Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Parazitologie

Bc. Tomáš Bečvář

Leishmanie podrodu *Mundinia*: genetická analýza a experimentální infekce hlodavců a přenašečů.

Leishmania of the subgenus *Mundinia*: genetical analysis and experimental infections of rodents and vectors.

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Jovana Sádlová, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

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

V Praze, 9.8.2019

Bc. Tomáš Bečvář

Chtěl bych velice poděkovat své školitelce RNDr. Jovaně Sádlové, PhD., bez které byste tyto řádky nyní nečetli. Především její úsměv a ochota mi byly největšími pomocníky během uplynulých tří let, během kterých vznikala tato práce. Dík patří také všem, kteří se jakkoli podíleli na pokusech – Terezce Leštinové, Lucce Tiché a hlavně Barče Vojtkové, která mi poskytla cenné rady o tom, jak manipulovat se zvířaty. Díky jejímu neutuchajícímu optimismu ty kousance ani tolik nebolely. Nesmím zapomenout ani na celý zbytek laboratorního kolektivu, který vytváří příjemnou atmosféru při práci. Velký dík patří prof. Petru Volfovi, který mi umožnil během studia cestovat a učit se novým věcem, spojených nejen s parazitologií, a vždycky, když bylo potřeba, pomohl nebo poradil. Nesmím zapomenout ani na stálou podporu své rodiny – mamky, Káti, Tomáše a babičky s dědou, kteří mě podrželi vždy, když třeba zrovna nebylo úplně veselo.

Z celého srdce Vám všem děkuji.

Abstrakt

Leishmanióza je lidské a zvířecí onemocnění způsobené jednobuněčnými dvojhostitelskými parazity rodu *Leishmania,* který je v současné době rozdělen do 4 podrodů – *L. (Leishmania), L. (Viannia), L. (Sauroleishmania)* a *L. (Mundinia).* Podrod *Mundinia* byl vytvořen teprve v roce 2016 a momentálně zahrnuje pět druhů leishmanií - parazity divokých zvířat *L. enriettii* a *L. macropodum* a tři druhy patogenní pro člověka - *L. martiniquensis*, *L. orientalis* a zatím nepojmenovanou *L*. sp. z Ghany. Geografické rozšíření těchto druhů pokrývá všechny kontinenty kromě Antarktidy. Mezi přenašeče onemocnění lze zařadit nejen flebotomy (Diptera: Psychodidae), jak je tomu u ostatních podrodů leishmanií, ale unikátně i tiplíky (Diptera: Ceratopogonidae). U většiny druhů ale nejsou potvrzeny konkrétní druhy přenašečů a stejnou neznámou jsou i jejich rezervoároví hostitelé.

Náplní této diplomové práce bylo testování možných přenašečů, potencionálních modelových organismů (morčat) a rezervoárových hostitelů všech pěti druhů podrodu *Mundinia* pomocí experimentálních infekcí. Pro testování vývoje v přenašečích jsme využili tři druhy flebotomů, které sdílejí geografické rozšíření s těmito leishmaniemi a byli k dispozici v našem insektáriu. Jelikož flebotomové z Austrálie nebyli nikdy kolonizováni, v případě australské *L. macropodum* byl použit permisivní druh *Lu. migonei*. *Leishmania enriettii* a *L. macropodum* nepřežívaly defekaci v *Lu. migonei,* stejně tomu bylo u *L*. sp. z Ghany v *P. duboscqi*. Na druhou stranu, v asijském *P. argentipes* dokázala *Leishmania martiniquensis* z Martiniku tvořit zralé infekce s kolonizací stomodeální valvy v 7 % samic pitvaných 8 dní po sání a L. *orientalis* dokonce v 21,5 % samic, přítomna zde byla i metacyklická infekční stádia. Je tudíž pravděpodobné, že *P. argentipes* by mohl fungovat jako přenašeč *L. orientalis.* V případě *L. martiniquensis* není jeho role vyloučena, ale velmi pravděpodobně se nebude jednat o hlavního přenašeče už proto, že východoasijský izolát *L. martiniquensis* nebyl schopen vytvořit v *P. argentipes* pozdní fáze infekce.

Modelové organismy, nezbytné pro základní výzkum, nejsou pro leishmanie podrodu *Mundinia* známy, s výjimkou morčete *(Cavia porcellus)* jako jediného popsaného hostitele *L. enriettii*. Pomocí experimentálních infekcí jsme testovali, zda morčata mohou sloužit jako modelové organismy také pro ostatní zástupce podrodu. Výsledky svědčí o tom, že morče není pro tyto leishmanie vhodný model. Kromě dočasné tvorby suchých lézí u zvířat nakažených *L. orientalis* nevyvolala žádná další leishmanie s výjimkou *L. enriettii* vnější příznaky onemocnění a leishmanie nebyly schopny v morčeti přežívat a diseminovat do dalších částí těla. Žádné ze zvířat, kromě těch nakažených *L. enriettii*, navíc nebylo infekční pro flebotomy při provedených xenodiagnostikách.

Leishmania sp. z Ghany způsobuje u místních lidí kutánní formu onemocnění a je tudíž důležité odhalit jejího přirozeného rezervoárového hostitele. Testovali jsme proto hostitelskou

kompetenci dvou druhů subsaharských hlodavců, *Arvicanthis niloticus* a *Mastomys natalensis*, kteří jsou v endemických oblastech velmi početní a žijí často v blízkosti lidských sídel. Ukázalo se však, že tato zvířata nejsou s největší pravděpodobností zapojena do životního cyklu tohoto druhu leishmanie, neboť zvířata nebyla během pokusu infekční pro flebotomy a po ukončení experimentu byla DNA leishmanií identifikována pouze u jedné z mastomyší. Na druhou stranu, mohou zřejmě dobře sloužit jako rezervoároví hostitelé *L. major*.

Abstract

Leishmaniasis is a human and animal disease caused by digenetic parasites of the genus *Leishmania*, which is now divided into 4 subgenera – *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)*, *L. (Sauroleishmania)* and *L. (Mundinia)*. Subgenus *Mundinia* was established in 2016 and consists of 5 species - *L. enriettii* and *L. macropodum* are parasites of wild mammals and *L. martiniquensis*, *L. orientalis* and unnamed *L*. sp. from Ghana are infectious to humans. *Mundinia* are geographically widely dispersed, their distribution covers all continents, except of Antarctica. Despite phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) also biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) are supposed to be involved in transmission of these species, which is a unique feature for this subgenus. But there is little to no current information on natural reservoir hosts and vector species for any *Mundinia* species.

In this thesis we tested possible vectors and potential model organisms (Guinea-pigs) and reservoir hosts of *Mundinia* species by experimental infections. We used 3 sand fly species sharing geographical distribution with respective *Mundinia* species and available in our laboratory for experimental infections. Sand flies from Australia had never been colonised so we used the permissive vector *Lu. migonei* for testing development of *L. macropodum*. *Leishmania enriettii* and *L. macropodum* did not survive defecation of *Lu. migonei* and the same trend was observed in *P. duboscqi* infected with *L.* sp. from Ghana. On the other hand, *L. martiniquensis* from Martinique Island and *L. orientalis* developed late stage infections in 7 % and 21.5 % of *P. argentipes* females 8 days post blood meal, respectively. Presence of metacyclic forms in gut smears from females infected with *L. orientalis* was detected. Based on these results, we suggest involvement of *P. argentipes* in transmission of *L. orientalis*. Its important role in transmission of *L. martiniquensis* is less probable, taking in account that experimental infections with Asian isolate of *L. martiniquensis* did not bring positive results.

Model organisms, which are crucial for basic research, are not available for *L. (Mundinia)* species with the only exception of Guinea pig for *L. enriettii*. We tested Guinea pigs as model organism for other *Mundinia* species using experimental infections. Our results do not support suitability of Guinea pigs for this purpose since no external signs of infection were observed in tested animals (with the exception of temporary dry lesions on ears inoculated with *L. orientalis*), leishmania parasites did not survive and disseminate in bodies of Guinea pigs and these animals were not infectious for sand flies.

Leishmania sp. from Ghana is the causative agent of human cutaneous leishmaniasis so identification of its reservoir host is very important. We tested host competence of two sub-Saharan

rodents, *Arvicanthis niloticus* and *Mastomys natalensis*, which are very abundant in endemic localities and live in close vicinity to human settings. Our results do not support their involvement in the life cycle of this leishmania since animals were not infectious to sand flies and we detected only very small numbers of parasites in only one *Mastomys natalensis* by the end of the experiment. On the other hand, they could probably serve as a good reservoir hosts for *L. major*.

Seznam zkratek

A. – *Arvicanthis*

AMG – abdominální mezenteron (abdominal midgut)

C. – *Cavia*

GPI – glykofosfatidylinositol

L. – *Leishmania*

LPG – lipofosfoglykan

Lu. – *Lutzomyia*

M. - *Mastomys*

P. – *Phlebotomus*

PI – po infekci

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

RH – rezervoárový hostitel

SV – stomodeální valva

TAE – Tris-Acetát-EDTA

TMG – thorakální mezenteron (thoracic midgut)

Obsah

1. Úvod a cíle práce 1
2. Literární přehled 3
2.1. Leishmanióza 3
2.2. Alternativní přenašeči leishmanií 5
2.3. Modelové organismy 8
2.4. Rezervoároví hostitelé 9
2.5. *L. (Mundinia)* – fylogenetické postavení, hostitelé a přenašeči 10
3. Materiál a metodika 14
3.1 Složení použitých roztoků 14
3.2 Kultivace leishmanií 14
3.3 Chov flebotomů 14
3.3.1. *Lutzomyia migonei* 15
3.3.2. *Phlebotomus duboscqi* 15
3.3.3. *Phlebotomus argentipes* 15
3.4. Chov hlodavců 15
3.4.1. *Cavia porcellus* 16
3.4.2. *Mastomys natalensis* 16
3.4.3. *Arvicanthis niloticus* 17
3.5. Pitvy a vyšetření střev flebotomů 17
3.6. Experimentální infekce flebotomů 18
3.7. Měření leishmanií 19
3.8. Xenodiagnostika 19
3.9. Izolace DNA 19
3.10. Konvenční PCR 20
3.11. Kvantitativní PCR 20
3.12. Experimentální infekce morčat 20
3.13. Experimentální infekce *Arvicanthis niloticus* 21
3.14. Experimentální infekce *Mastomys natalensis* 22
3.15 Statistika 23
4. Výsledky 24
4.1. Experimentální infekce flebotomů 24
4.1.1. Vývoj *L. enriettii* a *L. macropodum* v *Lu. migonei* 24
4.1.2. Vývoj *L.* sp. z Ghany v *P. duboscqi* 26
4.1.3. Vývoj izolátu *L. martiniquensis* z Martiniku v *P. argentipes* 27

4.1.4. Vývoj asijských izolátů *L. martiniquensis* a *L. orientalis* v *P. argentipes* 29
4.2. Experimentální infekce morčat *(C. porcellus)* 31
4.3. Experimentální infekce *A. niloticus* a *M. natalensis* 33
4.3.1. Experimentální infekce *A. niloticus* 33
4.3.2. Experimentální infekce *M. natalensis* 36
5. Diskuze 38
6. Shrnutí 44
7. Reference 46
8. Přílohy 53

1. Úvod a cíle práce

Leishmanióza je lidské a zvířecí onemocnění způsobené jednobuněčnými dvojhostitelskými parazity rodu *Leishmania* (Kinetoplastida) přenášené flebotomy, dvoukřídlým krevsajícím hmyzem z čeledi Diptera: Psychodidae (Phlebotominae), a pravděpodobně i tiplíky (Diptera: Ceratopogonidae). Vyskytuje se v tropickém a subtropickém pásu celého světa a na jihu mírného pásu s tendencí šířit se stále severněji.

Donedávna byl rod *Leishmania* rozdělen do tří podrodů – *Leishmania*, *Viannia* a *Sauroleishmania*. V roce 2016 však byl ustanoven čtvrtý podrod – *Mundinia*, který se odštěpuje na bázi fylogenetického stromu tohoto rodu a zahrnuje nyní 5 druhů. *Leishmania enriettii* a *L. macropodum* jsou parazité zvířat, konkrétně *L. enriettii* byla nalezena v morčatech a *L. macropodum* je jediný druh leishmanie vyskytující se v klokanech. *Leishmania martiniquensis*, *L. orientalis* a do data sepsání této práce zatím vědecky nepojmenovaný druh leishmanie z Ghany, jsou schopny vyvolávat různé formy onemocnění i u člověka. Výjimečné je geografické rozšíření jednotlivých druhů, neboť se tito parazité vyskytují napříč všemi kontinenty, kromě Antarktidy. Tato skutečnost je připisována právě stáří této skupiny, kdy se předpokládá, že za celosvětovou distribucí těchto druhů stojí rozpad Gondwany na dnešní kontinenty a následná speciace původního předka na jednotlivé druhy. *Leishmania enriettii* byla dosud zaznamenána pouze v Brazílii, *L. macropodum* je jediný druh leishmanie vyskytující se na území Austrálie, *L. martiniquensis* je pravděpodobně kosmopolitní druh, neboť byla izolována na ostrově Martinik, na Floridě, ve Švýcarsku, Německu a Thajsku. *Leishmania orientalis* se vyskytuje v Thajsku a poslední druh leishmanie byl izolován v Ghaně. Přenašeči těchto druhů nejsou s jistotou známí. K definitivnímu potvrzení přenašeče má však velmi blízko *Leishmania macropodum*, která je velmi pravděpodobně přenášena tiplíky rodu *Forcipomyia (Lasiohelea)*, což je naprosto výjimečný jev ve světě leishmanií a vnáší nový pohled a směr v hledání vektorů parazitů z podrodu *Mundinia*.

Tato diplomová práce je zaměřena právě na podrod *Mundinia*, jehož výše popsané aspekty vyvolávají jistou auru tajemství kolem těchto druhů a spoustu otázek, které zatím nebyly zodpovězeny. Co je přenašečem? Co je rezervoárovým hostitelem těchto druhů? Liší se nějak genom těchto leishmanií od ostatních a mají tyto změny vliv na cyklus těchto druhů v přírodě?

Cíle práce

- Experimentální infekce flebotomů s cílem otestovat, zda jako přenašeči *Leishmania enriettii, L. martiniquensis, L. orientalis* a *L*. sp. z Ghany mohou sloužit některé druhy flebotomů, které žijí v areálech výskytu daných druhů leishmanií, a jejichž kolonie jsou k dispozici na katedře parazitologie (*Lutzomyia migonei*, *Phlebotomus argentipes*, *P. duboscqi)*.
- Experimentální infekce morčat s cílem ověřit, zda se *L. macropodum*, *L. martiniquensis, L. orientalis* a *L.* sp. z Ghany vyvíjejí v tomto zvířeti obdobně jako *L. enriettii*, pro kterou je morče domácí jediný vhodný popsaný hostitel.
- Experimentální infekce *Arvicanthis niloticus* a *Mastomys natalensis* s cílem otestovat, zda tito hlodavci mohou sloužit jako přirození hostitelé ghanského druhu.
- Celogenomová sekvenace a srovnání genomu *L. (Mundinia)* s ostatními podrody rodu *Leishmania*.
-

2. Literární přehled

2.1. Leishmanióza

Leishmanióza je lidské a zvířecí onemocnění způsobené jednobuněčnými parazity rodu *Leishmania*. Tento rod charakterizuje digenetický životní cyklus – leishmanie kolují v přírodě mezi přirozenými rezervoárovými hostiteli, kterými jsou savci, v případě podrodu *Sauroleishmania* plazi, a dvoukřídlým krevsajícím hmyzem rodů *Phlebotomus* ve Starém světě a *Lutzomyia* v Novém světě (Diptera: Psychodidae). V poslední době se ale ukazuje, že do tohoto cyklu mohou být zapojeni i tiplíci (Ceratopogonidae), kteří přenášejí *L. macropodum* mezi klokany v Austrálii (Dougall et al. 2011).

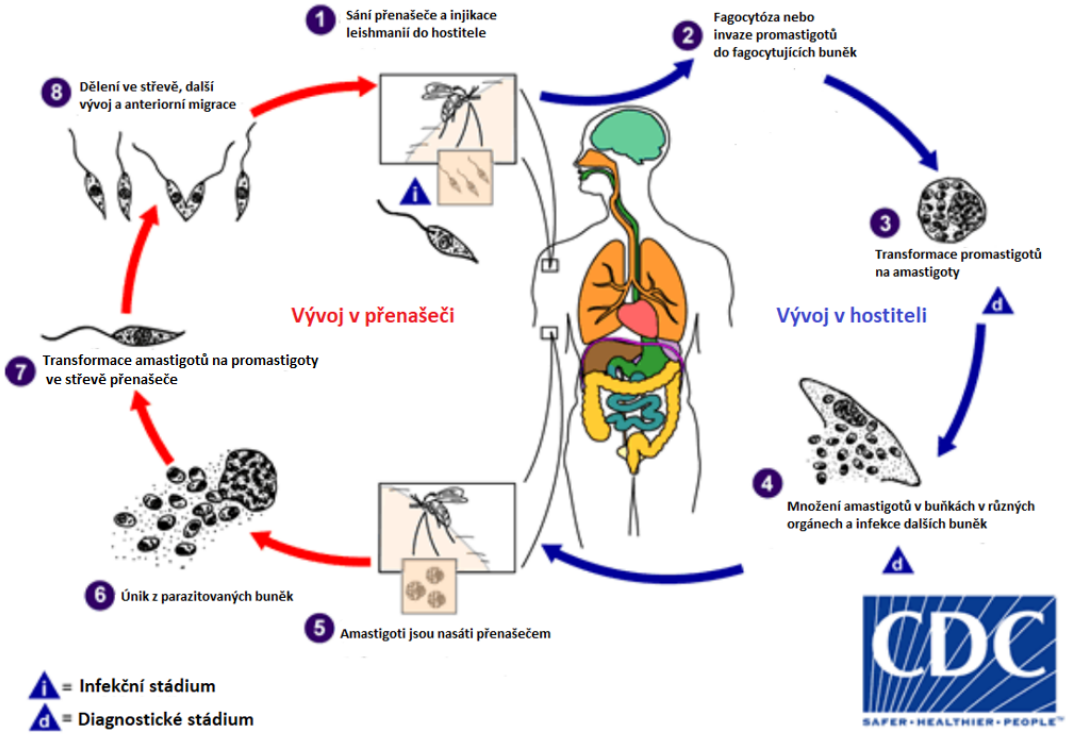
Z medicínského hlediska je důležitých zhruba 20 druhů leishmanií, které způsobují lidské onemocnění. Podle projevů lze leishmaniózu rozdělit na formu kutánní, difuzní kutánní, muko-kutánní a viscerální. Při kutánní formě dochází k vývinu kožní léze v místě inokulace leishmanií. Difuzní kutánní forma se také projevuje vývinem kožních lézí, ty však nejsou lokalizovány pouze v místě inokulace, nýbrž se šíří po více místech těla. Muko-kutánní forma způsobuje deformaci a destrukci měkkých tkání – sliznic a chrupavek. Při viscerální formě pak dochází k invazi leishmanií do vnitřních orgánů. Nejčastěji bývají postižena játra, slezina a kostní dřeň. Tato forma onemocnění je bez odpovídající zdravotní péče smrtelná. Naprostá většina hlášených případů viscerální leishmaniózy pochází z Brazílie, východní Afriky a indického subkontinentu (Alvar et al. 2012).

V endemických oblastech žije odhadem 1 miliarda lidí, z nichž se každý rok nakazí zhruba 1,2 milionu. Uvádí se, že každý rok přibude přibližně 300 000 případů viscerální formy, z nichž kolem 20 000 skončí smrtí. Tato čísla mohou ale být, vzhledem k rozšíření v nejchudších oblastech světa se špatnou dostupností lékařské péče, značně podhodnocena (WHO, 2010).

