

## ANTIGENI SALIVARI QUALI STRUMENTI EPIDEMIOLOGICI PER LA VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE UMANA AD *Aedes albopictus*

BRUNO ARCÀ<sup>a</sup> - SARA BUEZO MONTERO<sup>a</sup> - FABRIZIO LOMBARDO<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive - Sezione di Parassitologia, Sapienza Università di Roma, P.le Aldo Moro 5 - 00185 Roma (Italy)

Autore corrispondente: bruno.arca@uniroma1.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Approcci genomici e molecolari per il controllo di specie invasive di insetti di interesse agrario e sanitario". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 8 giugno 2018.

### *Salivary antigens as epidemiological tools to evaluate human exposure to Aedes albopictus*

Hematophagous arthropods during feeding inject into their hosts a cocktail of salivary proteins whose main role is to allow for an effective blood meal by counteracting host hemostasis, inflammation and immunity. However, saliva of blood feeders also evokes in vertebrates an antibody response that can be used to evaluate exposure to disease vectors. Salivary transcriptome studies carried out in different hematophagous species in the last fifteen years clarified the complexity of the salivary repertoires of blood feeding arthropods, pointing out that salivary proteins evolve at a fast evolutionary rate and highlighting the existence of family-, genus- and sometime even species-specific salivary proteins. Focusing on mosquitoes of the genera *Anopheles* and *Aedes*, which are important vectors of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and of several arboviruses, we summarize here recent efforts to exploit genus-specific salivary proteins as biomarkers of human exposure to these vectors of large relevance for public health.

KEY WORDS: blood feeding, salivary proteins, biomarkers, *Anopheles*, *Aedes*.

### INTRODUZIONE

La capacità di utilizzare una fonte alimentare ricca di aminoacidi quali il sangue dei vertebrati ha certamente conferito agli insetti ematofagi un considerevole vantaggio riproduttivo. Tuttavia, nutrirsi di sangue è un compito notevolmente impegnativo che ha richiesto l'evoluzione di complessi adattamenti comportamentali, morfologici e fisiologici tali da consentire all'insetto di localizzare l'ospite, attraversarne la barriera cutanea, quindi raggiungere, ingerire e digerire il sangue (LEHANE, 1991). È noto che il danno tissutale induce nei vertebrati risposte fisiologiche possenti e ridondanti atte a limitare le perdite di sangue, provvedere alla riparazione dei tessuti danneggiati e proteggerli dall'invasione di microorganismi. Per questi motivi, allo scopo di nutrirsi efficacemente di sangue, gli insetti ematofagi hanno evoluto un complesso armamentario di proteine salivari, parimenti possente e ridondante, capace di controbilanciare la risposta emostatica, infiammatoria ed immunitaria dell'ospite (RIBEIRO & ARCÀ, 2009). In effetti, la saliva di tutti gli artropodi ematofagi analizzati fino ad ora contiene almeno un inibitore piastrinico, un anticoagulante ed un vasodilatatore (Ribeiro, 1995); inoltre, nella saliva di queste specie si ritrovano anche numerose altre attività aggiuntive in grado di influenzare l'infiammazione e l'immunità

dell'ospite (ARCÀ & RIBEIRO, 2018) ed eventualmente di interferire con la trasmissione di patogeni (FONTAINE *et al.*, 2011).

