

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Lucie Tichá

***Sauroleishmania*: jejich vývoj v přenašeči a v hostiteli**

*Sauroleishmania*: development in the vectors and hosts

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí závěrečné práce: prof. RNDr. Petr Volf, CSc.

Praha, 2019

**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 26.4.2019

Lucie Tichá

## **Poděkování**

V prvé řadě bych chtěla velmi poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Petru Volfovi, CSc. za pomoc, cenné rady a čas, který mi i přes své velké pracovní vytížení věnoval. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Jitce Myškové, PhD. za pomoc a vedení v začátcích mých experimentů. Velký dík patří také všem, kteří se jakkoliv na mé diplomové práci podíleli, především RNDr. Jovaně Sádlové, PhD. za konzultace, veškerou pomoc a milá slova s dávkou úsměvu, která vždy zlepšila den.

Děkuji také své rodině za podporu v průběhu celého mého studia i při sepisování této diplomové práce. Moc si toho vážím.

## Abstrakt

Leishmanie podrodu *Sauroleishmania* jsou parazity plazů, nejčastěji ještěřů, a nejsou patogenní pro člověka. Proto jsou opomíjenou skupinou a jejich životní cyklus nebyl dosud zcela objasněn. Přenášejí se zřejmě pozřením nakaženého přenašeče, za kterého jsou zpravidla považováni flebotomové rodu *Sergentomyia* (Diptera: Psychodidae). *Sauroleishmania* jsou tradičně řazeny do skupiny Hypopylaria a k jejich vývoji by mělo docházet pouze v zadní části trávicího traktu flebotomů. Cílem této práce je především shrnout dosavadní známé poznatky o podrodu *Sauroleishmania* a objasnit některé otázky týkající se vývoje sauroleishmanií v přenašeči a hostiteli.

První část experimentů se zabývala vývojem čtyř druhů sauroleishmanií ve vybraných druzích flebotomů rodů *Sergentomyia* a *Phlebotomus*. Schopnost nakazit některé flebotomy rodu *Phlebotomus* a vyvíjet v nich pozdní infekce byla prokázána u dvou druhů, *Leishmania* (*S.*) *adleri* a *L. (S.) hoogstraali*. *Leishmania (S.) adleri* se ve flebotomech *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. sergenti* vyvíjela hypopylárně, zatímco u *P. argentipes*, *P. orientalis* a *P. duboscqi* docházelo k anteriorní migraci leishmanií v trávicím traktu přenašeče (peripylární způsob vývoje). Tento způsob byl zaznamenán také při vývoji *Leishmania (S.) hoogstraali* v *P. argentipes* a *P. orientalis*. U obou dvou druhů sauroleishmanií navíc docházelo ke kolonizaci stomodeální valvy v *P. argentipes* a *P. orientalis*, což naznačuje možnost nákazy hostitele inokulativně při sání flebotomů. U dalších dvou studovaných druhů *L. (S.) gymnodactyli* a *L. (S.) tarentolae* nedocházelo k vývoji pozdních infekcí, promastigoti se nacházeli ve střevě flebotomů pouze den po infekci.

Další část experimentů byla věnována vývoji sauroleishmanií v hostiteli. Gekoni druhu *Paroedura picta* byli nakaženi dvěma druhy sauroleishmanií *L. (S.) adleri* nebo *L. (S.) hoogstraali*. Způsob nákazy byl perorální a intraperitoneální. Gekoni byli vyšetřováni na přítomnost leishmanií v různých intervalech po infekci pomocí xenodiagnostiky a PCR. Nákaza nebyla prokázána u žádného z infikovaných jedinců. Gekoni *Paroedura picta* tedy zřejmě nejsou vhodnými hostiteli těchto dvou druhů sauroleishmanií.

Klíčová slova: *Sauroleishmania*, flebotomové, plazi, životní cyklus, infekce, xenodiagnostika

## Abstract

*Leishmania* of subgenus *Sauroleishmania* are parasites of reptiles, most often lizards, and are not pathogenic for humans. Therefore, they are neglected group of pathogens and their life cycle is not well-known. They are transmitted probably by ingestion of infected vector which is usually considered as sand flies of genus *Sergentomyia* (Diptera: Psychodidae). *Sauroleishmania* are traditionally denominated in Hypopylaria and it is expected that their development is limited to sand fly hindgut. The main aim of this work is to summarize the present knowledge about *Sauroleishmania* life cycle and to elucidate some aspects of their development in the vector and host.

In the first part of thesis we studied development of four *Sauroleishmania* species in various sand flies of genera *Sergentomyia* and *Phlebotomus*. Late-stage infections of *Leishmania* (*S.*) *adleri* and *L. (S.) hoogstraali* were found in six and two sand fly species, respectively. Hypopylarian infections of *Leishmania* (*S.*) *adleri* were found in *Se. schwetzi*, *P. papatasi* and *P. sergenti*, while in *P. argentipes*, *P. orientalis* and *P. duboscqi* this *Sauroleishmania* migrated anteriorly in the midgut (peripylarian development). Similar type of development was observed also in *P. argentipes* and *P. orientalis* infected by *Leishmania* (*S.*) *hoogstraali*. Both *L. (S.) adleri* and *L. (S.) hoogstraali* colonized the stomodeal valve of *P. argentipes* and *P. orientalis* which suggest the possibility of inoculative transmission by sand fly bite. In other two species *L. (S.) gymnodactyli* and *L. (S.) tarentolae* late-stage infections were not observed, promastigotes were found in sand fly midgut on day 1 postinfection only.

The second part of thesis was aimed at experimental infections of *Sauroleishmania* in geckos *Paroedura picta*. These geckos were infected by *L. (S.) adleri* or *L. (S.) hoogstraali*, either intraperitoneally or perorally. The presence of parasites was examined in different time intervals postinfection by xenodiagnosis and PCR. All geckos were found negative, therefore we suppose that *Paroedura picta* is not a suitable host for these two *Sauroleishmania* species.

Key words: *Sauroleishmania*, sand flies, reptiles, life cycle, infection, xenodiagnosis

# Obsah

1. Úvod a cíle práce.....	6
2. Literární přehled.....	8
2.1. Původ a fylogenetické postavení podrodu <i>Sauroleishmania</i> .....	8
2.2. Hostitelé plazích leishmanií.....	12
2.3. Vývoj sauroleishmanií v přenašeči .....	16
3. Materiál a metodika.....	22
3.1. Složení použitých roztoků .....	22
3.2. Použité druhy leishmanií a jejich kultivace .....	22
3.3. Chov flebotomů .....	23
3.4. Chov gekonů .....	24
3.5. Experimentální infekce flebotomů.....	25
3.6. Měření morfologických forem.....	26
3.7. Experimentální infekce gekonů .....	27
3.8. Xenodiagnostika .....	28
3.9. PCR detekce sauroleishmanií .....	30
4. Výsledky.....	32
4.1. Experimentální infekce flebotomů.....	32
4.1.1. <i>Leishmania (S.) adleri</i> .....	32
4.1.2. <i>Leishmania (S.) gymnodactyli</i> .....	39
4.1.3. <i>Leishmania (S.) hoogstraali</i> .....	41
4.1.4. <i>Leishmania (S.) tarentolae</i> .....	47
4.2. Morfologické formy sauroleishmanií ve flebotomech.....	49
4.3. Experimentální infekce gekonů .....	56
5. Diskuze.....	60
6. Závěr.....	67
7. Seznam použité literatury.....	68

# 1. Úvod a cíle práce

Trypanosomatida je řád parazitických prvoků, do kterého spadá několik medicínsky či veterinárně významných rodů. Jedním z nich je i rod *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), rozšířený převážně v tropech a subtropích Starého i Nového světa, kde u lidí způsobuje leishmaniózu. Toto onemocnění má několik forem s různě těžkými projevy, přičemž nejzávažnější z nich, viscerální leishmanióza, může končit i smrtí. Přenašeči leishmanií jsou flebotomové (Diptera: Psychodidae), krevsající hmyz rodů *Phlebotomus*, *Lutzomyia* a *Sergentomyia*. Medicínsky významné jsou hlavně rody *Phlebotomus* a *Lutzomyia*, které přenáší leishmanie patogenní pro člověka.

Ačkoliv je rod *Leishmania* v povědomí především pro svůj dopad na lidské zdraví, leishmanie parazitují i u řady jiných obratlovců, převážně savců. Tito hostitelé zároveň mohou sloužit jako rezervoár leishmanií v přírodě a umožňují tak jejich další šíření. Zvláštní skupinu pak tvoří sauroleishmanie, které ve svém životním cyklu využívají jako hostitele plazy; právě díky tomu získaly i své pojmenování. O *Sauroleishmania* se dříve uvažovalo jako o samostatném rodu, nyní však díky sekvenaci DNA víme, že náleží do rodu *Leishmania* a tvoří tak jeden z jeho podrodů. Sauroleishmanie jsou rozšířené ve Starém světě a za jejich přenašeče jsou považováni flebotomové rodu *Sergentomyia*. V nich se sauroleishmanie vyvíjejí hypopylárně, tedy v zadním střevě. Hostiteli jsou nejčastěji ještěři, napadat mohou ale i jiné plazy. K nákaze pak zřejmě dojde kontaminativně pozřením infikovaného vektora, avšak vyloučen není ani přenos inokulací při sání flebotomů.

Sauroleishmanie nejsou patogenní pro člověka, a tak bývají mnohdy opomíjenou skupinou. Publikací, které pojednávají o těchto plazích leishmaniích je poskrovnu, a často jsou již staršího data. Navíc se některé informace různých autorů rozcházejí. Proto je jedním ze základních cílů této diplomové práce shrnout a ucelit dosavadní poznatky o tomto podrodu. Experimentální část této práce se pak zabývá, jak již název napovídá, vývojem těchto leishmanií v přenašeči a v hostiteli.

První část pokusů je věnována vývoji sauroleishmanií ve flebotomech. Kromě experimentálních infekcí flebotomů rodu *Sergentomyia*, kteří jsou považováni za přirozené přenašeče plazích leishmanií, jsme se snažili ověřit infektivitu i pro jiné druhy flebotomů, jejichž výskyt odpovídá rozšíření našich sauroleishmanií. U nakažených samic jsme studovali intenzitu infekce a také lokalizaci leishmanií v trávicím traktu flebotomů. Druhá část pokusů byla věnována vývoji v obratlovčím hostiteli. Naší snahou bylo infikovat gekony druhu *Paroedura picta* sauroleishmaniemi a následně v nich sledovat vývoj

a lokalizaci těchto parazitů. Většina autorů se totiž dosud věnovala pouze popisu různých druhů sauroleishmanií z plazů odchycených z volné přírody.

**Cíle diplomové práce:**

- Shrnout dosavadní známé poznatky o podrodu *Sauroleishmania*.
- Porovnat vývoj čtyř druhů leishmanií podrodu *Sauroleishmania* v různých flebotomech rodů *Sergentomyia* a *Phlebotomus*.
- Popsat jednotlivá vývojová stádia sauroleishmanií v různých fázích infekce v přenašeči.
- Experimentálně infikovat gekony druhu *Paroedura picta* a studovat průběh infekce.
- Pomocí xenodiagnostiky zjistit, zda jsou gekoni infekční pro flebotomy.

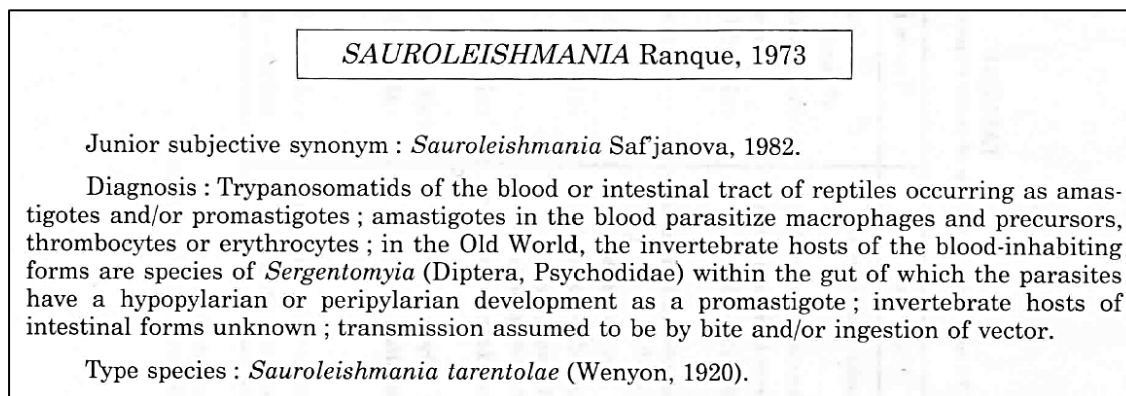


## 2. Literární přehled

### 2.1. Původ a fylogenetické postavení podrodu *Sauroleishmania*

První zmínky o plazích bičíkovecch pocházejí již ze začátku 20. století. Jeden z prvních objevů učinili Chatton & Blanc (1914; cit. dle Telford, 2009), kteří pozorovali amastigoty v krevních buňkách u *Tarentola mauritanica*. Od té doby bylo z tohoto druhu gekona získáno několik různých izolátů bičíkovecch tvarem připomínající leptomonády (shrnuto v Telford, 2009). Sergent a kol. (1915) se domnívali, že by gekoni mohli sloužit jako rezervoár leishmanií patogenních pro člověka a díky tomu byla výzkumu plazích bičíkovecch věnována značná pozornost. Autoři se tedy snažili ověřit infektivitu sauroleishmanií pro různé druhy savců, a to včetně několika lidských dobrovolníků. Nicméně schopnost plazích leishmanií nakazit savce nebyla prokázána (shrnuto v Belova, 1971). Parazité byli izolováni z různých druhů ještěřů, nejčastěji z krve nebo vnitřních orgánů, nacházeli je ale i v kloace. Jejich rodové či druhové zařazení bylo nejasné, pro svůj tvar byli mnohdy řazeni do rodů *Leptomonas* nebo *Herpetomonas* (shrnuto v Telford, 2009). Až Wenyon (1920) popsal nový druh z *Chamaeleo vulgaris* jako *Leishmania chamaeleonis* a druh parazitující u *Tarentola mauritanica* označil jako *Leishmania tarentolae*.

Samostatný rod *Sauroleishmania* ustanovil Ranque v roce 1973. Stejný název použila i Safjanova v roce 1982, která zároveň navrhla oddělit všechny leishmanie napadající plazy od těch, které napadají savce a člověka (Killick-Kendrick a kol., 1986). Killick-Kendrick a kol. (1986) následně seskupili do rodu *Sauroleishmania* další druhy a sepsali jeho novou definici (viz obr. 1). V současné době je známo 21 druhů sauroleishmanií (viz tab. 1), včetně 2 zatím nepojmenovaných druhů (shrnuto v Akhouni a kol., 2016).



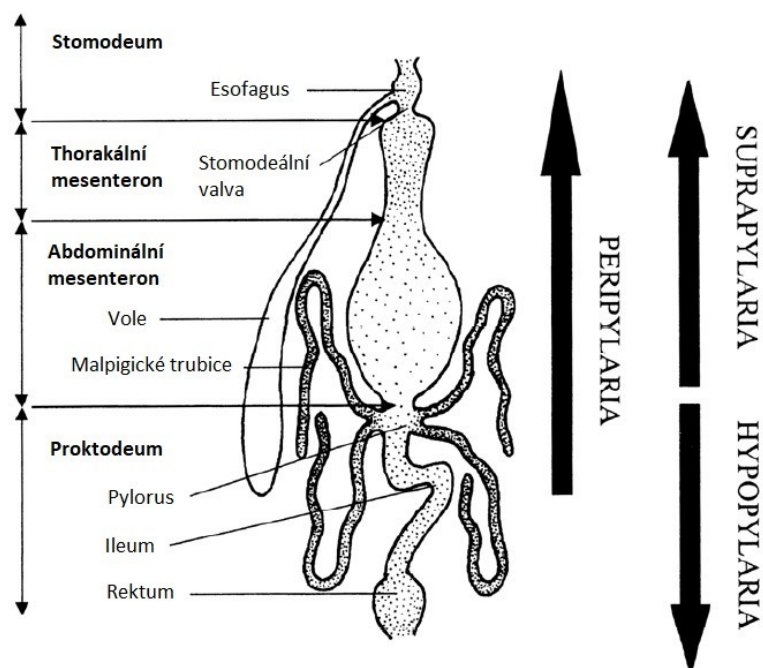
**Obr. 1:** Definice rodu *Sauroleishmania* (podle Killick-Kendrick a kol., 1986).

**Tab. 1:** Zástupci podrodu *Sauroleishmania*, jejich přenašeči a rozšíření (upraveno podle Wilson & Southgate, 1979; Akhoundi a kol., 2016; Schönian a kol., 2018).

Přenašeči patří do dvou rodů, *Sergentomyia* (*Se.*) a *Phlebotomus* (*P.*)

<b>Druh</b>	<b>Popsal (rok)</b>	<b>Vektor</b>	<b>Rozšíření</b>
<i>L. (S.) adleri</i>	Heisch, 1954	<i>Se. clydei</i> , <i>Se. dentata</i>	Irán, Keňa
<i>L. (S.) agamae</i>	David, 1929	<i>P. caucasicus</i> , <i>P. papatasi</i> , <i>Se. sintoni</i>	Východ mediteránu, Palestina, Libanon, Izrael, Turkmenistán
<i>L. (S.) ceramodactyli</i>	Adler & Theodor, 1929	<i>P. caucasicus</i> , <i>P. papatasi</i> , <i>Se. sintoni</i>	Východ mediteránu, Irák, Súdán, Turkmenistán
<i>L. (S.) chamaeleonis</i>	Wenyon, 1920	neznámý	Egypt, Izrael
<i>L. (S.) davidi</i>	Strong, 1924	neznámý	Střední Afrika
<i>L. (S.) gulikae</i>	Ovezmukammedov & Safjanova, 1987	neznámý	Turkmenistán
<i>L. (S.) gymnodactyli</i>	Khodukin & Sofiev, 1929	<i>P. caucasicus</i> , <i>Se. clydei</i> , <i>Se. dentata</i> , <i>P. papatasi</i> , <i>Se. sintoni</i>	Súdán, Irán, Turkmenistán
<i>L. (S.) helioscopi</i>	Khodukin & Sofiev, 1940	neznámý	Turkmenistán
<i>L. (S.) hemidactyli</i>	Mackie a kol., 1923	neznámý	Indie
<i>L. (S.) henrici</i>	Leger, 1918	neznámý	Martinik (?)
<i>L. (S.) hoogstraali</i>	McMillan, 1965	<i>Se. clydei</i>	Súdán, Senegal
<i>L. (S.) nicollei</i>	Khodukin & Sofiev, 1940	neznámý	Turkmenistán
<i>L. (S.) phrynocephali</i>	Khodukin & Sofiev, 1940	neznámý	Turkmenistán
<i>L. (S.) platycephala</i>	Telford, 2008	neznámý	Tanzánie
<i>L. (S.) senegalensis</i>	Ranque, 1973	<i>Se. dubia</i>	Senegal
<i>L. (S.) sofieffi</i>	Markov a kol., 1964	neznámý	Rusko, pobřeží Kaspického moře
<i>L. (S.) tarentolae</i>	Wenyon, 1920	<i>Se. antennata</i> , <i>Se. minuta</i> , <i>P. papatasi</i>	Severní Afrika, Malta, Súdán, Alžírsko, Itálie, Francie, Malta
<i>L. (S.) zmeevi</i>	Andruchko & Markov, 1955	<i>Se. arpaklensis</i> , <i>P. papatasi</i>	Turkmenistán
<i>L. (S.) zuckermani</i>	Paperna a kol., 2001	neznámý	Súdán, Jižní Afrika
<i>L. (S.) sp. I</i>	Telford, 1979	neznámý	Pákistán
<i>L. (S.) sp. II.</i>	Telford, 1979	neznámý	Pákistán

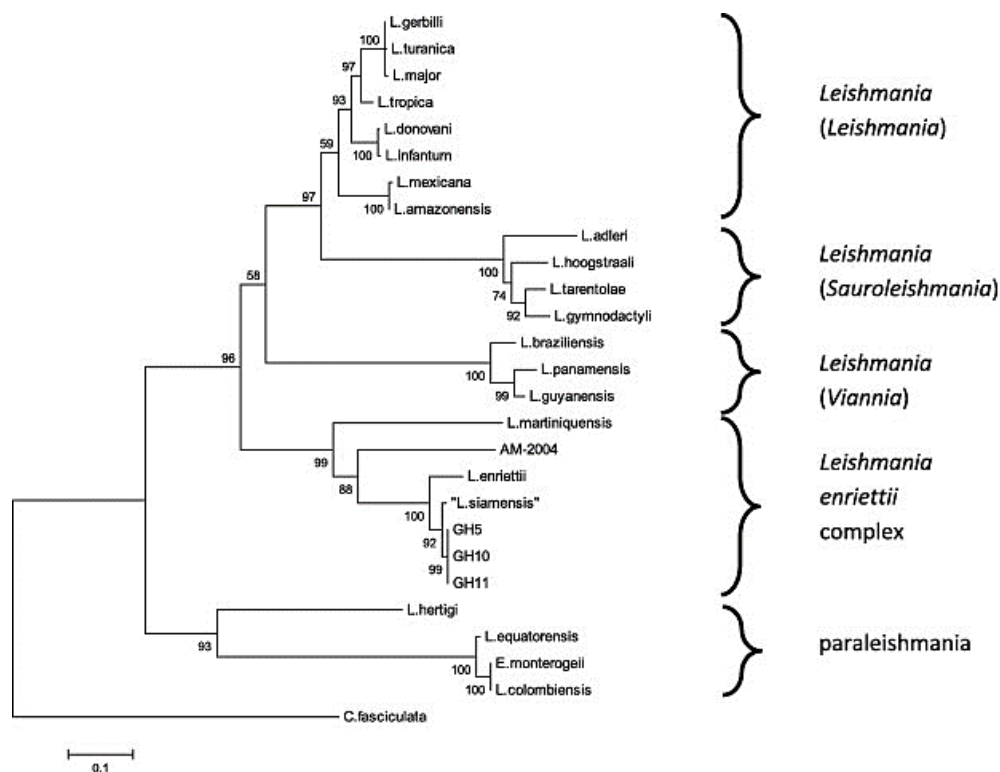
Fylogenetické postavení *Sauroleishmania* bylo dlouhou dobu nejasné a v průběhu let prošlo několika změnami. Důležitým milníkem pro klasifikaci leishmanií se stala studie Lainson & Shaw (1987), kteří rozdělili rod *Leishmania* na základě způsobu jejich vývoje v přenašeči (viz obr. 2) do tří podrodů: *Leishmania*, *Viannia* a *Sauroleishmania*. Pro podrod *Leishmania* je typický suprapylární způsob vývoje, kdy se leishmanie vyvíjejí v přední části trávicího traktu. Naopak leishmanie podrodu *Viannia* se vyvíjejí jak v zadním střevě, tak i mesenteronu. U těchto dvou podrodů je přenos parazitů umožněn díky inokulaci leishmanií při sání vektora. Do podrodu *Sauroleishmania* byly zařazeny leishmanie napadající plazy. Ty se vyvíjejí hypopylárně, tedy v zadním střevě a k jejich přenosu pak zřejmě dochází pozřením infikovaného vektora (shrnutí v Lainson & Shaw, 1987).



**Obr. 2:** Schématické znázornění rozdílu ve vývoji leishmanií skupiny Suprapylaria, Peripylaria a Hypopylaria (upraveno podle Sádlová, 1999).

Tento tradiční způsob rozdělení rodu *Leishmania* je mnohdy používán dodnes a v podstatě odpovídá některým novějším fylogenetickým studiím. Na základě sekvenace DNA víme, že *Sauroleishmania* skutečně náleží do rodu *Leishmania* a tvoří tak jeden z jeho podrodů (Croan a kol., 1997; Noyes a kol., 1997; shrnutí v Bates, 2007). Všechny tyto tři podrody jsou monofyletické, *Viannia* se bazálně odštěpuje od *Leishmania* a *Sauroleishmania* (Fraga a kol., 2010).

Jedna z novějších klasifikací navržená Cupollilo a kol. (2000) zahrnuje i druhy, které doposud stály mimo tyto tři podrody a rozděluje leishmanie do dvou fylogenetických linií. Linie *Euleishmania* zahrnuje čtyři podrody: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* a leishmanie komplexu *L. enriettii* (viz obr. 3). Paraleishmania pak zahrnuje spolu s *Endotrypanum* druhy *L. herreri*, *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. equatorensis* a *L. colombiensis*.



**Obr. 3:** Fylogenetický strom vytvořený na základě porovnání sekvencí ITS1 (upraveno podle Kwakye-Nuako a kol., 2015).

Geografický původ sauroleishmanií je zatím nejasný a mezi autory je toto téma hojně diskutované. Někteří se domnívají, že *Sauroleishmania* mají palearktický původ a poprvé se objevily u plazů již v období křídy. Leishmanie napadající savce se pak vyvinuly právě z těchto plazích leishmanií, a to v období kenozoika, kdy došlo k úbytku plazů a započala éra savců (Kerr, 2000). Naopak Noyes (1998) již dříve předložil hypotézu o evoluci *Sauroleishmania* až v mladších třetihorách, konkrétně v pozdním miocénu v Palearktické či Nearktické oblasti, důsledkem adaptace savčích leishmanií na plazy. Správnost těchto hypotéz se zatím nepodařila objasnit.

## 2.2. Hostitelé plazích leishmanií

Zástupci podrodu *Sauroleishmania* parazitují výhradně u plazů a jak již název napovídá, jejich hostiteli jsou převážně ještěři. Tyto leishmanie zřejmě nejsou úzce hostitelsky specifické, doposud byly izolovány z různých druhů ještěřů (viz tab. 2), nejčastěji z čeledí Agamidae, Gekkonidae, Iguanidae, Lacertidae a Scincidae (shrnutí v Belova, 1971; Wilson & Southgate, 1979).

**Tab. 2:** Vybrané druhy sauroleishmanií, jejich hostitelé a lokalizace parazitů v těchto hostitelích (upraveno podle Garnham, 1971; Wilson & Southgate, 1979).