V savčím hostiteli se leishmanie vyvíjejí intracelulárně v makrofázích ve formě amastigotů (krátká oválná forma bez viditelného bičíku), kteří jsou během sání přenašeče nasáti společně s krví. Během několika hodin po sání se v těle flebotoma kolem nasáté krve vytvoří peritrofická matrix (chitinózní obal vylučovaný buňkami střevního epitelu). Zde dochází k transformaci amastigotů na promastigoty (protáhlá, bičíkatá forma). Procykličtí promastigoti se intenzivně množí a během rozpadu peritrofické matrix se mění na dlouhé nektomonády, které se pomocí bičíku dokážou přichytit na stěnu střeva flebotomů, čímž zabrání svému vydefekování se zbytky nestrávené krve. Následně dochází k anteriorní migraci leishmanií do thorakálního mezenteronu (thoracic midgut, TMG). Zde jsou majoritně zastoupeny krátké leptomonády, které se dělí a následně přeměňují na dvě další formy – přisedlé haptomonády, které interagují s chitinovou výstelkou stomodeální valvy a volné, krátké metacyklické promastigoty (shrnuto v Ramalho-Ortigao et al. 2010; Dostálová, Volf 2012). Ti jsou díky dlouhému bičíku velmi mobilní a vysoce infekční pro savčího hostitele, a právě

jejich přítomnost je jedním z hlavních markerů schopnosti flebotoma přenášet leishmanie, spolu s úspěšnou kolonizací stomodeální valvy. Při přenosu do hostitele si leishmanie pomáhají dvěma hlavními způsoby – destrukcí chitinové výstelky stomodeální valvy pomocí chitináz (Rogers et al. 2008) a tvorbou gelovité zátky (tzv. promastigote secretory gel – PSG) v TMG (Stierhof et al. 1999; Rogers et al. 2002). Díky těmto krokům jsou při sání flebotoma regurgitovány metacyklické formy do savčího hostitele, kde dochází k jejich fagocytóze buňkami imunitního systému. Finální lokalizací leishmanií jsou makrofágy, kam se dostávají buď přímo nebo pasáží přes neutrofily. Funkcí makrofágů je destrukce cizorodých částic a patogenů. Leishmanie si ovšem vyvinuly způsoby, jak se této destrukci bránit, a naopak využívají makrofágy pro své množení ve formě amastigotů, ve které se inokulované metacykly rychle mění (shrnuto v Obr. 1) (Sharma, Singh 2009; Ramalho-Ortigao et al. 2010).

V poslední době se ale ukazuje, že vývoj leishmanií v přenašeči bude ještě o něco složitější, neboť Serafim et al. 2018 dokázali, že při opakovaném sání dochází ve flebotomech k dediferenciaci metacyklických stádií na tzv. retroleptomonádové stádium. V této fázi jsou leishmanie opět schopny se množit a vytvářet tak silnější infekce přenašečů s vyšším počtem infekčních stádií. Tento proces nakonec vede k zvýšení infekční dávky s vyšším podílem metacyklů a k zvýraznění projevů infekce u hostitele (Serafim et al. 2018; Giraud et al. 2019).



Obr. 1 – Vývoj leishmanií v přenašeči a hostiteli.

(převzato a upraveno z https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html)

2.2. Alternativní přenašeči leishmanií

Ještě donedávna platil výrok, že jsou leishmanie přenášeny výhradně flebotomy rodů *Phlebotomus* ve Starém světě a *Lutzomyia* v Novém světě, v případě *L. (Sauroleishmania)* rodem *Sergentomyia*, ale ukazuje se, že situace může být mnohem komplikovanější.

Na světě se vyskytuje více než 800 druhů flebotomů, z nichž přibližně 100 přenáší leishmanie a pouze cca 30 druhů je medicínsky významných. Flebotomové Starého světa obývají pouštní a semi-aridní habitaty, zatímco novosvětské druhy se vyskytují v pralesích a v lesních zónách. Obecně vzato jsou flebotomové rozšířeni v tropických, subtropických a případně teplých oblastech mírného pásu celého světa. Líhniště larev tohoto hmyzu jsou charakterizována přítomností půdy s vysokým obsahem organických zbytků a jsou to typicky nory hlodavců, termitiště atd. Flebotomové nejsou dobří letci, a tak je přítomnost líhnišť v blízkém okolí lidských sídel jedním z hlavních faktorů v přenosu leishmaniózy. Medicínsky nejvýznamnějšími přenašeči lidských leishmanií jsou *P. duboscqi, P. papatasi, P. argentipes, P. sergenti, P. perniciosus* a *Lu. longipalpis* (shrnuto v Maroli et al. 2013).

V posledních letech, hlavně díky rozvoji molekulárně biologických metod detekce DNA, se upíná stále větší pozornost k zapojení tzv. alternativních přenašečů leishmanií, neboť DNA leishmanií byla nalezena v různých krevsajících bezobratlých. Tento fakt ovšem nevypovídá o jejich schopnosti parazita přenášet. Proto, aby mohl být nějaký druh bezobratlého označen jako přenašeč leishmaniózy, musí být splněno několik bodů, které se souhrnně označují jako kritéria kompetence přenašeče. Ready (2013) stanovil následujících 7 bodů:

- Promastigoti byli opakovaně izolováni z jednoznačně určených, volně žijících jedinců možných přenašečů, kteří v sobě nemají čerstvé zbytky krve (méně než 36 hodin staré).
- Infekční formy nebo výrazné množení parazitů bylo pozorováno v anteriorním mezenteronu a na stomodeální valvě volně žijících jedinců nebo jedinců chovaných v koloniích po xenodiagnostických pokusech.
- Vektor je přitahován a běžně saje na člověku nebo jiném rezervoárovém hostiteli.
- Vektor se vyskytuje ve stejném prostředí (biotopu) jako rezervoárový hostitel a je mezi nimi silný ekologický vztah, včetně sezónní dynamiky výskytu.
- V laboratorních podmínkách se podařil experimentální přenos infekce z/na rezervoárového hostitele nebo plnohodnotný laboratorní model.
- Za použití retrospektivních dat byl vytvořen matematický model, který demonstruje, že daný vektor je esenciální pro udržení přenosu patogenu v dané oblasti s/bez zapojení dalších druhů vektorů.

- Byl vytvořen matematický model, který demonstruje, že v případě signifikantního snížení počtu přenašečů dojde i k odpovídajícímu snížení počtu nových případů onemocnění v dané lokalitě.

Nicméně poslední dva body jsou spíše hypotetické a jejich využití v praxi zatím není možné.

Jako alternativní přenašeči leishmanií byly testováni tiplíci, blechyklíšťata. Všechny tyto skupiny bezobratlých během svého života opakovaně sají na svých savčích hostitelích, a tak by se, v případě splnění výše uvedených podmínek, mohlo jednat o dobré přenašeče.

Klíšťata (Chelicerata: Acarina) přenášejí ve volné přírodě mnoho lidských i zvířecích nemocí jako například lymeskou boreliózu, klíšťovou encefalitidu, babeziózu, různé typy hemoragických horeček, anaplazmózu a ehrlichiózu. Jejich role v přenosu leishmanií byla v nedávné minulosti intenzivně zkoumána. Není divu, klíšťata jsou velmi dobrým přenašečem různých onemocnění hlavně díky intracelulárnímu trávení, a tudíž nízkému množství volných proteáz v trávicím traktu. Přenosu dále nahrává i potřeba klíšťat sát vícekrát během životního cyklu.

Nejvíce experimentů bylo provedeno na druhu *Rhipicephalus sanguineus*, klíštěti vázaném na psy, které se vyskytuje kosmopolitně, často i v endemických oblastech výskytu *L. infantum,* jejímž hlavním hostitelem je právě pes. Zdá se, že mezi těmito klíšťaty (sbíranými ovšem primárně z nakažených psů) je poměrně vysoká prevalence leishmanií, neboť například při testování lokalit na jihu Itálie a v Brazílii byla přítomnost DNA leishmanií potvrzena v 12,3 % klíšťat z Brazílie a také v blíže nespecifikovaném množství klíšťat z Itálie, neboť zde byla klíšťata testována v poolech po 5 jedincích. Dva pooly byly pozitivní a ve studii není uvedeno, kolik poolů bylo vytvořeno. Klíšťata byla při sání obrána ze psů a následně byla provedena PCR, která identifikovala přítomnost kDNA leishmanií (Dantas-Torres et al. 2010a). V jiné studii byly provedeny i peritoneální a perorální infekce křečků homogenátem infikovaných klíšťat a po šesti měsících byly provedeny pitvy a následná PCR a serologické testy. Více než 60 % křečků infikovaných peritoneálně a 40 % křečků infikovaných perorálně bylo pozitivních na přítomnost DNA leishmanií (Coutinho et al. 2005). Tyto testy ovšem nepotvrzují schopnost klíšťat přenášet leishmanie, neboť pro nákazu křečků byla použita klíšťata čerstvě nasátá na psech, v nichž přítomnost živých leishmanií (pravděpodobně amastigotů) není překvapující. Studie tedy nedokazuje schopnost parazita přežít v klíšťatech ekdyzi nebo alespoň strávení krve. Na přežití ekdyze klíšťat byla zaměřena jiná práce – Colombo et al. (2011) detekovali RNA leishmanií v klíšťatech po ekdyzi, podle těchto autorů jsou tedy leishmanie schopny přežít v klíšťatech i bez přítomnosti krve. Bohužel nebyly provedeny pitvy klíšťat, a tak není zřejmé, kde a v jakém množství se leishmanie vyskytovaly. Někteří autoři popisují i transovariální přenos leishmanií v klíšťatech, protože identifikovali kDNA ve vajíčkách infikovaných samic (Dantas-Torres et al. 2010b),

což je sice zajímavé zjištění, ale opět nic neříká o schopnosti dalšího přenosu. Navíc přítomnost kDNA ve vajíčkách nemusí znamenat, že jsou leishmanie životaschopné.

Pravděpodobně nejzajímavějších výsledků, co se přenosu týče, dosáhla studie (dizertační práce) provedená v 80. letech minulého století, kdy autor nasál nymfy klíšťat na infikovaných psech a nechal je vyvinout do stádia dospělců. Tato klíšťata poté sála na dvou imunosuprimovaných nenakažených psech. Po 4 týdnech byla na těchto psech nasáta zdravá klíšťata. Ve skupině klíšťat sátých na jednom z těchto psů, který měl později pozitivní výsledky na přítomnost leishmanií, byla objevena nakažená klíšťata (McKenzie, 1984). Bohužel tato studie nebyla zopakována na větším počtu jedinců ani publikována v odborném časopise, a tudíž jí nelze přikládat zásadní váhu. Navíc schopnost nakazit takto imunosuprimované psy pravděpodobně nesimuluje situaci ve volné přírodě.

Z uvedených výsledků předešlých studií vyplývá, že klíšťata nelze jednoznačně zavrhnout coby přenašeče leishmanií ve volné přírodě, ale důkazy o jejich zapojení do přenosu tohoto parazita rozhodně zatím nejsou dostatečné.

Velmi obdobná je situace i v případě blech (Insecta: Siphonaptera). Byly analyzovány blechy, které sály na infikovaných psech, ve kterých byla následně identifikována DNA *L. infantum* (Colombo et al. 2011; Coutinho a Linardi 2007; Ferreira et al. 2009). Byly provedeny i úspěšné experimentální infekce křečků homogenátem nakažených blech podobnou metodikou, jako ve výše popsané studii na klíšťatech provedenou Coutinho et al. 2005 (Ferreira et al. 2009). Tyto testy ale pouze dokazují, že jsou blechy schopny nasát leishmanie společně s krví infikovaného hostitele a parazité jsou poté v blechách schopni alespoň po nějaký čas přežít. Nebyly ovšem provedeny pitvy blech ani experimenty, kdy by nakažené blechy sály na zdravých psech, u kterých by se poté rozvinula infekce.

Tiplíci (Diptera: Ceratopogonidae) byli testováni jako možní přenašeči leishmanií již počátkem minulého století, ale vzhledem k tomu, že na pacientech s viscerální leishmaniózou způsobenou *L. donovani* nebyla po sání objevena žádná infikovaná samice tiplíka, zatímco 25 % samic *P. argentipes* infikovaných bylo (Christophers et al. 1925), bylo od takového výzkumu na dlouhou dobu upuštěno. V poslední době se ale tiplíci znovu vracejí do povědomí vědců jako možní přenašeči, a to hlavně díky australskému zástupci podrodu *Mundinia*. Byli totiž identifikováni jako nejpravděpodobnější vektoři *L. macropodum*, která způsobuje kutánní a muko-kutánní leishmaniózu klokanů v Austrálii (Rose et al. 2004). Terénní výzkum australských autorů odhalil přítomnost *L. macropodum* u 5,8 % tiplíků rodu *Forcipomyia (Lasiohelea)*, zatímco všichni odchycení flebotomové byli negativní (Dougall et al. 2011). Důležité je, že během této studie byly provedeny i pitvy, při kterých byla prokázána přítomnost metacyklických stádií a pozorována kolonizace stomodeální valvy tiplíků leishmaniemi, což je jeden z hlavních markerů schopnosti přenosu těchto parazitů.

V jiné laboratorní studii bylo dokázáno, že se v tiplících *Culicoides sonorensis* úspěšně vyvíjí a kolonizuje stomodeální valvu i *L. enriettii*. Zdá se ovšem, že tiplíci budou zapojeni pouze do cyklu leishmanií podrodu *Mundinia*, neboť experimentální infekce tiplíků druhy leishmanií z jiných podrodů byly neúspěšné a parazité byli ve většině případů vydefekováni se zbytky nestrávené krve (Seblova et al. 2015).

2.3. Modelové organismy

Využití modelových organismů je nezbytným předpokladem pro základní laboratorní výzkum parazitárních onemocnění. Dobrý modelový organismus pro studium lidských onemocnění by měl vykazovat podobné imunitní a patologické projevy jako člověk. V případě leishmanióz se využívá celé spektrum různých modelů, a to hlavně kvůli velké variabilitě patologických projevů mezi jednotlivými druhy leishmanií a velkým mezidruhovým rozdílům ve schopnosti nakazit různé druhy zvířat. Využívají se hlavně hlodavci, ale i psi, primáti a další druhy savců (Hommel, 2016).

Mezi nejvyužívanější hlodavce patří, tak jako v celém biomedicínském průmyslu, laboratorní myši, u kterých lze využít různé kmeny s jasně definovaným fenotypem. Pro studium kutánní leishmaniózy způsobené *L. major* se hojně využívají náchylné BALB/c myši, které jsou však schopné vyvinout efektivní imunitní odpověď vůči *L. donovani*. Naopak C57BL/6 myši rezistentní vůči *L. major* tvoří chronické léze při infekci *L. amazonensis* (shrnuto v Loria-Cervera 2014). Pro výzkum viscerální leishmaniózy působené *L. donovani* a *L. infantum* je pak, kvůli podobným klinicko-patologickým projevům jako u člověka, hojně využíván křeček *Mesocricetus auratus* (Melby 1998), který se používá i pro studium kožní formy onemocnění způsobené *L. amazonensis* (Robledo et al. 2012). Jak již bylo řečeno, jako modelová zvířata pro studium leishmanióz neslouží pouze hlodavci a například pro viscerální leishmaniózu působenou *L. infantum* se často využívají psi, kteří jsou jejím přirozeným rezervoárem (Moreno 2002).

Dalším zvířetem, které je v biomedicínském průmyslu hojně používáno, je morče *(Cavia porcellus)*, které bylo testováno jako potenciální laboratorní model pro studium leishmanií podrodu *Mundinia* během této diplomové práce. Tuto variantu jsme vybrali hlavně kvůli tomu, že morče je jediným popsaným a zároveň dobře dostupným hostitelem pro některý z druhů *L. (Mundinia)* (Paranaiba et al. 2018). Naopak vůči *L. braziliensis* jsou zřejmě morčata rezistentní (Paula et al. 2005).

2.4. Rezervoároví hostitelé

Leishmanióza je typický příklad onemocnění, v jehož koloběhu jsou zapojeni tzv. rezervoároví hostitelé (RH). Jak už název vypovídá, jedná se o zvířata, díky kterým patogen dlouhodobě cirkuluje ve volné přírodě.

Rezervoároví hostitelé jsou typicky rozdělováni do dvou hlavních skupin – primární RH a sekundární RH. Přítomnost primárního RH je sama o sobě dostatečná pro udržení koloběhu patogenu ve volné přírodě, naopak v případě sekundárního RH sice dochází k infekci přenašečů a přenosu na další hostitele, ale četnost těchto případů není dostatečná pro dlouhodobé udržení koloběhu. Sekundární RH tak může například sloužit jako překlenovací článek v době, kdy je abundance primárního hostitele nižší, než je pro dlouhodobé udržení potřebné, nebo například jako zdroj nákazy pro náhodné hostitele. Jako náhodní hostitelé jsou pak označováni živočichové, kteří se mohou nakazit patogenem, ale nepředají ho zpravidla dál a jejich podíl na udržení patogenu v přírodě není významný. V případě, že náhodným hostitelem je člověk, je způsobená nemoc označována jako zoonóza. V případě, že je člověk primárním hostitelem pak jako antroponóza (Ashford 1996; shrnuto v Quinnell a Courtenay 2009). Přesná definice rezervoárového hostitele je ale složitá a mezi autory nepanuje jednoznačná shoda. Například Haydon et al. (2002) nerozlišují rezervoárové hostitele na primární a sekundární a rozlišují jen RH, který je zdrojem parazita pro další hostitele a náhodného hostitele, který další kolování parazita nepodporuje (tzv. „parasite sinks“).

Pro identifikaci RH v endemické lokalitě musí být splněno několik podmínek (Silva et al. 2005, Ashford 1996, Ashford 1997).

- Geografický areál rozšíření RH a přenašeče se překrývá.
- Druh patogenu v rezervoárovém hostiteli a člověku se shoduje.
- RH přežívá dostatečně dlouho a dostatečně dlouho přežívá také patogen v RH (aby se parazit udržel i v období bez výskytu přenašečů).
- RH je na endemických lokalitách početný a je atraktivní pro přenašeče.
- Patogen se vyskytuje v kůži a/či krvi RH (v množství dostatečném pro přenos).
- Patogen není pro RH příliš patogenní.
- Prevalence je u RH vyšší než 20 %.

Poslední bod je ale diskutabilní, protože například v případě vysoké početnosti RH a přenašečů bude potřebná prevalence pro udržení koloběhu patogenu v přírodě zcela jistě nižší. Navíc se prevalence v populacích RH může velmi lišit sezónně a její stanovení závisí do značné míry na metodě odchytů.

2.5. L. (Mundinia) – *fylogenetické postavení, hostitelé a přenašeči*

Mundinia je podrod leishmanií, který byl vytvořen až v roce 2016, a to ze skupiny druhů do té doby známé jako *Leishmania enriettii* komplex (Espinosa et al. 2016). V současné době se skládá z 5 druhů leishmanií, z nichž čtyři jsou popsané a jeden na formální popis dosud čeká. Dva z těchto druhů jsou zřejmě infekční pouze pro zvířata a u tří jsou známé lidské infekce.

Dle dostupných fylogenetických analýz došlo k odštěpení podrodu *Mundinia* na bázi s ostatními podrody leishmanií (Kwakye-Nuako et al. 2015, Barrat et al. 2017). Tento fakt svědčí o starobylosti této skupiny a možná právě toto má souvislost i s jejím poměrně pozdním objevením. Tyto druhy jsou pravděpodobně velmi dobře adaptovány na své přirozené hostitele, divoká zvířata, jejichž nákazy nejsou patrné a k vývinu signifikantních projevů infekce dochází pouze při nákaze náhodných nebo imunodeficientních jedinců.

Se starobylostí této skupiny souvisí také geografické rozšíření jednotlivých druhů, které zahrnuje všechny kontinenty světa kromě Antarktidy. Někteří autoři tuto skutečnost vysvětlují vznikem jednotlivých druhů leishmanií ze společného předka po rozpadu Gondwany na základy budoucích kontinentů (Barrat et al. 2017).

L. enriettii, parazit domácích morčat z Brazílie, jehož přenašeč je dosud neznámý, byla poprvé izolována v 50. letech 20. století (Muniz a Medina 1948). Tento druh bývá často označován, jako „záhadná leishmania“, protože k jednotlivým případům docházelo i s 20letým odstupem. *Leishmania enriettii* způsobuje u morčat kožní formu onemocnění (Muniz a Medina 1948), ovšem může diseminovat i do vnitřních orgánů (Seblova et al. 2015) a působit i úmrtí zvířat (Thomaz-Soccol 1996). V laboratorních podmínkách došlo i k úspěšným nákazám křečků *Mesocricetus auratus,* u kterých dochází k vývinu kožních lézí v místě inokulace (Belehu et al. 1976; Seblova et al. 2015). Jak bylo řečenu již v úvodu tohoto odstavce, totožnost přenašeče zůstává dosud záhadou. Jednou z možností je *Lu. monticola*, která byla nalezena na stromech v okolí místa nákazy morčat z roku 1967 (Luz et al. 1967 v Machado et al. 1994). Není ale vyloučeno, že se může jednat i o místní druhy tiplíků, neboť ve studii z roku 2015 bylo dokázáno, že se *L. enriettii* poměrně dobře vyvíjí v tiplících *Culicoides sonorensis,* a že u nich dochází k vývinu pozdních infekcí s kolonizací stomodeální valvy. Naproti tomu při stejných experimentech s *Lu. longipalpis* leishmanie nedokázaly tvořit infekce v anteriorní části střeva (Seblova et al. 2015). Dalším tajemstvím v cyklu tohoto parazita zůstává dodnes i identita rezervoárového zvířete. Experimentální infekce makaků rhesus, psů, krys, myší, a dokonce i divokých morčat *Cavia aperea* nebyly úspěšné (Muniz a Medina 1948).