Grazie agli straordinari avanzamenti delle tecnologie di sequenziamento di acidi nucleici, nonché ai progressi delle tecniche proteomiche, la nostra comprensione della complessità, delle funzioni e dell'evoluzione delle proteine salivari di insetti ematofagi si è accresciuta in modo davvero considerevole negli ultimi quindici anni. Ad oggi gli studi di trascrittomici hanno consentito di ottenere informazioni sui sialomi (dal greco *sialo* = saliva) di almeno 49 specie di insetti ematofagi appartenenti a 3 differenti ordini (Ditteri, Emitteri e Sifonatteri). Queste analisi hanno rivelato che i repertori salivari della maggior parte dei Nematoceri ematofagi (come zanzare e flebotomi) includono ~100-200 proteine, mentre Brachicerci come la mosca tsetse ed Emitteri come la cimice Triatomina possono avere oltre 250 proteine salivari (ARCÀ & RIBEIRO, 2018). Attualmente, il ruolo fisiologico di numerose proteine salivari è stato chiarito attraverso studi funzionali oppure dedotto sulla base della similarità di sequenza a proteine note (NARASIMHAN *et al.*, 2017; RIBEIRO & ARCÀ, 2009). Tuttavia, è opportuno sottolineare che malgrado i considerevoli progressi ancora non abbiamo alcuna idea sulle possibili funzioni di circa il 30-40% delle putative proteine salivari identificate da insetti ematofagi.

## ANTIGENI SALIVARI COME STRUMENTI EPIDEMIOLOGICI

Le secrezioni salivari di artropodi ematofagi, a parte ed indipendentemente dalle proprietà biochimiche e farmacologiche delle proteine che le compongono, stimolano l'immunità umorale dei vertebrati. Di conseguenza, anticorpi circolanti diretti contro componenti salivari possono essere rivelati e misurati nei sieri di individui ripetutamente punti da artropodi. Numerosi studi hanno evidenziato come questa risposta anticorpale anti-saliva possa essere sfruttata per valutare l'esposizione dell'ospite a punture di artropodi vettori anche molto diversi fra loro come zecche, flebotomi, zanzare, mosche tsetse e cimici Triatomine (vedi RIZZO *et al.*, 2011 per le referenze originali). Al momento, la valutazione dell'esposizione umana a Culicidi vettori si basa su misure entomologiche classiche della densità vettoriale, ed eventualmente sulla propensione ad effettuare il pasto di sangue sull'uomo (trappole, catture al piretro, catture sull'uomo, etc.). Tuttavia, queste metodologie forniscono soltanto misure indirette del grado di esposizione umana a punture del vettore. Inoltre, richiedono un notevole impegno lavorativo, sono relativamente costose ed in alcune circostanze possono essere di difficile o impossibile implementazione (bassa densità vettoriale o costrizioni logistiche). A questo riguardo la disponibilità di semplici saggi immunologici per misurare direttamente il contatto uomo-vettore rappresenterebbe uno strumento addizionale estremamente utile. Infatti, la valutazione della trasmissione/rischio di malattie trasmesse da Culicidi vettori si basa frequentemente su misurazioni serologiche delle risposte anticorpali ad antigeni virali o parassitari; quindi, la disponibilità di antigeni salivari vettore-specifici consentirebbe la valutazione simultanea della circolazione del patogeno e dell'esposizione umana al suo vettore. Infine, ma non meno importante, la messa a punto di marcatori salivari sarebbe estremamente utile anche per la valutazione dell'efficacia di misure anti-vettoriali (per es. zanzariere impregnate o interventi con larvicidi e/o adulticidi). Se da un lato la misurazione della risposta anti-saliva rappresenta un utile strumento epidemiologico, dall'altro lato l'uso della saliva o di estratti salivari è problematico. Innanzitutto, ottenere grandi quantità di saliva o di estratti è una procedura laboriosa, difficile da standardizzare e scarsamente riproducibile. In secondo luogo, la saliva di artropodi ematofagi, come in precedenza specificato, è una miscela complessa e può determinare fenomeni di cross-reattività che possono essere fuorvianti. Per questi motivi un saggio immunologico per valutare l'esposizione umana a vettori di malaria o di arbovirus dovrebbe

essere idealmente basata su singoli antigeni specifici rispettivamente di zanzare *Anopheles* o *Aedes*.