Druh	Hostitel	Lokalizace
<i>L. (S.) adleri</i>	<i>Latasia longicaudata</i>	krev, kůže
<i>L. (S.) agamae</i>	<i>Agama stellio</i> , <i>A. sanguinolenta</i>	krev
<i>L. (S.) ceramodactyli</i>	<i>Ceramodactylus doriae</i>	krev
<i>L. (S.) gymnodactyli</i>	<i>Gymnodactylus caspius</i>	krev
<i>L. (S.) henrici</i>	<i>Anolis</i> sp.	krev, kloaka
<i>L. (S.) hemidactyli</i>	<i>Hemidactylus brooki</i>	krev
<i>L. (S.) hoogstraali</i>	<i>Hemidactylus turcicus</i>	krev
<i>L. (S.) chamaeleonis</i>	<i>Chamaeleon pumilus</i>	kloaka, střevo
<i>L. (S.) tarentolae</i>	<i>Tarentola mauritanica</i>	krev, slezina
<i>L. (S.) zmeevi</i>	<i>Eremias intermedia</i>	krev

Způsob, jakým se plazí leishmanie ve svých hostitelích vyvíjejí, nebyl zcela objasněn. Dle definice od Killick-Kendrick a kol. (1986) se sauroleishmanie v obratlovcích vyskytují ve formě promastigotů a/nebo amastigotů v makrofázích a monocytech nebo také v trombocytech a erytrocytech. Jeden z prvních nálezů leishmanií u gekonů druhu *Tarentola mauritanica* zaznamenali Sergent a kol. (1914) v Alžírsku. Krev gekonů byla kultivována v NNN médiu a přítomnost bičíkovců byla potvrzena u 15,7 % gekonů. Izolování bičíkovců byli morfologicky podobní promastigotům *Leishmania tropica* a díky tomu se o gekonech začalo uvažovat jako o rezervoáru kutánní leishmaniózy (Sergent a kol., 1915). Od té doby byla většina izolátů získána právě díky kultivaci krve nebo vnitřních orgánů, což byl zároveň nejefektivnější způsob pro potvrzení nákazy hostitele leishmaniami. Průkaz parazitů v krevních roztěrech či otiscích tkáně je totiž obtížný (shrnutí v Belova, 1971). Pouze několik druhů sauroleishmanií jako *L. (S.) chamaeleonis*, *L. (S.) henrici* a *L. (S.) davidi* bylo objeveno ve střevě či kloace hostitelů (Telford, 1979).

Nejvíce se vztahu mezi plazími leishmaniemi a jejich hostiteli věnovala Belova (1971). Ta v letech 1963-1966 zkoumala výskyt leishmanií napadající plazy v různých částech Turkmenistánu (viz tab. 3). Z celkového počtu 3 818 ještěřů a 9 hadů, byla u 11 z 21 zkoumaných druhů prokázána přítomnost leishmanií. Nejvyšší prevalence (15-30 %) byla popsána u druhů *Gymnodactylus caspius* a *Agama sanguinolenta*. Promastigoti leishmanií byli z hostitelů izolováni pomocí kultivace krve či tkáně v NNN médiu a krevním agaru.

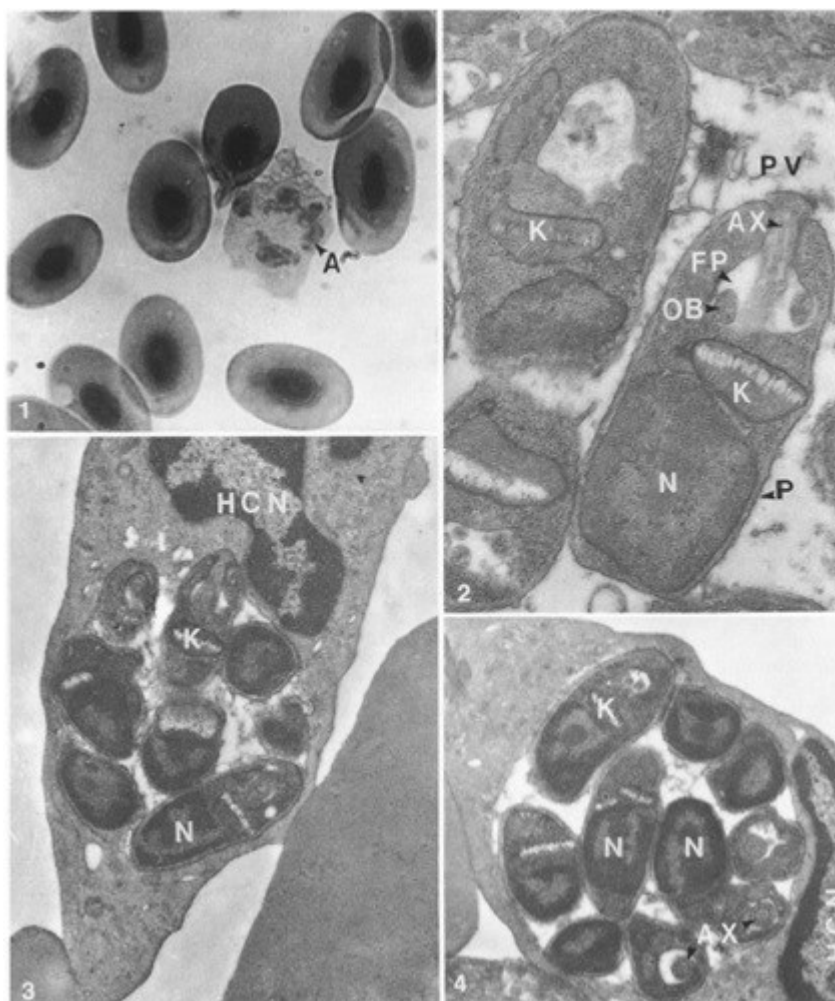
**Tab. 3:** Druhy ještěřů z oblasti Turkmenistánu vyšetřované na přítomnost promastigotů leishmanií (upraveno podle Wilson & Southgate, 1979).

Čeleď	Druh	Počet studovaných	Počet nakažených
Agamidae	<i>Agama caucasica</i>	39	0
	<i>Agama sanguinolenta</i>	683	41
	<i>Phrynocephalus helioscopus</i>	4	0
	<i>Phrynocephalus interscapularis</i>	926	17
	<i>Phrynocephalus mystaceus</i>	99	1
	<i>Phrynocephalus raddei raddei</i>	20	2
Lacertidae	<i>Eremias grammica</i>	88	2
	<i>Eremias guttulata guttulata</i>	169	3
	<i>Eremias intermedia</i>	277	3
	<i>Eremias lineolata</i>	113	5
	<i>Eremias scripta scripta</i>	4	0
	<i>Eremias velox</i>	354	11
Gekkonidae	<i>Crossobamon eversamani</i>	4	0
	<i>Gymnodactylus caspius</i>	907	139
	<i>Gymnodactylus russowi</i>	3	0
	<i>Teratoscincus scincus</i>	101	1
Anguidae	<i>Mabuya aurata</i>	7	0
	<i>Opisaurus apodus</i>	13	0
Varanidae	<i>Varanus griseus</i>	4	0
Scinciidae	<i>Eumeces schneideri princeps</i>	2	0
	<i>Eumeces taeniolatus</i>	1	0

Na rozdíl od promastigotů, kteří se kultivací získávají poměrně snadno, amastigotní formy sauroleishmanií nebyly doposud detailněji studovány a autoři je pozorují spíše zřídka. Poprvé popsali amastigoty leishmanií u *Tarentola mauritanica* v jižním Tunisku Chatton & Blanc (1914; cit. dle Telford, 2009). Autorka David (1929a, cit. dle Wilson & Southgate, 1979) izolovala nový druh leishmanie z *Agama stellio* v Palestině a popsala jej jako *L. (S.) agamae*. Leishmanie byly získány kultivací srdeční krve. Na krevních roztěrech se podařilo najít pouze jeden infikovaný monocyt s amastigoty. Tento objev o několik let později potvrdili i Edeson & Himo (1973), kteří pozorovali amastigoty na krevních roztěrech u 16 z 200 jedinců *A. stellio* v Libanonu. Několika z nich byla navíc odebrána srdeční krev na kultivaci. U 4 ze 14 ještěřů se po čase objevily leishmanie, ačkoliv se původně dle mikroskopického vyšetření roztěrů jevíli ještěři jako negativní.

Rioux a kol. (1969) ve Francii zaznamenali infekci *L. (S.) tarentolae* u *Tarentola mauritanica*. Amastigoti se nacházeli v monocytech ve skupinách po 3-10 a někteří byli i volně v plazmě. Telford (1979) popsal amastigotní formy dvou druhů sauroleishmanií u *Teratoscincus scincus* a *Agama agilis* v Pákistánu. Na roztěrech z periferní krve pozoroval parazity převážně uvnitř trombocytů. U *T. scincus* byla sklíčka připravována každé tři dny po dobu 38 dní a po tuto dobu docházelo ke zvyšování počtu amastigotů uvnitř trombocytů. U zástupců *A. agilis* bohužel nebylo možné delší pozorování, a tak nebyla parazitémie detailněji popsána. Elwasila (1988) prokázal infekci *L. (S.) tarentolae* u 3 z 16 gekonů druhu *Tarentola annularis* v Súdánu, nicméně parazitémie byly poměrně nízké. Na roztěrech z periferní krve byli amastigoti uvnitř leukocytů ve skupinách po 3-9 (viz obr. 4). V jedné z novějších studií Paperna a kol. (2001) popsali amastigoty *L. (S.) zuckermani* v erythrocytech *Pachydactylus turneri* v Jihoafrické republice. Autoři se domnívají, že mezi amastigoty tohoto druhu leishmanie nejsou oproti těm savčím žádné ultrastrukturální rozdíly. Naproti tomu některé starší práce (Garnham, 1971; Lewis, 1975) uvádějí, že mezi savčími a plazími leishmaniemi existují ultrastrukturální rozdíly v morfologii promastigotů, konkrétně v počtu subpelikulárních mikrotubulů a vzdálenosti mezi nimi.

Na základě zmíněných studií je pravděpodobné, že se sauroleishmanie v obratlovčím hostiteli opravdu vyskytují ve dvou formách: bezbičíkatí amastigoti uvnitř krevních buněk a podlouhlí promastigoti s bičíkem, kteří jsou volně v krvi. Avšak přesný mechanismus vývoje sauroleishmanií a jejich lokalizace v těle hostitele zatím zůstávají neobjasněny (shrnutu v Telford, 2009).



**Obr. 4:** Amastigoti *L. (S.) tarentolae* v leukocytech *Tarentola annularis* ve světelném (1) a transmisním elektronovém mikroskopu (2-4) (upraveno podle Elwasila, 1988).

Vysvětlivky: PV – parazitoformní vakuola; K – kinetoplast; A – axonema bičíku; FP – flagelární kapsa; HCN – jádro hostitelské buňky; N – jádro amastigota; OB – osmiofilní tělísko; P – pelikula

### Způsob přenosu

Vzhledem k typickému vývoji sauroleishmanií v zadním střevě flebotomů se jako nejpravděpodobnější způsob přenosu jeví pozření infikovaného přenašeče plazím hostitelem (Killick-Kendrick a kol., 1986). Nicméně ještěři (a plazi obecně) jsou v přírodě v úzkém kontaktu s flebotomy, kteří na nich sají. Již několik autorů pozorovalo anteriorní migraci sauroleishmanií v trávicím traktu flebotomů, proto není vyloučen ani přenos při sání vektora. Nicméně, úspěšný experimentální přenos sauroleishmanií na hostitele sáním vektora či jeho pozřením se doposud v laboratorních podmínkách nezdařil (shrnutí v Adler, 1964; Telford, 2009).



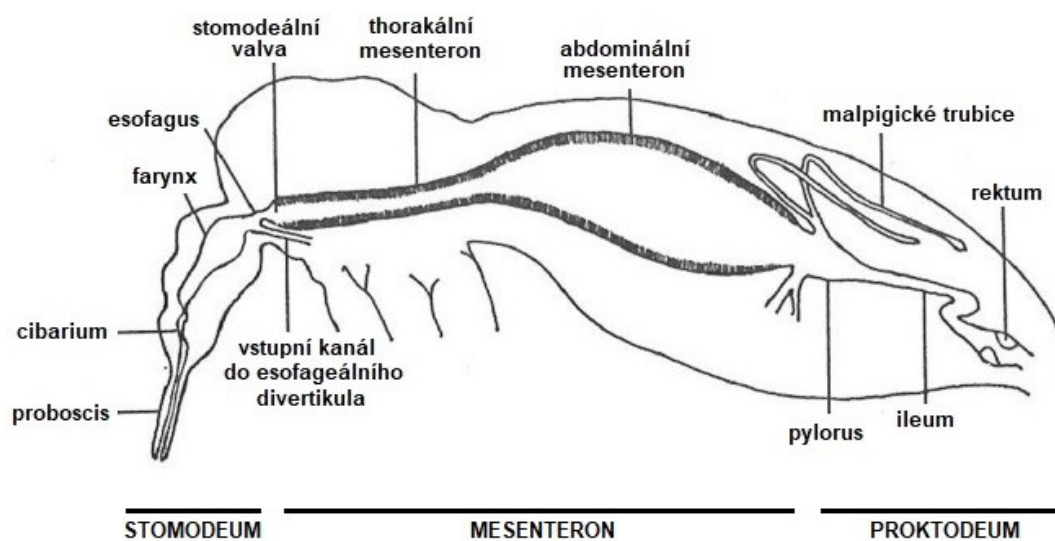
### 2.3. Vývoj sauroleishmanií v přenašeči

Sauroleishmanie mají dvouhostitelský způsob života a pro svůj přenos na plazí hostitele využívají flebotomy (Diptera: Psychodidae), v jejichž trávicím traktu dochází k množení a vývoji parazitů. Za přirozené přenašeče sauroleishmanií jsou považováni flebotomové rodu *Sergentomyia*, kteří ochotně sají na plazech (Minter & Wijers, 1963). Tradičně jsou plazí leishmanie řazeny do skupiny Hypopylaria, jejich vývoj je tedy omezen na zadní část trávicího traktu flebotomů (shrnutí v Lainson & Shaw, 1987). Celkově je však o vývoji sauroleishmanií ve flebotomech známo poměrně málo. Sporná je především anteriorní migrace některých druhů sauroleishmanií a také infektivita pro další druhy flebotomů rodu *Phlebotomus*.

Na plazech sají příležitostně také někteří flebotomové rodu *Phlebotomus*; toto chování bylo prokázáno u druhů *P. papatasi*, *P. caucasicus* a *P. sergenti* (Adler & Theodor, 1929; shrnutí v Belova, 1971). Mutinga & Ngoka (1981) provedli analýzu zdrojů krve u flebotomů v Keni a prokázali sání na plazech u druhů *P. martini* a *P. rodhaini*. Ochota některých druhů flebotomů sát na studenokrevných obratlovcích byla tedy potvrzena opakovaně.

#### **Trávicí trakt flebotomů**

Pro lepší názornost v nadcházejícím textu zde uvádím zjednodušený popis trávicího traktu flebotomů. Ten můžeme morfologicky rozdělit do tří hlavních částí: stomodeum, mesenteron a proktodeum (viz obr. 5). Stomodeum a proktodeum jsou pokryty chitinovou výstelkou, zatímco mesenteron je tvořen epitelem s mikrovily. Přední část traktu tvoří stomodeum, které se dále dělí na proboscis, cibarium, farynx, esofagus a esofageální divertikulum (vole). Přechodovou částí je stomodeální valva, na kterou pak navazuje thorakální a abdominální část mesenteronu. Trávicí trakt je zakončen proktodeem (zadním střevem). To se skládá z pyloru, ilea, rektálních ampulí a rekta. Od mesenteronu je proktodeum odděleno pylorickou valvou, kde dochází k vyústění malpighických trubic. Po nasátí krve je buňkami mesenteronu syntetizována peritrofická matrix (shrnutí v Killick-Kendrick, 1979), která je tvořena z chitinu, proteinů a proteoglykanů (shrnutí v Peters, 1992).

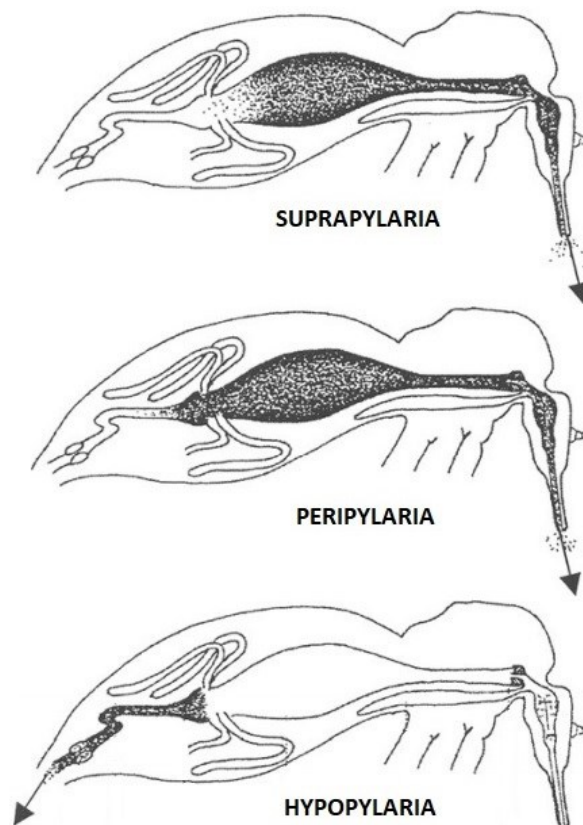


**Obr. 5:** Schéma trávicího traktu flebotomů  
(upraveno podle Killick-Kendrick, 1979).

### Vývoj ve flebotomech

Přesný způsob vývoje sauroleishmanií v přenašeči není znám a studií věnujících se tomuto tématu je málo. Přesto bych ráda uvedla základní schéma vývoje tohoto podrodu. Krátce po nasátí krve s amastigoty sauroleishmanií se nejprve bičíkovci množí v endoperitrofickém prostoru v oblasti mesenteronu. Po rozpadu peritrofické matrix sauroleishmanie migrují do proktodea, zadní části trávicího traktu, kde dochází k jejich přichycení k chitinózní výstelce pyloru, ilea či rekta. (shrnuto v Adler, 1964; Bates, 2007; Telford, 2009). Tento způsob vývoje je označován jako hypopylární. Naproti tomu peripylární leishmanie z podrodu *Viannia* se vyvíjejí taktéž v zadním střevě, ale zároveň i v mesenteronu. Leishmanie skupiny Suprapylaria se po rozpadu peritrofické matrix přichycují k mikrovilárnímu povrchu mesenteronu a v proctodeu se nevyvíjejí (viz obr. 6) (shrnuto v Lainson & Shaw, 1987).

Ve střevě flebotomů zaznamenali autoři různé formy sauroleishmanií a zatím se nepodařilo objasnit, které z těchto forem jsou infekční pro plazy. Adler & Theodor (1929) se domnívají, že pro plazího hostitele by mohly být infekční krátké formy s bičíkem nebo krátké bezbičíkaté.



**Obr. 6:** Způsob vývoje leishmanií v trávicím traktu flebotomů (upraveno podle Lawyer & Perkins, 2000).

Adler & Theodor (1929) sáli samice druhu *Phlebotomus papatasi* na gekonovi, který byl přirozeně infikovaný *L. (S.) ceramodactyli*. U 6 ze 17 nasátých samic byla potvrzena nákaza. Infekce byly převážně silné, leishmanie se nacházely v mesenteronu a též v proktodeu, kde docházelo k přichycení bičíkovců k chitinózní výstelce pyloru. U silných infekcí byly navíc leishmanie objeveny i v oblasti cardie, tedy těsně za stomodeální valvou. Autoři taktéž stejným druhem sauroleishmanie experimentálně infikovali samice *P. papatasi* sáním přes membránu, přičemž 109 z celkových 115 samic bylo pozitivních. Leishmanie byly lokalizovány především v oblasti zadního střeva. U velmi silných infekcí byli bičíkovci opět pozorováni i v oblasti cardie, kde navíc evidentně docházelo k jejich přichycení. Podle autorů se několik dní po infekci v proktodeu nejprve vyskytovaly dlouhé štíhlé formy s bičíkem, které se přichytávaly k chitinózní výstelce pylorické valvy. Středně dlouhé a krátké formy pak autoři pozorovali přichycené po celé délce proktodea, několik bičíkovců bylo v zadním střevě volně.

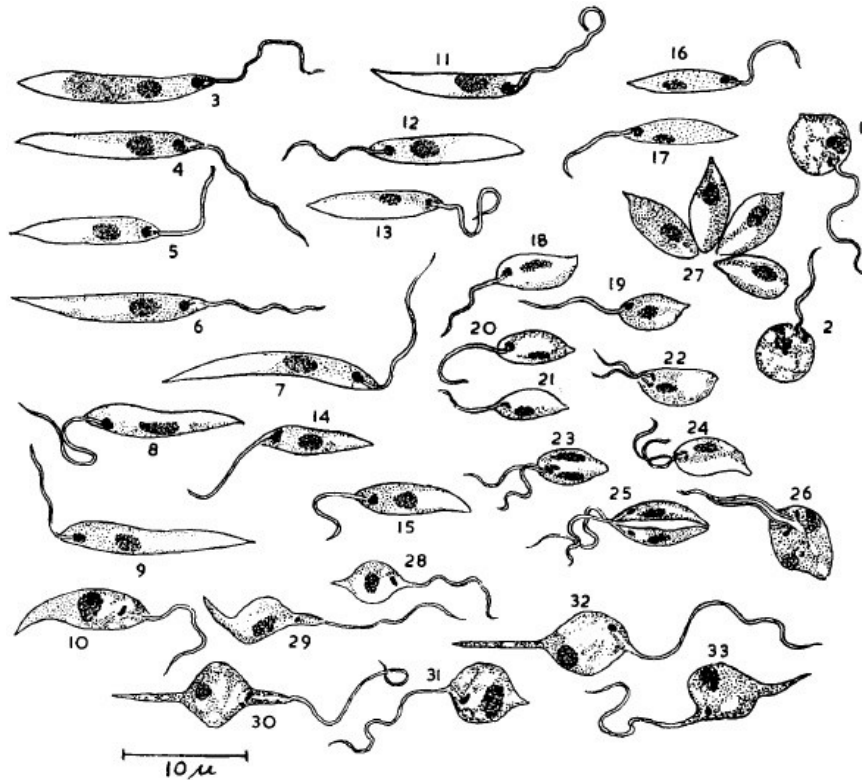
V téže studii autoři porovnávali vývoj *L. (S.) ceramodactyli* a *L. (S.) tarentolae*. Samice *P. papatasi* byly infikovány dvěma kmeny *L. (S.) tarentolae*. Tři až pět dní po sání byly leishmanie přítomny v oblasti cardie, avšak překvapivě nebyli nalezeni žádní bičíkovci v proktodeu (Adler & Theodor, 1929).

Autorka David (1929b; cit. dle Killick-Kendrick, 1979) infikovala *P. papatasi* experimentálním sáním přes membránu druhem *L. (S.) agamae*. Z 25 samic bylo 22 pozitivních 1-5 dní po infekci. Sauroleishmanie se vyvíjely hlavně v zadním střevě, jen u opravdu silných infekcí byli bičíkovci pozorováni také v thorakální části mesenteronu.

Adler & Theodor (1935) infikovali samice *P. parroti* (= *Se. minuta*; shrnuto v Telford, 2009) sáním na gekonovi *Tarentola mauritanica*, který byl pozitivní na infekci *L. (S.) tarentolae* a *Trypanosoma platydactyli*. Leishmanie byly pozorovány v oblasti mesenteronu a taktéž v cardii. Naproti tomu Parrot (1934a, 1934b, 1935; cit. dle Killick-Kendrick, 1979) infikoval stejným druhem sauroleishmanie flebotomy druhu *P. minutus parroti* (= *Se. antennata*; shrnuto v Telford, 2009). Parazit se v nasáté krvi hojně množili, nicméně po defekaci došlo k jejich vyloučení spolu se zbytky potravy. Z 53 samic vypitvaných před úplným strávením krve byla u 35 potvrzena infekce sauroleishmanií v zadní části střeva, nicméně bičíkovci jeví známky poškození. Po defekaci bylo vypitváno dalších 140 samic flebotomů a u žádné z nich nebyla infekce přítomna.

Rozdíly ve způsobu vývoje *L. (S.) tarentolae* v různých druzích flebotomů mohou být dle Killick-Kendrick (1979) zapříčiněné několika důvody. Je možné, že *Se. antennata* není přirozeným přenašečem tohoto druhu sauroleishmanie, zatímco *P. papatasi* ano. Dále mohlo dojít k záměně *L. (S.) tarentolae* a *T. platydactyli* ve střevě flebotoma, protože infekce v gekonovi byla smíšená, nebo také mohl být použit jiný kmen či dokonce odlišný druh sauroleishmanie, jelikož *T. mauritanica* by mohla být hostitelem různých druhů plazích leishmanií.

Heisch (1958) objevil samice *Se. clydei* přirozeně infikované plazími leishmaniemi. Bičíkovci se vyskytovali v anteriorním (thorakálním) mesenteronu. Pozorovaní parazité byli podobní těm, které Heisch popsal z kultivace srdeční krve ještěřů druhu *Latastia longicaudata* jako *L. (S.) adleri* (viz obr. 7), a tak se domníval, že by se mohlo jednat právě o tento druh sauroleishmanie, jelikož byli flebotomové odchyceni ve stejné oblasti jako infikovaní ještěři.



**Obr. 7:** Morfologické formy *L. (S.) adleri* v kultuře s NNN médiem  
(upraveno podle Heisch, 1958).

McMillan (1965) popsal nový druh *L. (S.) hoogstraali* z gekona *Hemidactylus turcicus*. Na infikovaném gekonovi nechal sít samice *P. papatasi*. Všechny 38 samic bylo 7. den po infekci negativní na leishmaniovou infekci.

Lainson a kol. (1977) infikovali flebotomy druhu *Lutzomyia longipalpis* promastigoty *L. (S.) hoogstraali*. Nákaza byla potvrzena pouze u 1 z 18 samic nasátých přes membránu. Leishmanie byly přítomny volně v mesenteronu a pyloru, nicméně infekce byla velmi slabá a bičíkovci na první pohled jeví známky poškození. Důvodem, proč se nepodařilo infekci v *Lu. longipalpis* uchytit, je dle autorů nekompetentnost tohoto vektora. *Lutzomyia longipalpis* je přenašečem leishmanií v Novém světě, kdežto sauroleishmanie jsou rozšířeny ve Starém světě, a tak by za běžných podmínek nedošlo k jejich setkání. Mimo to autoři zmiňují i fakt, že vlivem dlouhodobější kultivace mohlo dojít ke snížení infekтивности tohoto izolátu *L. (S.) hoogstraali*.