Druhým druhem je *L. macropodum*, která je jedinou doposud známou leishmanií z území Austrálie a zároveň jedinou leishmanií, u které je téměř jisté, že je přenášena tiplíky. Poprvé byl tento

druh zaznamenám v roce 2004, kdy byl izolován z klokanů rudých *(Macropus rufus)* a popsán jako nový druh *Leishmania* sp. (Rose et al. 2004). K formálnímu popsání došlo až v roce 2017 (Barrat et al. 2017). Tato leishmanie se projevuje kutánní, a pravděpodobně i mukózní, formou onemocnění, neboť kromě lézí na ocase, uších, předních a zadních nohách klokanů byly nalezeny také léze na kloace a očích. Léze jsou charakterizovány mírným až výrazným průnikem do dermis (Dougall et al. 2009). Přenašečem klokaní leishmaniózy jsou zřejmě tiplíci rodu *Forcipomyia (Lasiohelea)*, kteří byli nachytáni při terénních odchytech a přítomnost leishmanií byla potvrzena pomocí qPCR a pitev. Při pitvách byly nalezeny leishmanie i ve vydefekovaných jedincích. V jednom pitvaném tiplíkovi byla dokonce nalezena i masa leishmanií v TMG tvořící strukturu silně připomínající PSG zátku (Dougall et al. 2011). Jedinými hostiteli, ze kterých byly tyto leishmanie vyizolovány, dodnes zůstávají klokani. Konkrétně se jedná o druhy *Macropus rufus, Macropus robustus woodwardi, Macropus bernardus* a *Macropus agilis agilis,* jejich role jako rezervoárových hostitelů však zatím není zcela zřejmá, neboť všechna nakažená zvířata byla chována v zajetí, a kromě *Macropus agilis agilis* se přirozeně nevyskytují v endemické oblasti leishmaniózy. V případě posledního jmenovaného druhu klokana se jednalo o mladá zvířata, jejichž léze se rychle zhojily (Dougall et al. 2009).

Další 3 druhy jsou patogenní i pro člověka. Jsou jimi *L. martiniquensis*, *L. orientalis* a *L*. sp. z Ghany. *Leishmania martiniquensis* byla poprvé vyizolována z HIV pozitivního člověka na ostrově Martinik v roce 1992 a nejprve byla na základě izoenzymové analýzy zařazena mezi jednohostitelská trypanosomatida (Dedet et al. 1995). Až pozdější molekulární analýza vedla k zařazení mezi leishmanie komplexu *L. enriettii* a validnímu pojmenování jako *L. martiniquensis* (Desbois et al. 2014). O 2 roky později byl stejný parazit vyizolován z HIV negativního pacienta, který měl kutánní lézi na pravém obočí (Boisseau-Garsaud et al. 2000). V roce 2002 došlo k zařazení *L. martiniquensis*, tenkrát ještě jako nepopsaného druhu s označením MAR1, do bazálně se oddělující větve fylogenetického stromu do skupiny společně s *L. enriettii* (Noyes et al. 2002). *Leishmania martiniquensis* není endemitem ostrova Martinik, jak by se podle pojmenování mohlo zdát, ale jedná se druh vyskytující se téměř po celém světě, neboť jsou hlášeny případy infekcí koní způsobené touto leishmanií z Floridy, Německa a Švýcarska (Reuss et al. 2012, Müller et al. 2009) a skotu ze Švýcarska (Lobsinger et al. 2010). Dále byly hlášeny i případy nakažených lidí z Thajska (Pothirat et al. 2014). Vzhledem k takto širokému geografickému rozšíření je zřejmé, že během evoluce parazita muselo dojít k jeho adaptaci na hostitele vyskytující se na různých lokalitách. *Leishmania martiniquensis* se vyskytuje ve všech známých formách onemocnění, kromě muko-kutánní. U skotu a dobytka působí kožní léze, kdežto u lidí byla nalezena ve formě kutánní (Boisseau-Garsaud et al. 2000), difuzní kutánní (Dedet et al. 1995, Chusri et al. 2012) a dokonce i viscerální (Liataud et al. 2015). Identita přenašeče zůstává dodnes tajemstvím. Může se jednat o různé druhy rodů *Phlebotomus* a *Lutzomyia*

vyskytující se v lokalitách výskytu a vzhledem k příbuznosti s *L. enriettii* a její schopnosti vyvíjet se v tiplících, nelze vyloučit ani tuto skupinu hmyzu. Stejnou záhadou zůstává i identita rezervoárových zvířat. Může se jednat o různé druhy hlodavců, psy, kočky, koně a dobytek.

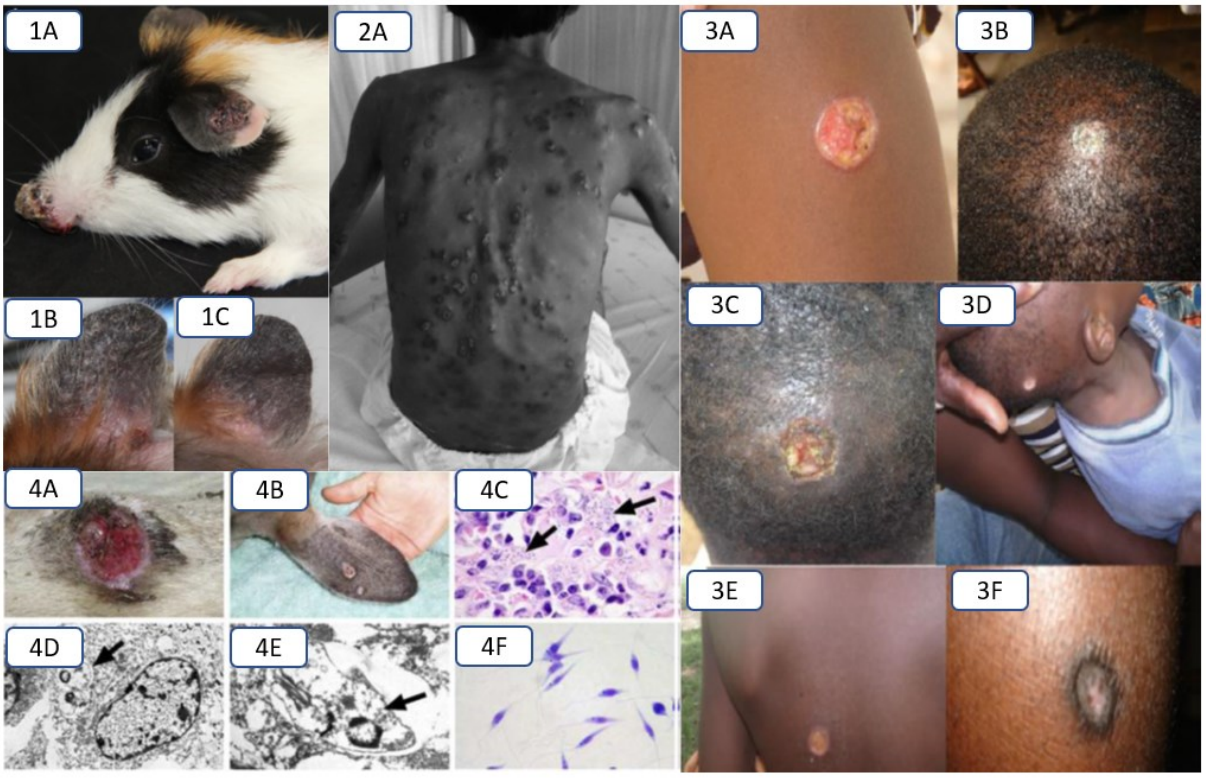
I když popsaných případů je stále velmi málo, skutečná prevalence je pravděpodobně násobně vyšší, než se zdá, neboť podle výzkumu mezi HIV nakaženými lidmi v oblasti provincie Trang v Thajsku zde byla zjištěna až 25% prevalence leishmaniózy, z nichž velká část byla způsobena právě *L. martiniquensis* (26,5 %) a *L. orientalis* (40,8 %). Zdá se tedy, že ve většině případů se nákaza u zdravého člověka vůbec neprojeví a teprve až imunodeficience vede k rozvoji symptomů (Manomat et al. 2017).

Situace ohledně *L. orientalis* byla dlouhou dobu nejasná. Často byla v minulosti zaměňována s *L. martiniquensis* a v literatuře bývala označována jako *L. siamensis* (Sukmee et al. 2008, Müller et al. 2009, Lobsinger et al. 2010, Reuss et al. 2012). Tento název nebyl však nikdy formálně zaregistrován, jde tedy o *nomen nudum*. K formálnímu popisu došlo až v prosinci 2018 (Jariyapan et al. 2018). *Leishmania orientalis* způsobuje stejné formy onemocnění jako *L. martiniquensis* u imunokompetentních i imunosuprimovaných lidí (Bualert et al. 2012, Suprisunjai et al. 2017, Jariyapan et al. 2018). Rezervoároví živočichové ani přirození přenašeči nejsou známí. Stejně jako u druhu *L. martiniquensis* nelze z úvah o přenašečích zcela vyloučit ani rod *Sergentomyia*, protože DNA těchto leishmanií byla detekována v druzích *S. gemmea* (Kanjanopas et al. 2013) a *S iyengari* (Siripattanapipong et al. 2018). Samotný nález DNA ale není dostatečným argumentem pro tvrzení, že se jedná o přenašeče onemocnění, neboť nevypovídá nic o schopnosti flebotoma leishmanie přenést na dalšího hostitele. Ze studie Kanjanopas et al. 2013 není patrné, zda se jednalo o druh *L. martiniquensis* nebo *L. orientalis*.

Posledním známým zástupcem podrodu *Mundinia* je dosud nepopsaný druh leishmanie z ghanské oblasti Volta, který zde způsobuje kutánní formu onemocnění. Prozatím byla vydána pouze jedna studie věnující se problematice tohoto nového druhu. Místní tomuto onemocnění říkají agbamekanu, což volně přeloženo znamená: „Dar od někoho, kdo se vrátil z cesty“. Pojmenování pravděpodobně odkazuje na místní víru, že onemocnění souvisí s lidmi migrujícími sem ze sousedního Toga (Kwakye-Nuako et al. 2015). Ve zdejší oblasti bylo zaznamenáno přes 8000 případů kožní leishmaniózy, ale v drtivé většině z nich nebyl přesně určen původce, a tak není jasné, jaká je zde četnost onemocnění způsobená právě tímto druhem. V oblasti se ještě endemicky vyskytují *L. major* (Kweku et al. 2011) a *L. tropica* (Nzelu et al. 2014). Z lidských leishmanií podrodu *Mundinia* se jedná o tu nejméně invazivní, neboť způsobuje pouze kutánní formu onemocnění, charakterizovanou většinou přítomností jednoho vředu, který se během několika týdnů-měsíců sám

zhojí. Nejčastěji jsou postiženy děti do 10 let, což pravděpodobně souvisí s absencí protilátek proti patogenu. Jsou však popsány i případy dospělých lidí s tímto onemocněním (Kwakye-Nuako et al. 2015). Ohledně rezervoárových zvířat a přenašečů zde panuje stejná nejistota jako v případě ostatních druhů podrodu *Mundinia*. Z přenosu jsou podezřelé rody *Phlebotomus* a *Sergentomyia*, i když prozatím není prokázáno, že rod *Sergentomyia* přenáší jiné než plazí leishmanie. Do potenciálních přenašečů lze zařadit hlodavce, domácí zvířata a místní divokou faunu (Kweku et al. 2011).

Z předešlého textu vyplívá, že *L. (Mundinia)* se u různých hostitelů prezentují celou škálou forem onemocnění, jejichž externí projevy jsou shrnuty v Obr. 2.



Obr.2 – Spektrum projevů onemocnění způsobených leishmaniemi podrodu *Mundinia*; 1 – *L. enriettii* (Seblova et al. 2015), 2 – *L. martiniquesis* (Chusri et al. 2012), 3 - *L.* sp. z Ghany (Kwakye-Nuako et al. 2015), 4 – *L. macropodum* (Rose et al. 2004).

3. Materiál a metodika

3.1 Složení použitých roztoků

- Anestetika: 2% xylazin (Rometar) + 10% ketamin (Narketan). Aplikace:

10 mg ketaminu/100 g + 2 mg xylazinu/100 g u *Mastomys natalensis* intraperitoneálně*;*

12,5 mg ketaminu/200 g + 1,5 mg xylazinu/200 g u *A. niloticus* intraperitoneálně a

37,5 mg ketaminu/750 g + 1,5 mg xylazinu/750 g u *C. porcellus* intramusculárně.

- Fyziologický roztok: 150 mM NaCl
- Ředící roztok pro počítání leishmanií v Bürkerově komůrce: 0,85% NaCl + 1% formaldehyd (CH_2O)
- Tekuté médium pro kultivaci leishmanií: Médium M199 (Sigma)+ 10% FCS (Gibco) + 1% BME vitamíny (Sigma) + 250 ug/ml amikin (Brystol- Myers Squibb) + 2% sterilní moč

3.2 Kultivace leishmanií

Během diplomové práce byly použity druhy *Leishmania enriettii* (MCAV/BR/45/LV90), *L. macropodum* (MMAC/AU/2004/AM-2004), *L*eishmania sp. z Ghany (MHOM/GH/2012/GH5), *L. orientalis* (MHOM/TH/2014/LSCM4), 2 kmeny *L. martiniquensis* (MHOM/MQ/1992/MAR1 a MHOM/TH/2011/CU1)*, L. major* (MARV/SN/XX/RV24;LV109)*, L. infantum* (ITOB/TR/2005/TOB2 a MHOM/TR/2000/OG-VL*)* dlouhodobě uchovávané v kryobance v zamrazovacích ampulích CryoTube™ Vials (NUNC) v médiu obsahujícím 7% DMSO (Sigma-Aldrich). Před použitím byly buňky rozmraženy a přeočkovány do tekutého kultivačního média M199 a kultivovány při 23 °C v plochých kultivačních zkumavkách. Kultury byly pravidelně přeočkovávány do nového média.

3.3 Chov flebotomů

Pro potřeby práce byly použity druhy flebotomů chované v naší laboratoři – *Lutzomyia migonei* (Brazílie)*, Phlebotomus argentipes* (Indie) a *P. duboscqi* (Senegal)*.*

Kolonie jsou chovány ve speciálních prostorách insektária, určených výhradně k tomuto účelu. Jedná se o místnosti s trvale udržovanou vlhkostí 50 % a teplotou 25 °C. Fotoperioda je 14 hodin světla a 10 hodin tmy. Dospělci jsou chováni v nylonových sítích uvázaných na kovových konstrukcích, které jsou umístěné v plastových pytlích. Uvnitř pytle je umístěna vata navlhčená destilovanou vodou, která udržuje vlhkost v pytli na ideálních 75-90 %.

Dospělci jsou krmeni 50% roztokem sacharózy. Kousek vaty nasáklý tímto roztokem je umístěn v malé skleněné Petriho misce na dně sítě. Dospělci jsou vypouštěni 3x týdně, samice staré minimálně 2 dny (dle individuálních specifik každého druhu) jsou sáty na uspané BALB/c myši (AnLab, s.r.o.) nebo na neuspaném Novozélandském bílém králíkovi (NZW, Velaz, s.r.o.) umístěném

ve fixačním postroji. Dva až pět dnů po sání jsou nasáté samice přemístěny do vlhčených, sádrou vylitých kelímků, ve kterých dochází ke kladení vajec. Kelímky jsou umístěny do plastových boxů s vlhčenou písčitou podestýlkou sloužící k udržení ideální vlhkosti uvnitř chovných boxů. Zhruba po týdnu se z vajec začínají líhnout larvičky L1, které se postupně vyvinou až do stádia L4, které se posléze zakuklí a zhruba po týdnu začnou z kukel vyletovat dospělci. Celý cyklus trvá 5-8 týdnů. Larvičky jsou 3x týdně krmeny jemně namletou fermentovanou směsí králičího trusu a granulí. K fermentaci dochází v uzavřených kovových bednách při teplotě 23-25 °C a vysoké vzdušné vlhkosti udržované přítomností táců s vodou uvnitř beden (Volf a Volfová 2011).

3.3.1. Lutzomyia migonei

Pro experimenty s *L. enriettii* byla vybrána kolonie *Lu. migonei*, protože se jedná o druh flebotoma s výskytem v Brazílii, odkud jsou zatím jediné zdokumentované případy nákazy tímto druhem leishmanie. Tento druh má v laboratorních podmínkách poměrně rychlý životní cyklus a preferuje sání na větších obratlovcích. K defekaci dochází během 2-3 dnů po sání. Je to permisivní vektor schopný podporovat vývoj *L. infantum* v laboratorních podmínkách, nicméně role tohoto druhu jako přenašeče v terénu není zatím jednoznačně potvrzena (Guimarães et al. 2016).

3.3.2. Phlebotomus duboscqi

V pokusech s Ghanským izolátem patřícím do podrodu *Mundinia* byl použit *Phlebotomus duboscqi*. Přirozeně se vyskytuje v subsaharské oblasti, kde obývá hlavně opuštěná termitiště, která mu slouží jako líhniště. V laboratorních podmínkách dochází k defekaci až 4 dny po sání a celkově je celý životní cyklus tohoto druhu spíše pomalý. Jedná se o hlavního přenašeče kutánní leishmaniózy působené *L. major* v oblastech výskytu.

3.3.3. Phlebotomus argentipes

Pro pokusy s *L. martiniquensis* a *L. orientalis* byl vybrán asijský druh *P. argentipes.* Jedná se o permisivního vektora se schopností přenášet různé druhy leishmanií a přirozeného přenašeče *L. donovani*. *Phlebotomus argentipes* má rychlé trávení krve a defekuje většinou již 3. den po sání, ale někdy je možné nalézt ve střevě krev i 8. den po sání.

3.4. Chov hlodavců

Během práce byly použity 3 druhy hlodavců – *Cavia porcellus*, *Mastomys natalensis* a *Arvicanthis niloticus.* Zatímco chovy *M. natalensis* a *A. niloticus* byly v naší laboratoři zavedeny (*M. natalensis* ze zvířat z komerčního zdroje, Kaprál s.r.o., a *A. niloticus* ze zvířat pocházejících z pražské ZOO), morčata (Dunkin-Hatley) byla pro účely pokusu zakoupena z komerčního chovu (AnLab s.r.o.).

Chovné skupiny i zvířata pro pokus byly umístěny v akváriích typu T4 (58 x 37 x 20 cm, Velaz). Podestýlka byla z neprašných pilin a neprašného sena. Hlodavci měli nepřetržitý přístup k čisté pitné vodě ve skleněné napáječce. *Mastomys natalensis* a *Arvicanthis niloticus* byli krmeni standardní krmnou směsí ST-1 (Velaz) doplněnou čerstvou zeleninou. *Mastomys natalensis* byly přikrmovány larvami *Zhophobas morio.* Morčata byla chována v boxech T4 po dvou kusech a byla krmena speciální krmnou směsí pro morčata obohacenou o vitamin C. V chovné místnosti byla udržována konstantní teplota 20-24 °C a vlhkost 45-50 %.

Při chovu hlodavců i pokusech s nimi jsou dodržovány podmínky stanovené platnými legislativními předpisy (zákon č. 359/2012 Sb. na ochranu zvířat proti týrání; vyhláška č. 419/2012 Sb. o ochraně pokusných zvířat). Chovná místnost má přidělenou akreditaci Ministerstvem zemědělství (č. j.: 37428/2019-MZE-18134). Chov výše uvedených druhů hlodavců a xenodiagnostické pokusy s nimi byly schváleny Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy rozhodnutím č. MŠMT-10270/2015-5. Se zvířaty manipulují jen lidé s platným Osvědčením o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů podle § 15d odst. 3 zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů (J. Sádlová č. osvědčení CZ 02566).

3.4.1. Cavia porcellus

Cavia porcellus z čeledi Caviidae (Hystrichomorpha) je domestikovaný druh morčete, jehož předkové původně pocházejí z jihoamerických And, a který je dnes hlavně díky snadnému ochočení a klidné povaze rozšířen v domácnostech téměř po celém světě. *Cavia porcellus* se ve volné přírodě nevyskytuje, ale v různých částech Jižní Ameriky jsou dnes běžně rozšířeny druhy *C. aperea*, *C. cutleri*, *C. tschuddi*, *C. fulgida*. Tato morčata obývají hlavně otevřené pastviny a mokřiny. Váha dospělých jedinců se většinou pohybuje mezi 700-1200 gramy a průměrná délka života dosahuje 4–5 let (shrnuto v Pritt 2012). V minulosti byla morčata jedním z nejvíce používaných laboratorních zvířat, a i přes narůstající využijí geneticky upravených myší a tlak na snižování počtu používaných laboratorních zvířat se dnes, vzhledem k větší podobnosti jejich fyziologie s lidmi, stále hojně používají (Hargaden a Singer, 2012).