## DIVERSITÀ DELLE PROTEINE SALIVARI DI INSETTI EMATOFAGI

Abbiamo già accennato alla grande quantità di informazioni ottenute negli ultimi dieci o quindici anni sui sialomi di insetti e artropodi ematofagi. Per quanto concerne i Culicidi attualmente sono disponibili trascrittomi salivari da 12 differenti specie appartenenti a 5 diversi generi (ARCA & RIBEIRO, 2018). Inoltre, il recente sequenziamento completo dei genomi di 16 specie di *Anopheles* da diversi continenti ha fornito una opportunità unica di studiare l'evoluzione dei geni codificanti proteine salivari in un arco temporale che abbraccia circa 100 milioni di anni di radiazione delle anofeline (ARCA *et al.*, 2017; NEAFSEY *et al.*, 2015). Questa larga quantità di informazioni ha permesso di chiarire che i geni salivari delle anofeline, e verosimilmente degli artropodi ematofagi più in generale, evolvono ad un tasso accelerato, forse sotto la pressione selettiva dei sistemi immunitari degli ospiti (ARCA *et al.*, 2017; ARCA *et al.*, 2014; NEAFSEY *et al.*, 2015). Questo tasso evolutivo insolitamente elevato, insieme all'osservazione che l'ematofagia si è evoluta indipendentemente numerose volte (convergenza evolutiva), giustifica l'osservazione che i repertori salivari di insetti ematofagi consistono sia di proteine che sono ampiamente condivise fra differenti famiglie di insetti ma anche di proteine salivari famiglia-, genere- e persino specie-specifiche (ARCA & RIBEIRO, 2018; RIBEIRO & ARCA, 2009). Più specificamente, analisi trascrittomiche comparative hanno evidenziato l'esistenza di gruppi di proteine salivari specifiche dei Culicidi e ristrette a specie dei generi *Anopheles* o *Aedes* (ARCA *et al.*, 2007; ARCA *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2010). Queste proteine genere-specifiche, se immunogeniche, rappresentano dei candidati ideali per lo sviluppo di saggi ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) per valutare l'esposizione umana a vettori di malaria (zanzare *Anopheles*) o di arbovirus (zanzare *Aedes*).

## LA PROTEINA GSG6 DI *ANOPHELES GAMBIAE*: UNA PROVA DI PRINCIPIO

Analisi comparative hanno consentito di identificare un gruppo di 18 polipeptidi salivari, appartenenti a 9 differenti famiglie proteiche, che si ritrovano esclusivamente nella saliva di anofeline e sono privi di similarità con proteine note (ARCA *et*

*al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2010). Le risposte IgG alle proteine gSG6 e cE5 del vettore afrotropicale di malaria *Anopheles gambiae* sono state analizzate in individui naturalmente esposti a punture di zanzare *Anopheles* da una zona ad iperendemia malarica del Burkina Faso, Africa occidentale. gSG6 (AGAP000150) è una piccola proteina di ~10 kDa espressa specificamente nelle ghiandole salivari di femmine adulte e relativamente abbondante nella saliva. Il preciso ruolo funzionale di gSG6 è ancora da chiarire, sebbene la sua deplezione dalla saliva mediante RNAi aumenti il tempo di *probing* e diminuisca l'efficienza del pasto di sangue (LOMBARDO *et al.*, 2009). Anche cE5 è un piccolo polipeptide (82 aa, AGAP008004) ma la sua struttura e funzione sono stati accuratamente determinati: si tratta di un potente inibitore trombinico appartenente alla famiglia dell'anofelina e lo si ritrova esclusivamente nella saliva di zanzare *Anopheles* (ARCA *et al.*, 2017; PIRONE *et al.*, 2017; RONCA *et al.*, 2012). Queste due proteine salivari genere-specifiche di *An. gambiae* sono entrambe immunogeniche ma è interessante notare che stimolano risposte immunitarie sostanzialmente differenti in individui ripetutamente esposti ad alti livelli di punture anofeliche. Infatti, la proteina gSG6 induce una risposta IgG di breve durata, come indicato dalla brusca diminuzione dei livelli anticorpali durante la stagione secca, dopo un periodo di ~3-4 mesi di esposizione scarsa o nulla (RIZZO *et al.*, 2011). La proteina cE5, che esibisce una maggiore immunogenicità in confronto a gSG6, evoca invece una risposta IgG di più lunga durata, come mostrato dall'assenza di variazione significativa dei livelli anticorpali fra la stagione delle piogge, ad alta densità vettoriale, e la stagione arida, a bassa densità vettoriale (RIZZO *et al.*, 2014). La risposta a queste due proteine è risultata differente anche (i) per la sottoclasse IgG predominante (IgG4 ed IgG1 rispettivamente per gSG6 e cE5) e (ii) per la capacità di indurre tolleranza immunologica, suggerendo che inducano risposte immunitarie di differente polarità negli individui esposti: di tipo Th-2 per gSG6 e di tipo Th-1 per cE5 (RIZZO *et al.*, 2014). La natura a più lungo termine della risposta IgG anti-cE5 indica una limitata adeguatezza di questa proteina quale marcatore di esposizione; tuttavia, la sua elevata sensibilità potrebbe essere sfruttata per valutare l'impatto di interventi di controllo vettoriale sul contatto uomo-vettore, e quindi per stimarne l'efficacia (MARIE *et al.*, 2015). Dall'altro lato, la proteina gSG6 (o il peptide gSG6-P1) sono stati validati quali marcatori di esposizione umana a vettori di malaria in un'ampia varietà di condizioni epidemiologiche in Africa (Angola, Benin, Burkina Faso, Costa d'Avorio,