Killick-Kendrick (1979) popsal ve své práci flebotomy *Sergentomyia minuta* přirozeně infikované promastigoty sauroleishmanií, které objevil prof. J. A. Rioux v roce 1969 při odchycích na jihu Francie. U dvou samic byla objevena střední až silná infekce

promastigotů v oblasti pyloru a ilea. Další samice měla velmi silnou infekci v mesenteronu, nikoliv však v pyloru či ileu. V tomto případě byly dokonce leishmanie přichyceny na stomodeální valvě. Ve všech případech autor také zmiňuje přítomnost promastigotů v malpigických trubicích. Rioux se domníval, že se jedná o parazita druhu *L. (S.) tarentolae*, jelikož byli flebotomové odchyceni v těsné blízkosti gekonů, ze kterých byl tento druh sauroleishmanie izolován. Avšak podle Killick-Kendrick (1979) je možné, že tito flebotomové byli nakaženi také některými jednohostitelskými trypanosomatidy, vzhledem k přítomnosti bičíkovců v malpigických trubicích, což není pro leishmanie typické.

Shatova a kol. (1991) experimentálně infikovali samice flebotomů druhu *Sergentomyia arpaklensis* sauroleishmanií *L. (S.) gymnodactyli*. Ačkoliv se parazité po infekci hojně množili v natrávené krvi, poté došlo k jejich vyloučení spolu se zbytky potravy. Zdá se, že ke konci trávení nedošlo k úplnému rozpadu peritrofické matrix, což znemožnilo leishmaniím jejich únik a přichycení ve střevě přenašeče. Autoři předpokládají, že pro *L. (S.) gymnodactyli* není *Se. arpaklensis* vhodným vektorem, přestože je hojně rozšířena v oblasti výskytu tohoto druhu sauroleishmanie. Naproti tomu Saf'janova & Alexeieff (1967; cit. dle Telford, 2009) uvádějí, že se *L. (S.) gymnodactyli* vyvíjela ve střevě *Se. arpaklensis*, a to v oblasti mesenteronu a proktodea.

Rashti a kol. (1994) popsali přirozené infekce *L. (S.) gymnodactyli* v *Sergentomyia sintoni*. Z celkem 403 odchycených a vypitvaných samic bylo 60 pozitivních na infekci leishmaniemi, všechny lokalizované v mesenteronu. Autoři taktéž izolovali bičíkovce z gekona druhu *Gymnodactylus caspius*. U obou izolátů byla provedena analýza izoenzymů a byly označeny jako *L. (S.) gymnodactyli*.

Rassi a kol. (1997) poprvé popsali přirozené infekce promastigotů v *Sergentomyia dentata*. Autoři se domnívali, že by tento druh flebotoma mohl být zapojen do přenosu plazích leishmanií. Nicméně bližší informace nezmiňují. Bližší neurčenou infekci promastigotů sauroleishmanií zmiňují také Zhang & Leng (1997) u flebotomů druhu *Sergentomyia sinkiangensis*. Bičíkovci byli pozorováni v mesenteronu i v zadním střevě.

*Leishmania (S.) adleri* byla izolována z flebotomů *Se. bedfordi*, *Se. clydei* a *Se. squamipleuris* v Keni (shrnuto v Kaddu, 1986). Infekce plazími leishmaniemi byly popsány i u druhů *Se. clydei*, *Se. dentata* a *Se. sintoni* v Íránu (Karimi a kol., 2014). Nicméně ani v těchto dvou studiích autoři nezmiňují bližší informace o lokalizaci a způsobu vývoje sauroleishmanií v přenašečích.

### 3. Materiál a metodika

#### 3.1. Složení použitých roztoků

##### Ředící roztok (počítání leishmanií v Bürkerově komůrce)

0,85% NaCl (fyziologický roztok) + 1% formaldehyd (CH<sub>2</sub>O)

##### Médium pro kultivaci leishmanií

M199 (Sigma), 20 % inaktivované fetální kravské sérum (Gibco), 2 % sterilní moč, 1 % BME vitamíny (Sigma), 0,8 % amikin (Bristol-Myers Squibb)

##### Krevní agar pro kultivaci leishmanií

2 g Bacto Neopeptone (BD), 2 g Bacto Agar (BD), 0,6 g NaCl doplněno do 100 ml H<sub>2</sub>O; sterilizováno 20 min autoklávem a po ochlazení přidáno 25 ml sterilní defibrilované králičí krve (Bioveta)

#### 3.2. Použité druhy leishmanií a jejich kultivace

Pro účely této diplomové práce byly použity 4 druhy leishmanií podrodu *Sauroleishmania*:

*L. (S.) adleri* (RLIZ/KE//LV30),

*L. (S.) gymnodactyli* (RGEC/SU/LV247),

*L. (S.) hoogstraali* (RLIZ/SD/LV31),

*L. (S.) tarentolae* (RTAR/SE/67/G10/LV108).

Všechny tyto izoláty pochází z laboratoře prof. Paula Batese (Faculty of Health and Medicine, Lancaster University, United Kingdom).

Leishmanie jsou uchovány v kryobance v zamrazovacích ampulích CryoTube™ Vials (NUNC) v médiu pro kultivaci leishmanií, které navíc obsahuje 5-10 % kryokonzervační látky DMSO (Sigma-Aldrich). Po vymražení jsou leishmanie přeneseny do plochých zkumavek „flat tubes“ (NUNC) s kultivačním médiem a uchovány v termostatu při teplotě 23 °C. Po několika dnech se kultura leishmanií přeočkují do nového média. Jako inokulum slouží 3-5 kapek starší kultury. Dostatečně narostlá kultura buněk (4-5 dní po přeočkování) pak byla použita pro infekční sání flebotomů.

### 3.3. Chov flebotomů

Použila jsem šest druhů flebotomů, které pocházejí z chovů katedry parazitologie na PřF UK: *Sergentomyia schwetzi* (původem z Etiopie), *Phlebotomus argentipes* (z Indie), *Phlebotomus duboscqi* (ze Senegalu), *Phlebotomus orientalis* (z Etiopie), *Phlebotomus papatasi* (z Turecka) a *Phlebotomus sergenti* (též původem z Turecka).

Kolonie jsou umístěny v chovných místnostech s fotoperiodou (14 hodin světlo - 10 hodin tma), ve kterých je udržována konstantní teplota (24-26 °C) a vlhkost (50 %). Dospělí flebotomové jsou třikrát týdně vypouštěni do nylonové sítě, která je navázaná na kovové konstrukci a vložena do pevného igelitového pytle. Pro zajištění dostatečné vlhkosti je na síť vložen tác s navlhčenou vatou. Jako potrava slouží dospělcům 50% roztok sacharózy napuštěný do kousku vaty umístěné na Petriho misce. Dospělé samice sají krev obvykle jednou týdně, a to především na uspaných BALB/c myších.

Nasáté samice jsou po defekaci přeneseny skleněným exhaustorem do kelímků vylitých sádrou, která je navlhčená destilovanou vodou. Kelímky jsou uzavřeny plastovým víčkem s monofilem a umístěny do větších a uzavřených plastových boxů, jejichž dno je pokryté navlhčeným sterilizovaným pískem (viz obr. 8). V kelímcích pak samice kladou vejce a dochází v nich k vývoji čtyř larválních stádií, které jsou krmeny třikrát týdně fermentovanou směsí králíčních exkrementů a granulí. Dospělci vylétující z kulek jsou vypouštěni do nově připravené sítě. Detailněji je cyklus popsán ve Volf & Volfová (2011).



**Obr. 8:** Pomůcky pro chov flebotomů (upraveno podle Volf & Volfová, 2011).

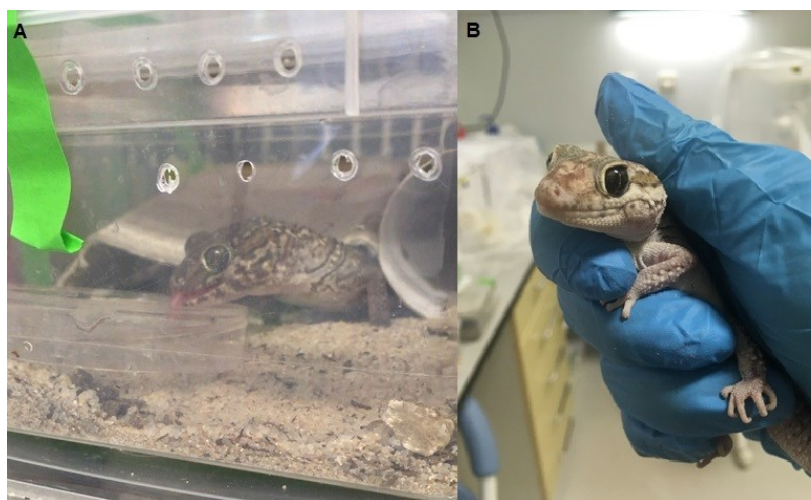
A. exhaustor a krmítko pro experimentální sání flebotomů; B. box pro fermentaci žrádla pro larvy; C. malá a velká síť navázaná na kovových konstrukcích; D. kelímky v dóze; E. sítě a dózy v termostatu



### 3.4. Chov gekonů

Jako potenciální hostitele plazích leishmanií jsme zvolili gekony *Paroedura picta* (Squamata: Gekkonidae), pro experimenty jsem měla k dispozici celkem 8 samců. Jedinci byli chováni samostatně v plastových teráriích o rozměrech (24×7×18 cm), která byla opatřena písčítým substrátem a doplněna o vhodné úkryty, které poskytují zvířatům dostatečný komfort (viz obr. 9). Pro omezení stresu byla tato terária oddělena neprůhlednou deskou, aby byl zamezen vizuální kontakt mezi samci. Optimální teplota pro chov byla zajištěna topnými kabely umístěnými tak, aby vznikl v teráriu teplotní gradient. Gekoni měli trvalý přístup k misce s čistou vodou a jako potravu dostávali 1-2× týdně cvrčky či moučné červy obalené ve vitamínové směsi.

Rod *Paroedura* je monofyletickou skupinou čeledi Gekkonidae. Vyskytuje se v oblastech Madagaskaru a Komorských ostrovů, pro které je tento rod endemický. *Paroedura picta* (Peters, 1854) je jedním z největších zástupců tohoto rodu. Jedná se o terestrický druh gekona, který je aktivní v noci a setkat se s ním můžeme především v suchých či polosuchých oblastech (shrnuto v Nussbaum & Raxworthy, 2000; Jackman a kol., 2008). Samice dospívají již ve 4 měsících a v jedné snůšce snáší pouze 1-2 vejce. Nicméně intervaly mezi jednotlivými snůškami vajec jsou poměrně krátké (7-10 dní), a tak je tento druh gekona pro svou nenáročnost často chován v zajetí a stal se oblíbeným společníkem v domácnostech celého světa (Kubička & Kratochvíl, 2009). Stále častěji také bývá využíván ve výzkumných zařízeních jako modelový organismus (Brillet, 1993; Blumberg a kol., 2002; Kratochvíl a kol., 2006; Starostová a kol., 2010).



**Obr. 9:** Samci gekona druhu *Paroedura picta* v chovné ubikaci (a) při manipulaci (b) (vlastní zdroj).

### 3.5. Experimentální infekce flebotomů

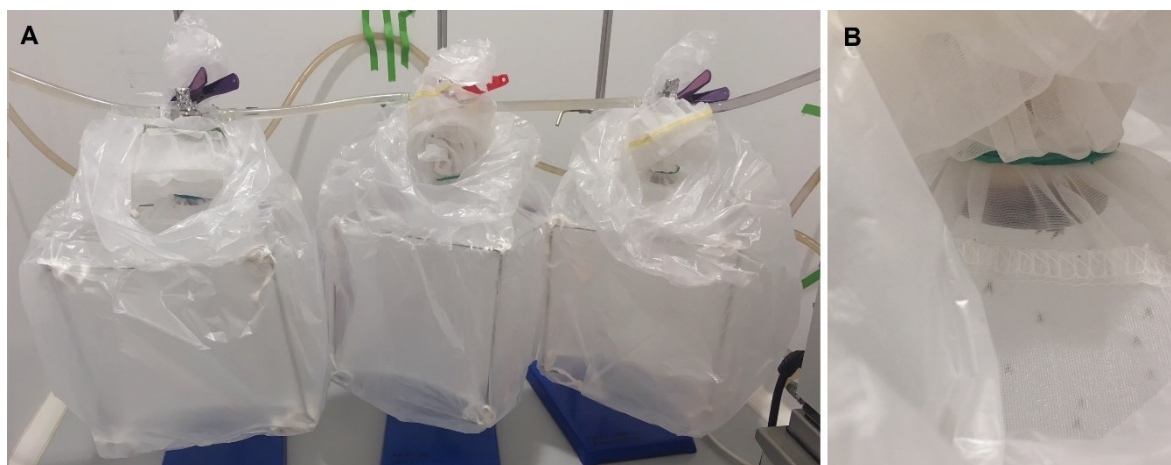
Pro experimentální infekce je nezbytná příprava membrán z kuřecí kůže, přes které budou samice flebotomů sát. Mrtvé, tři dny staré kuře je zbaveno peří v oblasti břicha či zad. Stažená kůže je  $2 \times 10$  minut promývána v 70% ethanolu, zbavena tuku a dále namáčena ve sterilním fyziologickém roztoku opět  $2 \times 10$  minut. Takto připravené kůžičky jsou uchovány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Ještě před provedením infekčního sání je třeba vymrazit požadovanou kulturu leishmanií a nechat ji 4-5 dní kultivovat (exponenciální fáze růstu). Takto narostlou kulturu promastigotů nejprve několikrát promyjeme ve sterilním fyziologickém roztoku. Následně 10  $\mu\text{l}$  této kultury smícháme s 990  $\mu\text{l}$  ředícího roztoku a pomocí Bürkerovy komůrky (P-lab) stanovíme koncentraci leishmanií a tím zjistíme i objem kultury potřebný pro infekční dávku  $5 \times 10^6$  buněk / 1 ml krve. Ve vodní lázni inaktivujeme požadovaný objem defibrilované králičí krve (Bioveta) a to 35 minut při  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Takto připravenou krev pak smícháme s kulturou leishmanií (300  $\mu\text{l}$  kultury  $5 \times 10^6$  buněk / 1 ml, 2700  $\mu\text{l}$  krve). Na skleněné krmítko natáhneme kuřecí membránu, kterou připevníme parafilmem a krmítko naplníme krví. Samice flebotomů staré 4-7 dní přefoukáme do malých nylonových sítěk na tenkých kovových konstrukcích. Tyto síťky jsou poté za pomoci kolíčků upevněny na krmítko (viz obr. 10). Stálá teplota krve ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) je zajištěna díky vodní lázni s vnější cirkulací. V šeru a v dostatečně vyhřáté místnosti samice sají nejdéle 2 hodiny. Poté je síťka opatrně sundána a nenasáté samice jsou vytríděny. Síť s nasátými samicemi je umístěna do termostatu s teplotou  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Flebotomové mají k dispozici vatu navlhčenou destilovanou vodou pro zajištění vlhkosti a jako potravu kousek vaty na Petriho misce nasycený 50% roztokem sacharózy.

V různých intervalech po sání (1 až 11 dní) byly samice flebotomů uspány na ledu, jejich střevo byla vypitvána pod binokulární lupou a mikroskopicky vyšetřena na přítomnost leishmanií. Každá samice byla nejprve zbavena končetin a pinzetou přenesena do kapky semi-sterilního fyziologického roztoku. Za pomoci pinzety a ručně vyrobených pitevních nástrojů (entomologické minucie zasazené ve špejli) byla samicím odstraněna hlava a za poslední zadečkové články bylo střevo vytaženo a přeneseno do čisté kapky fyziologického roztoku.

Poté je střevo prohlíženo pod světelným mikroskopem, kde se hodnotí intenzita infekce, a to ve čtyřech kategoriích: slabá (1-100 buněk/střevo), střední (100-1000 buněk/střevo), silná (více než 1000 buněk/střevo) a neinfekční.

Mimo to je při pitvách do protokolů zaznamenávána i lokalizace leishmanií v trávicím traktu flebotomů a případně také jejich morfologické formy.



**Obr. 10:** Infekční sání přes membránu – A. sítky přichycené na krmítkách;  
B. detail sání flebotomů (vlastní zdroj).

### 3.6. Měření morfologických forem

Měření morfologických forem bylo provedeno u dvou druhů sauroleishmanií – *L. (S.) adleri* a *L. (S.) hoogstraali* ve flebotomech druhu *P. orientalis*. Naším hlavním cílem bylo porovnat morfologii forem v různých fázích infekce. Střeva flebotomů byla 5., 7. a 9. den po infekci vypitvána na podložním sklíčku v kapce sterilního fyziologického roztoku. V místě vyústění malpigických trubic bylo střevo rozděleno a zadní část střeva byla přenesena do samostatné kapky fyziologického roztoku tak, aby formy vyskytujících se v zadní části střeva mohly být studovány zvlášť. Části střev pozitivní na leishmaniovou infekci byly opatrně rozmáčkнуты krycím sklíčkem a po zaschnutí byly fixovány 5 minut metanolem. Takto připravená sklíčka byla barvena roztokem Giemsy (Fluka; ředěným v poměru 1:20 destilovanou vodou) po dobu 20 minut a poté byla opláchnuta destilovanou vodou.

Preparáty byly prohlíženy za použití imerzního oleje (zvětšení 1000×) pod světelným mikroskopem (Olympus BX51) se zabudovanou kamerou (DP-70). Jednotlivé leishmanie byly foceny v programu QuickPHOTO MICRO 2.2 (Olympus). Měření bylo provedeno v programu ImageJ (Java) a zaznamenány byly tři rozměry: délka buňky, její šířka (v nejširší části) a délka bičíku. Pro každou skupinu (den 5, 7 a 9) bylo náhodně změřeno alespoň 140 leishmanií ze tří různých flebotomů. Data byla poté vyhodnocena v programu SPSS.

Jednotlivé morfologické formy (viz tab. 4) byly stanoveny na základě kritérií Sádlová a kol. (2010) s přihlédnutím k Adler & Theodor (1929).

**Tab. 4:** Morfologické formy sauroleishmanií

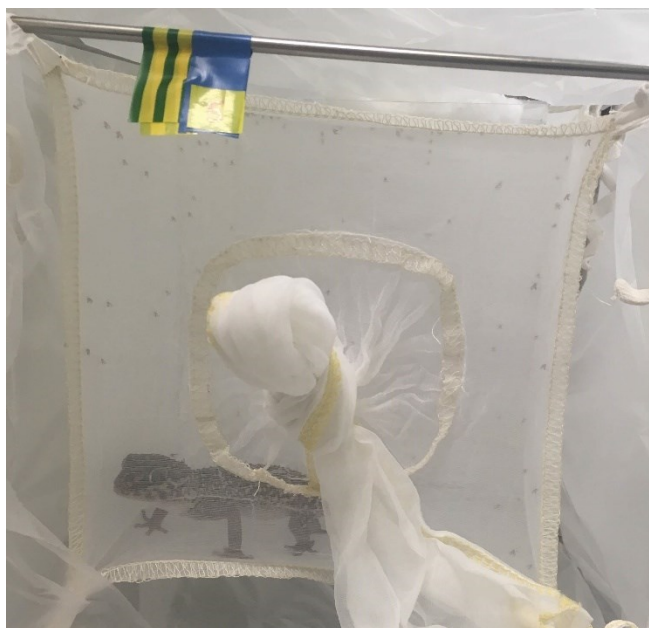
Dlouhé nektomonády	délka těla $\geq 14 \mu\text{m}$ délka bičíku < dvojnásobek délky těla
Metacykličtí promastigoti	poměr délky bičíku a těla $\geq 2$
Krátcí promastigoti (leptomonády)	délka těla < $14 \mu\text{m}$ délka bičíku < dvojnásobek délky těla
Haptomonády	
Kulaté formy	

### 3.7. Experimentální infekce gekonů

Gekoni druhu *Paroedura picta* byli experimentálně infikováni dvěma druhy sauroleishmanií – *Leishmania (S.) adleri* nebo *Leishmania (S.) hoogstraali*. Celkem osm gekonů tedy bylo rozděleno do dvou skupin po čtyřech, přičemž vždy dva jedinci z každé skupiny byli nakaženi perorálně a zbylí dva intraperitoneálně.

Gekoni byli infikováni promastigoty z kultury ve stacionární fázi (7. den po inokulaci). Kultura byla nejprve několikrát promyta ve sterilním fyziologickém roztoku a pomocí Bürkerovy komůrky (P-lab) byl stanoven počet leishmanií. Každé zvíře bylo nakaženo infekční dávkou  $10^7$  buněk v  $10 \mu\text{l}$  fyziologického roztoku. Pomocí jemné insulinové injekční stříkačky bylo toto množství injikováno dvěma gekonům do oblasti peritonea. U zbylých dvou jsme pro perorální způsob nákazy použili cvrčky. Ti byli pinzetou znehybněni, pokapáni  $10 \mu\text{l}$  kultury s leishmaniami a bezprostředně nabídnuti gekonům k požití. Tento postup byl stejný pro infekce oběma druhy leishmanií.

Infikovaní jedinci byli 3., 6., 9. a 12. týden vyšetřováni pomocí xenodiagnostiky (viz obr. 11). Současně byl kontrolován jejich zdravotní stav a kondice, ačkoliv se infekce sauroleishmanií u plazů jeví jako bezpříznakové. Část gekonů infikovaná intraperitoneálně byla 12. týden po infekci usmrcena. U všech čtyř jedinců byla provedena pitva, při níž bylo odebráno několik vzorků: krev, slezina, játra a kousek kůže z různých částí těla. Tyto vzorky byly vyšetřeny na přítomnost leishmanií pomocí PCR.



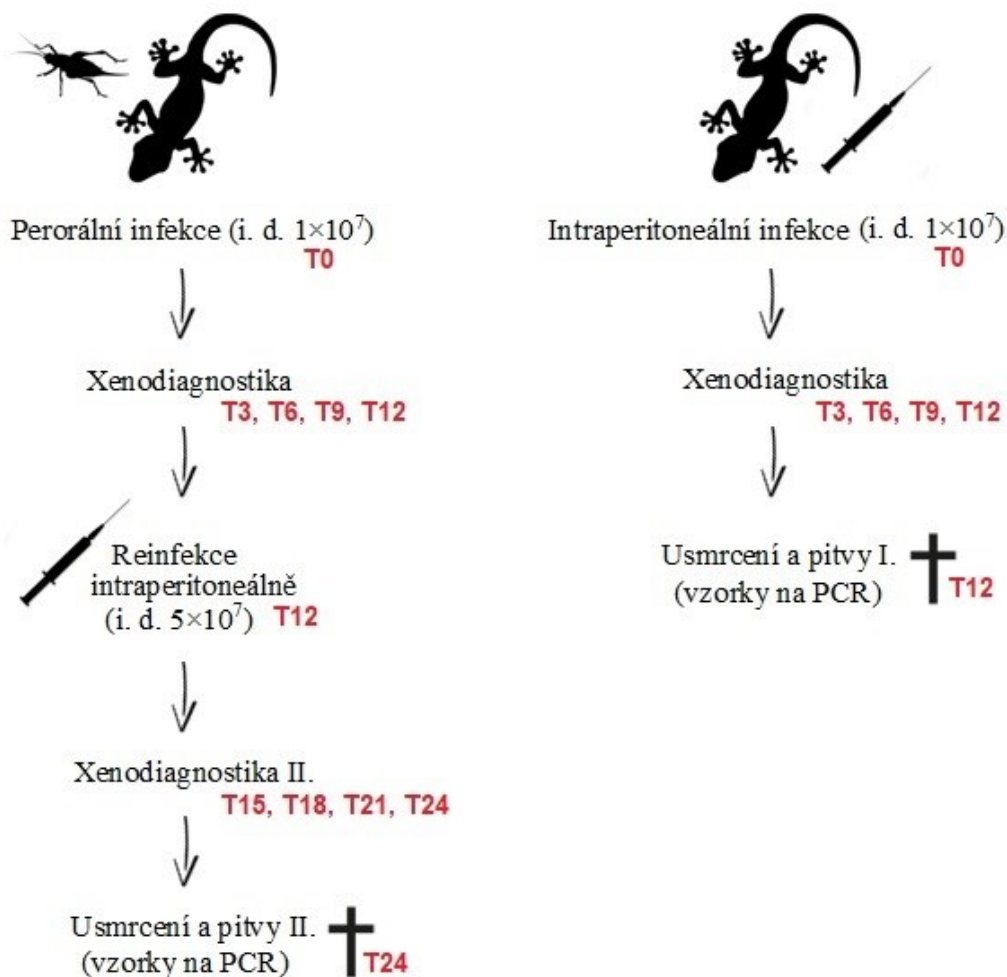
**Obr. 11:** Gekon druhu *Paroedura picta* na němž sají flebotomové *Sergentomyia schwetzi* při xenodiagnostickém vyšetření (vlastní zdroj).

Skupina nakažená perorálně byla znovu infikována, tentokrát intraperitoneálně a vyšší infekční dávkou ( $5 \times 10^7$  buněk / 10  $\mu$ l / zvíře). Tito gekoni byli následně opět kontrolováni a vyšetřováni pomocí xenodiagnostiky po dobu dalších 12 týdnů. Poté byl experiment ukončen, zvířata byla usmrcena a byly jim odebrány vzorky vnitřních orgánů na PCR detekci leishmanií. Celkové schéma pokusu popisuje obr. 12.

### 3.8. Xenodiagnostika

Infikovaní gekoni byli na přítomnost leishmanií vyšetřováni pomocí xenodiagnostiky a následné kultivace a PCR detekce sauroleishmanií. Xenodiagnostiku poprvé použil a popsal prof. Émile Brumpt v roce 1914 při studiu Chagasovy choroby. Tato metoda detekuje přítomnost parazita v krvi hostitele díky krevsajícimu přenašeči, ve kterém se nasátí parazité pomnoží. V případě leishmaniózy je tedy infikovaný hostitel vystaven sání přenašeče-flebotoma, ve kterém pak dochází k vývoji a množení leishmanií. Nasáté samice jsou poté mikroskopicky vyšetřeny na přítomnost parazitů (Molina a kol., 1994; shrnuto v Schenone, 1999). Tento způsob byl zvolen především kvůli složitější manipulaci s gekony, oproti jiným laboratorním modelům jako jsou třeba BALB/c myši. Obvykle se totiž ještěřům odebírá krev z loketní žíly nebo zastřížením špičky ocasu, což je pro zvíře značně stresující

a u gekonů navíc riskantní kvůli pouštění ocasu v reakci na stresové situace. Vzhledem k potřebě opakovaných odběrů se nám jako nejšetrnější metoda jevila právě xenodiagnostika.