3.4.2. Mastomys natalensis

Mastomys natalensis z čeledi Muridae obývá téměř celou subsaharskou Afriku, což z ní dělá nejvíce rozšířeného afrického hlodavce, patrně se ale jedná spíše o komplex velice podobných druhů. Obývá hlavně pastviny, louky, savany a často je lze najít i blízkosti lidských sídel. Rozšíření v aridních oblastech je závislé na přítomnosti vody. Jedná se o všežravé noční zvíře s nejvyšší aktivitou zhruba 3 hodiny po setmění. Délka březosti je 23 dní a vrhy často mají 10 a více mláďat. V průběhu roku

dochází k velkým populačním výkyvům. Hmotnost dospělých jedinců se pohybuje mezi 70-120 g a průměrná délka života je kolem 3 let (Leirs 2003).

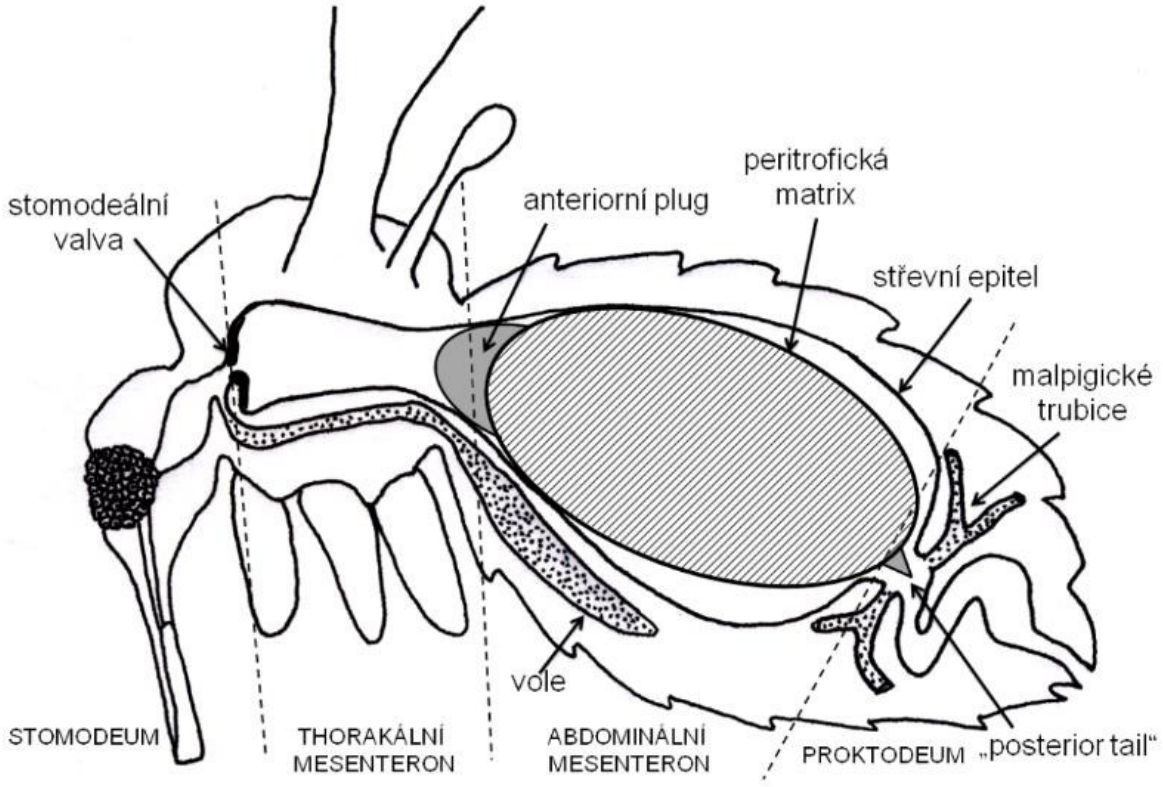
3.4.3. Arvicanthis niloticus

Arvicanthis niloticus je hlodavec z čeledi Muridae patřící do rodu *Arvicanthis*, který v současné době zahrnuje 7 druhů a je jedním z nejrozšířenějších afrických rodů hlodavců. *Arvicanthis niloticus* obývá pás táhnoucí se od Senegalu po Etiopii. Na východě pak zasahuje i do jižnějších států jako je Keňa, Uganda a Tanzanie. Na severu zase obývá břehy Nilu až do jeho delty. Separátní populace byla objevena i v Zambii a v Alžírsku. Obývá savany, louky i aridní stepi s úhrnem srážek od 200 do 1200 mm za rok. Populace se často nacházejí v blízkosti vodních toků v nadmořských výškách 0-2000 m.n.m. Velikost populací osciluje v průběhu roku, přičemž největší početnost je po období dešťů a nejnižší v době sucha.

Jsou to středně velcí, robustní, býložraví hlodavci s denní aktivitou. Zbarvení jedinců se může lišit podle výskytu – většinou se jedná o tmavě hnědou, ale zvířata z pouštních lokalit bývají výrazně světlejší. Dospělí samci mohou vážit i více než 300 g, samice jsou výrazně menší a váží kolem 200-250 gramů. Průměrná délka života jsou zhruba 3 roky (Granjon a Ducroz 2013).

3.5. Pitvy a vyšetření střev flebotomů

Nasáté samice byly pitvány ve dnech 1 (kontrola správného provedení experimentu), 3-4 (ověření schopnosti přežít ve flebotomech defekaci) a 8-10 (ověření schopnosti tvořit zralé infekce), dle druhu flebotoma. Samice byly uspány na ledu, přeneseny do kapky sterilního fyziologického roztoku, pod binokulární lupou dekapitovány a pomocí ostré entomologické pinzety a pitvátka (minucie zasazená do špejle) bylo separováno střevo. Střevo bylo přeneseno do nové kapky sterilního fyziologického roztoku a prohlédnuto pod světelným mikroskopem. Intenzita infekce byla dle Myšková et al. (2008) hodnocena jako slabá (méně než 100 buněk/střevo), střední (100-1000 buněk/střevo) a silná (více než 1000 buněk/střevo), zároveň byla popsána lokalizace leishmanií ve střevě dle Sádlová et al. (2010) (stomodeální valva, thorakální mezenteron, abdominální mezenteron a v případě přítomnosti peritrofické matrix u nevydefekovaných samic endoperitrofický prostor) (Obr. 3).



Obr. 3 – Průřez tělem flebotoma. (Dle Sádlová (nepublikováno))

3.6. Experimentální infekce flebotomů

Promastigoti leishmanií z log-fáze kultury byli smícháni s inaktivovanou (35 min/56 °C) defibrinovanou králičí krví (Bioveta) na výslednou koncentraci 10^6 buněk/ml. Krev byla podávána samicím ve skleněném krmítku přes kuřecí kůži plnící funkci membrány. Kůže byla stažena z hřbetní a břišní strany 3 dny starých kuřat, 2x promyta v 70% etanolu a 2x ve sterilním fyziologickém roztoku. Před použitím byla skladována v -20 °C. Těsně před pokusem byla kůže pomocí parafilmu připevněna na skleněné krmítko, které bylo po naplnění krví umístěno do malé sítě (20x20x20 cm). Sání probíhalo v přítmí při teplotě v místnosti mezi 25–27 °C (v závislosti na druhu daného flebotoma). Krmítka byla zahřívána na 37 °C průtokem ohřáté vody. Krmítko bylo odstraněno ze sítě po cca dvou hodinách a nenasáté samice byly odebrány ze sítě pomocí exhaustoru. K síti byla následně přidána Petriho miska s navlhčenou vatou, zajišťující trvalé udržení vlhkosti v síti a do sítě byl umístěn roztok 50% sacharózy.

Pokus s *L. enriettii* a *L. macropodum* v *Lu. migonei* byl opakován 2x, stejně jako pokus s *L*. sp. z Ghany v *P. duboscqi* a martinického izolátu *L. martiniquensis* (Lem2494) v *P. argentipes*. Pokus s thajským izolátem *L. martiniquensis* (Cu1R1) a *L. orientalis* v *P. argentipes* byl opakován 5x.

3.7. Měření leishmanií

Měření leishmanií použitých pro infekce hlodavců a leishmanií ze střev nakažených flebotomů bylo prováděno s cílem zjistit, zda a kolik bylo v kultuře/ve střevě přítomno metacyklických forem. Roztěry byly připraveny ze střev samic *P. argentipes* nakažených *L. orientalis* 8 dní PI. Roztěry byly po zaschnutí fixovány 5 minut metanolem a následně 20 minut barveny Giemsou (Fluka; ředění v poměru 1:19 dH_2O). Preparáty byly prohlíženy pod světelným mikroskopem (Olympus BX51) se zabudovanou kamerou (DP-70) při zvětšení 1000x za použití imerzního oleje. Leishmanie byly snímány v programu QuickPHOTO MICRO 2.2 (Olympus) a následně byla jejich velikost měřena v programu ImageJ (Java). Vždy bylo měřeno alespoň 130 leishmanií pocházejících z různých flebotomů. Data byla následně vyhodnocena v programu SPSS. 27. Zda se jedná nebo nejedná o metacyklickou formu bylo rozhodnuto na základě kritérií stanovených v Sádlová a kol. (2010).

3.8. Xenodiagnostika

V průběhu pokusů se zvířaty byla použita metoda přímé xenodiagnostiky. Čtyřicet až šedesát týden starých samic *P. duboscqi* anebo alespoň 4 dny starých samic *Lu. migonei* bylo umístěno do malých plastových kelímků uzavřených jemnou silonovou tkaninou. Tento kelímek byl držen na ušním boltci uspaného zvířete po dobu trvání anestezie, maximálně však 50 minut. Po ukončení sání byly samice vypuštěny do sítí a nenasáté samice byly odebrány pomocí exhaustoru.

V případě, že nebyl k dispozici druh flebotoma, ve kterém by leishmanie dokončily vývoj (všechny druhy podrodu *Mundinia*), byly samice 2-3 dny po sání uspány na ledu a umístěny do 1,5ml mikrozkumavek po 5 kusech/zkumavka, zality 100 µl Tissue lysis bufferu (Roche) a umístěny do mrazáku. Poté z nich byla vyizolována DNA (Roche) a provedena konvenční PCR pro detekci leishmanií. Pro analýzu pomocí PCR bylo použito vždy 8 poolů po 5 nasátých samicích nebo všechny nasáté samice v případě menšího počtu nasátých samic.

V případě infekcí zvířat *L. major* byly samice *P. duboscqi* (přirozený přenašeč tohoto parazita) 8-10 dní po sání vypitvány a intenzita a lokalizace infekce byla hodnocena dle Myšková et al. (2008).

3.9. Izolace DNA

Pro izolaci DNA z tkání hlodavců a z flebotomů byl použit komerčně dostupný High pure PCR preparation kit (Roche). DNA byla izolována dle protokolu dodaného výrobcem. DNA flebotomů a DNA z krve a uzlin hlodavců byla z kolonek eluována do 50 µl elučního pufru (Roche), DNA z ostatních tkání byla eluována do 150-200 µl a posléze uchovávána v -20 °C.

3.10. Konvenční PCR

Pro detekci leishmanií v tkáních a flebotomech byla použita metoda konvenční PCR s vlastními primery navrženými za pomoci programů BLAST, MEGA (ClustalW) a Primer-BLAST. Primery cílí na 246 bp dlouhý úsek DNA v sekvenci ITS-1 malé ribozomální podjednotky konzervovaný skrz všechny známé podrody leishmanií (alignment byl vytvořen pro 36 druhů). Reakce probíhala za použití Emerald master mixu dle protokolu 1. 94 °C/3:30 min, 2. 94 °C/30 vteřin, 3. 60 °C/30 vteřin, 4. 72 °C/20 vteřin, 5. 72 °C/7 min a poté byla reakce zchlazena na 12 °C. Počet cyklů byl nastaven na 37. Vzorky byly následně analyzovány na 1% agarózovém gelu v TAE pufru.

Sekvence primerů:

Forward – 5´ - AGATTATGGAGCTGTGCGACAA-3´

Reverse – 5´- TAGTTCGTCTTGGTGCGGTC-3´

3.11. Kvantitativní PCR

Pro detekci a kvantifikaci leishmanií v tkáních *M. natalensis* a *A. niloticus* byla využita metoda qPCR. Pro detekci bylo v případě *M. natalensis* využito měření fluorescence při navázání barvy SYBR Green (SsOAdvanced™ Universal SYBR®, Bio-Rad) na dvouvláknový produkt na přístroji iQ5 real-time PCR detection systém (Bio-Rad). Byly použity stejné primery jako při detekci leishmanií pomocí konvenční PCR.

V případě *A. niloticus* bylo využito měření fluorescence při navázání barvy SYBER Green (iQSYBER Green Supermix, Bio-Rad, Hercules, CA) na dvouvláknový produkt na stejném přístroji jako v případě *M. natalensis*. Primery cílí na kinetoplastovou DNA leishmanií.

Sekvence primerů:

Forward primer - 5´-CTTTTCTGGTCCTCCGGGTAGG-3´

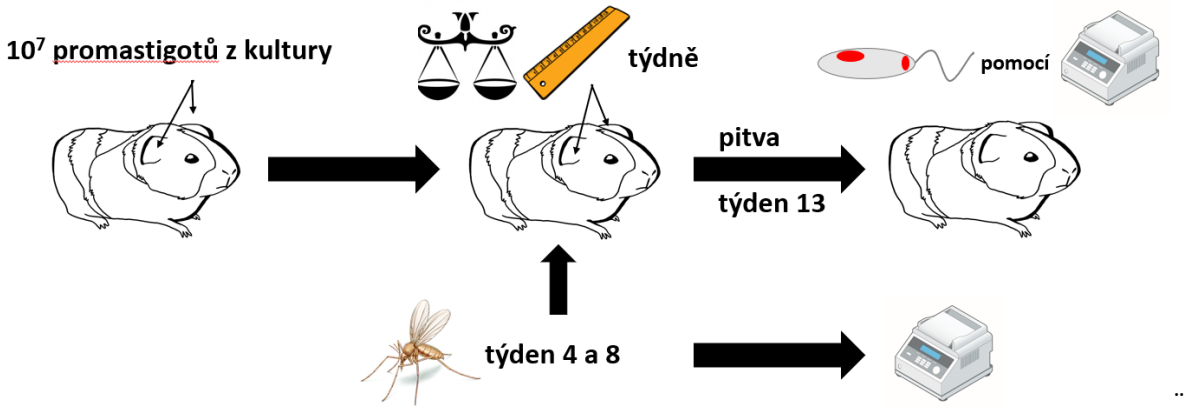
Reverse primer - 5´-CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA-3´

Kvantitativní PCR při detekci leishmanií v *A. niloticus* provedl doc. RNDr. Jan Votýpka, Ph.D.

3.12. Experimentální infekce morčat

Zvířata byla infikována intradermální inokulací leishmanií ze stacionární fáze kultury infekční dávkou $1x10^7$ leishmanií do každého ucha. Pro každý druh leishmanií (*L. enriettii*, *L. macropodum*, *L. orientalis*, 2 kmeny *L. martiniquensis* (Lem2494 a Cu1R1) a *L*. sp. z Ghany) byla použita vždy 3 zvířata – celkem 18 zvířat. Další 3 morčata byla použita jako kontrolní. Zvířata byla každý týden vážena a velikost lézí byla měřena pomocí posuvného měřítka. V týdnech 4 a 8 PI byly provedeny xenodiagnostiky za použití *Lutzomyia migonei* nebo *Phlebotomus duboscqi,* jak je popsáno v kapitole

3.8. Pokus byl ukončen utracením zvířat a pitvou v týdnu 13 PI. Pro diagnostiku pomocí PCR byly odebrány obě uši, přední a zadní tlapky, spádové uzliny uší, krev, slezina a játra (Obr. 4).



Obr. 4 – Grafické znázornění – schéma pokusu s morčaty.

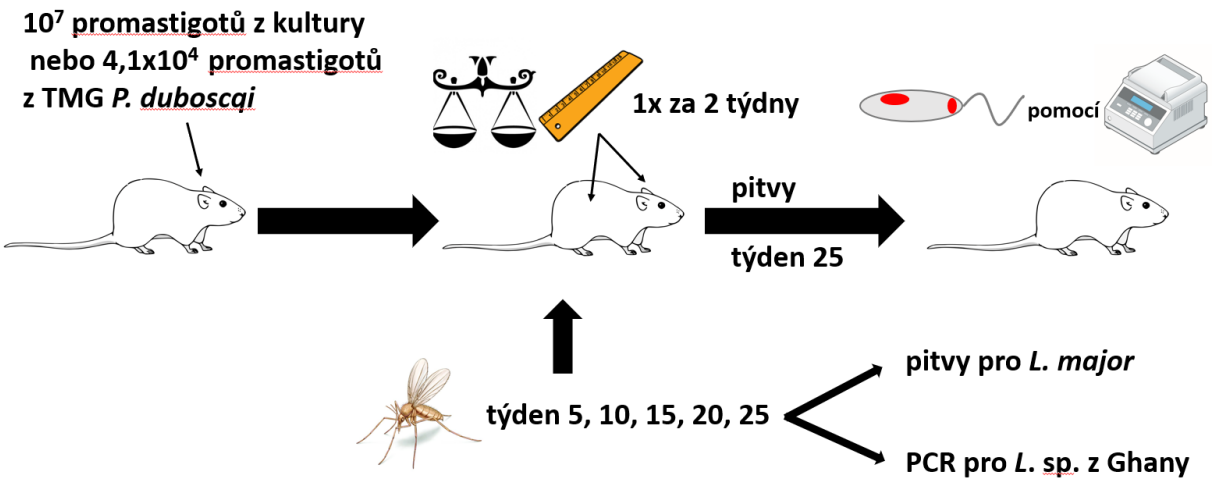
3.13. Experimentální infekce Arvicanthis niloticus

Pro pokusy s *A. niloticus* byly vytvořeny 4 skupiny po 3 jedincích od každého pohlaví – celkem 24 zvířat (Tab. 1). Zvířata byla infikována intradermální inokulací do levého ucha 10^7 leishmanií ze stacionární fáze kultury (skupina A, B) nebo $4{,}1x10^4$ *L. major* (LV109) leishmanií získaných z thorakálních mezenteronů *P. duboscqi* 10 dní PI (skupina C), ke kterým bylo přidáno 0,5 slinné žlázy flebotomů na zvíře. Skupina D sloužila jako kontrola bez infekce.

Tab. 1 - Tabulkové znázornění pokusu s *A. niloticus.*

	Skupina A	Skupina B	Skupina C	Skupina D
Počet zvířat	6	6	6	6
Druh leishmanie	*L.* sp. z Ghany	*L. major* (LV109)	*L. major* (LV109)	/
Původ	kultura	kultura	*P. duboscqi*	/
Infekční dávka	$1x10^7$	$1x10^7$	$4{,}1x10^4$	/
Procento metacyklů v inokulu	42 %	9 %	52 %	/
Slinné žlázy flebotomů	0,5 žlázy/zvíře	0,5 žlázy/zvíře	0,5 žlázy/zvíře	/

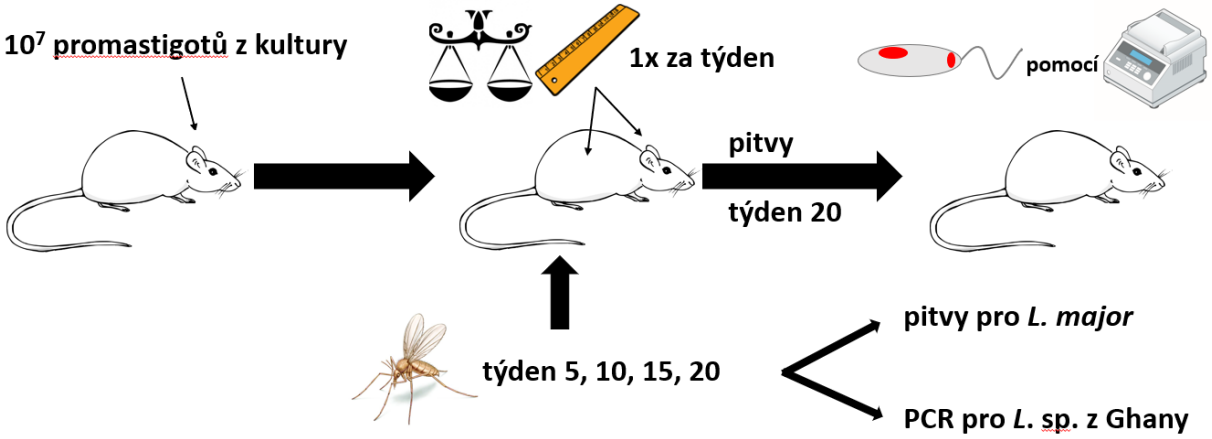
Hmotnost a vývoj lézí byly hodnoceny jednou za dva týdny. Xenodiagnostiky byly prováděny v týdnu 5, 10, 15, 20 a 25 PI. Pokus byl ukončen utracením a pitvou zvířat v 25. týdnu PI. Z každého zvířete byly odebrány obě uši, přední a zadní tlapky, spádové mízní uzliny, ocas, krev, slezina a játra pro analýzu pomocí qPCR (Obr. 5).