Kenya, Senegal, Tanzania ed Uganda) e, più recentemente, in Asia (Cambogia, confine Thailandia-Birmania) e Polinesia (Vanuatu) (BADU *et al.*, 2012; DRAME *et al.*, 2010; DRAME *et al.*, 2015; IDRIS *et al.*, 2017; POINSIGNON *et al.*, 2008; PROIETTI *et al.*, 2013; RIZZO *et al.*, 2011; STONE *et al.*, 2012; TRAORE *et al.*, 2018; YA-UMPHAN *et al.*, 2017). Questi dati forniscono una chiara prova di principio che antigeni salivari da artropodi ematofagi possono essere usati in maniera affidabile per valutare l'esposizione umana a vettori di patogeni e che rappresentano utili strumenti per studi epidemiologici e per la stima dell'efficacia di interventi di controllo vettoriale.

#### ANTIGENI SALIVARI PER LA VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE A ZANZARE *Aedes*

Zanzare appartenenti al genere *Aedes* sono vettori di arbovirus di grande rilevanza per la salute umana quali i virus della dengue (DENV), Zika (ZIKV), chikungunya (CHIKV) e febbre gialla. *Aedes aegypti* ed *Aedes albopictus* sono certamente i vettori più rilevanti, con *Ae. aegypti* che rappresenta il principale vettore nelle aree tropicali e subtropicali, mentre *Ae. albopictus* sta rapidamente guadagnando l'attenzione generale in virtù della sua rapida diffusione globale e della sua competenza alla trasmissione di numerosi arbovirus (KRAEMER *et al.*, 2015). Inoltre, i recenti casi di trasmissione autoctona di chikungunya e dengue causati da *Ae. albopictus* in Italia, Francia e Croazia hanno evidenziato che il continente europeo è vulnerabile a infezioni trasmesse da *Ae. albopictus* (GOSSNER *et al.*, 2018), sottolineando la necessità di un migliore monitoraggio e controllo di questo rilevante vettore.