**Obr. 12:** Schéma experimentálních infekcí gekonů (vlastní zdroj).

Vysvětlivky: i. d. – infekční dávka; T – týden po infekci

V rámci svých experimentů jsem také zkoumala hostitelskou atraktivitu gekonů pro různé druhy flebotomů. Pro xenodiagnostické vyšetření jsem nakonec zvolila 4-7 dní staré samice *Sergentomyia schwetzi*, které v našich laboratorních chovech sály na gekonech nejochotněji. Do nylonových sítěk na kovové konstrukci bylo odděleno vždy 50-100 samic a do každé z nich byl umístěn jeden z osmi gekonů. Samice flebotomů na gekonech sály

1-2 hodiny za tmy při teplotě 26 °C. Poté byly nenasáté samice vytříděny, nasátým byl podán cukr i vlhkost a sít'ky byly uchovány v termostatech při 26 °C.

Pitvy střev byly vždy provedeny nejpozději 2 dny po sání, tedy ještě před defekací, a to vzhledem k tomu, že po defekaci se většina infekcí v *Se. schwetzi* ztrácí, jak bylo zjištěno v předchozích pokusech. Samice flebotomů byly nejprve imobilizovány na ledu. Poté byla každá z nich krátce promyta v 70 % ethanolu a dále ve sterilním fyziologickém roztoku. Střevo bylo vypitváno na sterilním podložním sklíčku a přeneseno pomocí injekční stříkačky do plochých zkumavek s krevním agarem a médiem. Tyto zkumavky byly následně uloženy v termostatu při 23 °C a průběžně kontrolovány pod inverzním mikroskopem. Z části vypitvaných střev pak byly navíc udělány roztěry pro případné morfometrické stanovení forem leishmanií. Část imobilizovaných nasátých samic byla dána do mikrozkušavek s 200 µl „tissue lysis buffer“ (Roche), zamrazena při – 20 °C a později využita pro detekci leishmanií pomocí PCR.

### 3.9. PCR detekce sauroleishmanií

#### Izolace DNA

K izolaci DNA byly použity tkáně experimentálně infikovaných gekonů *Paroedura picta*. Gekoni byli usmrceni 12. týden po infekci (skupina infikovaná intraperitoneálně; gekoni č. 1-4) a 24. týden po infekci (reinfikovaná skupina; gekoni č. 5-8). Každému gekonovi byl odebrán vzorek krve, sleziny, jater a kousků kůže z různých částí těla. Játra byla homogenizována rozmělněním v 500 µl elučního pufru („elution buffer“, Roche).

Všechny vzorky byly uchovány v mikrozkušavkách při –20 °C. Z těchto vzorků jsme posléze izolovali DNA pomocí High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) dle protokolu výrobce. Vyizolovaná DNA byla eluována do 40-200 µl elučního pufru a uchována v mikrozkušavkách taktéž při – 20 °C.

Podobným způsobem byla izolována DNA ze samic flebotomů druhu *Sergentomyia schwetzi* nasátých na experimentálně nakažených gekonech při xenodiagnostickém vyšetření. Nasáté samice byly nejprve imobilizovány na ledu a poté přeneseny do mikrozkušavek s 200 µl lyzačního pufru („tissue lysis buffer“, Roche). Počet flebotomů se pohyboval v rozmezí 1-12 jedinců na vzorek (podle počtu nasátých samic). Sterilními tyčinkami byly jednotlivé vzorky homogenizovány a poté z těchto vzorků byla izolována DNA (viz výše). Vyizolovaná DNA byla eluována do 100 µl PCR H<sub>2</sub>O.

## Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro detekci sauroleishmanií ve tkáních gekonů a ve flebotomech, kteří byli využiti při xenodiagnostice, byla použita metoda klasické PCR s primery o sekvencích forward (F): AGATTATGGAGCTCTGCGACAA a reverse (R): TAGTTCGTCTTGGTGCGGTC. Tyto primery jsou cíleny na 246 pb dlouhý úsek DNA v sekvenci ITS1 malé ribozomální podjednotky. Složení reakční směsi popisuje tab. 5. PCR reakce probíhala dle protokolu sepsaného v tab. 6, po jehož ukončení byla zchlazena na 12 °C. Výsledné PCR produkty byly ověřovány na přítomnost specifického amplikonu pomocí horizontální elektroforézy za použití 1% agarózového gelu a TAE pufru. Jako dvě pozitivní kontroly sloužily DNA izolovaná z kultury *Leishmania major* a z *Leishmania (Sauroleishmania) adleri*.

**Tab. 5:** Složení reakční směsi

Složka	Množství
Master Mix (Emerald green)	10 µl
Primer F	0,5 µl
Primer R	0,5 µl
PCR H <sub>2</sub> O	7 µl
vzorek DNA	2 µl

**Tab. 6:** Průběh PCR reakce

Teplota	Čas	Opakování
94 °C	3:30 min	1x
94 °C	0:30 s	35 x
54 °C	0:30 s	
72 °C	0:35 s	
72 °C	5:00 min	1x



## 4. Výsledky

### 4.1. Experimentální infekce flebotomů

Vývoj čtyř druhů sauroleishmanií byl zkoumán u vybraných druhů flebotomů rodů *Sergentomyia* a *Phlebotomus*. Infekční dávka byla  $5 \times 10^6$ .

#### 4.1.1. *Leishmania (S.) adleri*

Vývoj *L. (S.) adleri* jsme studovali u tří druhů flebotomů: *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*. Pitvy byly provedeny vždy 1. a 7. den po infekci (PI). Výsledky infekčních sání shrnuje a porovnává tab. 7 a obr. 13. Lokalizaci leishmanií v trávicím traktu flebotomů pak popisuje tab. 8 a obr. 14.

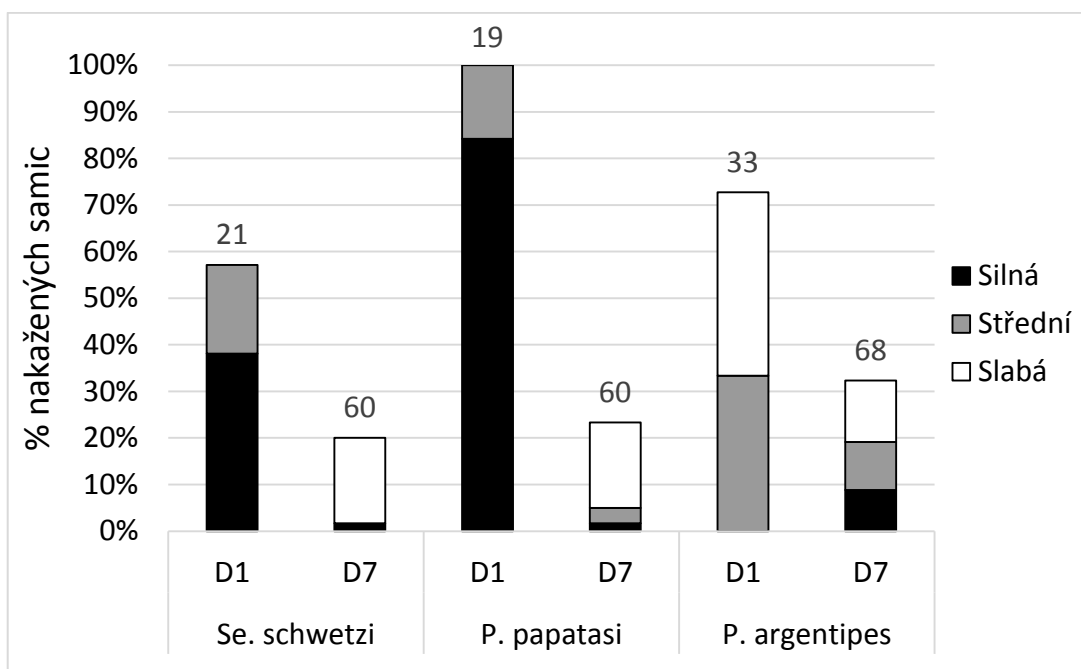
První den PI byly u všech tří druhů flebotomů leishmanie přítomny v nasáté krvi uvnitř peritrofické matrix (endoperitrofický prostor).

Sedmý den PI se ve *Se. schwetzi* leishmanie vyvíjely v oblasti zadního střeva, infekce byly slabé (v řádu desítek kusů) a lokalizované především v pyloru a ileu. Převládající formou byly přisedlé haptomonády, avšak u dvou samic byly v zadním střevě přítomny i dlouhé bičíkaté formy. U flebotomů druhu *P. papatasi* se *L. (S.) adleri* vyvíjela obdobně. Den 7 PI se leishmanie nacházely v oblasti zadního střeva, (především v pyloru), přítomny byly opět převážně přisedlé haptomonády, ale také dlouhé bičíkaté formy. U jedné samice *P. papatasi* bylo několik promastigotů lokalizováno též v oblasti anteriorního a thorakálního mesenteronu. Vývoj *Leishmania (S.) adleri* v *P. argentipes* byl odlišný. Ačkoliv v den 1 PI se parazité zdáli být málo pohybliví a poškození, v den 7 PI se nacházeli v zadní části traktu flebotomů, mimo to však docházelo k jejich anteriorní migraci. V některých případech (40 %) tedy byli parazité pozorováni i v přední části trávicího traktu (v anteriorním i thorakálním mesenteronu) a dokonce také v oblasti cardie, tedy těsně za stomodeální valvou. U jedné samice byla stomodeální valva kolonizovaná přisedlými formami. U části samic *P. argentipes* nedošlo ani 7. den PI k úplné defekaci a leishmanie byly přítomny ve zbytcích krve.

**Tab. 7:** Výsledky infekčních sání a porovnání intenzity infekce *L. (S.) adleri* ve třech druzích flebotomů: *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*.

Vysvětlivky: PI – po infekci

		Silná	Střední	Slabá	Neinfekční	Celkem
<i>Se. schwetzi</i>	Den 1 PI	8	4	0	9	21
	Den 7 PI	1	0	11	48	60
<i>P. papatasi</i>	Den 1 PI	16	3	0	0	19
	Den 7 PI	1	2	11	46	60
<i>P. argentipes</i>	Den 1 PI	0	11	13	9	33
	Den 7 PI	6	7	9	46	68

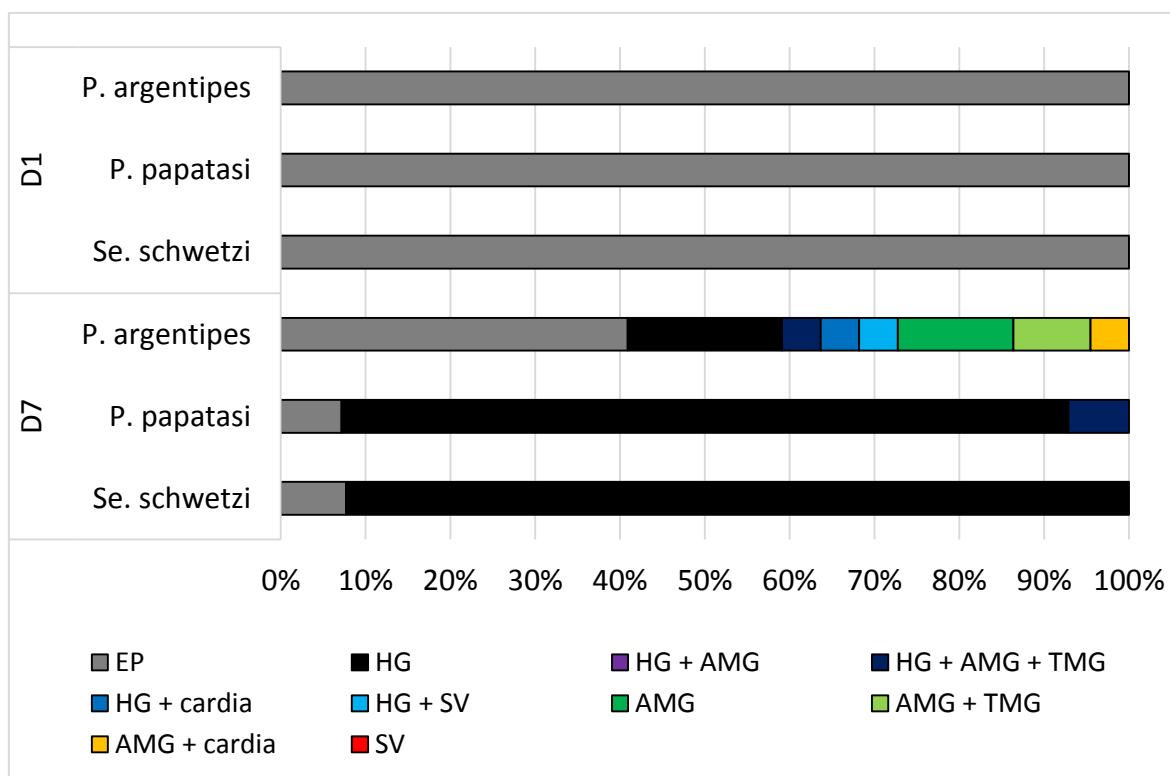


**Obr. 13:** Porovnání intenzity infekce *L. (S.) adleri* ve třech druzích flebotomů *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*. Čísla nad sloupci značí počet vypitvaných samic.

**Tab. 8:** Lokalizace infekce *L. (S.) adleri* ve třech druzích flebotomů *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*.

Vysvětlivky zkratk: EP – endoperitrofický prostor; HG – zadní střevo; AMG – anteriorní mesenteron; TMG – thorakální mesenteron; cardia – oblast těsně za stomodeální valvou; SV – stomodeální valva  
PI – po infekci

		EP	HG	HG AMG	HG AMG TMG	HG cardia	HG SV	AMG	AMG TMG	AMG cardia	SV
<i>Se. schwetzi</i>	Den 1 PI	12									
	Den 7 PI	1	11								
<i>P. papatasi</i>	Den 1 PI	19									
	Den 7 PI	1	12		1						
<i>P. argentipes</i>	Den 1 PI	24									
	Den 7 PI	9	4		1	1	1	3	2	1	



**Obr. 14:** Lokalizace leishmanií druhu *L. (S.) adleri* v trávicím traktu flebotomů druhů *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*.

Vysvětlivky zkratk: EP – endoperitrofický prostor; HG – zadní střevo; AMG – anteriorní mesenteron; TMG – thorakální mesenteron; cardia – oblast těsně za stomodeální valvou; SV – stomodeální valva

V návaznosti na výše shrnuté výsledky jsme se rozhodli tímto druhem sauroleishmanie infikovat další tři druhy flebotomů: *P. duboscqi*, *P. sergenti* a *P. orientalis*, kteří se přirozeně vyskytují v oblasti rozšíření *L. (S.) adleri*. Pro důkladnější pozorování průběhu infekce byly pitvy provedeny vždy 1., 5., 7., 9. a 11. den po infekci (PI). Výsledky infekčních sání shrnuje a porovnává tab. 9 a obr. 15. Lokalizaci leishmanií v trávicím traktu flebotomů pak popisuje tab. 10 a obr. 17.

První den 1 PI se u všech tří druhů flebotomů leishmanie hojně množily v nasáté krvi uvnitř endoperitrofického prostoru.

U druhu *P. duboscqi* byly leishmanie den 5, 7, 9 a 11 PI lokalizované v zadním střevě, anteriorním a thorakálním mesenteronu. V zadním střevě převládaly přisedlé haptomonády, v menší míře zde také byla pozorována i bičíkatá stádia. U čtyř samic (50 %) byly leishmanie 11. den PI taktéž přítomny v oblasti cardie.

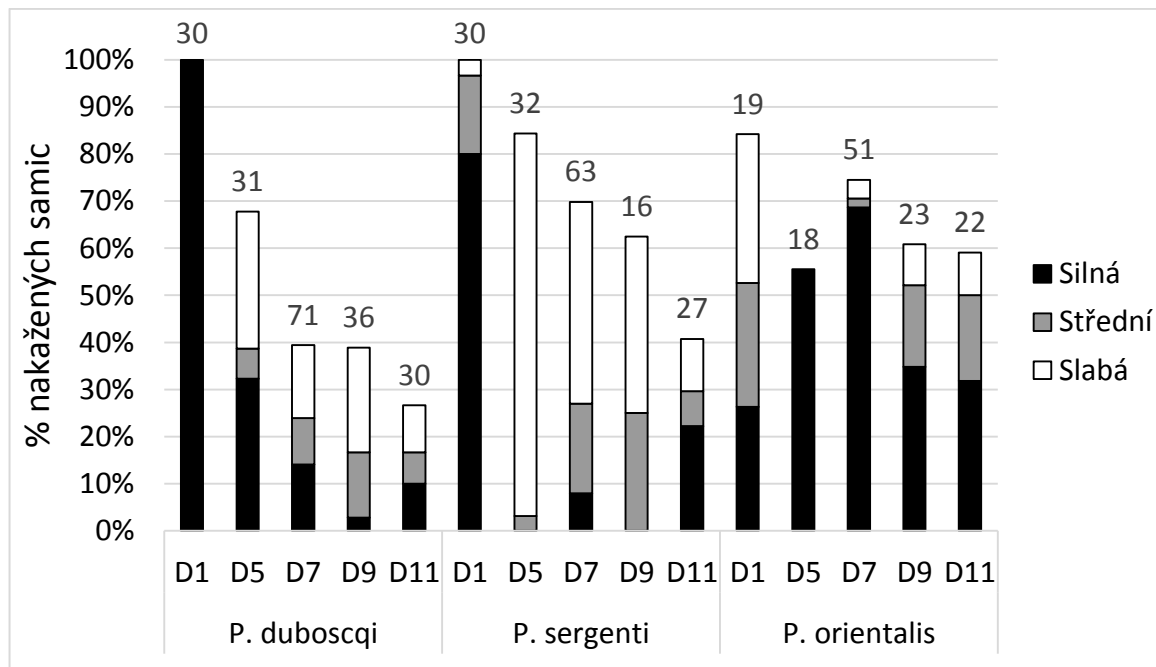
Naproti tomu u druhu *P. sergenti* se leishmanie 5., 7. a 9. den PI vyskytovaly téměř výhradně v zadním střevě, především v oblasti pyloru a ilea. Největší zastoupení zde měly přisedlé haptomonády, ale opět byly v některých případech pozorovány i dlouhé bičíkaté formy. Pouze u dvou samic (4,5 %) bylo 7. den PI nalezeno menší množství promastigotů také v oblasti anteriorního mesenteronu. Den 11 PI byly leishmanie přítomny opět převážně v zadním střevě, několik leishmanií bylo pozorováno ale i v anteriorním a thorakálním mesenteronu a u jedné samice dokonce v oblasti cardie.

Vývoj *L. (S.) adleri* v *P. orientalis* byl ještě rychlejší a úspěšnější než v *P. duboscqi*. Infekce byly převážně silné a leishmanie již 5. den PI byly nalezeny i v přední části trávicího traktu, včetně thorakálního mesenteronu a cardie. Den 7 PI byly leishmanie pozorovány přisedlé na stomodeální valvě. Infekce v podobné intenzitě přetrvávaly i den 9 a 11 PI a docházelo i ke kolonizaci stomodeální valvy (viz obr. 16).

**Tab. 9:** Výsledky infekčních sání a porovnání intenzity infekce *L. (S.) adleri* ve třech druzích flebotomů: *P. duboscqi*, *P. sergenti* a *P. orientalis*.

Vysvětlivky: PI – po infekci

		Silná	Střední	Slabá	Neinfekční	Celkem
<i>P. duboscqi</i>	Den 1 PI	30	0	0	0	30
	Den 5 PI	10	2	9	10	31
	Den 7 PI	10	7	11	43	71
	Den 9 PI	1	5	8	22	36
	Den 11 PI	3	2	3	22	30
<i>P. sergenti</i>	Den 1 PI	24	5	1	0	30
	Den 5 PI	0	1	26	5	32
	Den 7 PI	5	12	27	19	63
	Den 9 PI	0	4	6	6	16
	Den 11 PI	6	2	3	16	27
<i>P. orientalis</i>	Den 1 PI	5	5	6	3	19
	Den 5 PI	10	0	0	8	18
	Den 7 PI	35	1	2	13	51
	Den 9 PI	8	4	2	9	23
	Den 11 PI	7	4	2	9	22



**Obr. 15:** Porovnání intenzity infekce *L. (S.) adleri* ve třech druzích flebotomů *P. duboscqi*, *P. sergenti* a *P. orientalis*. Čísla nad sloupci značí počet vypitvaných samic.

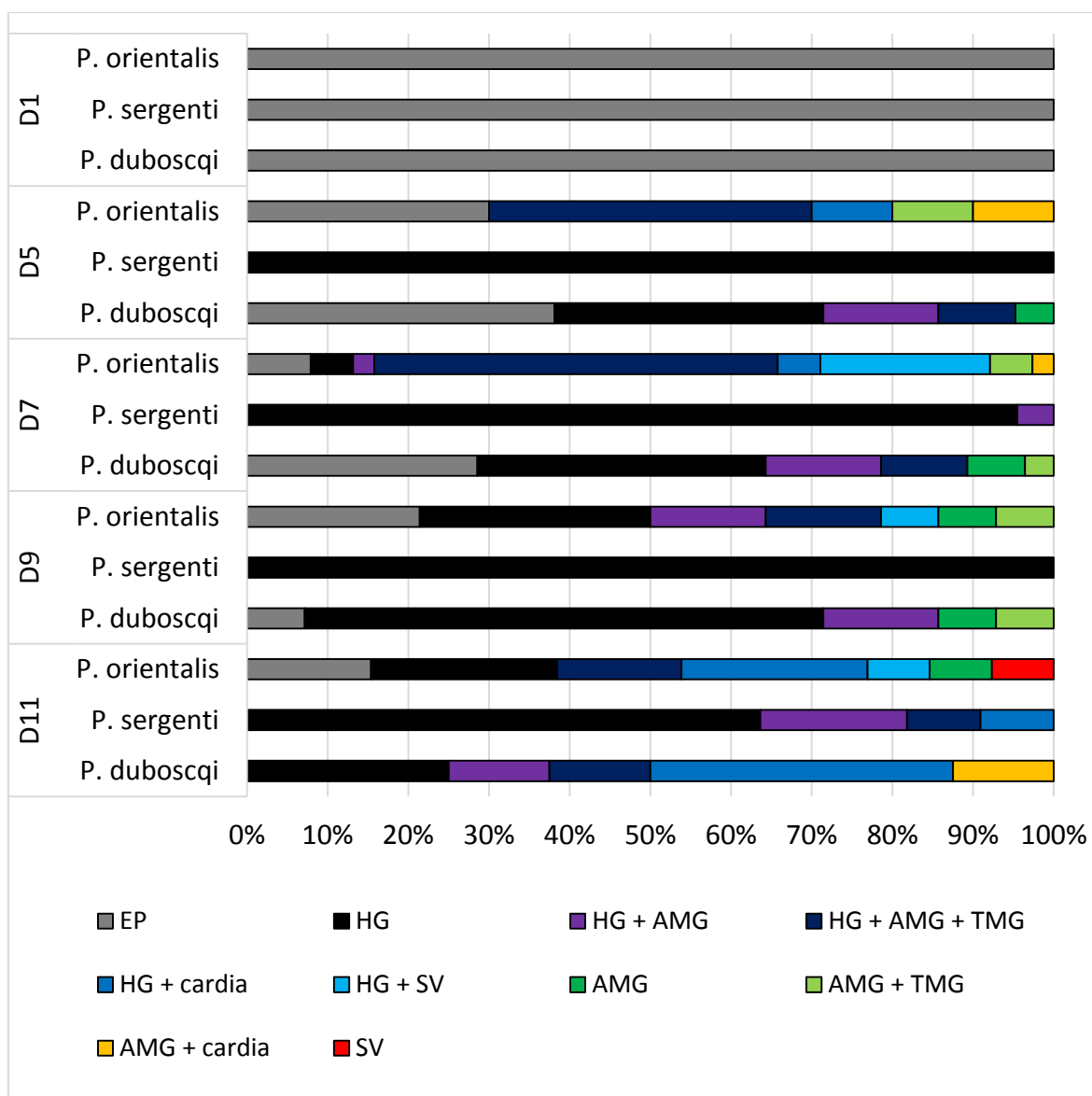
**Tab. 10:** Lokalizace infekce *L. (S.) adleri* v trávicím traktu flebotomů druhů *P. duboscqi*, *P. sergenti* a *P. orientalis*.

Vysvětlivky zkratk: EP – endoperitrofický prostor; HG – zadní střevo; AMG – anteriorní mesenteron; TMG – thorakální mesenteron; cardia – oblast těsně za stomodeální valvou; SV – stomodeální valva  
PI – po infekci

		EP	HG	HG AMG	HG AMG TMG	HG cardia	HG SV	AMG	AMG TMG	AMG cardia	SV
<i>P. duboscqi</i>	Den 1 PI	30									
	Den 5 PI	8	7	3	2			1			
	Den 7 PI	8	10	4	3			2	1		
	Den 9 PI	1	9	2				1	1		
	Den 11 PI		2	1	1	3				1	
<i>P. sergenti</i>	Den 1 PI	30									
	Den 5 PI		27								
	Den 7 PI		42	2							
	Den 9 PI		10								
	Den 11 PI		7	2	1	1					
<i>P. orientalis</i>	Den 1 PI	16									
	Den 5 PI	3			4	1			1	1	
	Den 7 PI	3	2	1	19	2	8		2	1	
	Den 9 PI	3	4	2	2		1	1	1		
	Den 11 PI	2	3		2	3	1	1			1



**Obr. 16:** Kolonizace stomodeální valvy *L. (S.) adleri* v *P. orientalis*  
11. den PI (světelný mikroskop; zvětšení 400×).



**Obr. 17:** Lokalizace leishmanií druhu *L. (S.) adleri* v trávicím traktu flebotomů druhů *P. duboscqi*, *P. sergenti* a *P. orientalis*.