Obr. 5 – Grafické znázornění – schéma pokusu s *A. niloticus.*

3.14. Experimentální infekce Mastomys natalensis

Pro pokusy s *M. natalensis* byly vytvořeny 3 skupiny po šesti zvířatech – celkem 18 zvířat. Jedna skupina byla infikována 1x10^7 do levého ucha *L.* sp. izolovanou v Ghaně, druhá stejnou infekční dávkou *L. major* (LV109) a třetí skupina byla ponechána jako kontrolní. Zvířata byla každý týden vážena a jejich uši kontrolovány na přítomnost lézí. Xenodiagnostiky byly provedeny v týdnech 5, 10, 15 a 20 PI dle postupu popsaného v kapitole 3.8. Pokus byl ukončen ve 20. týdnu PI utracením a pitvou zvířat, kdy jim byly odebrány vzorky krve, spádových mízních uzlin, uší, předních a zadních tlapek, ocasu, sleziny a jater, pro následnou analýzu pomocí qPCR (Obr. 6).



Obr. 6 – Grafické znázornění – schéma průběhu pokusu s *M. natalensis.*

3.15 Statistika

Statistická analýza byla provedena s použitím programu R (http://cran.r-project.org/). Vztah mezi hmotnostmi zvířat v jednotlivých skupinách (infikované a neinfikované) a času byl testován pomocí analýzy kovariance se zohledněním vztahu opakovaných měřeních stejného zvířete. Do modelu byla zanesena interakce mezi skupinami (infikované a neinfikované) a času. Za signifikantní bylo považováno $p < 0,05$.

Statistickou analýzu provedla RNDr. Tatiana Spitzová, Ph.D.

4. Výsledky

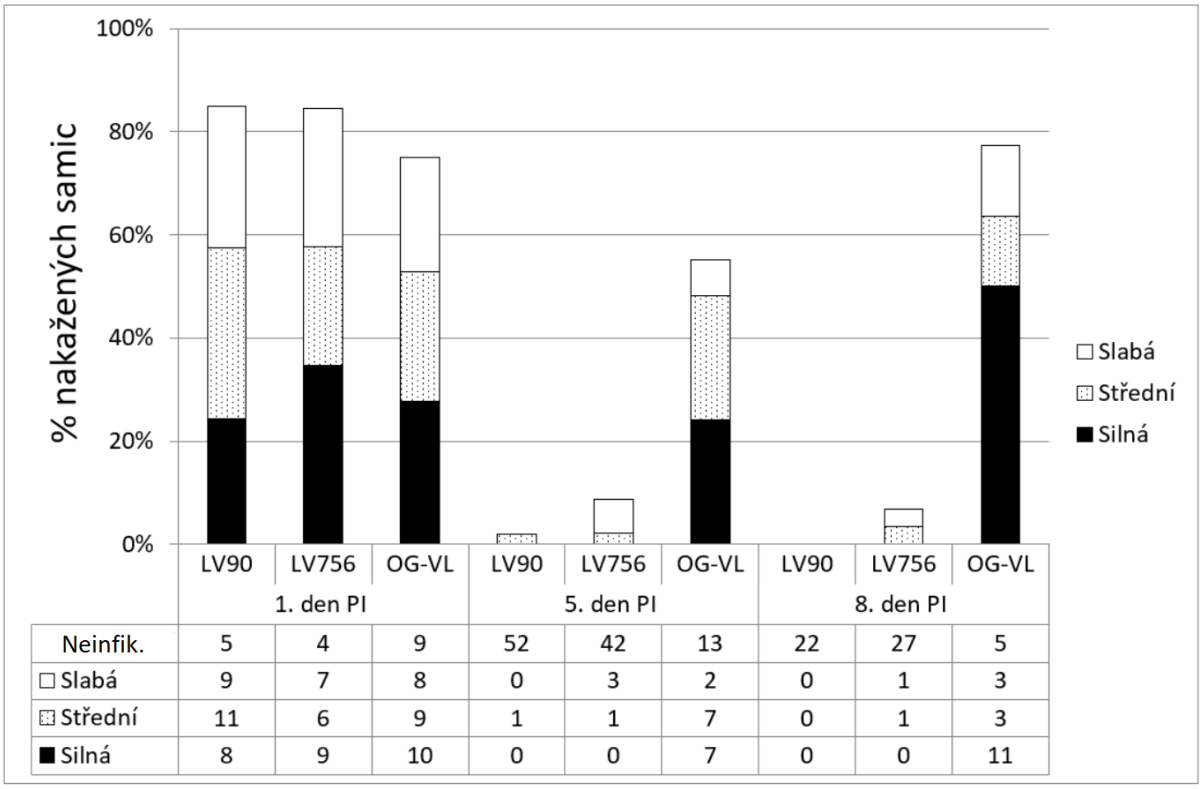
4.1. Experimentální infekce flebotomů

Protože přirození přenašeči leishmanií jednotlivých druhů leishmanií z podrodu *Mundinia* nejsou známí, rozhodli jsme se otestovat schopnost jejich vývoje ve flebotomech, kteří s nimi sdílejí stejný geografický areál rozšíření a jejichž chovy jsou zároveň zavedeny v naší laboratoři. *Leishmania enriettii* byla tedy testována v *Lu. migonei, L*. sp. z Ghany *v P. duboscqi* a *L. martiniquensis* (jeden izolát z Martiniku a jeden z Thajska) a *L. orientalis* ve *P. argentipes.* Protože žádný druh flebotoma z Austrálie nebyl nikdy kolonizován, schopnost vývoje australské *L. macropodum* jsme testovali v permisivním jihoamerickém druhu *Lu. migonei.*

Po sání byly nasáté samice pitvány v různých časových intervalech podle druhu použitého flebotoma, protože jednotlivé druhy se liší délkou trávení krve (blíže v kapitole 3.3.). Infekční dávka byla vždy $1x10^6$ leishmanií/ml krve.

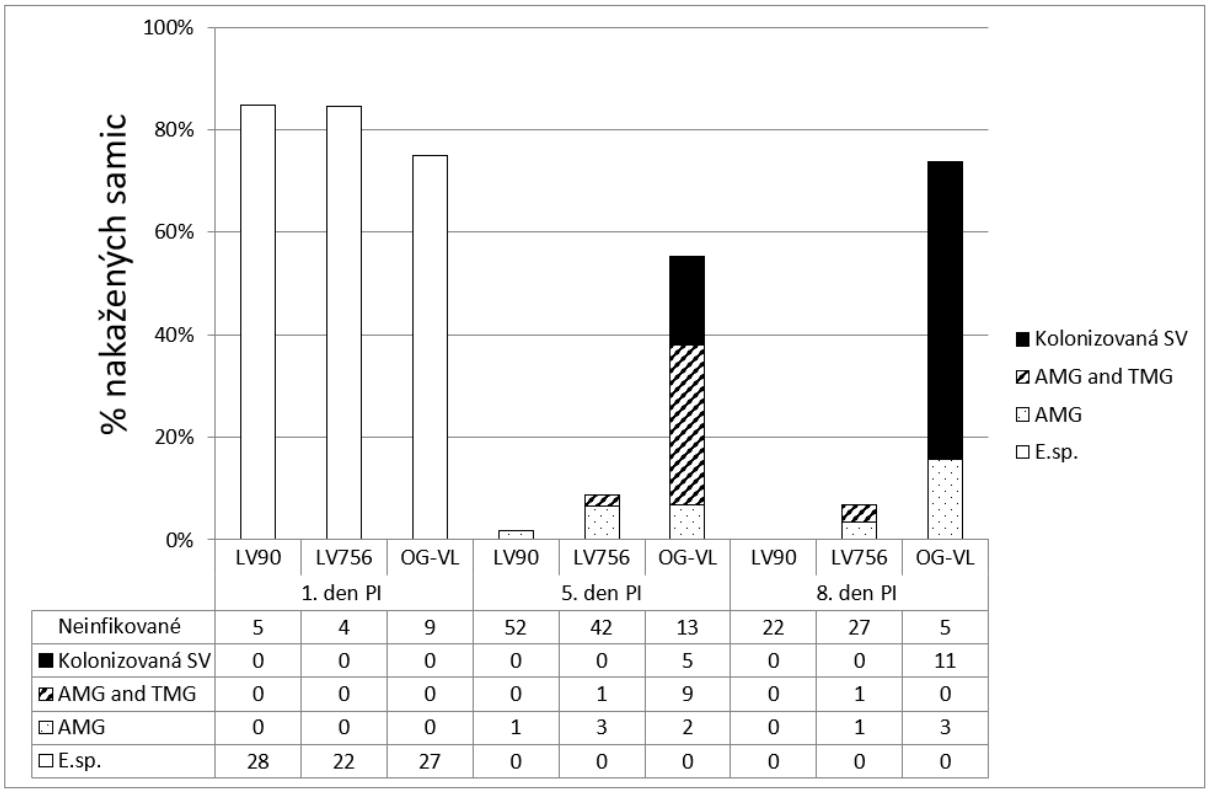
4.1.1. Vývoj L. enriettii *a* L. macropodum *v* Lu. migonei

Lutzomyia migonei se neukázala být vhodným přenašečem pro *L. enriettii* ani pro *L. macropodum.* Zatímco kontrolní *L. infantum* tvořila osmý den PI silné infekce s kolonizací stomodeální valvy u většiny pitvaných samic*,* obě leishmanie podrodu *Mundinia* se vyvíjely srovnatelně pouze v časné fázi infekce, první den PI. Po defekaci nestrávených zbytků potravy a peritrofické matrix 5. den PI už však byly přítomny pouze velice výjimečně a v malých počtech (Obr. 7). Navíc se přeživší buňky vyskytovaly převážně v oblasti AMG a pouze u dvou samic bylo několik leishmanií zaznamenáno i v oblasti TMG (Obr. 8).



	LV90	LV756	OG-VL	LV90	LV756	OG-VL	LV90	LV756	OG-VL
	1. den PI			5. den PI			8. den PI		
Neinfik.	5	4	9	52	42	13	22	27	5
Slabá	9	7	8	0	3	2	0	1	3
Střední	11	6	9	1	1	7	0	1	3
Silná	8	9	10	0	0	7	0	0	11

Obr. 7 – Intenzita infekce nakažených samic *Lu. migonei* v průběhu pokusu. LV 90 – *L. enriettii*, LV756 – *L. macropodum*, OG-VL – *L. infantum*

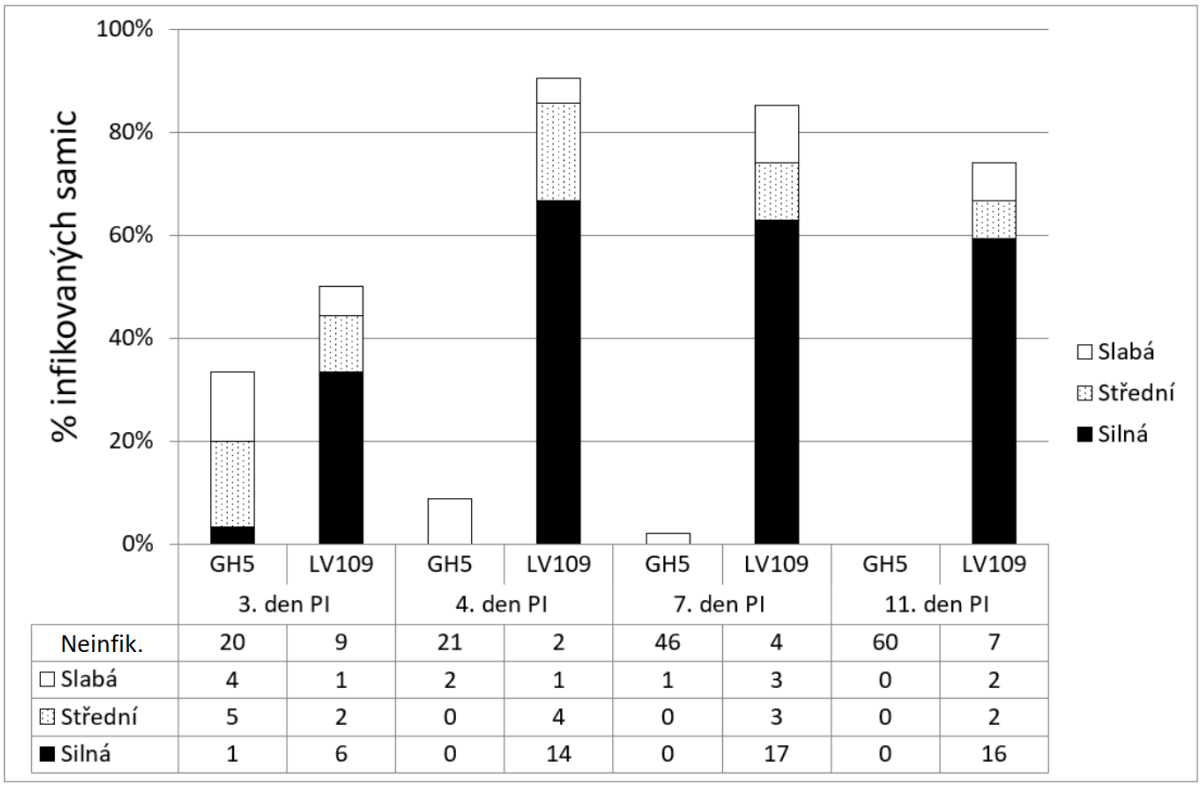


	LV90	LV756	OG-VL	LV90	LV756	OG-VL	LV90	LV756	OG-VL
	1. den PI			5. den PI			8. den PI		
Neinfikované	5	4	9	52	42	13	22	27	5
Kolonizovaná SV	0	0	0	0	0	5	0	0	11
AMG and TMG	0	0	0	0	1	9	0	1	0
AMG	0	0	0	1	3	2	0	1	3
E.sp.	28	22	27	0	0	0	0	0	0

Obr. 8 – Lokalizace infekce nakažených samic *Lu. migonei* v průběhu pokusu. LV 90 – *L. enriettii*, LV756 – *L. macropodum*, OG-VL – *L. infantum*

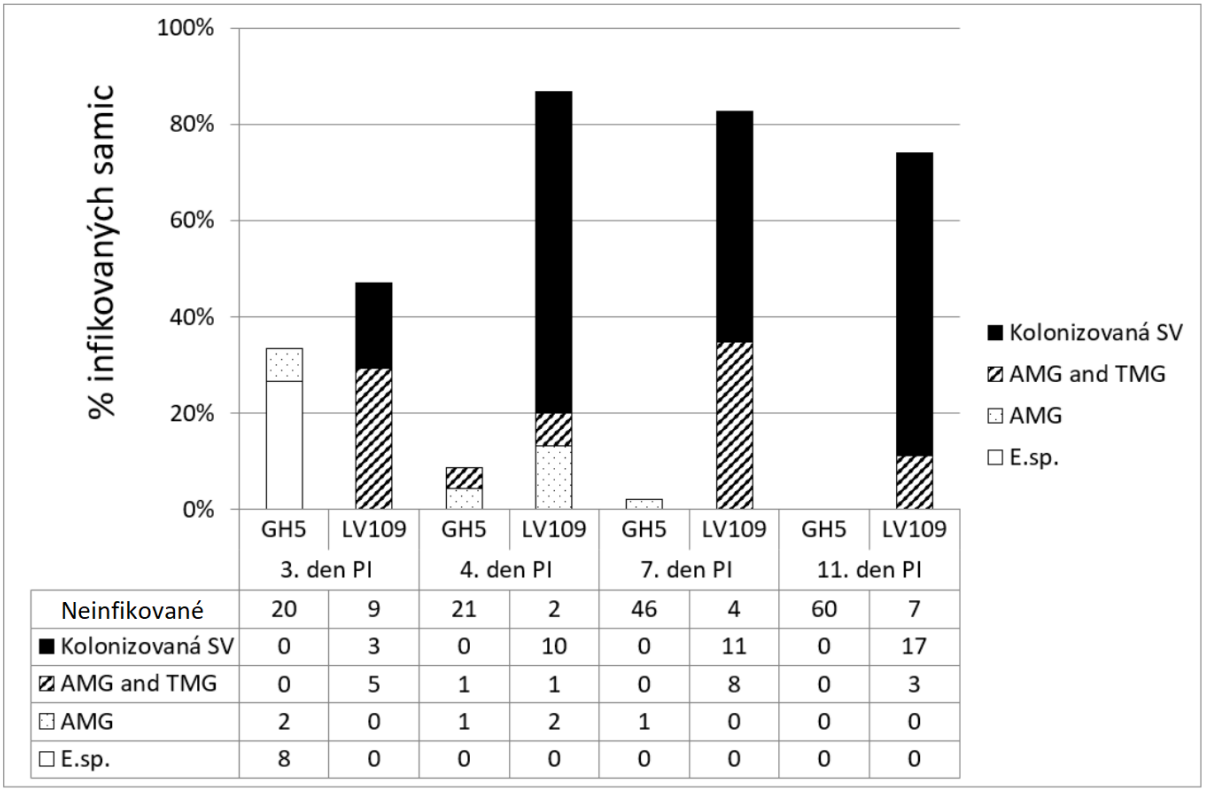
4.1.2. Vývoj L. *sp. z Ghany v* P. duboscqi

P. duboscqi (přirozený přenašeč *L. major*) byl vybrán pro testování vývoje tohoto druhu leishmanie, působícího kutánní leishmaniózu v Ghaně, protože sdílí s tímto zástupcem podrodu *Mundinia* geografické rozšíření. Ovšem zatímco kontrolní *L. major* (LV 109) tvořila ve většině samic silné infekce a kolonizovala stomodeální valvu flebotomů, zástupci podrodu *Mundinia* přežívaly proces trávení krve a následnou defekaci pouze velice zřídka a v malých počtech. Čtvrtý den PI byly nalezeny nakažené pouze 2 samice, a to navíc velmi slabě. Sedmý den už byla vypitvána pouze 1 slabě nakažená samice. Jedenáctý den po infekci už nebyla nakažena žádná z 60 pitvaných samic (Obr. 9). U pozitivních samic nebyla pozorována anteriorní migrace parazitů (Obr. 10).