Studi precedenti hanno chiaramente mostrato che la risposta IgG alla saliva di *Ae. aegypti* o di *Ae. albopictus* può essere impiegata per valutare l'esposizione umana a questi vettori (DOUCOURE *et al.*, 2012a; DOUCOURE *et al.*, 2012b; MATHIEU-DAUDE *et al.*, 2018; ORLANDI-PRADINES *et al.*, 2007). Allo stesso tempo le analisi trascrittomiche su differenti specie di zanzare *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* hanno portato all'identificazione di un gruppo di almeno una decina di proteine salivari tipiche di culicine e con limitata identità aminoacidica fra specie di *Aedes* e *Culex* (ARCA *et al.*, 2007; ARCA *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2018). Queste osservazioni, insieme alla prova di principio ottenuta con gSG6/gSG6-P1 per vettori di malaria, incoraggiano gli sforzi per la messa a punto di saggi simili per la valutazione dell'esposizione a zanzare *Aedes*. Fra i candidati idonei ci sono le proteine salivari

di *Ae. albopictus* 23.4 kDa (AAV90700), 27 kDa (AAV90698), 30.5 kDa (AAV90697), 34k1(AAV90689), 34k2 (AAV90690), 62k1 (AAV90683), 62k2 (AAV90682), HHH (AAV90655), W-rich (AAV90636), hyp8.2 (AAV90696); inoltre, alcune indicazioni preliminari di immunogenicità per l'uomo sono state ottenute per alcuni di questi candidati mediante approcci di immunoproteomica (DOUCOURE *et al.*, 2013).

L'unico antigene salivare *Aedes*-specifico utilizzato finora con qualche successo è il peptide Nterm-34 kDa che è disegnato sulla regione N-terminale della proteina salivare 34k1 di *Ae. aegypti* (ABF18017). In uno studio effettuato in 7 differenti villaggi del Benin meridionale (Africa occidentale) si è visto che la risposta IgG anti-Nterm-34 kDa aumenta in bambini esposti a zanzare *Aedes* passando dalla stagione secca (bassa esposizione) alla stagione delle piogge (alta esposizione) (ELANGA NDILLE *et al.*, 2012). Inoltre, ci sono alcune evidenze che il peptide Nterm-34 kDa potrebbe essere utile per valutare la qualità di interventi di controllo vettoriale (ELANGA NDILLE *et al.*, 2016; Sagna *et al.*, 2018). Questi risultati, sebbene necessitino di più estesa validazione, sono certamente promettenti ed incoraggianti ma l'analisi di ulteriori candidati potrebbe consentire la messa a punto di marcatori più efficaci. Da questo punto di vista è opportuno considerare come l'utilizzo di peptidi sintetici, pur presentando alcuni rilevanti vantaggi, abbia anche alcune limitazioni. Infatti, da un lato l'impiego di peptidi consente di evitare le laboriose procedure di espressione, purificazione e rinaturazione delle proteine ricombinanti, peraltro non sempre coronate da successo, e può garantire una minore variabilità da preparazione a preparazione dell'antigene. D'altro canto, i peptidi sintetici hanno spesso una sensibilità limitata, dovuta alla perdita degli epitopi conformazionali delle proteine native, e richiedono l'impiego di sieri più concentrati, il che può essere un problema in alcune situazioni o condizioni epidemiologiche. Ci si aspetta che ulteriori progressi verso la messa a punto di marcatori sensibili ed efficaci di esposizione a zanzare *Aedes* possa venire dall'espressione in forma ricombinante e dalla validazione di proteine salivari *Aedes*-specifiche. Un passo importante in questa direzione può venire dall'utilizzo di sistemi sperimentali animali (topo, coniglio o cavia) che consentano un rapido screening preliminare di numeri relativamente elevati di candidati. Un approccio di questo tipo, pur necessitando di validazione finale sull'uomo in condizioni naturali di esposizione, ha numerosi vantaggi. Innanzitutto, il regime di esposizione può essere strettamente controllato ed è possibile impiegare protocolli di esposizione a punture di differenti zanzare vettrici (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex*): questo