Vysvětlivky zkratk: EP – endoperitrofický prostor; HG – zadní střevo; AMG – anteriorní mesenteron; TMG – thorakální mesenteron; cardia – oblast těsně za stomodeální valvou; SV – stomodeální valva

#### 4.1.2. *Leishmania (S.) gymnodactyli*

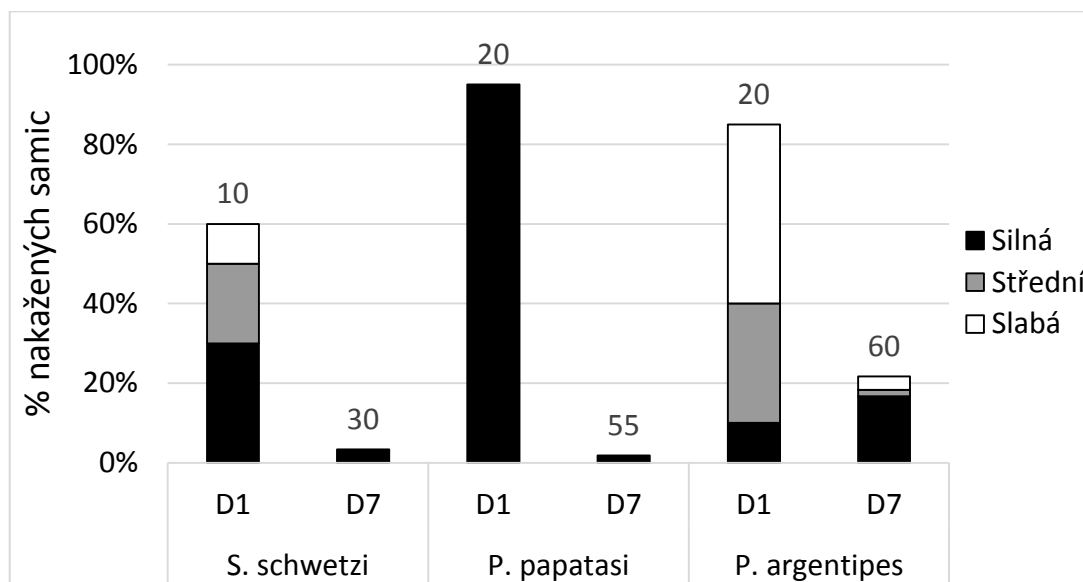
U *L. (S.) gymnodactyli* jsme studovali vývoj u tří druhů flebotomů: *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*. Pitvy byly provedeny vždy 1. a 7. den po infekci (PI). Výsledky infekčních sání shrnuje a porovnává tab. 11 a obr. 18. Lokalizaci leishmanií v trávicím traktu flebotomů pak popisuje tab. 12 a obr. 19.

Den 1 PI se leishmanie vždy vyvíjely v nasáté krvi obklopené peritrofickou matrix, avšak u *P. argentipes* některé jevíly známky poškození a byly málo pohyblivé. V den 7 PI byly leishmanie přítomny pouze ve zbytcích nestrávené nevydefekované krve.

**Tab. 11:** Výsledky infekčních sání a porovnání intenzity infekce *L. (S.) gymnodactyli* ve třech druzích flebotomů: *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*.

Vysvětlivky: PI – po infekci

		Silná	Střední	Slabá	Neinfekční	Celkem
<i>Se. schwetzi</i>	Den 1 PI	3	2	1	4	10
	Den 7 PI	1	0	0	29	30
<i>P. papatasi</i>	Den 1 PI	19	0	0	1	20
	Den 7 PI	1	0	0	54	55
<i>P. argentipes</i>	Den 1 PI	2	6	9	3	20
	Den 7 PI	10	1	2	47	60



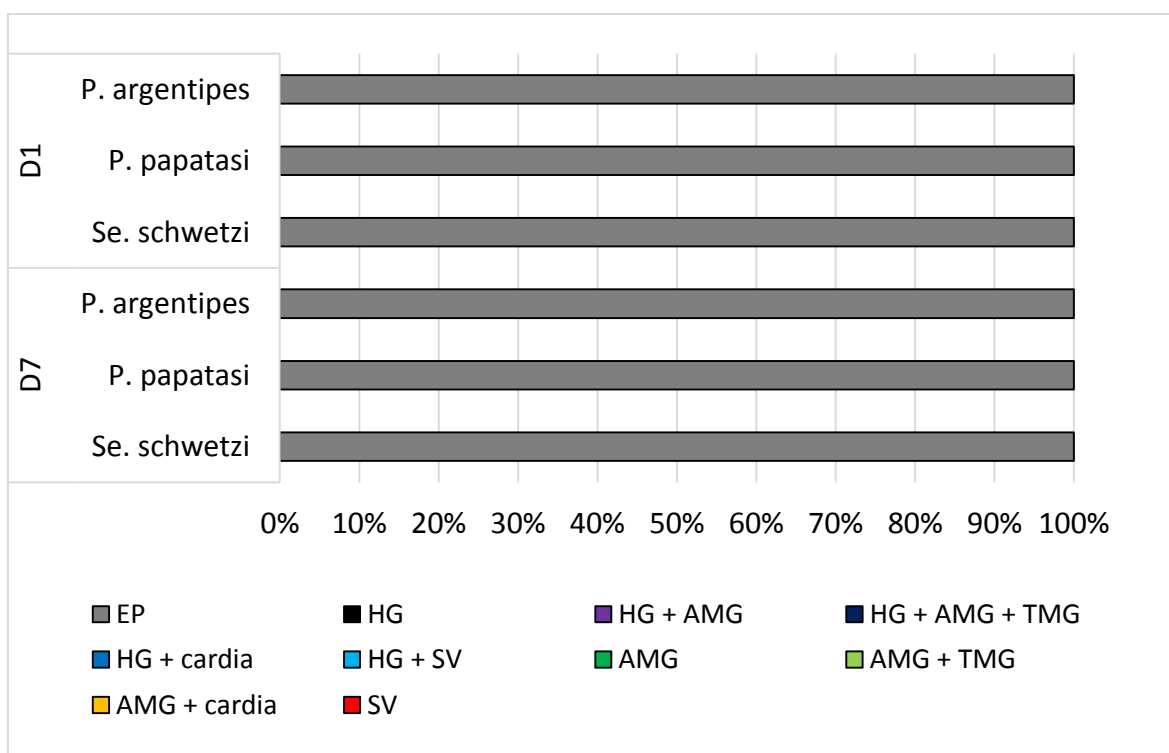
**Obr. 18:** Porovnání intenzity infekce *L. (S.) gymnodactyli* ve třech druzích flebotomů *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*. Čísla nad sloupci značí počet vypitvaných samic.



**Tab. 12:** Lokalizace infekce *L. (S.) gymnodactyli* ve třech druzích flebotomů *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*.

Vysvětlivky zkratk: EP – endoperitrofický prostor; HG – zadní střevo; AMG – anteriorní mesenteron; TMG – thorakální mesenteron; cardia – oblast těsně za stomodeální valvou; SV – stomodeální valva  
PI – po infekci

		EP	HG	HG AMG	HG AMG TMG	HG cardia	HG SV	AMG	AMG TMG	AMG cardia	SV
<i>Se. schwetzi</i>	Den 1 PI	6									
	Den 7 PI	1									
<i>P. papatasi</i>	Den 1 PI	19									
	Den 7 PI	1									
<i>P. argentipes</i>	Den 1 PI	17									
	Den 7 PI	13									



**Obr. 19:** Lokalizace leishmanií druhu *L. (S.) gymnodactyli* v trávicím traktu flebotomů druhů *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*.

Vysvětlivky zkratk: EP – endoperitrofický prostor; HG – zadní střevo; AMG – anteriorní mesenteron; TMG – thorakální mesenteron; cardia – oblast těsně za stomodeální valvou; SV – stomodeální valva

#### 4.1.3. *Leishmania (S.) hoogstraali*

U *L. (S.) hoogstraali* jsme studovali vývoj u tří druhů flebotomů: *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*. Pitvy byly provedeny vždy 1. a 7. den po infekci (PI). Výsledky infekčních sání shrnuje a porovnává tab. 13 a obr. 20. Lokalizaci leishmanií v trávicím traktu flebotomů pak popisuje tab. 14 a obr. 21.

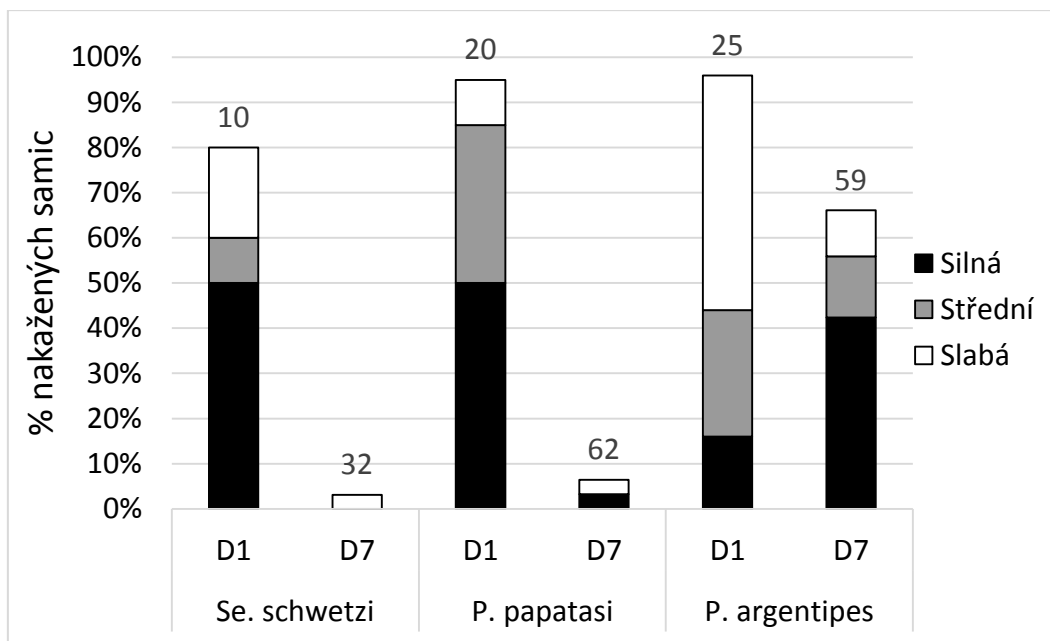
Den 1 PI byly leishmanie lokalizovány v nasáté krvi obklopené peritrofickou matrix. Den 7 PI byla nakažena pouze 1 samice *Se. schwetzi*, slabá infekce byla lokalizovaná v anteriorním mesenteronu. U flebotomů druhu *P. papatasi* byla 7. den PI pozorována nákaza pouze u tří samic. Ve dvou případech byly leishmanie lokalizované pouze v abdominálním mesenteronu, v jednom případě bylo několik promastigotů přítomno i v thorakálním mesenteronu. U jedné nevydefekované samice byly leishmanie pozorovány v endoperitrofickém prostoru.

Výrazně úspěšněji se tento druh sauroleishmanie vyvíjel u *P. argentipes*. *Leishmania (S.) hoogstraali* vytvářela 7. den PI převážně silné infekce. Kromě zadního střeva byli parazité pozorováni také v přední části trávicího traktu (79 %), vyskytovaly se poměrně hojně v oblasti cardie a docházelo i ke kolonizaci stomodeální valvy (20 %).

**Tab. 13:** Výsledky infekčních sání a porovnání intenzity infekce *L. (S.) hoogstraali* ve třech druzích flebotomů: *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*.

Vysvětlivky: PI – po infekci

		Silná	Střední	Slabá	Neinfekční	Celkem
<i>Se. schwetzi</i>	Den 1 PI	5	1	2	2	10
	Den 7 PI	0	0	1	31	32
<i>P. papatasi</i>	Den 1 PI	10	7	2	1	20
	Den 7 PI	2	0	2	58	62
<i>P. argentipes</i>	Den 1 PI	4	7	13	1	25
	Den 7 PI	25	8	6	20	59

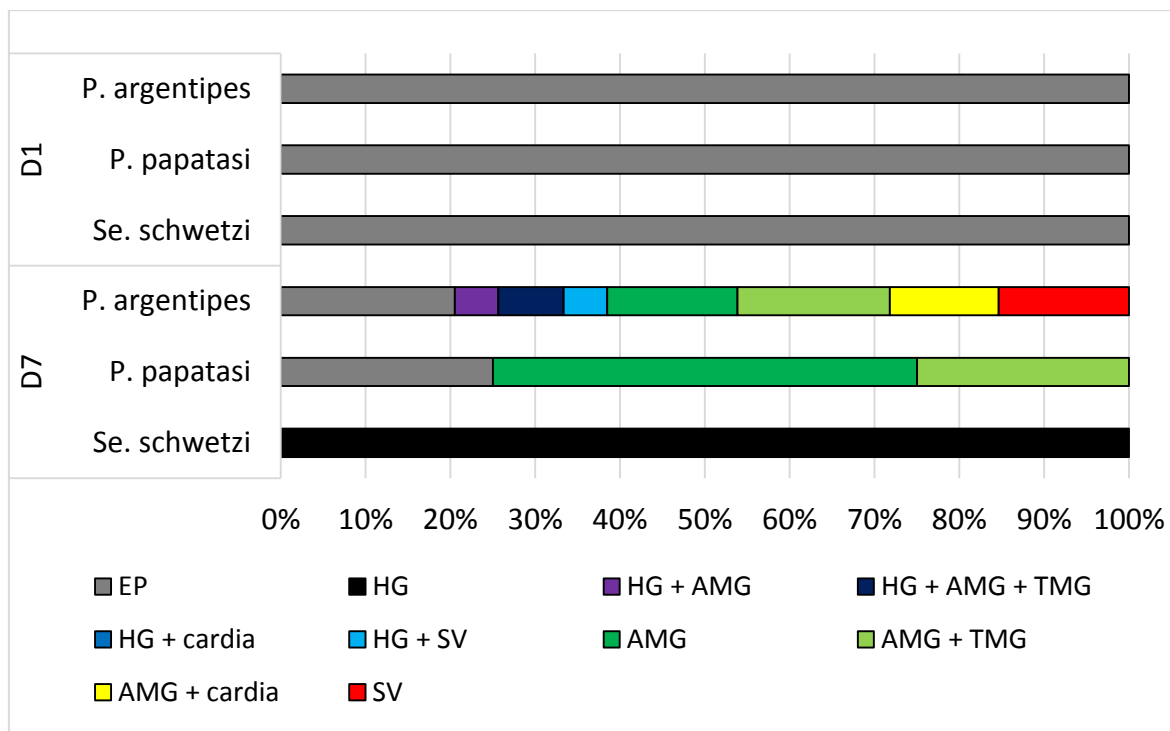


**Obr. 20:** Porovnání intenzity infekce *L. (S.) hoogstraali* ve třech druzích flebotomů *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*. Čísla nad sloupci značí počet vypitvaných samic.

**Tab. 14:** Lokalizace infekce *L. (S.) hoogstraali* ve třech druzích flebotomů *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*.

Vysvětlivky zkratk: EP – endoperitrofický prostor; HG – zadní střevo; AMG – anteriorní mesenteron; TMG – thorakální mesenteron; cardia – oblast těsně za stomodeální valvou; SV – stomodeální valva  
PI – po infekci

		EP	HG	HG AMG	HG AMG TMG	HG cardia	HG SV	AMG	AMG TMG	AMG cardia	SV
<i>Se. schwetzi</i>	Den 1 PI	8									
	Den 7 PI		1								
<i>P. papatasi</i>	Den 1 PI	19									
	Den 7 PI	1						2	1		
<i>P. argentipes</i>	Den 1 PI	24									
	Den 7 PI	8		2	3		2	6	7	5	6



**Obr. 21:** Lokalizace leishmanií druhu *L. (S.) hoogstraali* v trávicím traktu flebotomů druhů *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*.

Vysvětlivky zkratk: EP – endoperitrofický prostor; HG – zadní střevo; AMG – anteriorní mesenteron; TMG – thorakální mesenteron; cardia – oblast těsně za stomodeální valvou; SV – stomodeální valva

Na základě zmíněných výsledků jsme se rozhodli experimentálně nakazit další tři druhy flebotomů, a to *P. duboscqi*, *P. sergenti* a *P. orientalis*, kteří jsou rozšířeni v místě výskytu *L. (S.) hoogstraali*. Pro detailnější pozorování průběhu infekce byly pitvy provedeny vždy 1., 5., 7. a 9. den po infekci (PI). Výsledky infekčních sání shrnuje a porovnává tab. 15 a obr. 22. Lokalizaci leishmanií v trávicím traktu flebotomů pak popisuje tab. 16 a obr. 23.

U flebotomů druhu *P. duboscqi* byly den 1 PI v nasáté krvi uvnitř endoperitrofického prostoru přítomny především silné infekce leishmanií. Nicméně po defekaci (den 5 PI) byly pozorovány jen slabé infekce v zadním střevě a anteriorním mesenteronu. U jedné samice byly leishmanie přítomny navíc i v thorakálním mesenteronu. Den 7 a 9 PI docházelo k postupnému snižování intenzity infekce a u nakažených samic bylo pozorováno pouze několik desítek leishmanií. Hlavní zastoupení v zadním střevě měly přisedlé haptomonády, v menší míře štíhlé bičíkaté formy. Silné a střední infekce byly den 5, 7 a 9 PI pozorovány pouze ve zbytcích krve u částečně vydefekovaných samic.

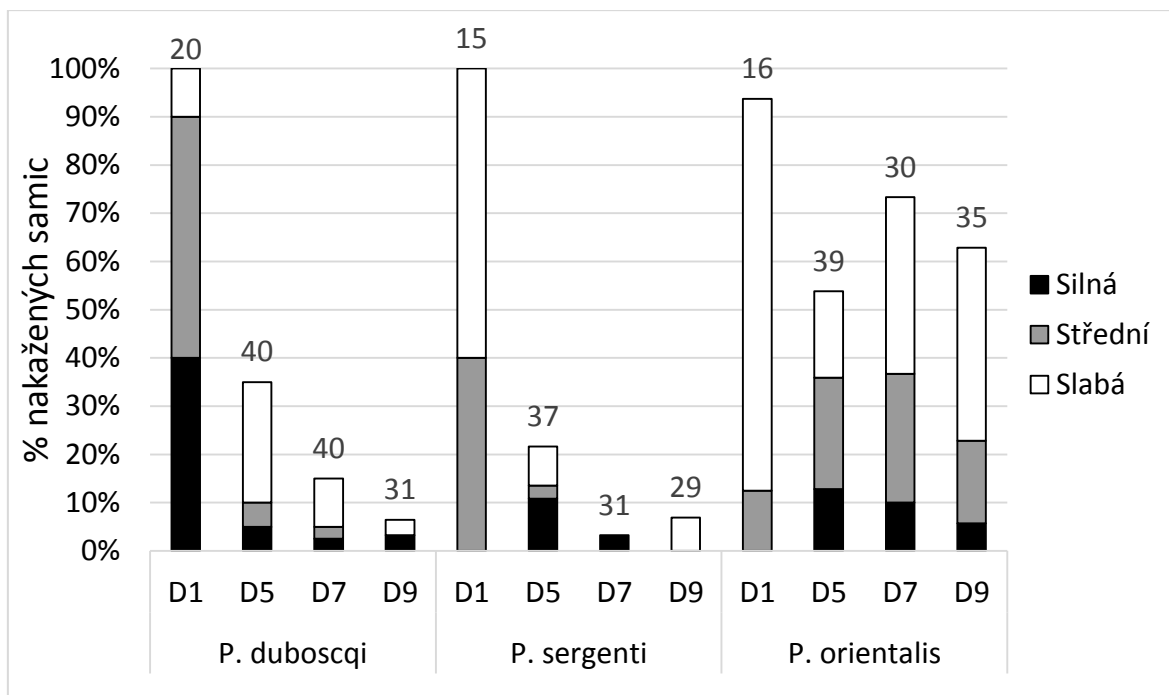
U *P. sergenti* byly den 1 PI pozorovány především slabé a střední infekce. U vydefekovaných samic byly den 5, 7 i 9 PI pouze slabé infekce. V zadním střevě a u jedné samice i v anteriorním mesenteronu bylo lokalizováno pouze několik desítek leishmanií. Střední a silné infekce byly opět pouze u samic s nevydefekovanými zbytky krve.

Ve flebotomech *P. orientalis* vytvářel tento druh sauroleishmanie den 1 PI pouze slabé až střední infekce. Přesto se 5., 7. i 9. den PI leishmanie poměrně hojně ve střevě množily. V zadním střevě jsme pozorovali opět přisedlé haptomonády a v několika případech také bičíkaté formy. Nicméně tento druh sauroleishmanie měl již 5. den PI tendence kolonizovat spíše přední části trávicího traktu a v zadním střevě tak byly lokalizované hlavně slabší infekce. Den 7 a 9 PI docházelo k vývoji typických pozdních infekcí a ke kolonizaci stomodeální valvy.

**Tab. 15:** Výsledky infekčních sání a porovnání intenzity infekce *L. (S.) hoogstraali* ve třech druzích flebotomů: *P. duboscqi*, *P. sergenti* a *P. orientalis*.

Vysvětlivky: PI – po infekci

		Silná	Střední	Slabá	Neinfekční	Celkem
<i>P. duboscqi</i>	Den 1 PI	8	10	2	0	20
	Den 5 PI	2	2	10	26	40
	Den 7 PI	1	1	4	34	40
	Den 9 PI	1	0	1	29	31
<i>P. sergenti</i>	Den 1 PI	0	6	9	0	15
	Den 5 PI	4	1	3	29	37
	Den 7 PI	1	0	0	30	31
	Den 9 PI	0	0	2	27	29
<i>P. orientalis</i>	Den 1 PI	0	2	13	1	16
	Den 5 PI	5	9	7	18	39
	Den 7 PI	3	8	11	8	30
	Den 9 PI	2	6	14	13	35

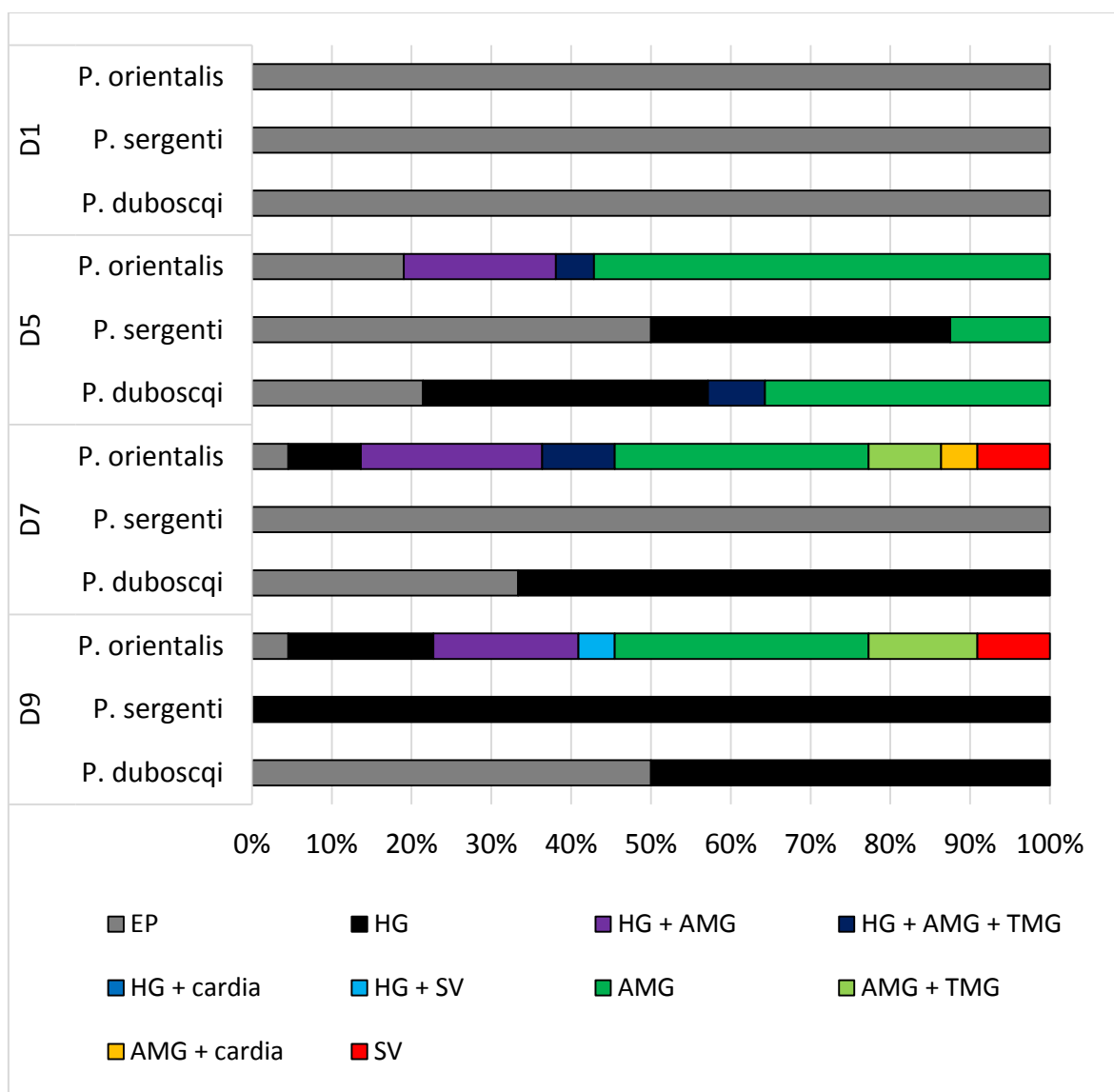


**Obr. 22:** Porovnání intenzity infekce *L. (S.) hoogstraali* ve třech druzích flebotomů *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*. Čísla nad sloupci značí počet vypitvaných samic.

**Tab. 16:** Lokalizace infekce *L. (S.) hoogstraali* ve třech druzích flebotomů *P. duboscqi*, *P. sergenti* a *P. orientalis*.