	GH5	LV109	GH5	LV109	GH5	LV109	GH5	LV109
	3. den PI		4. den PI		7. den PI		11. den PI	
Neinfik.	20	9	21	2	46	4	60	7
□ Slabá	4	1	2	1	1	3	0	2
⬚ Střední	5	2	0	4	0	3	0	2
■ Silná	1	6	0	14	0	17	0	16

Obr. 9 – Intenzita infekce nakažených samic *P. duboscqi* v průběhu pokusu. GH5 – *L.* sp. z Ghany, LV109 – *L. major*



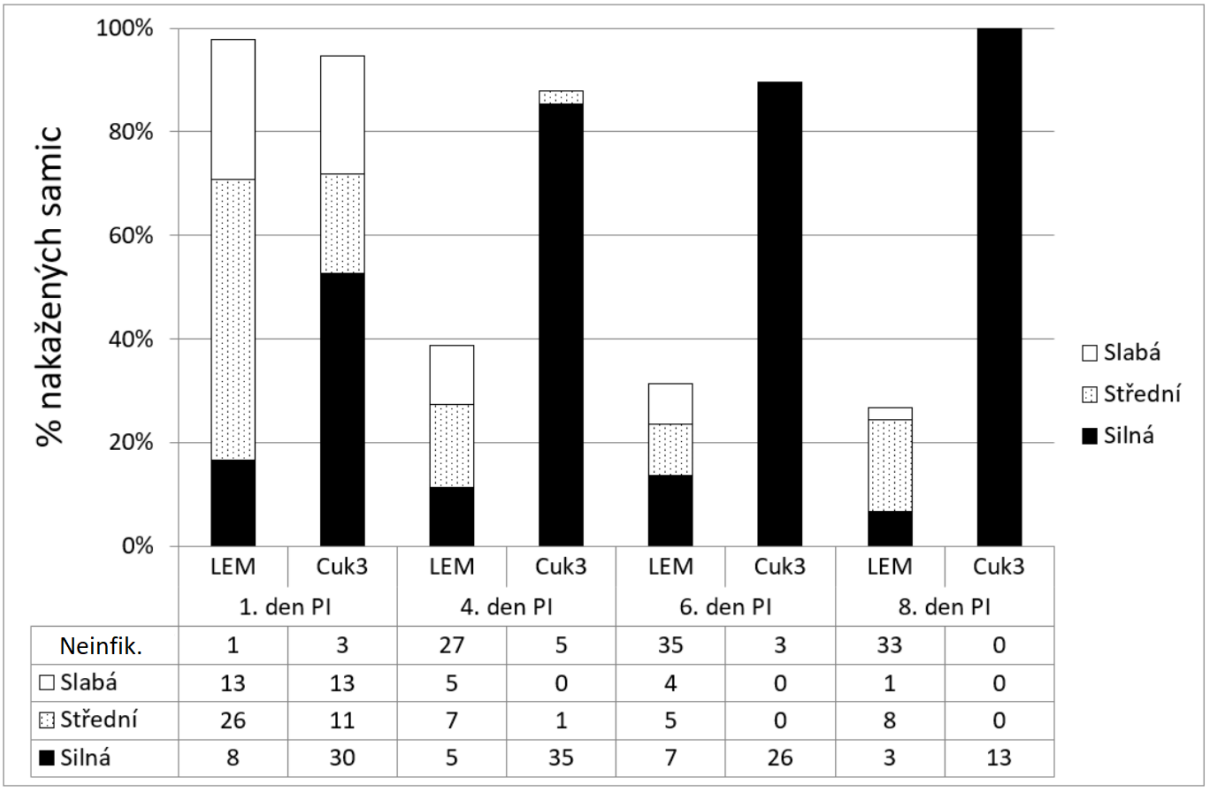
	GH5	LV109	GH5	LV109	GH5	LV109	GH5	LV109
	3. den PI		4. den PI		7. den PI		11. den PI	
Neinfikované	20	9	21	2	46	4	60	7
■ Kolonizovaná SV	0	3	0	10	0	11	0	17
▨ AMG and TMG	0	5	1	1	0	8	0	3
⬚ AMG	2	0	1	2	1	0	0	0
□ E.sp.	8	0	0	0	0	0	0	0

Obr. 10 – Lokalizace infekce nakažených samic *P. duboscqi* v průběhu pokusu. GH5 – *L.* sp. z Ghany, LV109 – *L. major*

4.1.3. Vývoj izolátu L. martiniquensis *z Martiniku v* P. argentipes

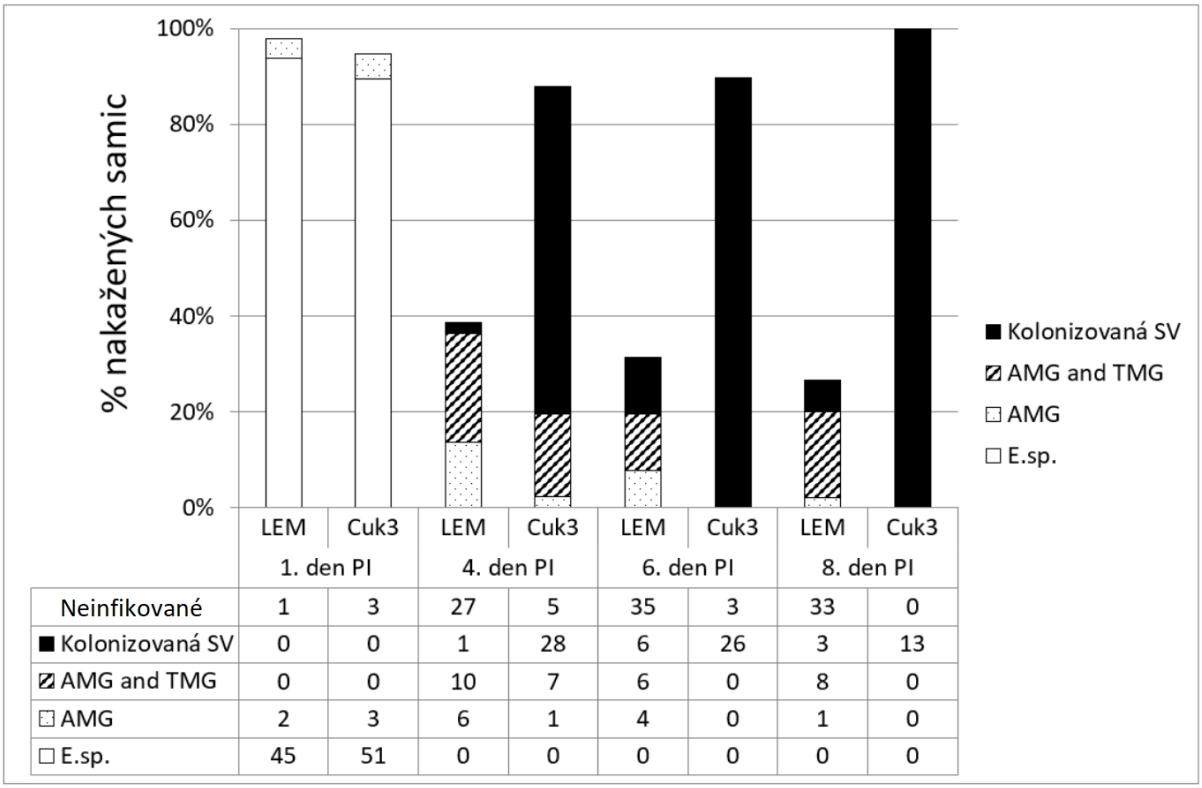
V našich chovech není dostupný žádný z flebotomů vyskytujících se na ostrově Martinik, a tak byl pro pilotní pokusy s *L. martiniquensis* (MHOM/MQ/1992/MAR1) použit *P. argentipes*, který se přirozeně vyskytuje v jihovýchodní Asii, odkud byla *L. martiniquensis* také izolována. Protože jsme testovali i asijský izolát, bylo zároveň díky tomu možné porovnat, jestli se od sebe jednotlivé izoláty liší kromě geografického původu i specifitou k přenašeči.

Leishmania martiniquensis přežila trávení krve a následnou defekaci v 38,6 % (Obr. 11) a už 4. den po infekci bylo možné pozorovat kolonizaci stomodeální valvy (Obr. 12). Osmý den po infekci bylo možné pozorovat silné pozdní infekce s kolonizací stomodeální valvy u 7 % pitvaných samic (Obr. 13). Tyto výsledky naznačují možné zapojení *P. argentipes* v životním cyklu tohoto parazita na lokalitách geografického překryvu. Jelikož je ale procento nakažených samic v pozdní fázi infekce poměrně nízké, pravděpodobně se nejedná o hlavního přenašeče. Kontrolní *L. infantum* tvořila silné infekce u 85-100 % samic pitvaných ve všech časových intervalech po defekaci flebotomů.



	LEM	Cuk3	LEM	Cuk3	LEM	Cuk3	LEM	Cuk3
	1. den PI		4. den PI		6. den PI		8. den PI	
Neinfik.	1	3	27	5	35	3	33	0
☐ Slabá	13	13	5	0	4	0	1	0
⬚ Střední	26	11	7	1	5	0	8	0
■ Silná	8	30	5	35	7	26	3	13

Obr. 11 – Intenzita infekce nakažených samic *P. argentipes* v průběhu pokusu. LEM – *L. martiniquensis,* CUK3 – *L. infantum*



	LEM	Cuk3	LEM	Cuk3	LEM	Cuk3	LEM	Cuk3
	1. den PI		4. den PI		6. den PI		8. den PI	
Neinfikované	1	3	27	5	35	3	33	0
■ Kolonizovaná SV	0	0	1	28	6	26	3	13
▨ AMG and TMG	0	0	10	7	6	0	8	0
⬚ AMG	2	3	6	1	4	0	1	0
☐ E.sp.	45	51	0	0	0	0	0	0

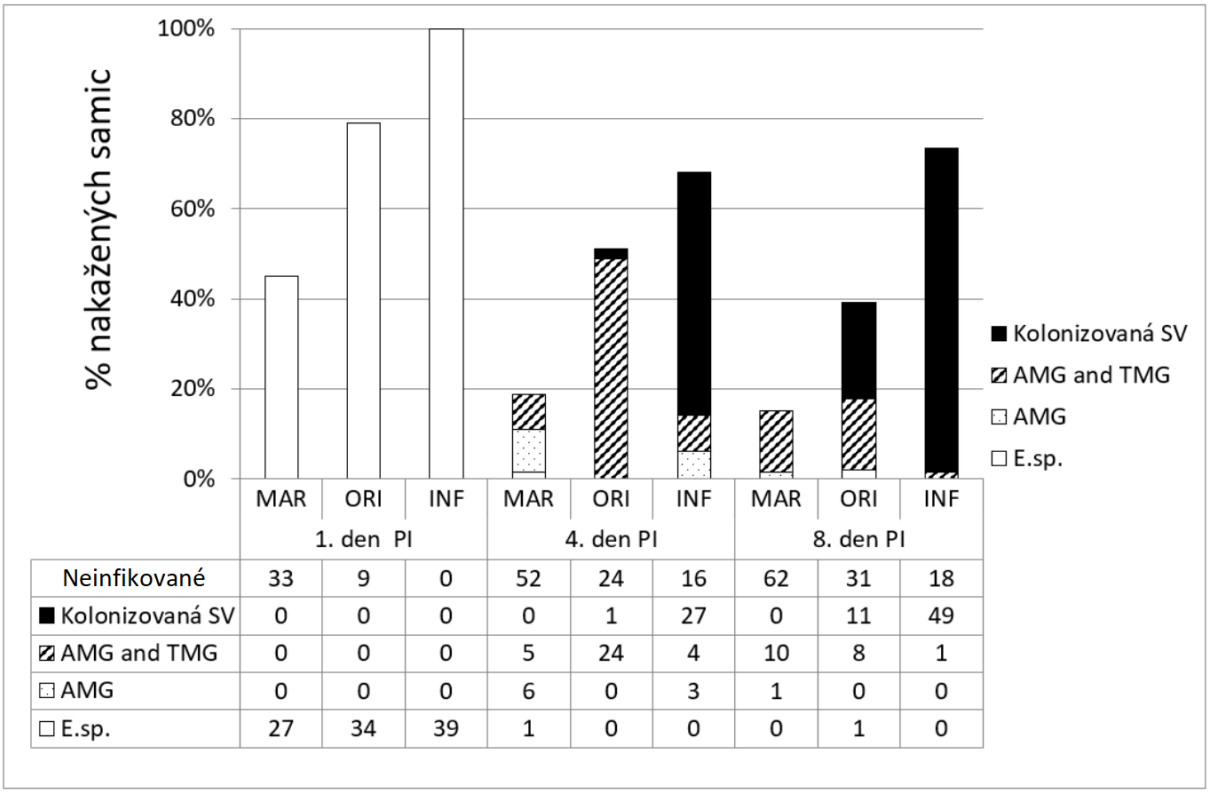
Obr. 12 – Lokalizace infekce nakažených samic *P. argentipes* v průběhu pokusu. LEM - *L. martiniquensis,* CUK3 – *L. infantum*

Obr. 13 – Haptomonády a leptomonády *L. martiniquensis* kolonizující stomodeální valvu *P. argentipes*.

4.1.4. Vývoj asijských izolátů L. martiniquensis *a* L. orientalis *v* P. argentipes

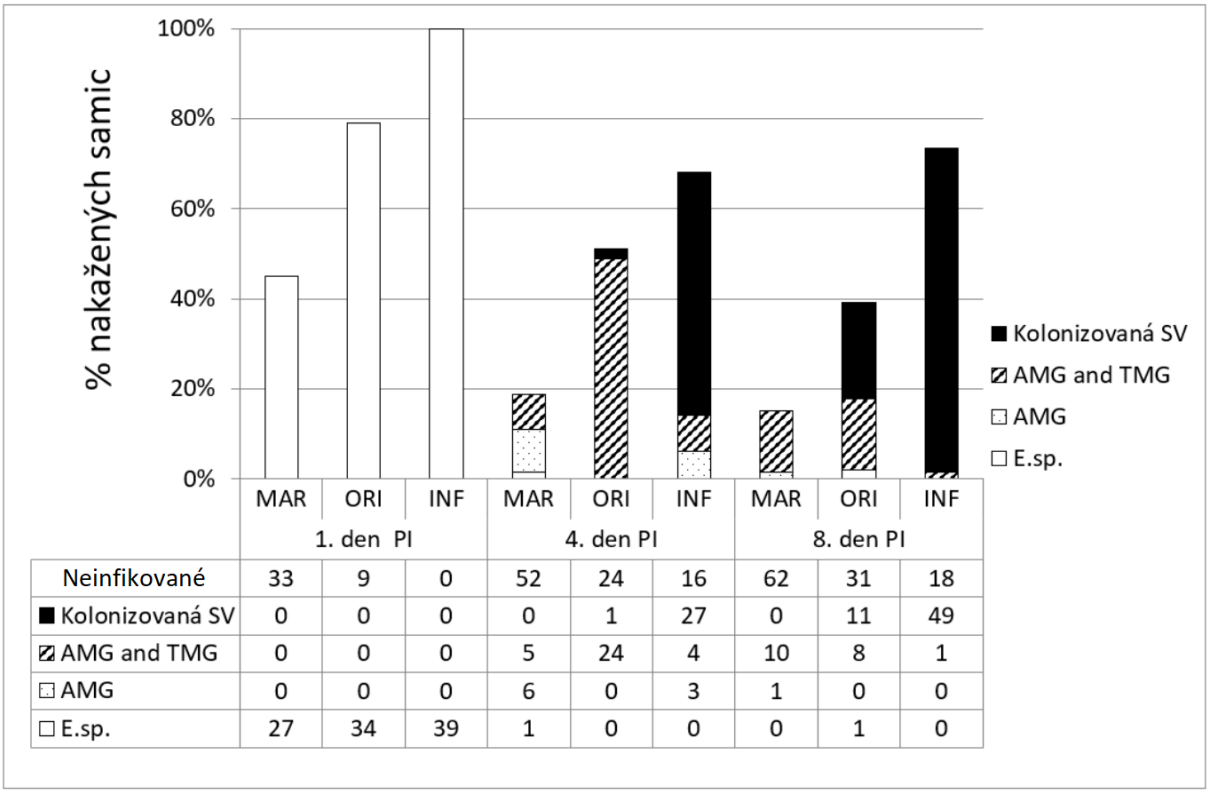
Pro pokusy s thajskými izoláty *L. martiniquensis* (MHOM/TH/2011/CU1) a *L. orientalis* (MHOM/TH/2014/LSCM4) byl vybrán *P. argentipes*, jelikož obývá oblasti výskytu těchto druhů leishmanií a jeho chov je zaveden v naší laboratoři.

Leishmania martiniquensis byla sice v některých případech schopna přežít defekaci, ale posléze už nedocházelo k vývoji infekce a četnost parazitů postupně klesala a 8. den po sání už bylo možné identifikovat jen ojediněle malé množství leishmanií (Obr. 14) pouze na rozhraní TMG a AMG (Obr. 15). Nižší procento infikovaných samic již první den po sání mohlo být v tomto případě způsobeno tvorbou abnormálně velkých rozet, které byly pozorovány při pěstování v kultuře. Pokud by se velké rozety tvořily i v krvi nabídnuté flebotomům k sání, mohlo by to ztížit či vyloučit nasátí parazita flebotomy. *Leishmania orientalis* se dokázala vyvíjet v poměrně vysokém procentu samic a 8. den po infekci vytvořila pozdní silné infekce (Obr. 14) s kolonizací stomodeální valvy (Obr. 16) v 21,5 % pitvaných samic (Obr. 15). Na sklíčkách s roztěry střev byly nalezeny 3 % metacyklických stádií.



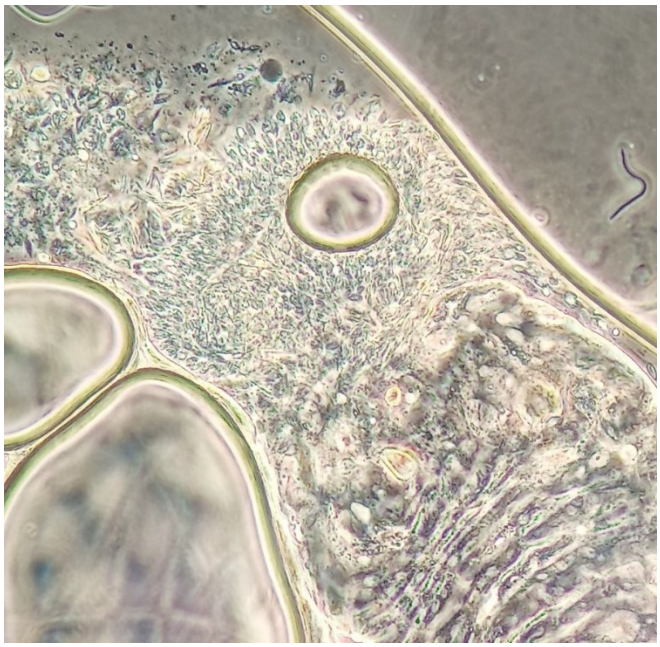
	MAR	ORI	INF	MAR	ORI	INF	MAR	ORI	INF
	1. den PI			4. den PI			8. den PI		
Neinfikované	33	9	0	52	24	16	62	31	18
■ Kolonizovaná SV	0	0	0	0	1	27	0	11	49
▨ AMG and TMG	0	0	0	5	24	4	10	8	1
⬚ AMG	0	0	0	6	0	3	1	0	0
□ E.sp.	27	34	39	1	0	0	0	1	0

Obr. 14 – Intenzita infekce nakažených samic *P. argentipes* v průběhu infekce. MAR – *L. martiniquensis*, ORI – *L. orientalis*, INF – *L. infantum*



	MAR	ORI	INF	MAR	ORI	INF	MAR	ORI	INF
	1. den PI			4. den PI			8. den PI		
Neinfikované	33	9	0	52	24	16	62	31	18
■ Kolonizovaná SV	0	0	0	0	1	27	0	11	49
▨ AMG and TMG	0	0	0	5	24	4	10	8	1
⬚ AMG	0	0	0	6	0	3	1	0	0
□ E.sp.	27	34	39	1	0	0	0	1	0

Obr. 15 – Lokalizace infekce nakažených samic *P. argentipes* v průběhu infekce. MAR – *L. martiniquensis*, ORI – *L. orientalis*, INF – *L. infantum*



Obr. 16 – *L. orientalis* kolonizující stomodeální valvu *P. argentipes*.

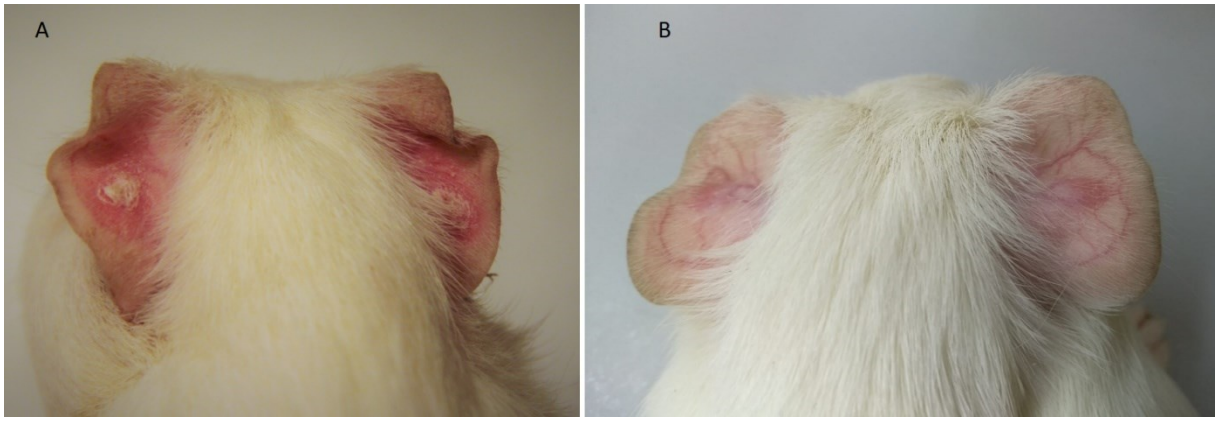
4.2. Experimentální infekce morčat (C. porcellus)

Hlavním cílem pokusů s morčaty bylo zjistit, zda mohou sloužit jako modelový organismus pro studium chování leishmanií podrodu *Mundinia* v savčím hostiteli. Morčata byla nakažena infekční dávkou $1x10^7$ leishmanií z kultury do obou uší. Bylo vytvořeno celkem 6 skupin zvířat po třech jedincích – zvířata nakažená *L. enriettii, L. macropodum*, *L. orientalis, L*. sp. z Ghany a dvěma izoláty *L. martiniquensis* (MAR1 z Martiniku a Cu1R1 z Thajska). Metodika pokusu je popsána v kapitole 3.12.

