8.
- Šíma, M., Novotný, M., Pravda, L., Sumová, P., Rohoušová, I., Volf, P. (2016). The diversity of yellow-related proteins in sand flies (Diptera: Psychodidae). *PLoS ONE*, 11(11), 1–17.
- Teixeira, C., Gomes, R., Collin, N., Reynoso, D., Jochim, R., Oliveira, F., et al. (2010). Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(3), 13–15.
- Thiakaki, M., Rohoušová, I., Volfová, V., Volf, P., Chang, K. P., Soteriadou, K. (2005). Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. *Microbes and Infection*, 7(4), 760–766.
- Tsegaw, T., Gadisa, E., Seid, A., Abera, A., Teshome, A., Mulugeta, et al. (2013). Identification of environmental parameters and risk mapping of visceral leishmaniasis in Ethiopia by using geographical information systems and a statistical approach. *Geospatial Health*, 7(2), 299–308.
- Valenzuela, J. G., Belkaid, Y., Garfield, M. K., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E. D., et al. (2001). Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(3), 331–342.
- Valenzuela, J. G., Charlab, R., Gonzalez, E. C., De Miranda-Santos, I. K. F., Marinotti, O., Francischetti, I. M. B., & Ribeiro, J. M. C. (2002). The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera. *Insect Molecular Biology*, 11(2), 149–155.
- Valenzuela, J. G., Garfield, M., Rowton, E. D., Pham, V. M. (2004). Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *The Journal of Experimental Biology*, 207 (Pt 21), 3717–3729.
- Vinhas, V., Andrade, B. B., Paes, F., Bomura, A., Clarencio, J., Miranda, J. C., et al. (2007). Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. *European Journal of Immunology*, 37(11), 3111–3121.

- Vlková, M., Rohoušová, I., Drahota, J., Stanneck, D., Kruedewagen, E. M., Mencke, N., et al. (2011). Canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(10), 1–9.
- Vlková, M., Rohoušová, I., Hostomská, J., Pohanková, L., Zidková, L., Drahota, J., et al. (2012). Kinetics of antibody response in BALB/c and C57BL/6 mice bitten by *Phlebotomus papatasi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(7), 1–9.
- Vlková, M., Šíma, M., Rohoušová, I., Košťálová, T., Sumová, P., Volfová, et al. (2014). Comparative analysis of salivary gland transcriptomes of *Phlebotomus orientalis* sand flies from endemic and non-endemic foci of visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(2), e2709.
- Volf, P., Tesařová, P., Nohýnková, E. (2000). Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. *Medical and Veterinary entomology*, 14(3), 251–256.
- Volf, P., Rohoušová, I. (2001). Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology*, 122(1), 37–41.
- Volf, P., a Volfová, V. (2011). Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology*, 36, S1–S9.
- Volfová, V., Hostomská, J., Černý, M., Votýpka, J., Volf, P. (2008). Hyaluronidase of bloodsucking insects and its enhancing effect on *Leishmania* infection in mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(9), 1–8.
- Warburg, A., Saraiva, E., Lanzaro, G. C, Titus, R. G, Neva, F. (1994). Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 345(1312), 223–230
- Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, et al. (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*, 422(1988), 307–312.
- Xu, X., Oliveira, F., Chang, B. W., Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., et al. (2011). Structure and function of a “ Yellow ” protein from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* that confers protective immunity against *Leishmania major* infection. *Journal of biological chemistry*, 286(37), 32383–32393.
- Yin, J., Li, G., Ren, X., Herrler, G. (2007). Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127(3), 335–347.