può consentire di valutare la genere- ed eventualmente la specie-specificità della risposta anticorpale. In aggiunta, il prelievo di piccoli volumi di siero a tempi definiti (prima, durante ed a tempi diversi dal termine dell'esposizione) può fornire informazioni dettagliate sulla cinetica di comparsa e decadimento della risposta, che è un parametro cruciale per la selezione di marcatori efficaci. In un sistema di questo tipo si può immaginare che lo screening iniziale di peptidi disegnati su idonee proteine salivari *Aedes*-specifiche possa guidare la selezione di candidati ottimali per la successiva espressione dell'intera proteina in forma ricombinante. In conclusione le prospettive per lo sviluppo di marcatori di esposizione a zanzare *Aedes* sono certamente molto incoraggianti: ci si attende che questi possano rappresentare degli strumenti addizionali estremamente utili per stimare il grado di esposizione umana a questi importanti vettori di arbovirus con implicazioni rilevanti per studi epidemiologici, per la valutazione del rischio e per il miglioramento degli interventi di controllo antivettoriali.

#### RIASSUNTO

Gli artropodi ematofagi, durante il pasto di sangue, iniettano nei loro ospiti un cocktail salivare il cui ruolo principale è di consentire un'efficace assunzione del sangue contro bilanciando le risposte emostatica, infiammatoria ed immunitaria dell'ospite. Le proteine salivari di ematofagi, tuttavia, inducono negli ospiti vertebrati una risposta anticorpale che può essere sfruttata per valutarne l'esposizione a vettori di importanti malattie. Studi di trascrittomici effettuati negli ultimi quindici anni su differenti specie di insetti ematofagi hanno consentito di chiarire la complessità dei loro repertori salivari mettendo in rilievo come le proteine salivari mostrino un accelerato tasso evolutivo ed evidenziando l'esistenza di proteine salivari famiglia-, genere- e talvolta anche specie-specifiche. Focalizzando l'attenzione su zanzare dei generi *Anopheles* ed *Aedes*, importanti vettori rispettivamente del parassita malarico *Plasmodium falciparum* e di numerosi arbovirus, riassumiamo qui recenti studi finalizzati all'utilizzo di proteine salivari per la messa a punto di saggi atti a valutare l'esposizione umana a questi vettori di notevole rilevanza per la salute pubblica.

#### REFERENCES

- ARCÀ B., LOMBARDO F., FRANCISCHETTI I. M., *et al.*, 2007 – *An insight into the sialome of the adult female mosquito Aedes albopictus*. - *Insect Biochem Mol Biol*, 37(2): 107-127.
- ARCÀ B., LOMBARDO F., STRUCHINER C.J., *et al.*, 2017 – *Anopheline salivary protein genes and gene families: an evolutionary overview after the whole genome sequence of sixteen Anopheles species*. - *BMC Genomics*, 18 (1): 153.
- ARCÀ B., LOMBARDO F., VALENZUELA J. G., *et al.*, 2005 – *An updated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, Anopheles gambiae*. - *J Exp Biol*, 208(Pt 20): 3971-3986.