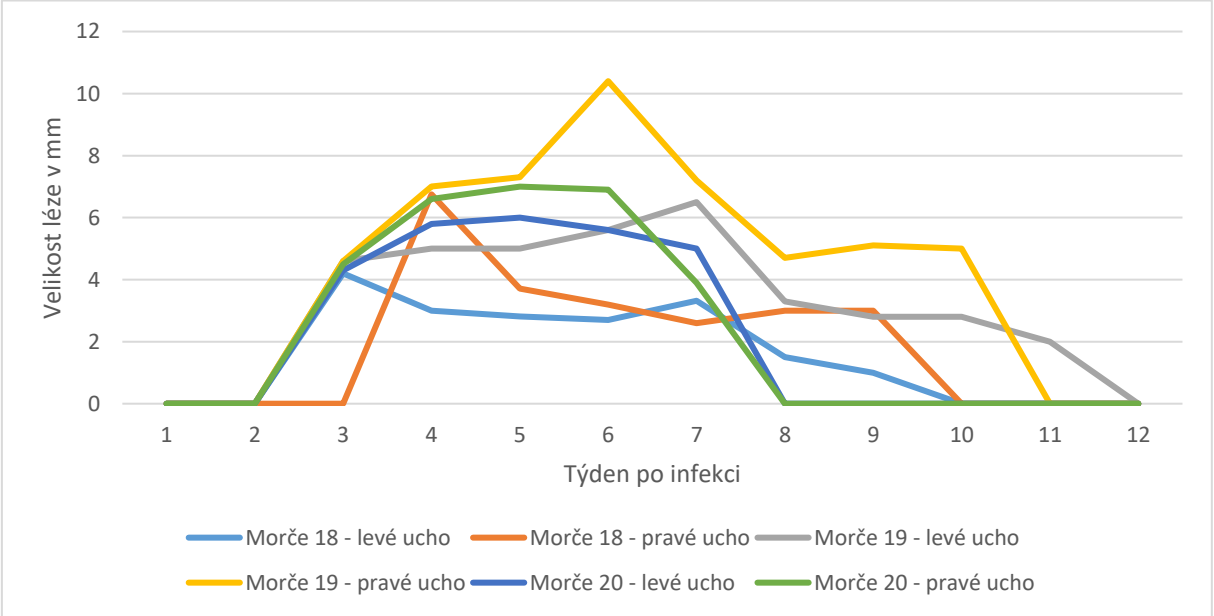
Čtyři morčata nebyla infikována (do ušních boltců jim byl injikován pouze fyziologický roztok) a byla použita jako kontrola pro hodnocení přírůstku váhy a případných externích projevů infekce. Jedno z těchto kontrolních morčat zemřelo na začátku prvního turnusu pokusů, pravděpodobně na nedostatek vitamínů ve stravě, která byla dodavatelem deklarována jako kompletní krmivo pro morčata. Ostatní zvířata prvního turnusu (pokusy s *L. enriettii* a *L. macropodum*) se podařilo zachránit, i když byl u všech pozorovatelný dočasný váhový propad a dočasné částečné ochrnutí zadních končetin. Po aplikaci vhodných doplňků stravy se jejich stav rapidně zlepšoval a zbylá zvířata byla použitelná pro pokus.

U žádné skupiny morčat nebyl zaznamenán rozdíl v příbytku hmotnosti oproti kontrolním zvířatům (*L. macropodum* - P = 0.70*, L. enriettii* - P = 0.12, *L. martiniquensis* MAR1 - P = 0.77, *L. martiniquensis* Cu1R1 - P = 0.12, *L*. sp. z Ghany - P = 0.20, *L. orientalis* - P = 0.11, příloha 1). Zatímco morčata infikovaná *L. macropodum*, *L*. sp. z Ghany a *L. martiniquensis* (Cu1R1) neprojevovala po celou dobu pokusu žádné známky infekce, nebyla infekční pro flebotomy (0/96 poolů po 5 nasátých samicích) a po ukončení pokusu nebyly leishmanie detekovány v žádném ze vzorků odebraných tkání,

morčatům infikovaným *L. enriettii* se vyvinuly během 2. – 3. týdne PI suché léze na uších, které byly postupně vyhojeny (Obr. 17, 18). Morčata byla infekční pro flebotomy v 9/16 případů v 4. týdnu a v 1/16 případů v 8. týdnu. Morčatům infikovaným *L. martiniquensis* (MAR1) se vytvořilo 4. týden PI v místě inokulace zarudnutí na uších, ale nedošlo k vývoji lézí a zarudnutí vymizelo 8. týden PI. Zvířata nebyla infekční pro flebotomy během žádné z provedených xenodiagnostik (0/32 poolů). U morčat nakažených *L. orientalis* došlo 3. – 4. týden PI k zarudnutí místa vpichu, ze kterého se poté vyvíjel nodul, který se většinou otevřel do suché léze obklopené tmavě fialovou kožní skvrnou (Obr.17). Léze se vyhojily do 7. až 8. týdne PI (Tab. 2). Xenodiagnostiky byly negativní (0/32 poolů) a u žádného z odebraných vzorků nebyla detekována přítomnost DNA leishmanií. U kontrolních zvířat nedošlo v místě vpichu k žádné kožní reakci.



Obr. 17 – Externí projevy na uších morčat nakažených *L. enriettii* a *L. orientalis* 5 týdnů PI. A) *L. enriettii* B) *L. orientalis*



Obr. 18 – Graf změny velikosti lézí v průběhu pokusu u *C. porcellus* infikovaných *L. enriettii.*

Tab. 2 – Vnější příznaky infekce v průběhu pokusu u *C. porcellus* infikovaných *L. orientalis.*

Týden PI	Morče 18		Morče 19		Morče 20	
	L-ucho	**P-ucho**	**L-ucho**	**P-ucho**	**L-ucho**	**P-ucho**
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	zarudnutí	zarudnutí
4	zarudnutí	zarudnutí	1 mm	1 mm	nodulus 1 mm	nodulus
5	suchá léze 1 mm	nodulus 2,5 mm	0	suchá léze 2,5 mm	4 mm fialová skvrna, suchá léze	4 mm fialová skvrna, suchá léze
6	suchá léze 1 mm	nodulus 2 mm	0	suchá léze 2,5 mm	fialová skvrna 3 mm	suchá léze 3 mm
7	0	0	0	0	1 mm	suchá léze 1 mm
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0

4.3. Experimentální infekce A. niloticus *a* M. natalensis

Hlavním cílem pokusů s hlodavci *A. niloticus* a *M. natalensis* bylo zjistit, zda mohou tato zvířata sloužit jako rezervoároví hostitelé *L*. sp. z Ghany v endemických oblastech. Protože v subsaharské Africe není znám ani rezervoárový hostitel druhu *Leishmania major*, testovali jsme v rámci širšího projektu, zaměřeného na testování hlodavců z této oblasti, jejich hostitelskou kompetenci také pro tento druh leishmanie.

Kompletní metodika pokusů je shrnuta v kapitolách 3.13. a 3.14.

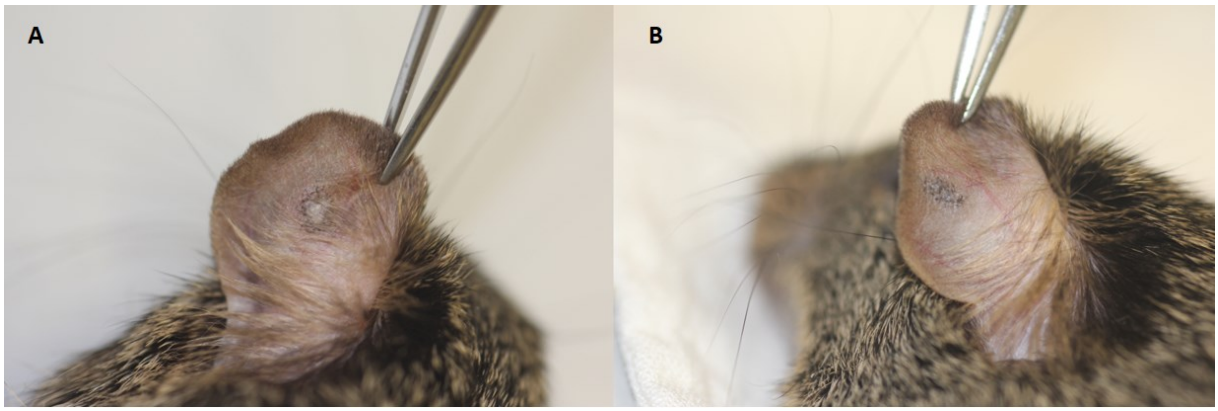
4.3.1. Experimentální infekce A. niloticus

V experimentech s *A. niloticus* byly vytvořeny 4 skupiny (A, B, C, D) po 6 zvířatech. Skupina A byla infikována *L*. sp. z Ghany leishmaniemi z kultury, skupiny B a C byly infikovány *L. major* – jedna skupina (B) leishmaniemi z kultury, druhá (C) leishmaniemi získanými z flebotomů 10 dní po experimentální infekci, tedy s převahou metacyklických stádií schopných přenosu na hostitele a skupinu D tvořilo 6 kontrolních zvířat pro porovnání externích příznaků infekce (hmotnost, vzhled

uší). Infekční dávky a původ leishmanií popisuje také tabulka v kapitole 3.13. Jedno ze zvířat infikovaných *L. major* z kultury zemřelo 5. týden PI a nebylo zahrnuto do studie. Další zvíře z téže skupiny zemřelo 12. týden po infekci, bylo vypitváno a vzorky byly zpracovány pomocí qPCR.

U skupiny infikované *L*. sp. z Ghany nebylo během pokusu možné pozorovat žádné vnější příznaky infekce, hmotnost zvířat se signifikantně nelišila od kontrol po celou dobu pokusu (P = 0.59, viz. příloha 2), xenodiagnostické pokusy byly negativní (0/95 poolů) a po usmrcení zvířat nebylo možné identifikovat přítomnosti leishmanií DNA v žádném z odebraných vzorků.

V obou skupinách infikovaných *L. major* se objevily první kožní symptomy 6. týden PI. Místa inokulace na uších byla hyperpigmentovaná a kůže suchá, loupavá. U některých zvířat postupně došlo ke ztrátě pigmentace v centru těchto suchých lézí, hyperpigmentace zůstala přítomna pouze na jejích okrajích (Obr. 19). Během následujících týdnů docházelo k postupnému zvětšování lézí až do velikosti 3-4 mm v týdnech 10-12. U tří zvířat zůstaly suché léze přítomny až do ukončení experimentu v 25. týdnu. U ostatních zvířat docházelo k postupnému hojení (Tab. 3). Experiment byl ukončen 25 týdnů PI usmrcením zvířat a následnou pitvou, při které byly odebrány vzorky krve, uší, předních a zadních pacek, spádových uzlin uší, sleziny, jater a ocasu. Přítomnost DNA leishmanií byla potvrzena pomocí qPCR zaměřené na kDNA u 4/11 zvířat v uších, předních a zadních packách a ocase (Tab. 4). V ostatních odebraných vzorcích nebyla detekována přítomnost DNA *L. major*. U zvířete analyzovaného 12. týden PI bylo zaznamenáno vyšší množství parazitů než u zvířat analyzovaných až po ukončení experimentu. Tato skutečnost odpovídá výsledkům xenodiagnostik, jelikož *A. niloticus* byli infekční pro flebotomy pouze 5. a 10. týden PI. Infektivita se v těchto týdnech pohybovala mezi 4-10 % (Tab. 5). V pozdnějších fázích infekce již byly xenodiagnostické pokusy negativní (Sádlová et al. 2019).



Obr. 19 – Vzhled uší *A. niloticus* infikovaných *L. major* 12 týdnů PI. A – depigmentace centrální části uší ohraničená hyperpigmentovaným okrajem; B – hyperpigmentace ucha

Tab. 3 – Externí manifestace v místě inokulace infekce *L. major* LV109 v průběhu pokusu s *A. niloticus.* Zvířata B1-B5 byla infikována promastigoty z kultury (skupina B), zvířata C1-C6 byla infikována promastigoty z TMG *P. duboscqi* (skupina C). Černá barva – hyper-pigmentace, šedá barva – depigmentace ve středu léze ohraničená hyper-pigmentovanými okraji. Čísla znázorňují velikost postižené části ucha v mm. * - zvíře zemřelo 12. týden PI.

Zvíře	Týden po infekci												
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	25
B1*			2	3	4	X	X	X	X	X	X	X	X
B2					1	2.5	3.5	3.5	4	4	4	4	4
B3					1	2.5	3.5	3.5	4	4	4	4	4
B4			1	1	1	1	3.5	3.5	4	4	4	3	3
B5				1	1	2.5	3.5	4	4	4	4	3	3
C1					1	2	2	2.5	3	3	3	3	3
C2			1	1	2	4	4	3	3	3	3	3	3
C3				1	1	4	4	2	1	1	1	1	1
C4					3	3	2	2	2	2	1	1	1
C5			1	1	2.5	2.5	3	1.5	1.5	1.5	1	1	1
C6			1	2	2.5	3	3	1.5	1				

Tab. 4 – Lokalizace a intenzita infekce u zvířat s pozitivními vzorky z qPCR. * - zvíře utraceno v 12. týdnu PI. +++ silná infekce; ++ střední infekce; + slabá infekce

Analyzované tkáně/orgány	*C1 (L. major* z flebotomů)	*B1 (L. major* z kultury)*	*B2 (L. major* z kultury)	*B3 (L. major* z kultury)
Levé (Inokulované) ucho	-	+++	++	-
Pravé ucho	-	++	-	++
Přední packy	+	-	-	-
Zadní packy	-	+	-	+
Ocas	-	-	-	+

Tab. 5 – Výsledky xenodiagnostických pokusů s *A. niloticus*

Týden PI.	**Počet testovaných zvířat**	**Počet pitvaných flebotomů**	**Množství nakažených flebotomů**
Infekce leishmaniemi z flebotomů (skupina C)			
5	2	30	3 (10 %)
10	2	33	2 (6,1 %)
15	2	63	0
20	2	31	0
25	6	108	0
Infekce leishmaniemi z kultury (skupina B)			
5	3	49	2 (4,1 %)
10	2	18	1 (5,6 %)
15	3	66	0
20	2	31	0
25	4	47	0
Celkem		**476**	**8 (1,7%)**

4.3.2. Experimentální infekce M. natalensis

Pro pokusy s *M. natalensis* byly vytvořeny 3 skupiny po 6 jedincích – jedna infikovaná *L. major* (LV109) a jedna infikovaná *L*. sp. z Ghany infekční dávkou $1x10^7$ do levého ucha. Procento metacyklických stádií v původní kultuře bylo 32,7 % pro *L*. sp. z Ghany a 5,5 % pro *L. major*. Třetí skupina byla kontrolní, neinfikovaná a sloužila k případným porovnáním přírůstků zvířat.

Během pokusu došlo u skupiny nakažené *L*. sp. z Ghany k signifikantně pomalejšímu přírůstku hmotnosti oproti kontrolám (P = 0.01) zatímco zvířata infikovaná *L. major* se váhově nelišila od kontrol (P = 0.98, příloha 3). U žádné ze skupin nedošlo k vývinu lézí nebo jiných abnormalit na uších nebo jinde na těle. Zvířata nebyla infekční při žádné z xenodiagnostik provedených v týdnech 5, 10, 15 a 20 PI (0/202 flebotomů u *L. major* a 0/87 poolů u *L*. sp. z Ghany). Dvě zvířata ze skupiny infikované *L. major* a jedno zvíře ze skupiny infikované *L*. sp. z Ghana zemřely v průběhu pokusu a nebyly jim odebrány vzorky tkání. Jedno zvíře ze skupiny *L*. sp. z Ghany bylo z důvodu špatného zdravotního stavu usmrceno v 16. týdnu PI a byly mu odebrány vzorky tkání. Žádný z těchto vzorků nebyl pozitivní na přítomnost DNA leishmanií při PCR.

V 20. týdnu PI byla zvířata utracena, vypitvána a vzorky zpracovány a byla provedena qPCR. Ve čtyřech z osmi zvířat byla detekována DNA leishmanií, tedy u 3/4 zvířat infikovaných *L. major* a 1/4 zvířat infikovaných *L*. sp. z Ghany. Vzorky izolované z krve, spádových mízních uzlin na pravé straně hlavy, zadních pacek, sleziny a jater byly negativní na přítomnost DNA leishmanií. Slabé infekce byly zachyceny ve vzorcích inokulovaného (levého) ucha a jeho spádové uzliny, pravého ucha, předních pacek a ocasu. Distribuce leishmanií v těle zvířat, ve kterých byla nalezena DNA parazitů je shrnuta v tabulce 6.

Tab. 6 – Distribuce leishmanií v těle zvířat, ve kterých byla objevena DNA parazita. +++ silná infekce; ++ střední infekce; + slabá infekce

Analyzované tkáně/orgány	*L. major* 1	*L. major* 2	*L. major* 3	*L*. sp. z Ghany
Levá uzlina	-	-	+	+
Levé ucho (inokulované)	+	+	+	+
Pravé ucho	-	-	-	+
Přední packy	-	-	+	+
Ocas	-	-	+	-

5. Diskuze

Leishmanie podrodu *Mundinia* jsou nejnověji popsaným podrodem leishmanií (Espinosa et al. 2016). O biologii pěti druhů, které tvoří tuto zajímavou skupinu, je dosud známo velice málo. Mají unikátní fylogenetické postavení (jsou bazální skupinou na větvi k ostatním leishmaniím), (Barrat et al. 2017) a geografické rozšíření (jednotliví zástupci byli izolování z různých oblastí celého světa), (Muniz, Medina 1948; Dedet et al. 1995; Reuss et al. 2012, Müller et al. 2009; Lobsinger et al. 2010; Rose et al. 2004; Bualert et al. 2012). Mnoho otázek také vyvolává identita jejich přenašečů (Dougall et al. 2011) a rezervoárových hostitelů, a právě identifikace těchto druhů by mohla vést k lepšímu pochopení a případné kontrole onemocnění. Zodpovězení nebo alespoň drobné přispění k objasnění některých z těchto otázek bylo hlavní motivací k vypracování a sepsání této práce.

Jedním ze základních pilířů laboratorního parazitologického výzkumu je dostupnost vhodného modelového zvířete pro testování průběhu a projevů infekce. Vzhledem k tomu, že jediná zvířata, ze kterých byl dříve zástupce podrodu *Mundinia* izolován, jsou domácí morčata (*Cavia porcellus),* (Muniz, Medina, 1948) a klokani (Rose et al. 2004), byla volba právě morčat prvním logickým krokem. *Leishmania enriettii* byla opakovaně izolována z domácích morčat z různých lokalit v Brazílii (Muniz, Medina 1948; Luz et at. 1967 v Machado et al. 1994). Jednotlivé nálezy ovšem od sebe dělí 20 let, což je samo o sobě velmi zajímavé, protože morče je hojně chovaným domácím mazlíčkem a k nákaze *L. enriettii* je podle laboratorních studií velmi náchylné (Paraense et al. 1953, Bryceson et al. 1970). Dlouhý časový interval mezi jednotlivými případy je zvláštní a vyvolává minimálně 3 otázky: 1) Je infikovaných morčat ve skutečnosti hodně, jen se nedostanou k vyšetření a izolaci parazita? 2) Nebo se infikovaní přenašeči a RH vyskytují jen velmi výjimečně v blízkosti lidských sídel? 3) V případě, že jsou to striktně pralesní druhy, jsou do koloběhu parazita dočasně zapojeny i další druhy přenašeče či sekundárního RH, jejichž přirozený habitat se více překrývá s lidskými sídly, ve kterých se domácí morčata vyskytují?