Vysvětlivky zkratk: EP – endoperitrofický prostor; HG – zadní střevo; AMG – anteriorní mesenteron; TMG – thorakální mesenteron; cardia – oblast těsně za stomodeální valvou; SV – stomodeální valva  
PI – po infekci

		EP	HG	HG AMG	HG AMG TMG	HG cardia	HG SV	AMG	AMG TMG	AMG cardia	SV
<i>P. duboscqi</i>	Den 1 PI	20									
	Den 5 PI	3	5		1			5			
	Den 7 PI	2	4								
	Den 9 PI	1	1								
<i>P. sergenti</i>	Den 1 PI	15									
	Den 5 PI	4	3					1			
	Den 7 PI	1									
	Den 9 PI		2								
<i>P. orientalis</i>	Den 1 PI	15									
	Den 5 PI	4		4	1			12			
	Den 7 PI	1	2	5	2			7	2	1	2
	Den 9 PI	1	4	4			1	7	3		2



**Obr. 23:** Lokalizace leishmanií druhu *L. (S.) hoogstraali* v trávicím traktu flebotomů druhů *P. duboscqi*, *P. sergenti* a *P. orientalis*.

Vysvětlivky zkratk: EP – endoperitrofický prostor; HG – zadní střevo; AMG – anteriorní mesenteron; TMG – thorakální mesenteron; cardia – oblast těsně za stomodeální valvou; SV – stomodeální valva

#### 4.1.4. *Leishmania (S.) tarentolae*

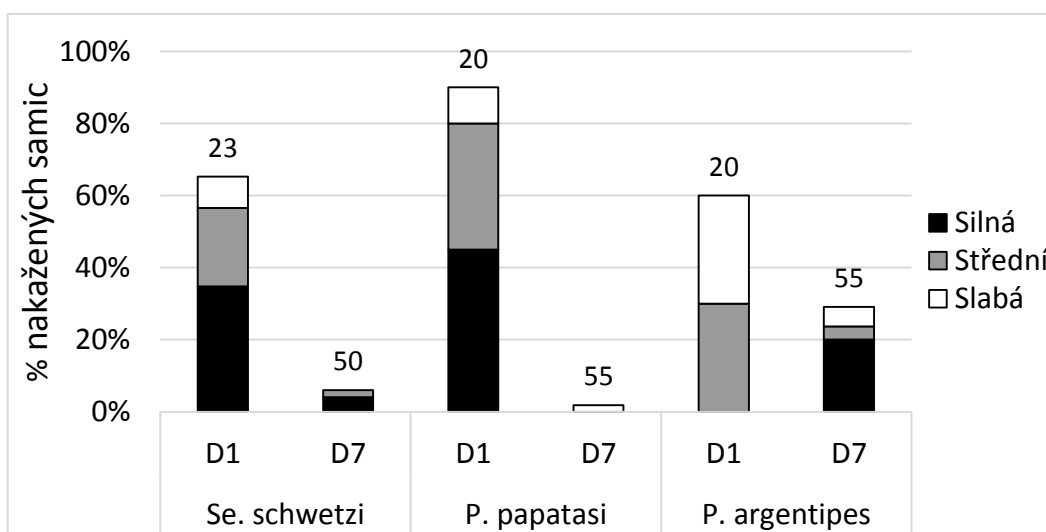
U *L. (S.) tarentolae* jsme studovali vývoj u tří druhů flebotomů: *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*. Pitvy byly provedeny vždy 1. a 7. den po infekci (PI). Výsledky infekčních sání shrnuje a porovnává tab. 17 a obr. 24. Lokalizaci leishmanií v trávicím traktu flebotomů pak popisuje tab. 18 a obr. 25.

Den 1 PI byly leishmanie lokalizovány v nasáté krvi obklopené peritrofickou matrix, u *P. argentipes* jevíly některé leishmanie známky poškození a infekce byly spíše nízké. Den 7 PI se pak leishmanie nacházely pouze ve zbytcích nestrávené krve. U zcela vydefekovaných samic nebyly leishmanie pozorovány. K nákaze došlo jen u jedné samice *P. argentipes*, nicméně intenzita infekce byla velmi nízká, v anteriorním mesenteronu bylo pozorováno pouze několik leishmanií.

**Tab. 17:** Výsledky infekčních sání a porovnání intenzity infekce *L. (S.) tarentolae* ve třech druzích flebotomů: *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*.

Vysvětlivky: PI – po infekci

		Silná	Střední	Slabá	Neinfekční	Celkem
<i>Se. schwetzi</i>	Den 1 PI	8	5	2	8	23
	Den 7 PI	2	1	0	47	50
<i>P. papatasi</i>	Den 1 PI	9	7	2	2	20
	Den 7 PI	0	0	1	54	55
<i>P. argentipes</i>	Den 1 PI	0	6	6	8	20
	Den 7 PI	11	2	3	39	55



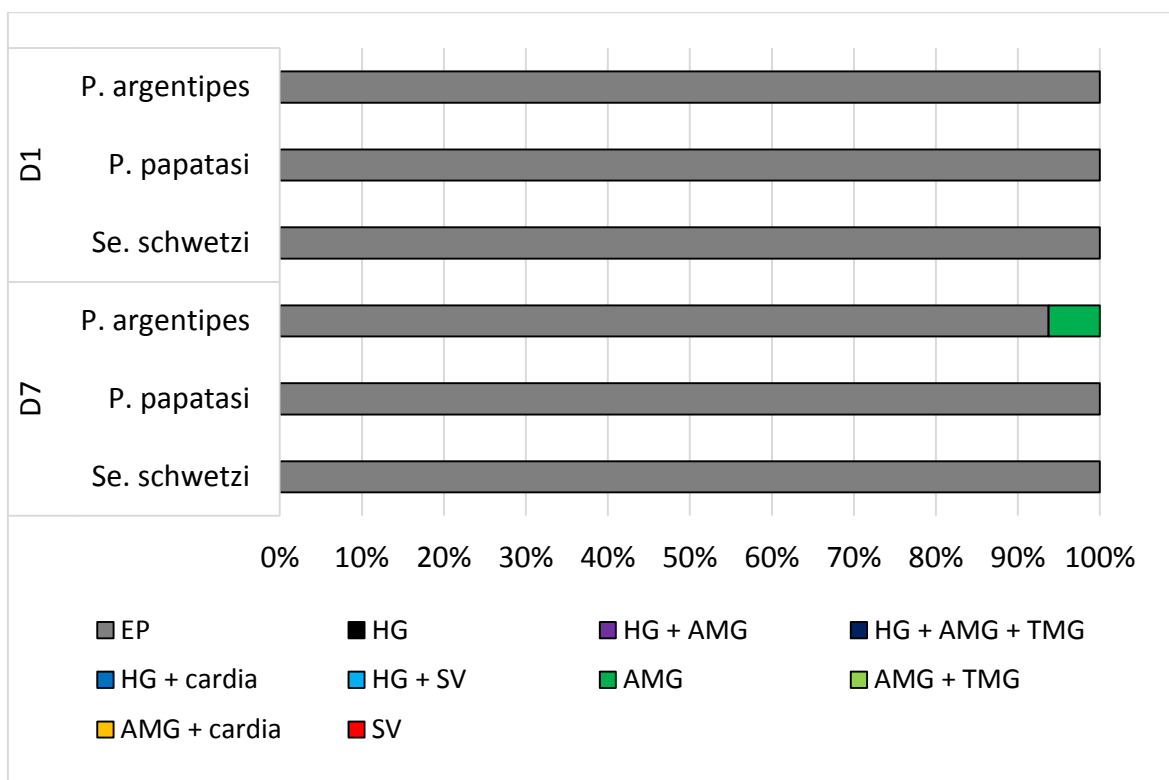
**Obr. 24:** Porovnání intenzity infekce *L. (S.) tarentolae* ve třech druzích flebotomů *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*. Čísla nad sloupci značí počet vypitvaných samic.



**Tab. 18:** Lokalizace infekce *L. (S.) tarentolae* ve třech druzích flebotomů *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*.

Vysvětlivky zkratk: EP – endoperitrofický prostor; HG – zadní střevo; AMG – anteriorní mesenteron; TMG – thorakální mesenteron; cardia – oblast těsně za stomodeální valvou; SV – stomodeální valva  
PI – po infekci

		EP	HG	HG AMG	HG AMG TMG	HG cardia	HG SV	AMG	AMG TMG	AMG cardia	SV
<i>Se. schwetzi</i>	Den 1 PI	15									
	Den 7 PI	3									
<i>P. papatasi</i>	Den 1 PI	18									
	Den 7 PI	1									
<i>P. argentipes</i>	Den 1 PI	12									
	Den 7 PI	15						1			



**Obr. 25:** Lokalizace leishmanií druhu *L. (S.) tarentolae* v trávicím traktu flebotomů druhů *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*.

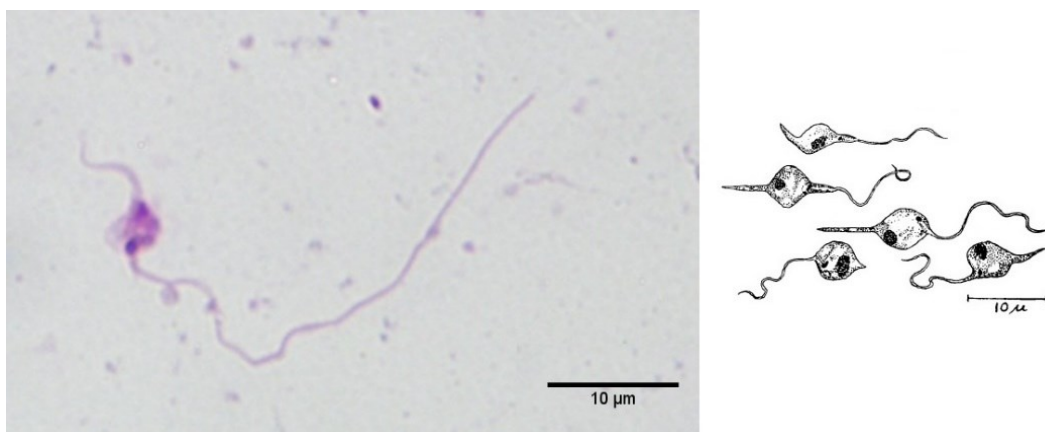
Vysvětlivky zkratk: EP – endoperitrofický prostor; HG – zadní střevo; AMG – anteriorní mesenteron; TMG – thorakální mesenteron; cardia – oblast těsně za stomodeální valvou; SV – stomodeální valva

## 4.2. Morfologické formy sauroleishmanií ve flebotomech

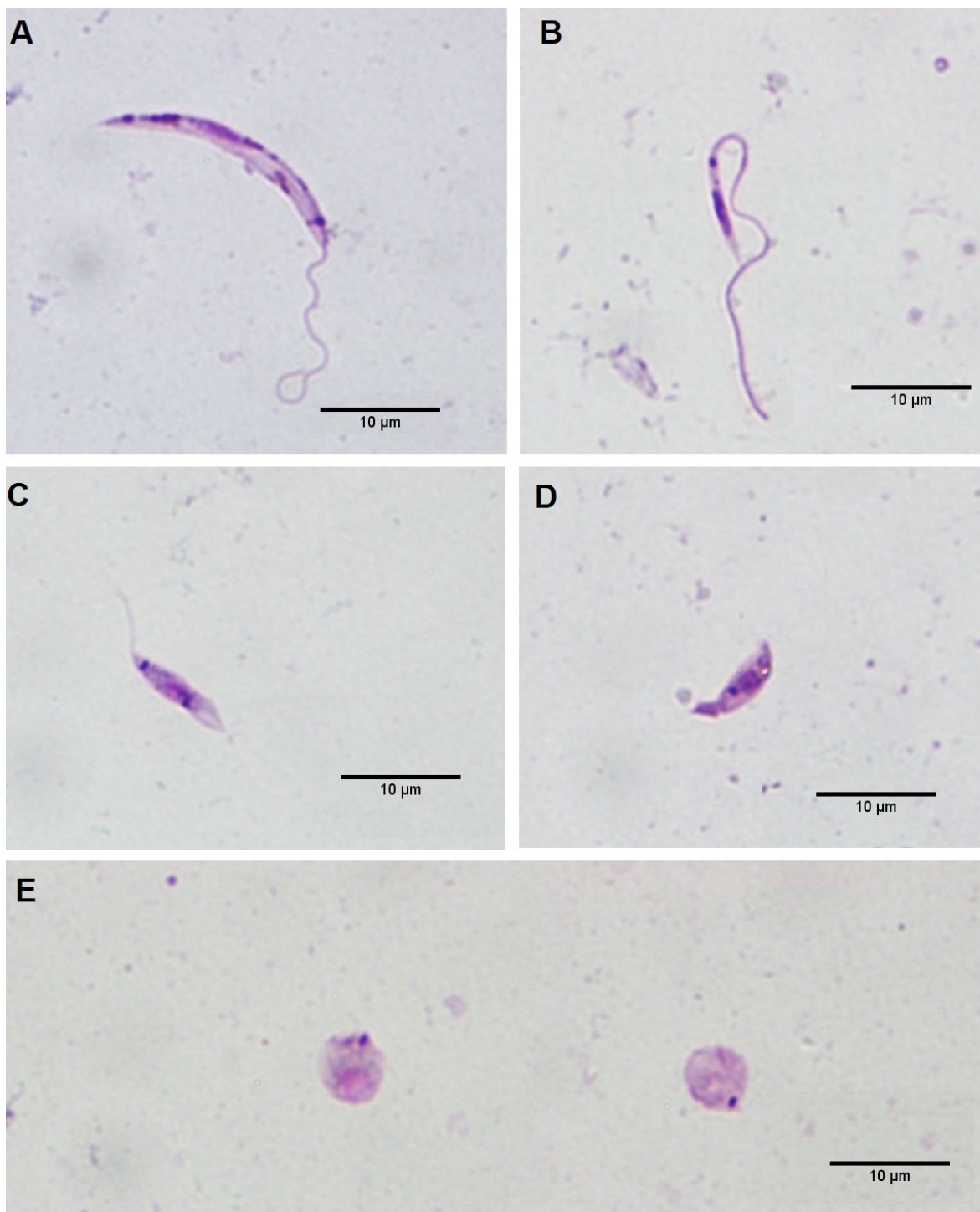
V další části diplomové práce jsem studovala morfologické formy dvou druhů sauroleishmanií – *Leishmania (S.) adleri* a *Leishmania (S.) hoogstraali* během pozdních infekcí ve *Phlebotomus orientalis*. Samice flebotomů byly vypitvány v den 5., 7. a 9. PI a roztěry jejich střev byly nabarveny. Na základě kritérií od Sádlová a kol. (2010) s přihlédnutím k Adler & Theodor (1929) bylo stanoveno 5 morfologických forem:

- Dlouhé nektomonády (obr. 27 - A)
- Metacykličtí promastigoti (obr. 27 - B)
- Krátkí promastigoti – leptomonády (obr. 27 - C)
- Haptomonády (obr. 27 - D)
- Kulaté formy (obr. 27 - E)

U obou druhů sauroleishmanií jsme při prohlížení střev ve světelném mikroskopu pozorovali také další morfologickou formu tzv. „fisherman’s float“ (viz obr. 26), tedy leishmanie připomínající svým tvarem rybářské plováky. Tyto formy mají rozšířené tělo v oblasti jádra, které se pak dále výrazně zužuje. „Fisherman’s float“ již dříve zaznamenalo několik autorů (Heisch, 1958; McMillan, 1965), nicméně doposud nebyly blíže definovány. Na barvených roztěrech navíc nebyly tyto formy dostatečně patrné pro měření, a jsou zde uváděny tedy pouze pro doplnění informací.



**Obr. 26:** „Fisherman’s float“ forma *L. (S.) adleri* v porovnání s ilustrací od Heisch (1958; upraveno).



**Obr. 27:** Morfologické formy sauroleishmanií (barvení Giemsou, zvětšení 1000×).

- A. dlouhá nektomonáda; B. metacyklický promastigot;  
 C. krátký promastigot; D. haptomonáda; E. kulaté formy

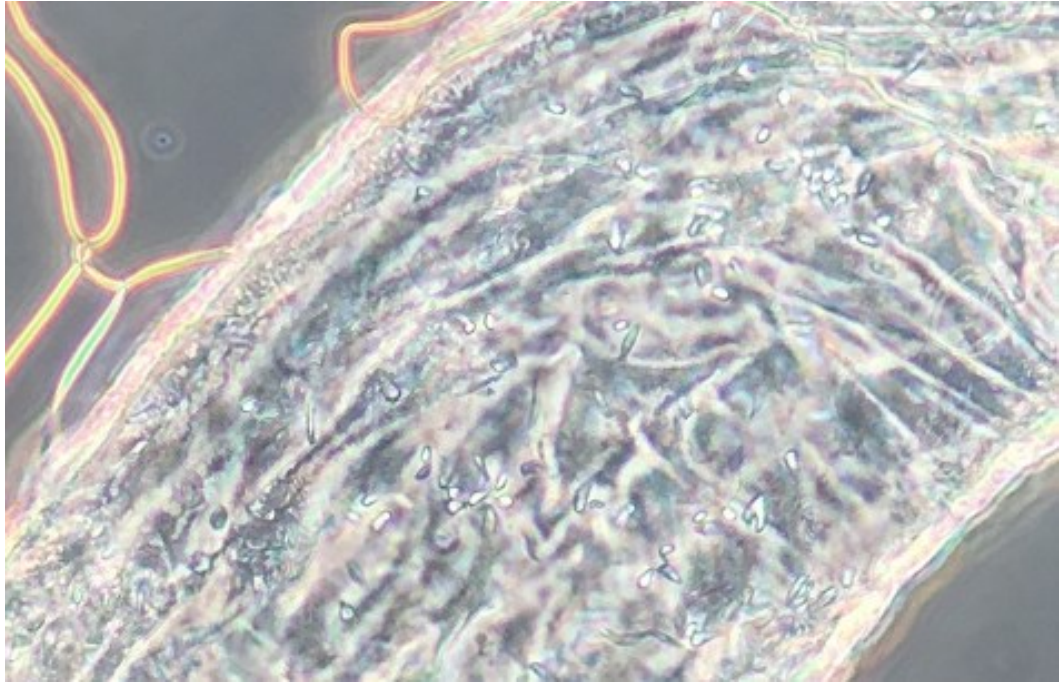
Morfologické formy popsané výše jsou pro oba dva druhy sauroleishmanií totožné, lišil se pouze jejich počtech. Zastoupení jednotlivých forem den 5, 7 a 9 PI popisuje tab. 19 pro *Leishmania (S.) adleri* a tab. 20 pro *Leishmania (S.) hoogstraali*. U *L. (S.) adleri* byly nejvíce zastoupeny dlouhé nektomonády (75 %), zatímco u *L. (S.) hoogstraali* převládali kratší promastigoti (leptomonády) (62 %). Jak u dlouhých nektomonád, tak u krátkých promastigotů jsme pozorovali také buňky s výrazně zkráceným bičíkem, jehož délka se pohybovala kolem 4  $\mu\text{m}$ .

Metacykličtí promastigoti (poměr délky bičíku a těla  $\geq 2$ ) byli zastoupeni u obou druhů sauroleishmanií, a to po celou dobu sledování infekce (den 5, 7 a 9 PI). Tato stádia byla morfologicky značně proměnlivá, podle délky a šířky těla jsme mohli rozlišit tři typy buněk: krátké široké, krátké štíhlé a dlouhé štíhlé metacykly. Některé z těchto forem měly výrazně prodloužené bičíky jejichž délka dosahovala až k 50  $\mu\text{m}$ .

Dalšími formami byly haptomonády s typicky lístečkovitým bičíkem a také kulaté formy s velmi krátkým či chybějícím bičíkem. Rozměry jednotlivých forem v různých fázích infekce shrnují tabulky 21 (a-c) pro *Leishmania (S.) adleri* a tabulky 22 (a-c) pro *Leishmania (S.) hoogstraali*.

Především haptomonádní formy, které bývají pevně přichyceny k povrchu střeva (viz obr. 28) nejsou v roztěrech dobře detekovatelné a jsou tedy pozorovány spíše zřídka. Vzhledem k tomu, že doposud nikdo detailněji nepopsal morfologické formy sauroleishmanií v přenašeči, jsme se rozhodli v našem případě měřit právě i haptomonády, ačkoliv je jejich počet značně podhodnocen. Původně bylo střevo při pitvách rozděleno v místě malpighických trubic na dvě části pro přesné stanovení forem v přední a zadní části střeva. Nicméně z důvodu nižšího počtu leishmanií v zadní části střeva a hůře detekovatelných haptomonád se nepodařilo v zadním střevě změřit vypovídající počet leishmanií. Formy vyskytující se v zadní části střeva jsou tedy popsány samostatně níže.

V oblasti zadního střeva jsou dle prohlížení ve světelném mikroskopu nejčastěji zastoupenými formami přisedlé haptomonády. V menší míře byly v proktodeu pozorovány ale i štíhlé formy s dlouhým bičíkem, kdy u části těchto forem docházelo k přichycení bičíku k chitinózní výstelce proktodea. Část těchto forem byla v zadním střevě volně. Vypovídající počet leishmanií v zadním střevě se podařilo naměřit pouze při velmi silné infekci *L. (S.) adleri* u jedné samice *P. orientalis* 5. den PI. V tomto případě bylo v zadním střevě zastoupeno všech pět zmíněných morfologických forem. Přítomna byla také stádia s dlouhými bičíky, která dle definice odpovídají metacyklům.



**Obr. 28:** Přisedlé formy *L. (S.) adleri* v zadním střevě *P. orientalis* ve světelném mikroskopu (zvětšeno 400×).

**Tab. 19:** Zastoupení jednotlivých morfologických forem druhu *L. (S.) adleri*.

	Den 5 PI	Den 7 PI	Den 9 PI	Celkem
Dlouhé nektomonády	106	117	121	344
Metacykličtí promastigoti	14	2	3	19
Krátcí promastigoti – leptomonády	48	21	16	85
Haptomonády	7	0	0	7
Kulaté formy	2	1	0	3
Celkem	177	141	140	458

**Tab. 20:** Zastoupení jednotlivých morfologických forem druhu *L. (S.) hoogstraali*.

	Den 5 PI	Den 7 PI	Den 9 PI	Celkem
Dlouhé nektomonády	16	70	48	134
Metacykličtí promastigoti	12	15	1	28
Krátcí promastigoti – leptomonády	112	58	100	270
Haptomonády	0	0	1	1
Kulaté formy	0	0	3	3
Celkem	140	143	153	436

## Měření forem *Leishmania (S.) adleri* v *P. orientalis*

**Tab. 21 (a):** Rozměry jednotlivých forem *L. (S.) adleri* – den 5 PI.

		Délka těla	Šířka těla	Délka bičíku
Dlouhé nektomonády	Průměr (odchylka)	18,37 (± 0,23)	1,92 (± 0,05)	20,77 (± 0,61)
	Medián	17,91	1,87	20,45
	Minimum	14,0	1,0	3,3
	Maximum	25,6	4,3	38
	Počet forem	106	106	106
Metacykličtí promastigoti	Průměr (odchylka)	11,73 (± 1,32)	1,75 (± 0,30)	31,8 (± 3,15)
	Medián	12,07	1,29	31,54
	Minimum	3,3	0,9	14,8
	Maximum	20,1	4,4	53,2
	Počet forem	14	14	14
Krátcí promastigoti (leptomonády)	Průměr (odchylka)	11,11 (± 0,28)	2,15 (± 0,08)	14,43 (± 0,8)
	Medián	11,42	2,04	12,86
	Minimum	5,9	1,2	5,5
	Maximum	13,9	4,5	32,1
	Počet forem	48	48	48
Haptomonády	Průměr (odchylka)	8,06 (± 0,37)	2,13 (± 0,11)	2,36 (± 0,31)
	Medián	8,52	2,21	2,2
	Minimum	6,9	1,7	1,3
	Maximum	9,1	2,5	4
	Počet forem	7	7	7
Kulaté formy	Průměr (odchylka)	4,8 (± 0,04)	4,25 (± 0,32)	0,89 (± 0,89)
	Medián	4,8	4,25	0,89
	Minimum	4,8	3,9	0
	Maximum	4,8	4,6	1,8
	Počet forem	2	2	2
Celkem		177		

**Tab. 21 (b):** Rozměry jednotlivých forem *L. (S.) adleri* – den 7 PI.

		Délka těla	Šířka těla	Délka bičíku
Dlouhé nektomonády	Průměr (odchylka)	18,85 (± 0,28)	2,1 (± 0,03)	18,38 (± 0,47)
	Medián	18,51	2,02	18,1
	Minimum	14	1,4	3,8
	Maximum	26,8	3,1	38
	Počet forem	117	117	117
Metacykličtí promastigoti	Průměr (odchylka)	11,51 (± 5,82)	1,78 (± 0,07)	24,64 (± 10,48)
	Medián	11,51	1,78	24,64
	Minimum	5,7	1,7	14,2
	Maximum	17,3	1,9	35,1
	Počet forem	2	2	2
Krátcí promastigoti (leptomonády)	Průměr (odchylka)	13,33 (± 0,33)	2,31 (± 0,22)	13,59 (± 0,98)
	Medián	12,81	2,02	13,74
	Minimum	8,4	1,4	2,8
	Maximum	13,9	5,1	23,5
	Počet forem	21	21	21
Kulaté formy	Průměr (odchylka)	3,79	3,88	0,87
	Medián	3,79	3,88	0,87
	Minimum	3,8	3,9	0,9
	Maximum	3,8	3,9	0,9
	Počet forem	1	1	1
Celkem		141		

**Tab. 21 (c):** Rozměry jednotlivých forem *L. (S.) adleri* – den 9 PI.

		Délka těla	Šířka těla	Délka bičíku
Dlouhé nektomonády	Průměr (odchylka)	18,31 ( $\pm 0,26$ )	2,14 ( $\pm 0,03$ )	17,43 ( $\pm 0,52$ )
	Medián	17,78	2,12	17,27
	Minimum	14,1	1,3	3,8
	Maximum	29,2	3,7	34,7
	Počet forem	121	121	121
Metacykličtí promastigoti	Průměr (odchylka)	6,01 ( $\pm 0,25$ )	3,45 ( $\pm 1,19$ )	17,14 ( $\pm 2,64$ )
	Medián	5,81	2,8	17,01
	Minimum	5,7	1,8	12,6
	Maximum	6,5	5,8	21,8
	Počet forem	3	3	3
Krátcí promastigoti (leptomonády)	Průměr (odchylka)	12,675 ( $\pm 0,31$ )	2,2 ( $\pm 0,1$ )	13,26 ( $\pm 1,26$ )
	Medián	12,98	2,12	13,08
	Minimum	9,1	1,6	4
	Maximum	13,9	2,9	20,9
	Počet forem	16	16	16
Celkem		140		