- ARCA B., RIBEIRO J. M., 2018 – *Saliva of hematophagous insects: a multifaceted toolkit*. - *Curr Opin Insect Sci*, 29: 102-109.
- ARCA B., STRUCHINER C. J., PHAM V. M., *et al.*, 2014 – *Positive selection drives accelerated evolution of mosquito salivary genes associated with blood-feeding*. - *Insect Mol. Biol.*, 23(1): 122-131.
- BADU K., SIANGLA J., LARBI 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*. - *Malar J*, 11 (1): 318.
- DOUCOURE S., CORNELIE S., PATRAMOOL S., *et al.*, 2013 – *First screening of Aedes albopictus immunogenic salivary proteins*. - *Insect Mol Biol*, 22(4): 411-423.
- DOUCOURE S., MOUCHET F., CORNELIE S., *et al.*, 2012a – *Evaluation of the human IgG antibody response to Aedes albopictus saliva as a new specific biomarker of exposure to vector bites*. - *PLoS Negl Trop Dis*, 6(2): e1487.
- DOUCOURE S., MOUCHET F., COURNIL A., *et al.*, 2012b – *Human Antibody Response to Aedes aegypti Saliva in an Urban Population in Bolivia: A New Biomarker of Exposure to Dengue Vector Bites*. - *Am J Trop Med Hyg*, 87 (3): 504-510.
- DRAME P. M., POINSIGNON A., BESNARD P., *et al.*, 2010 – *Human antibody response to Anopheles gambiae saliva: an immuno-epidemiological biomarker to evaluate the efficacy of insecticide-treated nets in malaria vector control*. - *Am J Trop Med Hyg*, 83(1): 115-121.
- DRAME P. M., POINSIGNON A., DECHAVANNE C., *et al.*, 2015 – *Specific antibodies to Anopheles gSG6-P1 salivary peptide to assess early childhood exposure to malaria vector bites*. - *Malar J*, 14: 285.
- ELANGA NDILLE E., DOUCOURE S., DAMIEN G., *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 Negl Trop Dis*, 6 (11): e1905.
- ELANGA NDILLE E., DOUCOURE S., POINSIGNON A., *et al.*, 2016 – *Human IgG Antibody Response to Aedes Nterm-34kDa Salivary Peptide, an Epidemiological Tool to Assess Vector Control in Chikungunya and Dengue Transmission Area*. - *PLoS Negl Trop Dis*, 10 (12): e0005109.
- FONTAINE A., DIOUF I., BAKKALI N., *et al.*, 2011 – *Implication of hematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions*. - *Parasit Vectors*, 4: 187.
- GOSSNER C. M., DUCHEYNE E., SCHAFFNER F., 2018 – *Increased risk for autochthonous vector-borne infections transmitted by Aedes albopictus in continental Europe*. - *Euro Surveill*, 23 (24).
- IDRIS Z. M., CHAN C. W., MOHAMMED M., *et al.*, 2017 – *Serological measures to assess the efficacy of malaria control programme on Ambae Island, Vanuatu*. - *Parasit Vectors*, 10 (1): 204.
- KRAEMER M. U., SINKA M. E., DUDA K. A., *et al.*, 2015 – *The global distribution of the arbovirus vectors Aedes aegypti and Ae. albopictus*. - *Elife*, 4: e08347.
- LEHANE M. J., 1991 - *Biology of blood-sucking insects*. London, Harper Collins Academic.
- LOMBARDO F., RONCA R., RIZZO C., *et al.*, 2009 – *The Anopheles gambiae salivary protein gSG6: an anopheline-specific protein with a blood-feeding role*. - *Insect Biochem Mol Biol*, 39 (7): 457-466.
- MARIE A., RONCA R., POINSIGNON A., *et al.*, 2015 – *The Anopheles gambiae cE5 salivary protein: a sensitive biomarker to evaluate the efficacy of insecticide-treated nets in malaria vector control*. - *Microbes Infect*, 17(6): 409-416.
- MATHIEU-DAUDE F., CLAVERIE A., Plichart C., *et al.*, 2018 – *Specific human antibody responses to Aedes aegypti and Aedes polynesiensis saliva: A new epidemiological tool to assess human exposure to disease vectors in the Pacific*. - *PLoS Negl Trop Dis*, 12(7): e0006660.
- NARASIMHAN S., SCHLEICHER T. R., FIKRIG E., 2017 – *Translation of Saliva Proteins Into Tools to Prevent Vector-Borne Disease Transmission*. In: *Arthropod vector: controller of disease transmission*, S. K. Wikel, S. Aksoy and G. Dimopoulos Ed., Elsevier/Academic Press and imprint of Elsevier, London; San Diego, CA, pp. 249-300.