**Měření forem *Leishmania (S.) hoogstraali* v *P. orientalis***

**Tab. 22 (a):** Rozměry jednotlivých forem *L. (S.) hoogstraali* – den 5 PI.

		Délka těla	Šířka těla	Délka bičíku
Dlouhé nektomonády	Průměr (odchylka)	16,36 ( $\pm 0,58$ )	2,29 ( $\pm 0,14$ )	17,85 ( $\pm 1,38$ )
	Medián	16,1	2,3	17,28
	Minimum	14	1,5	6,7
	Maximum	21,8	3,9	27,6
	Počet forem	16	16	16
Metacykličtí promastigoti	Průměr (odchylka)	7,27 ( $\pm 0,82$ )	3,3 ( $\pm 0,27$ )	19,25 ( $\pm 1,75$ )
	Medián	7,09	3,19	16,97
	Minimum	3,9	2,1	9,9
	Maximum	12,8	5	29
	Počet forem	12	12	12
Krátcí promastigoti (leptomonády)	Průměr (odchylka)	10,99 ( $\pm 0,16$ )	2,2 ( $\pm 0,04$ )	12,42 ( $\pm 0,5$ )
	Medián	11,21	2,17	11,7
	Minimum	6,7	1,5	1
	Maximum	13,8	3,7	26,1
	Počet forem	112	112	112
Celkem		140		

**Tab. 22 (b):** Rozměry jednotlivých forem *L. (S.) hoogstraali* – den 7 PI.

		Délka těla	Šířka těla	Délka bičíku
Dlouhé nektomonády	Průměr (odchylka)	17,15 (± 0,36)	2,26 (± 0,58)	19,54 (± 0,88)
	Medián	16,13	2,21	19,57
	Minimum	14	1,4	3,9
	Maximum	26,9	4,4	39,1
	Počet forem	70	70	70
Metacykličtí promastigoti	Průměr (odchylka)	12,03 (± 1,06)	2,58 (± 0,28)	26,81 (± 2,02)
	Medián	11,15	2,13	24,12
	Minimum	6,9	1,8	18,1
	Maximum	19,7	5,9	41,8
	Počet forem	15	15	15
Krátcí promastigoti (leptomonády)	Průměr (odchylka)	11,38 (± 0,22)	2,19 (± 0,72)	14,34 (± 0,73)
	Medián	11,45	2,04	13,67
	Minimum	7,3	1,5	3,9
	Maximum	13,9	4,1	25,3
	Počet forem	58	58	58
Celkem		143		

**Tab. 22 (c):** Rozměry jednotlivých forem *L. (S.) hoogstraali* – den 9 PI.

		Délka těla	Šířka těla	Délka bičíku
Dlouhé nektomonády	Průměr (odchylka)	16,38 (± 0,27)	2,32 (± 0,07)	17,47 (± 0,63)
	Medián	15,61	2,24	17,91
	Minimum	14,1	1,3	5,9
	Maximum	21,1	3,6	25,4
	Počet forem	48	48	48
Metacykličtí promastigoti	Průměr (odchylka)	9,25	1,54	19,95
	Medián	9,25	1,54	19,95
	Minimum	9,3	1,5	19,9
	Maximum	9,3	1,5	19,9
	Počet forem	1	1	1
Krátcí promastigoti (leptomonády)	Průměr (odchylka)	10,7 (± 0,2)	2,36 (± 0,06)	12,17 (± 0,62)
	Medián	11,02	2,26	12,37
	Minimum	4,8	1,5	1,4
	Maximum	13,9	4,9	24,4
	Počet forem	100	100	100
Haptomonády	Průměr (odchylka)	5,45	2,69	2,3
	Medián	5,45	2,69	2,3
	Minimum	5,5	2,7	2,3
	Maximum	5,5	2,7	2,3
	Počet forem	1	1	1
Kulaté formy	Průměr (odchylka)	6,05 (± 0,24)	5,32 (± 0,17)	0,45 (± 0,22)
	Medián	5,8	5,29	0,67
	Minimum	5,8	5,1	0
	Maximum	6,5	5,6	0,7
	Počet forem	3	3	3
Celkem		153		



### 4.3. Experimentální infekce gekonů

Gekoni druhu *Paroedura picta* byli experimentálně infikováni dvěma druhy sauroleishmanií, čtyři jedinci byli nakaženi *Leishmania (S.) adleri* a zbylí čtyři *Leishmania (S.) hoogstraali*. Vždy dva gekoni ze skupiny byli infikováni intraperitoneálně a dva perorálně, infekční dávka byla  $10^7$  buněk. Gekoni byli na přítomnost leishmanií vyšetřováni po dobu 12 týdnů pomocí xenodiagnostiky. Část nasátých samic byla vypitvána a jejich střeva byla použita na kultivaci, výsledky shrnuje tab. 23. Zbylá část nasátých samic byla fixována pro PCR detekci leishmanií. Průkaz leishmanií pomocí PCR byl u všech samic *Se. schwetzi* nasátých na infikovaných gekonech negativní, výsledky shrnuje tab. 24.

Zdravotní stav gekonů a jejich kondice byly po celou dobu sledování infekce dobré. Avšak týden 9 PI došlo k výraznému snižování váhy u gekona č. 3 - intraperitoneální infekce *L. (S.) hoogstraali*, což následně vedlo k jeho úmrtí. Gekon byl nalezen delší dobu po úmrtí (přes víkend) a nebylo tak možné odebrat jeho vnitřní orgány pro PCR detekci leishmanií.

**Tab. 23:** Výsledky kultivací nasátých střev *Se. schwetzi* při xenodiagnostickém vyšetření.

Vysvětlivky: 1-8 – číslo gekona; A – gekoni infikováni *L. (S.) adleri*; H – gekoni infikováni *L. (S.) hoogstraali*; I – gekoni infikováni intraperitoneálně; P – gekoni infikováni perorálně; T – týden po infekci.

	T0 PI	T3 PI	T6 PI	T9 PI	T12 PI
1-A-I	∅	∅	∅	∅	∅
2-A-I	∅	∅	∅	∅	∅
3-H-I	∅	∅	∅	∅	-
4-H-I	∅	∅	∅	∅	∅
5-A-P	∅	∅	∅	∅	∅
6-A-P	∅	∅	∅	∅	∅
7-H-P	∅	∅	∅	∅	∅
8-H-P	∅	∅	∅	∅	∅

**Tab. 24:** PCR detekce sauroleishmanií ve flebotomech *Se. schwetzi*.

Vysvětlivky: 1-8 – číslo gekona; A – gekoni infikovaní *L. (S.) adleri*; H – gekoni infikovaní *L. (S.)*

*hoogstraali*; I – gekoni infikování intraperitoneálně; P – gekoni infikování perorálně; T – týden po infekci.

Gekon	Čas	Počet flebotomů	Výsledek
1-A-I	T0 PI	3	Neg.
	T3 PI	6	Neg.
	T6 PI	6	Neg.
	T9 PI	4	Neg.
	T12 PI	7	Neg.
2-A-I	T0 PI	8	Neg.
	T3 PI	6	Neg.
	T6 PI	10	Neg.
	T9 PI	6	Neg.
	T12 PI	3	Neg.
3-H-I	T0 PI	10	Neg.
	T3 PI	1	Neg.
	T6 PI	1	Neg.
	T9 PI	6	Neg.
	T12 PI	-	-
4-H-I	T0 PI	6	Neg.
	T3 PI	5	Neg.
	T6 PI	2	Neg.
	T9 PI	4	Neg.
	T12 PI	5	Neg.
5-A-P	T0 PI	4	Neg.
	T3 PI	1	Neg.
	T6 PI	3	Neg.
	T9 PI	4	Neg.
	T12 PI	5	Neg.
6-A-P	T0 PI	-	-
	T3 PI	4	Neg.
	T6 PI	5	Neg.
	T9 PI	8	Neg.
	T12 PI	4	Neg.
7-H-P	T0 PI	5	Neg.
	T3 PI	2	Neg.
	T6 PI	3	Neg.
	T9 PI	2	Neg.
	T12 PI	2	Neg.
8-H-P	T0 PI	24	Neg.
	T3 PI	9	Neg.
	T6 PI	6	Neg.
	T9 PI	3	Neg.
	T12 PI	3	Neg.

Po 12 týdnech PI byla skupina infikována intraperitoneálně usmrcena a pro vyloučení nákazy vnitřních orgánů bylo gekonům odebráno několik vzorků na PCR detekci sauroleishmanií. DNA sauroleishmanií nebyla zaznamenána v žádném z nich, výsledky shrnuje tab. 25.

**Tab. 25:** PCR detekce sauroleishmanií ve tkáních gekonů.

Vysvětlivky: 1-8 – číslo gekona; A – gekoni infikovaní *L. (S.) adleri*; H – gekoni infikovaní *L. (S.) hoogstraali*; T – týden po infekci.

Gekon	Usmrcení	Počet vyšetřovaných vzorků	Výsledek
1-A-I	T12 PI	4 (krev, slezina, játra, kůže)	Neg.
2-A-I	T12 PI	4 (krev, slezina, játra, kůže)	Neg.
4-H-I	T12 PI	4 (krev, slezina, játra, kůže)	Neg.

Skupina nakažena perorálně byla 12. týden PI znovu infikována intraperitoneálně a vyšší infekční dávkou  $5 \times 10^7$ . Gekoni byli opět vyšetřováni pomocí xenodiagnostiky po dobu dalších 12 týdnů. Výsledky z kultivací nasátých střev *Se. schwetzi* shrnuje pro tuto reinfikovanou skupinu tab. 26. Při vyšetření pomocí PCR nebyla přítomnost leishmanií u samic *Se. schwetzi* sátých na reinfikovaných gekonech potvrzena viz tab. 27.

**Tab. 26:** Výsledky kultivací nasátých střev *Se. schwetzi* při xenodiagnostickém vyšetření u reinfikované skupiny gekonů.

Vysvětlivky: 5-8 – číslo gekona; A – gekoni infikovaní *L. (S.) adleri*; H – gekoni infikovaní *L. (S.) hoogstraali*; Re – reinfikovaná skupina; T – týden po infekci.

	T15 PI	T18 PI	T21 PI	T24 PI
5-A-Re	∅	∅	∅	∅
6-A-Re	∅	∅	∅	∅
7-H-Re	∅	∅	∅	∅
8-H-Re	∅	∅	∅	∅

**Tab. 27:** PCR detekce sauroleishmanií ve flebotomech *Se. schwetzi* – reinfikovaná skupina.

Vysvětlivky: 5-8 – číslo gekona; A – gekoni infikovaní *L. (S.) adleri*; H – gekoni infikovaní *L. (S.) hoogstraali*; Re – reinfikovaná skupina; T – týden po infekci.

Gekon	Čas	Počet flebotomů	Výsledek
5-A-Re	T15 PI	5	Neg.
	T18 PI	5	Neg.
	T21 PI	5	Neg.
	T24 PI	6	Neg.
6-A-Re	T15 PI	6	Neg.
	T18 PI	4	Neg.
	T21 PI	6	Neg.
	T24 PI	1	Neg.
7-H-Re	T15 PI	1	Neg.
	T18 PI	2	Neg.
	T21 PI	4	Neg.
	T24 PI	4	Neg.
8-H-Re	T15 PI	5	Neg.
	T18 PI	7	Neg.
	T21 PI	10	Neg.
	T24 PI	1	Neg.

Experiment byl 24. týden PI ukončen. Gekoni z reinfikované skupiny byli usmrceni a také jim byly odebrány vzorky vnitřních orgánů pro PCR detekci leishmanií. Ani v tomto případě nebyla DNA sauroleishmanií detekována v žádném ze vzorků viz tab. 28.

**Tab. 28:** PCR detekce sauroleishmanií ve tkáních gekonů – reinfikovaná skupina.

Vysvětlivky: 1-8 – číslo gekona; A – gekoni infikovaní *L. (S.) adleri*; H – gekoni infikovaní *L. (S.) hoogstraali*; Re – reinfikovaná skupina; T – týden po infekci.

Gekon	Usmrcení	Počet vyšetřovaných vzorků	Výsledek
5-A-Re	T24 PI	4 (krev, slezina, játra, kůže)	Neg.
6-A-Re	T24 PI	4 (krev, slezina, játra, kůže)	Neg.
7-H-Re	T24 PI	4 (krev, slezina, játra, kůže)	Neg.
8-H-Re	T24 PI	4 (krev, slezina, játra, kůže)	Neg.

## 5. Diskuze

Za přenašeče plazích leishmanií jsou považováni flebotomové rodu *Sergentomyia*, kteří ochotně sají na studenokrevných obratlovcích. Avšak ochota sát příležitostně na plazech byla potvrzena i u několika druhů flebotomů rodu *Phlebotomus* a to u *P. papatasi*, *P. caucasicus* a *P. sergenti* (Adler & Theodor, 1929; shrnuto v Belova, 1971). Také se ukázalo, že některé druhy sauroleishmanií byly schopny v těchto flebotomech vyvíjet pozdní infekce. Typickým příkladem je *Leishmania (S.) ceramodactyli* a *Leishmania (S.) tarentolae*, jejichž vývoj v *P. papatasi* popsali Adler & Theodor (1929).

Podle klasifikace od Lainson & Shaw (1987) jsou sauroleishmanie řazeny do skupiny Hypopylaria a je pro ně typický vývoj omezený na zadní střevo flebotomů. Nicméně několik autorů také zaznamenalo anteriorní migraci některých druhů sauroleishmanií v mesenteronu flebotomů (shrnuto v Adler, 1964; Telford, 2009), což naznačuje možnost peripylárního vývoje. Problémem je, že většina studií o sauroleishmaniích je již staršího data a informace jsou mnohdy rozporuplné. Nelze s jistotou říci, zda bičíkovci pozorovaní ve flebotomech opravdu náleželi mezi *Sauroleishmania*. Na základě nejasného způsobu vývoje sauroleishmanií ve flebotomech a za použití modernějších výzkumných metod jsme se tedy rozhodli provést srovnávací studii se čtyřmi druhy sauroleishmanií ve vybraných druzích flebotomů chovaných v naší laboratoři.

Vývoj dvou druhů sauroleishmanií, *Leishmania (S.) gymnodactyli* a *Leishmania (S.) tarentolae*, jsme porovnávali u tří druhů flebotomů: *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*. Kromě jediného zástupce rodu *Sergentomyia*, kterého jsme měli k dispozici (*Se. schwetzi*), jsme použili jednoho zástupce rodu *Phlebotomus*, který je považován za specifického přenašeče (*P. papatasi*) a jednoho zástupce, jenž je permissivním přenašečem (*P. argentipes*) (Volf & Myšková, 2007). Tyto dva druhy sauroleishmanií přežívaly ve všech třech druzích flebotomů v časně fázi infekce (den 1 po sání), avšak nevytvářely pozdní infekce v ani jednom z nich a byly vydefekovány spolu se zbytky nestrávené potravy. Neúspěšný vývoj *L. (S.) tarentolae* v *P. papatasi* je v rozporu s pozorováním Adler & Theodor (1929), kteří naopak popsali u tohoto druhu flebotomů přítomnost leishmanií v oblasti cardie den 3 a 5 po infekci. Rozdílné výsledky mohou být dle mého názoru zapříčiněné použitím odlišných kmenů *L. (S.) tarentolae*.

Další dva druhy sauroleishmanií, *L. (S.) adleri* a *L. (S.) hoogstraali*, jsme testovali nejprve ve výše zmíněných třech druzích flebotomů. Oba druhy sauroleishmanií se úspěšně vyvíjely v *P. argentipes*, a tak jsme okruh testovaných flebotomů rozšířili o další tři

druhy: *P. sergenti* a *P. duboscqi*, kteří jsou považováni za specifické přenašeče (shrnuť v Dostálová & Volf, 2012), a *P. orientalis*, který je permisivním přenašečem (Šeblová a kol., 2013).

Ukázalo se, že *L. (S.) adleri* byla schopná vytvářet pozdní infekce u všech těchto šesti druhů flebotomů. Ve flebotomech *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. sergenti* byly leishmanie lokalizované v zadním střevě, zatímco u druhů *P. argentipes*, *P. duboscqi* a *P. orientalis* se leishmanie vyvíjely také v přední části trávicího traktu, tedy peripylárně. Navíc u druhů *P. argentipes* a *P. orientalis* docházelo ke kolonizaci stomodeální valvy.

Anteriorní migraci *L. (S.) adleri* popsal u flebotomů *Se. clydei* již dříve Heisch (1958). Nicméně tuto informaci nelze považovat za zcela relevantní. Autor totiž soudil, že se jedná o tento druh sauroleishmanie pouze na základě podobnosti pozorovaných bičíkovců s těmi, které z ještěrek *Latastia longicaudata* izoloval a popsal jako *L. (S.) adleri*. Ačkoliv byli nakažení flebotomové odchyceni ve stejné lokalitě jako infikované ještěrky, nelze s jistotou říct, že se skutečně jednalo o sauroleishmanie, natož o druh *L. (S.) adleri*.

Naproti tomu u flebotomů druhů *P. papatasi* a *P. sergenti* se *Leishmania (S.) adleri* vyvíjela po celou dobu sledování infekce takřka výhradně v zadním střevě, tedy hypopylárně. Odlišný způsob vývoje *L. (S.) adleri* v různých druzích flebotomů byl překvapivý a toto zjištění odporuje hypotéze Lainson & Shaw (1987) o dělení do skupin Suprapylaria, Peripylaria a Hypopylaria.

Důvodem hypopylárního vývoje *L. (S.) adleri* v *P. sergenti* a *P. papatasi* může být neschopnost přichycení se v mesenteronu. Tyto dva druhy flebotomů jsou řazeny mezi specifické vektory. *Phlebotomus sergenti* je specifickým přenašečem *L. tropica* (Kamhawi a kol., 2000), zatímco *P. papatasi* je specifickým vektorem *L. major* (Pimenta a kol., 1994) a *L. turanica* (Chajbullinová a kol., 2012). U těchto druhů flebotomů se leishmanie přichytávají na epitel mesenteronu díky druhově specifickému lipofosfoglykanu (LPG). U *L. major* se LPG s terminálními galaktosovými epitopy váže na galektin *P. papatasi* (Kamhawi a kol., 2004) a velmi podobný LPG má i *L. turanica* (Volf a kol., 2014). LPG u sauroleishmanií nebyl doposud detailněji zkoumán a tomuto tématu se věnovalo jen velmi málo studií. Zdá se, že *L. (S.) tarentolae* ztratila některé geny podílející se na syntéze LPG (Raymond a kol., 2011). U *L. (S.) adleri* se nepodařilo prokázat existenci LPG pomocí protilátek CA7AE, které rozpoznávají fosforylované disacharidy, jež jsou součástí LPG u patogenních leishmanií (Previato a kol., 1997). Schopnost *L. (S.) adleri* udržet se v trávicím traktu *P. papatasi* a *P. sergenti* i po defekaci si tedy vysvětlujeme tím, že sauroleishmanie se sice nejsou schopny přichytit v mesenteronu, ale využívají ke svému

přichycení odlišný mechanismus a jinou lokalizaci v trávicí trubici flebotoma. Jejich bičík se váže k chitinózní výstelce zadního střeva, a proto nejsou leishmanie při defekaci vyloučeny.

Naproti tomu flebotomové druhu *P. argentipes* a *P. orientalis* jsou řazeni mezi permissivní vektory a v laboratorních podmínkách jsou náchylní vůči různým druhům leishmanií, které v nich mohou vytvořit i plnohodnotné pozdní infekce (shrnuto v Dostálová & Volf, 2012). U permissivních přenašečů se leishmanie přichytávají jiným mechanismem, který je nezávislý na LPG. Jejich mesenteron je pokryt vysoce glykosylovanými proteiny, které byly u druhu *Lu. longipalpis* popsány jako mucin (Myšková a kol., 2016). *Leishmanie* různých druhů a zřejmě i některé sauroleishmanie se tak mohou vázat nespecificky na mesenteron permissivních druhů flebotomů. Právě u těchto druhů jsme také zaznamenali kolonizaci stomodeální valvy *L. (S.) adleri*.

Nicméně otázkou zůstává, jak si vysvětlit anteriorní migraci *Leishmania (S.) adleri* u druhu *P. duboscqi*, který bývá zpravidla považován za specifického vektora (Svárovská a kol., 2010).

U stejných šesti druhů flebotomů (*Se. schwetzi*, *P. papatasi*, *P. argentipes*, *P. duboscqi*, *P. sergenti* a *P. orientalis*) jsme také zkoumali vývoj *Leishmania (S.) hoogstraali*. Tento druh sauroleishmanie vyvíjel pozdní infekce pouze u druhů *P. argentipes* a *P. orientalis*. V těchto dvou druzích flebotomů se *L. (S.) hoogstraali* vyvíjela peripylárně a docházelo také ke kolonizaci stomodeální valvy. U zbylých druhů flebotomů se infekce ztrácely po defekaci. Neúspěšný vývoj *L. (S.) hoogstraali* v *P. papatasi* popsal již dříve McMillan (1965) a naše výsledky jeho tvrzení potvrzují. Lainson a kol. (1977) experimentálně infikovali flebotomy druhu *Lutzomyia longipalpis*, nicméně ani v tomto druhu flebotoma nevytvářela *L. (S.) hoogstraali* pozdní infekce. Autoři poukazují na fakt, že tak zřejmě bylo z důvodu nekompetentnosti tohoto vektora, který je rozšířen v Novém světě, zatímco tento druh sauroleishmanie je rozšířen ve Starém světě. Dle mně dostupné literatury nebyl vývoj *L. (S.) hoogstraali* u jiných druhů flebotomů zkoumán.

Výše zmíněné výsledky prokázaly, že u některých druhů sauroleishmanií opravdu dochází k anteriorní migraci v trávicím traktu flebotomů a k peripylárnímu způsobu vývoje. Tuto schopnost jsme zaznamenali opakovaně u *L. (S.) adleri* a *L. (S.) hoogstraali*, které byly v některých flebotomech také schopny kolonizace stomodeální valvy. Pokud je mi známo, přítomnost sauroleishmanií přisedlých na stomodeální valvě byla popsána pouze v jednom případě, a to u samic *Se. minuta*, které zkoumal prof. J. A. Rioux v roce 1969 ve Francii (shrnuto v Killick-Kendrick, 1979). Avšak i v tomto případě není jasné, zda pozorovaný

parazit opravdu náležel mezi *Sauroleishmania*. Sám Killick-Kendrick poukazuje na přítomnost bičíkovců v malpigických trubicích flebotomů, což je u leishmanií nezvyklé a podle něj tedy flebotomové mohli být nakaženi také některými zástupci jednohostitelských trypanosomatid.

Pro budoucí studium sauroleishmanií by bylo žádoucí získat další kolonii flebotomů rodu *Sergentomyia*. Vhodným adeptem je *Se. minuta*, která se zdá být kompetentním vektorem pro některé druhy sauroleishmanií (Adler & Theodor, 1935; shrnuto v Killick-Kendrick, 1979; Telford, 2009). Tento druh se vyskytuje v některých oblastech jižní Evropy a je zajímavý také tím, že v něm byly nalezeny i leishmanie patogenní pro člověka (Maia & Depaquit, 2016). Je možné, že *Se. minuta* by byla pro studium sauroleishmanií vhodnější než *Se. schwetzi*, kterou se zatím nepodařilo nakazit žádným druhem leishmanií, kromě *L. (S.) adleri*, která vyvíjela pouze slabé infekce. Důvodem je, že u *Se. schwetzi* se peritrofická matrix rozpadá až těsně před defekací, což neposkytuje promastigotům dostatek času pro uchycení ve střevě (Sádlová a kol., 2013). Dynamika tvorby a rozpadu peritrofické matrix je druhově specifický proces (Pružinová a kol., 2015). Je tedy možné, že u *Se. minuta* bude rozpad peritrofické matrix a defekace probíhat jiným způsobem.

Způsob, jakým se plazí hostitelé sauroleishmaniemi nakazí je nejasný. Vzhledem k hypopylárnímu vývoji, který je pro *Sauroleishmania* typický, se doposud uvažovalo zejména o kontaminativním přenosu, kdy se hostitel nakazí pozřením infikovaného vektora (Killick-Kendrick a kol., 1986). Schopnost kolonizace stomodeální valvy a anteriorní migrace některých druhů sauroleishmanií naznačuje možnost přenosu při sání přenašeče. Dle dostupné literatury se experimentální infekce plazů sauroleishmaniemi sáním flebotomů či pozřením nakaženého flebotoma v laboratořích dosud neuskutečnily nebo nezdařily a přesný mechanismus nákazy tedy není objasněn (shrnuto v Telford, 2009).

Morfologie sauroleishmanií byla doposud detailněji popsána pouze ve studii Adler & Theodor (1929). Pro lepší pochopení způsobu vývoje sauroleishmanií ve flebotomech jsme se proto rozhodli popsat morfologické formy vyskytující se v různých fázích infekce, a to u *Leishmania (S.) adleri* a *Leishmania (S.) hoogstraali* ve flebotomech *P. orientalis*. Ukázalo se, že oba tyto druhy vytvářely stejné morfologické formy.

Nejčastěji jsme pozorovali dlouhé nektomonády a krátké promastigoty. Méně byla zastoupena stádia morfologicky shodná s metacyklickými promastigoty, haptomonády



a také kulaté formy, které měly velmi krátký bičík, jenž dokonce v některých případech nebyl vůbec viditelný. Přítomnost kulatých buněk byla překvapivá, jelikož u savčích leishmanií nebyla tato stádia při vývoji ve flebotomech zaznamenána. Nicméně tyto formy popsali již dříve ve své studii Adler & Theodor (1929) u *L. (S.) ceramodactyli* při vývoji v zadním střevě *P. papatasi* a lze je tedy považovat za typické životní stádium sauroleishmanií v přenašeči. Jediným rozdílem byla lokalizace těchto forem, kdy v našem případě byla kulatá stádia pozorována i v přední části trávicího traktu flebotomů, konkrétně v mesenteronu.

Další formou, kterou zkoumané sauroleishmanie vytvářely, byly tzv. „fisherman's float“. Tyto formy, které připomínají svým tvarem rybářské plováky, poprvé zaznamenal Heisch (1958) při popisu *L. (S.) adleri*, nicméně nebyly blíže definovány. Na základě jeho kreseb lze usuzovat, že tyto formy mají rozšířené tělo v oblasti jádra, které se poté výrazně zužuje. „Fisherman's float“ formy pozoroval také McMillan (1965) při studiu *L. (S.) hoogstraali*. Soudě dle kresby použité v této práci již nebyla morfologie forem v tomto případě tak jednoznačná. My jsme „fisherman's float“ pozorovali ve světelném mikroskopu při prohlížení infikovaných střev u obou dvou druhů sauroleishmanií. Na barvených roztěrech ale nebyly tyto formy dostatečně patrné, často také docházelo k jejich poškození. Proto jsme „fisherman's float“ prozatím nezaznamenávali jako samostatné formy. Při dalším studiu by bylo vhodné se zaměřit na tato stádia a zdokumentovat je podrobně ve světelném i elektronovém mikroskopu. Je možné, že se jedná o unikátní typ promastigota, který se nevyskytuje u jiných leishmanií ani u jednohostitelských zástupců čeledi Trypanosomatidae.

Při pozorování ve světelném mikroskopu jsme v zadním střevě zaznamenali přisedlé haptomonády a v menší míře také štíhlé bičíkaté formy, které byly jak volné, tak přichycené k chitinózní výstelce střeva. Tato pozorování odpovídají těm, které ve své práci popsali Adler & Theodor (1929) u *L. (S.) ceramodactyli*. Detailnější popis těchto forem a způsobu jejich přichycení k chitinózní výstelce zadního střeva není bez přípravy histologických preparátů možný. Při dalším studiu by opět bylo vhodné využít také transmisní elektronovou mikroskopii. Vzhledem k nízkým infekcím v zadním střevě *P. orientalis* se nám podařilo změřit dostatečný počet forem vyskytujících se v proktodeu pouze u druhu *L. (S.) adleri* 5. den PI, kdy byla infekce poměrně vysoká. Pozorováno bylo všech pět morfologických forem popsaných výše, a to včetně těch, které dle definice odpovídají metacyklům.

U savčích leishmanií dochází při metacyklogenezi k prodlužování LPG a přestavbě jeho terminálních cukrů (McConville, 1992). Navíc u těchto stádií také dochází ke zvýšené expresi genů kódující tzv. SHERP proteiny (small hydrophilic ER-associated

proteins) (shrnuto v Kamhawi, 2006), a proto je možné metacyklické promastigoty savčích leishmanií odlišit specifickými protilátkami nebo molekulárními metodami. LPG ani SHERP proteiny nebyly u sauroleishmanií doposud spolehlivě prokázány, stejně tak neexistují informace o metacyklogenezi sauroleishmanií. Při dalším studiu by proto bylo vhodné charakterizovat LPG a případně ověřit, zda se jeho terminální cukry mění během životního cyklu ve flebotomovi. Zároveň by bylo vhodné ověřit přítomnost metacyklických stádií sauroleishmanií v zadní části trávicího traktu i u jiných druhů flebotomů. Vhodným adeptem by mohl být druh *P. sergenti*, u něhož se leishmanie tohoto druhu vyvíjely primárně v zadním střevě, a porovnat je s *P. orientalis*, kde docházelo k anteriorní migraci sauroleishmanií a osidlování především přední části trávicího traktu.

Jak již ve své práci shrnula Belova (1971), sauroleishmanie parazitují u celé řady plazích hostitelů. My jsme jako potenciální hostitele plazích leishmanií zvolili gekony druhu *Paroedura picta*, kteří jsou poměrně nenároční na chov v laboratoři. Infikovali jsme je dvěma druhy sauroleishmanií, *L. (S.) adleri* a *L. (S.) hoogstraali* a zvolili dva způsoby inokulace. Intraperitoneální dávka se zdá být poměrně efektivní, zatímco perorální způsob nákazy je zase blíže přirozenému přenosu, který je zřejmě kontaminativní.

Dále jsme zvažovali, jakým způsobem budeme infikované gekony vyšetřovat na přítomnost sauroleishmanií. Jako nejvhodnější způsob se nám jevila xenodiagnostika s využitím samic flebotomů druhu *Sergentomyia schwetzi*. Tato metoda se zdá být nejšetrnější a nejméně stresující pro zvíře, což bylo důležité hlavně z hlediska opakovaného vyšetřování po dlouhou dobu (tři měsíce). Nicméně i tato metoda měla svá úskalí. Pro zajištění komfortu nebyli gekoni při sání imobilizováni, což umožnilo jejich drbání a popřípadě i požití flebotomů. Počet nasátých samic získaných při xenodiagnostice byl tedy proměnlivý. Vyzkoušeli jsme také několik způsobů, jak dosáhnout většího množství nasátých samic. V našich laboratorních chovech máme dvě samostatné kolonie *Se. schwetzi*, přičemž jedna saje na myších a druhá na gekonech. V množství nasátých samic nebyly mezi těmito dvěma koloniemi viditelné rozdíly. Dále jsme zkusili přefoukat samice flebotomů do malé nádoby překryté silonovou punčochou, která byla následně znehybněným gekonům přikládána na kůži tak, aby samice mohly sát. Nicméně ani tento způsob sání nebyl výrazně efektivnější a gekoni při něm byli vystaveni větší míře stresu.

Po celou dobu sledování infekce nebyla nákaza u žádného z gekonů prokázána, a to ani po zvýšení infekční dávky. Vyloučena byla také infekce vnitřních orgánů, které byly gekonům odebrány a diagnostikovány pomocí PCR. *Leishmania (S.) adleri* ani *L. (S.)*

*hoogstraali* tedy nebyly schopny infikovat gekony druhu *Paroedura picta*. Domníváme se proto, že tento druh gekona nelze považovat za vhodného hostitele studovaných sauroleishmanií.

Důvodem, proč se nepodařilo gekony nakazit, může být například jejich odlišné geografické rozšíření. Tito gekoni se běžně vyskytují na Madagaskaru, zatímco oba dva druhy sauroleishmanií jsou rozšířeny hlavně v oblasti subsaharské Afriky. Zdá se, že vytipování vhodného hostitele, který by byl zároveň vhodný k laboratornímu chovu a pokusům s flebotomy, může být velmi náročné, a proto se v budoucnu hodláme zaměřit spíše na tu část životního cyklu sauroleishmanií, která probíhá v přenašeči.

## 6. Závěr

- Vývoj *Leishmania (S.) gymnodactyli* a *Leishmania (S.) tarentolae* byl zkoumán u tří druhů flebotomů: *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. argentipes*. Tyto dva druhy sauroleishmanií nebyly schopné vyvinout pozdní infekce ani v jednom ze studovaných druhů flebotomů.
- *Leishmania (S.) hoogstraali* byla ze šesti zkoumaných druhů flebotomů (*Se. schwetzi*, *P. papatasi*, *P. argentipes*, *P. duboscqi*, *P. sergenti* a *P. orientalis*) schopna vytvářet pozdní infekce pouze u *P. argentipes* a *P. orientalis*. V těchto druzích flebotomů se vyvíjela peripylárně (v mesenteronu a zadním střevě), promastigoti migrovali anteriorním směrem a kolonizovali i stomodeální valvu.
- *Leishmania (S.) adleri* vyvíjela pozdní infekce ve všech šesti zkoumaných druzích flebotomů. Ve flebotomech *Se. schwetzi*, *P. papatasi* a *P. sergenti* se tento druh sauroleishmanie vyvíjel hypopylárně (pouze v zadním střevě), zatímco u druhů *P. argentipes*, *P. duboscqi* a *P. orientalis* docházelo k anteriorní migraci leishmanií v trávicím traktu flebotomů (peripylární způsob vývoje). U druhů *P. argentipes* a *P. orientalis* tato sauroleishmanie kolonizovala nejen mesenteron, ale také stomodeální valvu.
- U *Leishmania (S.) adleri* a *Leishmania (S.) hoogstraali* v trávicím traktu flebotomů *P. orientalis* bylo možno rozlišit pět morfologických forem. U *L. (S.) adleri* byly nejvíce zastoupeny dlouhé nektomonády, zatímco u *L. (S.) hoogstraali* převládali kratší promastigoti (leptomonády). Dále byli u obou dvou druhů přítomni také metacykličtí promastigoti, haptomonády a kulatá stádia s velmi krátkým nebo zcela chybějícím bičíkem.
- *Leishmania (S.) adleri* ani *Leishmania (S.) hoogstraali* nebyly schopny vyvinout infekci v gekonech druhu *Paroedura picta*. Ani jeden z odebraných vzorků tkání (krev, slezina, játra a kůže) vyšetřovaných pomocí konvenční PCR nebyl pozitivní na přítomnost sauroleishmanií. Kultivace střev flebotomů *Sergentomyia schwetzi* nasátých na gekonech při xenodiagnostickém vyšetření byly negativní na přítomnost leishmanií po celou dobu sledování, negativní byl i výsledek vyšetření nasátých samic *Se. schwetzi* pomocí metody PCR.

## 7. Seznam použité literatury

**Adler, S. (1964):** *Leishmania*. In *Advances in Parasitology*. Dawes, B. (ed.), Academic Press/New York and London, vol. 2: 35-96. ISBN: 978-0080580487.

**Adler, S., & Theodor, O. (1929):** Observations on *Leishmania ceramodactyli* n. sp. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 22: 343-355.

**Adler, S., & Theodor, O. (1935):** Investigation on Mediterranean kala azar X—A note on *Trypanosoma platydactyli* and *Leishmania tarentolae*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 116: 543-544.

**Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016):** A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10: e0004349.

**Bates, P. A. (2007):** Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37: 1097-1106.

**Belova, E. M. (1971):** Reptiles and their importance in the epidemiology of leishmaniasis. *Bulletin of the World Health Organization*, 44: 553-560.

**Blumberg, M. S., Lewis, S. J., & Sokoloff, G. (2002):** Incubation temperature modulates post-hatching thermoregulatory behavior in the Madagascar ground gecko, *Paroedura pictus*. *Journal of Experimental Biology*, 205: 2777-2784.

**Brillet, C. (1993):** Behavioural cues in sex recognition by two species of nocturnal lizards: *Eublepharis macularius* and *Paroedura pictus*. *Amphibia-Reptilia*, 14: 71-82.

**Croan, D. G., Morrison, D. A., & Ellis, J. T. (1997):** Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 89: 149-159.

**Cupolillo, E., Medina-Acosta, E., Noyes, H., Momen, H., & Grimaldi, G. (2000):** A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today*, 16: 142-144.

- David, A. (1929a).** Note préliminaire sur un *Leishmania* trouvé chez le lézard gris de la région de Tibériade (Basse-Galilée, Palestine). *Annales de Parasitologie Humane et Comparée*, 7, 190-192, citováno podle Wilson, V. C. L. C., & Southgate, B. A. (1979): Lizard *Leishmania*. In *Biology of the Kinetoplastida*. Lumsden, W. H. R., Evans, D. A. (eds.), Academic Press/London, vol. 2: 241–268. ISBN: 978-0124602014.
- David, A. (1929b).** Recherches expérimentales sur un haematozair du genre *Leishmania*. (*L. agamae* A. David). Thèse Doctorat en Sciences, Université de Paris. *Les Presses universitaires de France*, 54 pp, citováno podle Killick-Kendrick a kol. (1979): Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In *Biology of the Kinetoplastida*. Lumsden, W. H. R., Evans D. A. (eds.), Academic Press/London, vol. 2: 395-460. ISBN: 978-0124602014.
- Dostálová, A., & Volf, P. (2012):** *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors*, 5: 276.
- Edeson, J. F. B., & Himo, J. (1973):** *Leishmania* sp. in the blood of a lizard (*Agama stellio*) from Lebanon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 67: 27.
- Elwasila, M. (1988):** *Leishmania tarentolae* Wenyon, 1921 from the gecko *Tarentola annularis* in the Sudan. *Parasitology Research*, 74: 591-592.
- Fraga, J., Montalvo, A. M., De Doncker, S., Dujardin, J. C., & Van der Auwera, G. (2010):** Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 10: 238-245.
- Garnham, P. C. C. (1971):** The genus *Leishmania*. *Bulletin of the World Health Organization*, 44: 477-489.
- Heisch, R. B. (1958):** On *Leishmania adleri* sp. nov. from lacertid lizards (*Latastia* sp.) in Kenya. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 52: 68-71.
- Chajbullinova, A., Votypka, J., Sadlova, J., Kvapilova, K., Seblova, V., Kreisinger, J., Jirku, M., Sanjoba C., Gantuya, S., Matsumoto, Y. & Volf, P. (2012):** The development of *Leishmania turanica* in sand flies and competition with *L. major*. *Parasites & Vectors*, 5: 219.

**Chatton, E., & Blanc, G. (1914):** Existence de corps leishmaniformes dans les hémato blastes d'un Gecko barbaresque, *Tarentola mauritanica* L. Gunth, *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*, 7: 430-433, citováno podle Telford, S. R. (2009): Hemoparasites of the Reptilia. Color Atlas and Text. CRC Press, vol. 1: 1-376. ISBN: 978-1-4200-8040-7.

**Jackman, T. R., Bauer, A. M., Greenbaum, E., Glaw, F., & Vences, M. (2008):** Molecular phylogenetic relationships among species of the Malagasy-Comoran gecko genus *Paroedura* (Squamata: Gekkonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 74-81.

**Kaddu, J. B. (1986):** *Leishmania* in Kenyan phlebotomine sandflies—III. Advances in the investigations of vectorial capacity and vector-parasite relationships of various species of sandflies in Kenya. *International Journal of Tropical Insect Science*, 7: 207-212.

**Kamhawi, S. (2006):** Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*, 22: 439-445.

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

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

**Karimi, A., Hanafi-Bojd, A. A., Yaghoobi-Ershadi, M. R., Akhavan, A. A., & Ghezlbash, Z. (2014):** Spatial and temporal distributions of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae), vectors of leishmaniasis, in Iran. *Acta Tropica*, 132: 131-139.

**Kerr, S. F. (2000):** Palaearctic origin of *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 75-80.

**Killick-Kendrick, R. (1979):** Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In *Biology of the Kinetoplastida*. Lumsden, W. H. R., Evans D. A. (eds.), Academic Press/London, vol. 2: 395-460. ISBN: 978-0124602014.

- Killick-Kendrick, R., Lainson, R., Rioux, J. A., & Saf'janova, V. M. (1986):** The taxonomy of *Leishmania*-like parasites of reptiles. In: *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications Eco-épidémiologiques*, Colloq. int. CNRS/INSERM, 1984, IMEE, Montpellier, 143-148.
- Kratochvíl, L., Kubička, L., & Landová, E. (2006):** Yolk hormone levels in the synchronously developing eggs of *Paroedura picta*, a gecko with genetic sex determination. *Canadian Journal of Zoology*, 84: 1683-1687.
- Kubička, L., & Kratochvíl, L. (2009):** First grow, then breed and finally get fat: hierarchical allocation to life-history traits in a lizard with invariant clutch size. *Functional Ecology*, 23: 595-601.
- Kwakye-Nuako, G., Mosore, M. T., Duplessis, C., Bates, M. D., Puplampu, N., Mensah-Attipoe, I., Desewu, K., Afegbe, G., Asmah, R. H., Jamjoom, M. B., Ayeh-Kumi, P. F., Boakye, D. A. & Bates, P. A. (2015):** First isolation of a new species of *Leishmania* responsible for human cutaneous leishmaniasis in Ghana and classification in the *Leishmania enriettii* complex. *International Journal for Parasitology*, 45: 679-684.
- Lainson, R. & Shaw, J. J. (1987):** Evolution, classification and geographical distribution. In *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Peters, W., Killick-Kendrick, R. (eds.), Academic Press, vol. 1: 1-120. ISBN: 0-12-552101-4.
- Lainson, R., Ward, R. D., & Shaw, J. (1977):** *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proceedings of the Royal society of London. Series B. Biological sciences*, 199: 309-320.
- Lawyer, P. G., & Perkins, P. V. (2000):** Leishmaniasis and trypanosomiasis. In *Medical Entomology – A text on Public Health and Veterinary Problems caused by Arthropods*, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. Eldridge, B. F., Edman, J. (eds.), 231-298. ISBN: 978-94-011-6472-6.
- Lewis, D. H. (1975):** Ultrastructural study of promastigotes of *Leishmania* from reptiles. *The Journal of Protozoology*, 22: 344-352.
- Maia, C., & Depaquit, J. (2016):** Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? *Parasite*, 23: 55.



- McConville, M. J., Turco, S. J., Ferguson, M. A., & Sacks, D. L. (1992):** Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *The EMBO Journal*, 11: 3593-3600.
- McMillan, B. (1965):** Leishmaniasis in the Sudan Republic. 22. *Leishmania hoogstraali* sp. n. in the gecko. *The Journal of Parasitology*, 51: 336-339.
- Minter, D. M., & Wijers, D. J. B. (1963):** Studies on the Vector of Kala-Azar in Kenya: IV.—Experimental Evidence. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 57: 24-31.
- Molina, R., Cafiavate, C., Cercenado, E., Lagunat, F., Lopez-Velez, R., & Alvar, J. (1994):** Indirect xenodiagnosis of visceral leishmaniasis in 10 HIV-infected patients using colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Aids*, 8: 277-278.
- Mutinga, M. J., & Ngoka, J. M. (1981):** Suspected vectors of lizard leishmaniasis in Kenya and their possible role in partial immunization of the human population against *Leishmania donovani* in kala-azar endemic areas. *International Journal of Tropical Insect Science*, 1: 207-210.
- Myšková, J., Dostálová, A., Pěničková, L., Halada, P., Bates, P. A., & Volf, P. (2016):** Characterization of a midgut mucin-like glycoconjugate of *Lutzomyia longipalpis* with a potential role in *Leishmania* attachment. *Parasites & Vectors*, 9: 413.
- Noyes, H. (1998):** Implications of a Neotropical origin of the genus *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 657-662.
- Noyes, H. A., Arana, B. A., Chance, M. L., & Maingon, R. (1997):** The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania*: their classification and evidence for a neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44: 511-517.
- Nussbaum, R. A., & Raxworthy, C. J. (2000):** Systematic revision of the genus *Paroedura* Günther (Reptilia: Squamata: Gekkonidae), with the description of five new species. *Miscellaneous Publications Museum of Zoology, University of Michigan*, 189: 1-26.

- Paperna, I., Boulard, Y., Hering-Hagenbeck, S. H., & Landau, I. (2001):** Description and ultrastructure of *Leishmania zuckermanni* n. sp. amastigotes detected within the erythrocytes of the South African gecko *Pachydactylus turneri* Gray, 1864. *Parasite*, 8: 349-353.
- Parrot, L. (1934a):** L'évolution d'un hématozoaire de gecko (*Leishmania tarentolae*) chez un moucheron piqueur du groupe des phlebotomes (*Phlebotomus minutus*). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* (Paris), 199: 1073-1074, citováno podle Killick-Kendrick, R. (1979): Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In *Biology of the Kinetoplastida*. Lumsden, W. H. R., Evans D. A. (eds.), Academic Press/London, vol. 2: 395-460. ISBN: 978-0124602014.
- Parrot, L. (1934b):** L'évolution de *Leishmania tarentolae* Wenyon chez *Phlebotomus minutus* Rond. *Bulletin de la Société de Pathologie exotique*, 27: 839-843, citováno podle Killick-Kendrick, R. (1979): Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In *Biology of the Kinetoplastida*. Lumsden, W. H. R., Evans D. A. (eds.), Academic Press/London, vol. 2: 395-460. ISBN: 978-0124602014.
- Parrot, L. (1935).** Nouvelles recherches sur l'évolution de *Leishmania tarentolae* chez *Phlebotomus minutus* Rondani. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 28: 958-960, citováno podle Killick-Kendrick, R. (1979): Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In *Biology of the Kinetoplastida*. Lumsden, W. H. R., Evans D. A. (eds.), Academic Press/London, vol. 2: 395-460. ISBN: 978-0124602014.
- Peters, W. (1992):** Peritrophic membranes. In *Zoophysiology*, Springer-Verlag Press. Bradshaw, S. D., Burggren, W., Heller, H. C., Ishii, S., Langer, H., Neuweiler, G., Randall D. J. (eds.), Vol. 30: 1–238. ISBN: 3-540-53635-3.
- Pimenta, P. F., Saraiva, E. M., Rowton, E., Modi, G. B., Garraway, L. A., Beverley, S. M., Turco, S. J. & Sacks, D. L. (1994):** Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 9155-9159.
- Previato, J. O., Jones, C., Wait, R., Routier, F., Saraiva, E., & Mendonça-Previato, L. (1997):** *Leishmania adleri*, a lizard parasite, expresses structurally similar glycoinositolphospholipids to mammalian *Leishmania*. *Glycobiology*, 7: 687-695.

- Pruzinova, K., Sadlova, J., Seblova, V., Homola, M., Votypka, J., & Volf, P. (2015):** Comparison of bloodmeal digestion and the peritrophic matrix in four sand fly species differing in susceptibility to *Leishmania donovani*. *PLOS One*, 10: e0128203.
- Rioux, J. A., Knoepfler, L. P., Martini, A., Callot, J., & Kremer, M. (1969):** Présence en France de *Leishmania tarentolae* Wenyon, 1921. Parasite du gecko *Tarentola mauritanica* (L. 1758). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 44: 115-118.
- Rashti, M. S., & Mohebali, M. (1994):** Natural promastigote infection of *Sergentomyia sintoni* its seasonal variation and reservoir host in Turkemen Sahapa Iran. *Iranian Journal of Public Health*, 23: 41-50.
- Rassi, Y., Javadian, E., Nadim, A., & Tahvildar-Bidruni, G. H. (1997):** Natural promastigote infection of sand-flies and its first occurrence in *Sergentomyia dentata* in Ardabil Province, North West of Iran. *Iranian Journal of Public Health*, 26: 7-12.
- Raymond, F., Boisvert, S., Roy, G., Ritt, J. F., Legare, D., Isnard, A., ... & Ouellette, M. (2011):** Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Research*, 40: 1131-1147.
- Sádlová, J. (1999):** The life history of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 63: 331-366.
- Sadlova, J., Dvorak, V., Seblova, V., Warburg, A., Votypka, J., & Volf, P. (2013):** *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to humans. *Parasites & Vectors*, 6: 186.
- Sádlová, J., Price, H. P., Smith, B. A., Votýpka, J., Volf, P., & Smith, D. F. (2010):** The stage- regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*. *Cellular Microbiology*, 12: 1765-1779.
- Saf'janova, V. M. & A. N. Alexeieff (1967):** Susceptibility of *Phlebotomus papatasi* Sc. and *Sergentomyia arpaklensis* Perf. to leptomonads of different serological groups experimentally. *Meditinskaja Parazitologija* 36: 580-586, citováno podle Telford, S. R. (2009): Hemoparasites of the Reptilia. Color Atlas and Text. CRC Press, vol. 1: 1-376. ISBN: 978-1-4200-8040-7.

- Schönian, G., Lukeš, J., Stark, O., & Cotton, J. A. (2018):** Molecular evolution and phylogeny of *Leishmania*. In *Drug Resistance in Leishmania Parasites*, Springer Nature 2018, Ponte-Sucre, A., Padrón-Nieves M. (eds.), 19-57. ISBN: 978-3-319-74185-7.
- Seblova, V., Volfova, V., Dvorak, V., Pruzinova, K., Votypka, J., Kassahun, A., Gebre-Michael, T., Hailu, A., Warburg, A. & Volf, P. (2013):** *Phlebotomus orientalis* sand flies from two geographically distant Ethiopian localities: biology, genetic analyses and susceptibility to *Leishmania donovani*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7: e2187.
- Sergent, E., Sergent, E., Lemaire, G., & Senevet, G. (1914):** Insecte transmetteur et Réservoir de virus du Clou de Biskra. Hypothèse et expériences préliminaires. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 7: 577-579.
- Sergent, E., Sergent, E., Lemaire, G., & Senevet, G. (1915):** Hypothèse sur le phlébotome transmetteur et la tarente réservoir du virus du bouton d'orient. *Annales de l'Institut Pasteur*, 29: 309-322.
- Shatova, S. M., Saf'janova, V. M., & Ovezmukhammedov, A. (1991):** An experimental study of the interrelations of *Leishmania (Sauroleishmania) gymnodactyli* and the sandfly *Sergentomyia arpaklensis* (Diptera: Phlebotominae). *Parazitologiya*, 25: 110-115.
- Schenone, H. (1999):** Xenodiagnosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 289-294.
- Starostová, Z., Kubička, L., & Kratochvíl, L. (2010):** Macroevolutionary pattern of sexual size dimorphism in geckos corresponds to intraspecific temperature-induced variation. *Journal of Evolutionary Biology*, 23: 670-677.
- Svárovská, A., Ant, T. H., Seblová, V., Jecná, L., Beverley, S. M., & Volf, P. (2010):** *Leishmania major* glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2<sup>-</sup>) but not lipophosphoglycan (lpg1<sup>-</sup>) for survival in permissive sand fly vectors. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 4: e580.
- Telford, S. R. (1979):** Evolutionary implications of *Leishmania* amastigotes in circulating blood cells of lizards. *Parasitology*, 79: 317-324.
- Telford, S. R. (2009):** Hemoparasites of the Reptilia. Color Atlas and Text. CRC Press, vol. 1: 1-376. ISBN: 978-1-4200-8040-7.

**Volf, P., Nogueira, P. M., Myskova, J., Turco, S. J., & Soares, R. P. (2014).** Structural comparison of lipophosphoglycan from *Leishmania turanica* and *L. major*, two species transmitted by *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology International*, 63: 683-686.

**Volf, P., & Myskova, J. (2007).** Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends in Parasitology*, 23: 91-92.

**Volf, P., & Volfova, V. (2011):** Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology*, 36: S1-S9.

**Wenyon, C. M. (1920):** Observations on the intestinal protozoa of three Egyptian lizards, with a note on a cell-invading fungus. *Parasitology*, 12: 350-365.

**Wilson, V. C. L. C., & Southgate, B. A. (1979):** Lizard *Leishmania*. In *Biology of the Kinetoplastida*. Lumsden, W. H. R., Evans, D. A. (eds.), Academic Press/London, vol. 2: 241-268. ISBN: 978-0124602014.

**Zhang, L. M., & Leng, Y. J. (1997):** Eighty-year research of Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in China (1915-1995) - II. Phlebotomine vectors of leishmaniasis in China. *Parasite*, 4: 299-306.