- NEAFSEY D. E., WATERHOUSE R. M., ABAI M. R., *et al.*, 2015 – *Mosquito genomics. Highly evolvable malaria vectors: the genomes of 16 Anopheles mosquitoes*. - *Science*, 347 (6217): 1258522.
- ORLANDI-PRADINES E., ALMERAS L., DENIS DE SENNEVILLE L., *et al.*, 2007 – *Antibody response against saliva antigens of Anopheles gambiae and Aedes aegypti in travellers in tropical Africa*. - *Microbes Infect*, 9 (12-13): 1454-1462.
- PIRONE L., RIPOLL-ROZADA J., LEONE M., *et al.*, 2017 – *Functional analyses yield detailed insight into the mechanism of thrombin inhibition by the antihemostatic salivary protein cE5 from Anopheles gambiae*. - *J Biol Chem*, 292 (30): 12632-12642.
- POINSIGNON A., CORNELIE S., MESTRES-SIMON M., *et al.*, 2008 – *Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to Anopheles bites*. - *PLoS One*, 3 (6): e2472.
- PROIETTI C., VERRA F., BRETSCHER M. T., *et al.*, 2013 – *Influence of infection on malaria-specific antibody dynamics in a cohort exposed to intense malaria transmission in northern Uganda*. - *Parasite Immunol*, 35 (5-6): 164-173.
- RIBEIRO J. M., ARCA B., LOMBARDO F., *et al.*, 2007 – *An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, Aedes aegypti*. - *BMC Genomics*, 8(1): 6.
- RIBEIRO J.M., CHARLAB R., PHAM V. M., *et al.*, 2004 – *An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito Culex pipiens quinquefasciatus*. - *Insect Biochem Mol Biol*, 34 (6): 543-563.
- RIBEIRO J. M., MANS B. J., ARCA B., 2010 – *An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera*. - *Insect Biochem Mol Biol*, 40(11): 767-784.
- RIBEIRO J. M. C., 1995 - *Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists?* - *Infect Agents Dis*, 4 (3): 143-152.
- RIBEIRO J. M. C., ARCA B., 2009 - *From Sialomes to the Sialoverse: An Insight into Salivary Potion of Blood-Feeding Insects*. - *Advances in Insect Physiology*, 37: 59-118.
- RIBEIRO J. M. C., MARTIN-MARTIN I., MOREIRA F.R., *et al.*, 2018 - *A deep insight into the male and female sialotranscriptome of adult Culex tarsalis mosquitoes*. - *Insect Biochem Mol Biol*, 95: 1-9.
- RIZZO C., LOMBARDO F., RONCA R., *et al.*, 2014 – *Differential antibody response to the Anopheles gambiae gSG6 and cE5 salivary proteins in individuals naturally exposed to bites of malaria vectors*. - *Parasit Vectors*, 7 (1): 549.
- RIZZO C., RONCA R., FIORENTINO G., *et al.*, 2011 – *Humoral response to the Anopheles gambiae salivary protein gSG6: a serological indicator of exposure to Afrotropical malaria vectors*. - *PLoS One*, 6 (3): e17980.
- RONCA R., KOTSIFYAKIS M., LOMBARDO F., *et al.*, 2012 – *The Anopheles gambiae cE5, a tight- and fast-binding thrombin inhibitor with post-transcriptionally regulated salivary-restricted expression*. - *Insect Biochem Mol Biol*, 42 (9): 610-620.

- SAGNA A. B., YOBO M. C., ELANGA NDILLE E., *et al.*, 2018 - *New Immuno-Epidemiological Biomarker of Human Exposure to Aedes Vector Bites: From Concept to Applications.* - Trop Med Infect Dis, 3 (3).
- STONE W., BOUSEMA T., JONES S., *et al.*, 2012 – *IgG responses to Anopheles gambiae salivary antigen gSG6 detect variation in exposure to malaria vectors and disease risk.* - PLoS One, 7 (6): e40170.
- TRAORE D. F., SAGNA A. B., ADJA A.M., *et al.*, 2018 – *Evaluation of Malaria Urban Risk Using an Immuno-Epidemiological Biomarker of Human Exposure to Anopheles Bites.* - Am J Trop Med Hyg, 98 (5): 1353-1359.
- YA-UMPHAN P., CERQUEIRA D., PARKER D.M., *et al.*, 2017 – *Use of an Anopheles Salivary Biomarker to Assess Malaria Transmission Risk Along the Thailand-Myanmar Border.* - J Infect Dis, 215 (3): 396-404.