V našich pokusech se potvrdila náchylnost morčat k *L. enriettii.* U všech nakažených zvířat došlo k vývoji typických lézí na uších a xenodiagnostické pokusy byly pozitivní ve 4. a 8. týdnu PI. Procento infikovaných flebotomů bylo přitom výrazně vyšší ve 4. týdnu PI než v týdnu 8 PI. Takový pokles infektivity v průběhu pokusu pozorovali také Seblova et al. (2015). Po ukončení experimentu nebyla v tělech morčat identifikovatelná DNA parazitů. Spontánní hojení lézí morčat popisuje také Paranaiba et al. (2015). V jejich experimentech, kdy morčata byla intradermálně inokulována dávkou 10^5 promastigotů, se lišila virulence dvou použitých kmenů; jeden z nich (Cobaia) vůbec léze netvořil, zatímco léze tvořené kmenem L88 se zvětšovaly mezi týdnem 4-6 PI, poté se jejich velikost zmenšovala až do vyhojení. Autoři také popisují tvorbu větších lézí u skupiny infikované s přidáním

slinných žláz flebotomů. Naopak ve studii Thomaz-Soccol et al. (1996) došlo při infekci morčat amastigoty kmene, který se dle izoenzymové analýzy shodoval s kmenem L88, k výraznějším projevům onemocnění, jež zahrnovalo diseminaci leishmanií po těle morčat a následnou smrt všech tří testovaných jedinců. Autoři bohužel ve studii neuvádějí infekční dávku, kterou byla zvířata nakažena, a tak není možné porovnat, zda k rozdílnému průběhu infekce došlo vlivem rozdílné infekční dávky nebo virulencí čerstvého izolátu. Diseminaci v těle morčat pozorovali během své studie i Paraense (1953), kteří infikovali zvířata homogenátem lézí s amastigoty a Seblova et al. (2015), kde inokulum tvořilo 10^7promastigotů. Tyto výsledky ukazují jednak na rozdílnou patogenitu a schopnost diseminace jednotlivých izolátů, jednak ilustrují vliv uspořádání experimentu na průběh infekcí (velikost a charakter infekčního inokula, použití slinných žláz flebotomů). Vývoj *L. enriettii* byl kromě morčat dříve testován také v křečcích *Mesocriterus auratus,* u kterých dochází pouze k vývinu dočasných lézí lokalizovaných v místě inokulace a k jejich následnému vyhojení (Belehu et al. 1976; Seblova et al. 2015). Ovšem při pokusech o infekce divokých morčat, makaků a psů (Muniz, Medina 1948) nebylo dosaženo pozitivních výsledků. Morčata jsou tedy zatím nejlepším modelem pro výzkum *L. enriettii*.

Naše pokusy bohužel ukázaly, že ostatní leishmanie z podrodu *Mundinia* se v morčatech zdárně vyvíjet nedokážou. Na morčatech infikovaných *L. macropodum*, *L*. sp z Ghany a *L. martiniquensis* (Cu1R1) nebyly během 13týdenních pokusů rozpoznatelné žádné symptomy probíhající infekce, zvířata nebyla infekční pro flebotomy a pitvy a následná analýza vybraných částí těla pomocí PCR neodhalily přítomnost DNA leishmanií v žádném z pokusných zvířat. V případě infekcí martinickým kmenem *L. martiniquensis* (MAR1) a druhem *L. orientalis* sice došlo k signifikantním změnám na povrchu uší, ale pouze krátkodobě a zvířata nebyla ani v této fázi infekce infekční pro flebotomy. V žádném z odebraných vzorků tkáně po ukončení experimentu navíc nebyla identifikovatelná DNA leishmanií. Zdá se tedy, že leishmanie jsou schopny pouze dočasného udržení v uchu morčete, ale nejsou schopny překonat imunitní bariéry, které jim brání v další diseminaci.

Pro lepší pochopení chování leishmanií podrodu *Mundinia* tak bude nutné vybrat jiný zvířecí modelový organismus. Jako první variantou se jeví BALB/c myši používané pro výzkum mnoha jiných druhů leishmanií. Infekce tohoto imunodeficientního myšího kmene by mohly přinést odpovědi na mnohé dílčí otázky, byť nenahradí model přirozeného hostitele a nemůžou věrně simulovat skutečnou situaci v přírodě. Nabízí se i pokus o infekce křečků *Mesocricetus auratus*, ve kterých se alespoň dočasně vyvíjí *L. enriettii* (Belehu et al. 1976, Seblova et al. 2015) či méně obvyklých modelů, jako jsou křečíci džungarští *(Phodopus sungorus)*, křečíci čínští *(Cricetulus griseus)* či pestrušky písečné *(Lagurus lagurus)*. Tato zvířata jsou mimořádně vnímavá k širšímu spektru leishmanií, jak ukazují dosud nepublikované výsledky naší skupiny.

Dalším bodem této práce byly experimentální infekce divokých subsaharských hlodavců *Arvicanthis niloticus* a *Mastomys natalensis* dvěma druhy leishmanií – *L. major* (senegalský kmen LV109) a *L*. sp. z Ghany. Tyto dva druhy hlodavců by pravděpodobně mohly být zapojeny do přirozeného cyklu *L. major* v subsaharské Africe, protože v nich tento parazit byl opakovaně v terénu detekován (shrnuto v Ashford 1996, Ashford 2000, Desjeux 1991) a jsou to hojné druhy žijící v endemických oblastech ve velkých populačních hustotách, často velmi blízko lidských sídel. V nedávno publikované laboratorní práci, která obsahuje mimo jiné i část výsledků této DP (infekce *A. niloticus*), je možnost zapojení hlodavců rodů *Mastomys* a *Arvicanthis* do přenosu *L. major* potvrzena. Byli schopni udržet v sobě *L. major* po mnoho týdnů a infikovat flebotomy bez viditelných zdravotních komplikací. Vyšší procento nakažených jedinců, rozsáhlejší diseminace parazitů v těle hostitelů a delší perioda infektivity pro flebotomy u *M. natalensis* než u rodu *Arvicanthis* pak svědčí o významnější roli *M. natalensis* v přenosu tohoto parazita, ovšem *Arvicanthis* by mohl sloužit jako potenciální rezervoár v období, kdy populační hustoty *M. natalensis* poklesnou (Sádlová et al. 2019). Infekce *M. natalensis* prováděné v této DP nepřinesly pozitivní výsledky xenodiagnostických pokusů, a přestože byly leishmanie přítomné u 3/4 testovaných zvířat, počty detekovaných parazitů *post mortem* pomocí qPCR byly překvapivě nízké. Přičítáme to nižší kvalitě inokula, které obsahovalo jen 5 % metacyklických forem. Již dříve bylo prokázáno, že podíl metacyklických stádií je, společně s dalšími faktory, jako například místo inokulace nebo infekční dávka, jedním z kruciálních bodů pro následný vývoj infekce (Stamper et al. 2011).

Pro tuto diplomovou práci byly podstatnou částí experimentální infekce zvířat *L*. sp. z Ghany. Bohužel se ukázalo, že v *A. niloticus* ani *M. natalensis* se, i přes vysoké procento metacyklických stádií v inokulu (42 % u *A. niloticus* a 32,7 % u *M. natalensis*) tento druh leishmanie dobře nevyvíjí – zvířata nebyla infekční pro flebotomy a parazit přežil do konce pokusu jen v jedné *M. natalensis*, a to ve velmi malém počtu, evidentně nedostatečném pro nákazu přenašeče. Tudíž je velmi nepravděpodobné, že by tyto druhy hlodavců byly zapojené do přirozeného cyklu *L*. sp. z Ghany. Ovšem pro definitivní závěr by bylo třeba zopakovat experiment na větším počtu zvířat. Pro odhalení rezervoárového druhu zvířete bude tedy nutné provést detailní analýzu tamější fauny a z ní vybrat vhodného kandidáta pro další testování. Nelze vyloučit ani hypotetickou možnost, že tento parazit koluje v Ghaně jako antroponóza bez účasti jiných rezervoárových hostitelů. Frekvence lidských případů může být podceněna záměnami s *L. major* a *L. tropica* (Kweku et al. 2011).

Zatím jediný zástupce podrodu *Mundinia*, australská *L. macropodum*, má téměř definitivně potvrzené přenašeče – tiplíky rodu *Forcipomyia (Lasiohelea)* (Dougall et al. 2011). Protože také při experimentálních infekcích tiplíků *C. sonorensis* druhem *L. enriettii* dochází v laboratorních podmínkách k vývinu pozdních infekcí s kolonizací stomodeální valvy (Seblova at al. 2015), je třeba

uvažovat zapojení tiplíků i v případě jiných leishmanií tohoto podrodu. Samozřejmě jsou ale prvními kandidáty na hledané přenašeče těchto leishmanií různé druhy flebotomů.

Z více než 800 známých druhů flebotomů jich je jen necelá stovka zapojena do přenosu leishmanií (shrnuto v Maroli et al. 2013). Některé druhy přitom podporují vývoj různých druhů leishmanií (tzv. permisivní vektoři), jiné pouze vývoj určitého druhu leishmanie (specifičtí vektoři (shrnuto v Dostálová, Volf 2012). Faktory kontrolující kompetenci přenašeče působí hlavně v časné fázi vývoje leishmanií ve flebotomech. Ke ztrátě infekcí dochází zpravidla při defekaci nestrávených zbytků potravy, a to, pokud nejsou leishmanie schopny čelit jednomu ze tří faktorů: (1) nedokážou přežít v nehostinném prostředí mezenteronu během trávení krve, (2) nedokážou uniknout z PM či (3) přichytit se ke střevnímu epitelu během defekace (shrnuto v Dostálová, Volf 2012). Úspěšná infekce po defekaci flebotoma je pak charakterizována anteriorní lokalizací parazitů s kolonizací stomodeální valvy flebotoma a přítomností metacyklických infekčních stádií. Nález DNA leishmanií ve flebotomech při terénním výzkumu, bez údaje o lokalizaci infekce a stupni strávení krve, tedy sám o sobě rozhodně neznamená, že daný druh flebotoma je opravdu přenašečem. Při hledání přenašeče by měly laboratorní experimenty doplňovat terénní výzkum a poskytnout cennou informaci, zda druhy flebotomů, vyskytující se sympatricky s daným druhem leishmanie, jsou schopny podporovat kompletně jejich vývoj. V této práci jsme chtěli přispět k identifikaci přenašečů *L. (Mundinia)* testováním jejich schopnosti vývoje v těch druzích flebotomů, které máme k dispozici v koloniích chovaných v naší laboratoři.

Pro testování vývoje *L. enriettii* byla vybrána *Lu. migonei,* permisivní vektor se schopností přenášet *L. infantum* (Guimarães et al. 2016). *Leishmania enriettii* není schopna se v tomto druhu flebotoma vyvíjet a je vydefekována spolu se zbytky krve. Stejný průběh lze pozorovat i při infekcích *Lu. longipalpis*, jak již popsali Seblova et al. (2015). Dalším kandidátem tak zůstává například *Lu. monticola,* která byla nachytána poblíž míst infekcí morčat v 70. letech 20. století (Luz et al. 1967 v Machado et al. 1994), tento druh ovšem není v laboratořích chován.

Lutzomyia migonei byla zároveň použita i pro experimentální infekce *L. macropodum.* Hlavním cílem zde bylo zjistit, zda se může australský druh leishmanie kromě tiplíků vyvíjet i v permisivním vektoru z rodu *Lutzomyia*. Stejně jako v případě *L. enriettii* byly leishmanie vydefekovány společně s krví. Jelikož v endemické oblasti byly identifikovány tyto leishmanie pouze v tiplících a infekce tohoto permisivního vektora i předešlé infekce *Lu. longipalpis* vedly k negativním výsledkům (Seblova et al. 2015), zdá se, že by tento druh mohl být adaptován striktně na tiplíky.

Kandidátem na přenašeče lidské kutánní leishmaniózy v Ghaně způsobené dosud nepojmenovaným druhem *Leishmania* sp. byl *P. duboscqi,* který je v subsaharské oblasti přenašečem

L. major. Ani v tomto případě ale leishmanie nepřežily defekaci samic a netvořily zralé infekce, a tak i jediná africká *L. (Mundinia)* zatím čeká na objev svého přenašeče. Ve studii provedené Nzelu et al. 2014 byla DNA leishmanií identifikována v samicích druhů *Sergentomyia hamoni* a *S. ingrami* a tudíž nelze s jistotou vyloučit ani zapojení těchto druhů do přenosu. Panuje sice všeobecně rozšířené přesvědčení, že rod *Sergentomyia* přenáší pouze leishmanie plazů, a do přenosu savčích druhů není zapojen (shrnuto v Maia a Depaquit, 2016), ovšem vzhledem k tomu, že minimálně některé druhy *L. (Mundinia)* mohou být přenášeny tiplíky (Dougall et al. 2011; Seblova et al. 2015), nelze vyloučit ani možné zapojení těchto netradičních přenašečů. Jak již bylo ale několikrát zmíněno, samotný nález DNA není dostatečným důkazem pro toto tvrzení, neboť se může jednat o samice s nestrávenou krví a není tedy jisté, zda by u nich došlo vývoji infekce schopné přenosu na dalšího hostitele.

Posledním druhem flebotoma, který byl v této práci použit byl *P. argentipes,* hlavní přenašeč *L. donovani* v Indii. Tento druh obývá celou Indii a jihovýchodní Asii, včetně Thajska (Apiwathnasorn et al. 1993) a byl zachycen také na Sri-Lance, kde je přenašečem kmene *L. donovani*, který způsobuje kutánní formu onemocnění (Ozbel et al. 2011). Byl vybrán pro testování vývoje 2 kmenů *L. martiniquensis* (MAR1 a Cu1R1) a *L. orientalis*.

Zatímco asijský kmen *L. martiniquensis* Cu1R1 netvořil v *P. argentipes* pozdní infekce spojené s kolonizací stomodeální valvy, martinický kmen MAR1 byl kolonizace SV schopen už 4. den po sání. Osmý den byly pozdní infekce s kolonizací SV pozorovatelné u 7 % pitvaných samic. Jak již ale bylo zmíněno, růst izolátu Cu1R1 v kultuře je charakterizován tvorbou velkých rozet, což mohlo negativně ovlivnit schopnost flebotomů nasát dostatečné množství leishmanií. Fakt, že u kmene z Martiniku dochází k vývoji pozdních infekcí, slouží jako motivace k výzkumu dalších druhů flebotomů v endemických lokalitách. Na Martiniku se endemicky vyskytují pouze *Lu. atroclavata* a *Lu. cayennensis* (Desbois et al. 2014), takže se nabízí zapojení jednoho z těchto druhů. V Thajsku byla *Leishmania martiniquensis* izolována i z nachytaných samic rodu *Sergentomyia*, proto nelze zcela vyloučit ani roli těchto flebotomů (Kanjanopas et al. 2013) s výhradami zmíněnými v pasáži o *L*. sp. z Ghany a *S. hamoni* a S*. ingrami*. Nelze samozřejmě pominout možnou roli tiplíků při přenosu *L. martiniquensis*.

Posledním testovaným asijským izolátem byl druh *L. orientalis*. Dle výsledků se zdá, že zde je zapojení *P. argentipes* do životního cyklu této leishmanie velmi pravděpodobné, neboť při infekcích došlo ke kolonizaci SV u 21,5 % pitvaných samic a byla zaznamenána i tvorba metacyklických forem parazita. To je dosud první úspěšný doklad vývoje některého z druhů podrodu *Mundinia* ve flebotomech. Stejně jako u ostatních druhů podrodu ale nelze vyloučit ani zapojení tiplíků.

Původně měly být v této práci zahrnuty i výsledky z celogenomového sekvenování 3 druhů *L. (Mundinia)* – *L. enriettii, L. macropodum* a *L. martiniquensis* (MAR1) a následné porovnání jejich genomů s ostatními druhy leishmanií. Tato část projektu ale byla závislá na spolupráci s laboratoří V. Yurchenka. Protože jsem se nemohl účastnit všech fází tohoto výzkumu, nebyl můj podíl na získaných výsledcích dostatečný na to, abych tuto pasáž do své diplomové práce s čistým svědomím zařadil. Z výsledků bioinformatické analýzy nicméně vyplývá, že genom leishmanií podrodu *Mundinia* je menší než u druhů z podrodů *Leishmania* a *Viannia* (cca 30 vs. 32 Mbp), což pozitivně koreluje s faktem, že v uzlu větvení podrodu *Mundinia* bylo zaznamenáno pouze 13 získaných a 234 ztracených ortologních skupin. Všech 13 získaných a 148/234 ztracených skupin kóduje proteiny s neznámou funkcí (hypothetical proteins). Anotace sekvencí ztracených ortologních skupin naznačuje změny ve struktuře povrchu leishmanií, mimo jiné, v genech zodpovědných za interakci s přenašečem a hostitelem. Tato práce je nyní zaslána k posouzení do časopisu BMC Genomics (Butenko et al., nepublikováno). Na tuto analýzu genomu bych chtěl navázat během dizertační práce a analyzovat vybrané geny pomocí metody CRISPR-Cas9. Zjištění skutečné role jednotlivých genů při vývoji v přenašeči a hostiteli by mohlo v budoucnu přinést lepší pochopení biologie nejen těchto záhadných leishmanií, ale i ostatních druhů tohoto rodu.

6. Shrnutí

Experimentální infekce flebotomů:

- ***Lutzomyia migonei* nepodporuje vývoj *L. enriettii* ani *L. macropodum***.
- ***Phlebotomus duboscqi* nepodporuje vývoj *L.* sp. z Ghany.**
- ***Phlebotomus argentipes* částečně podporuje vývoj *L. martiniquensis,*** neboť v 7 % pitvaných samic nakažených martinickým izolátem došlo k vývinu pozdních infekcí s kolonizací stomodeální valvy. Není tedy vyloučeno jeho zapojení v koloběhu *L. martiniquensis*, ale pravděpodobně se nejedná o důležitého/hlavního přenašeče, a to i vzhledem k tomu, že thajský izolát zralé infekce s kolonizací stomodeální valvy ve *P. argentipes* netvořil.
- ***P. argentipes* podporuje vývoj *L. orientalis***, neboť u 21,5 % pitvaných samic byla detekována pozdní infekce s kolonizací stomodeální valvy a byly zde přítomné i metacyklické formy parazita. Tento druh flebotoma má tedy kapacitu přenášet tento druh leishmanie, což je první pozitivní výsledek při hledání přenašečů leishmanií z podrodu *Mundinia* mezi flebotomy. Tento poznatek významně přispívá k identifikaci přenašeče *L. orientalis*, ovšem bude nutno doplnit další důkazy z terénu a případně provést přenosové experimenty. Zapojení *P. argentipes* do přenosu nevylučuje přítomnost dalšího vektora.

V navazující disertační práci bych chtěl vývoj jednotlivých druhů leishmanií podrodu Mundinia *testovat také v tiplících. V rámci programu INFRAVEC2 máme zajištěny dodávky* Culicoides sonorensis *z Pirbright Institute (UK) a první pilotní experiment přinesl velmi slibné výsledky.*

Experimentální infekce morčat:

- Bylo zjištěno, že **domácí morče *(Cavia porcellus)* není dobrým laboratorním modelem pro studium leishmanií podrodu *Mundinia*** s výjimkou *L. enriettii.* Dočasné vnější projevy onemocnění byly pozorovány také u zvířat infikovaných *L. martiniquensis* (MAR1) a *L. orientalis*, ale pouze zvířata nakažená *L. enriettii* byla infekční pro flebotomy při xenodiagnostikách. V žádném z infikovaných zvířat nebyla po ukončení experimentu identifikována DNA leishmanií.

Další volbou při hledání laboratorního modelu budou myši BALB/c a křečík džungarský (Phodopus sungorus).

Experimentální infekce *Arvicanthis niloticus* a *Mastomys natalensis:*

- Výsledky pokusů **nepodporují hypotézu, že by tyto druhy hlodavců mohly sloužit jako rezervoároví hostitelé ghanského druhu podrodu *Mundinia***. Žádné ze zvířat nebylo v průběhu pokusu infekční pro flebotomy a po ukončení pokusu nebyla identifikována DNA leishmanií v žádném *A. niloticus.* V jedné *M. natalensis* byla DNA detekována v levém inokulovaném uchu a jeho spádové uzlině, v předních packách a v pravém uchu, ovšem všude jen v nízkém počtu.

- Naproti tomu, ***Arvicanthis niloticus*** **je pravděpodobně zapojen v cyklu *L. major* v subsaharské Africe**, neboť u inokulovaných zvířat došlo k vývinu lézí a zvířata byla infekční pro flebotomy v týdnech 5 a 10 po infekci.

  U obou druhů těchto subsaharských hlodavců testujeme v rámci projektu GAČR také jejich hostitelskou kompetenci pro L. major *a* L. donovani*. Výsledky pokusů s* L. major *byly již publikovány.*

  Celogenomová sekvenace a srovnání genomu *L. (Mundinia)* s ostatními podrody rodu *Leishmania:*

  Tato část není oproti původnímu záměru zařazena do diplomové práce, protože jsem se nemohl účastnit všech důležitých fází tohoto výzkumu, který probíhal ve spolupráci s laboratoří V. Yurchenka. Práce je zaslána k posouzení do časopisu BMC Genomics (Butenko et al., nepublikováno).

  Na výsledky celogenomového sekvenování tří druhů L. *(*Mundinia*) a následného porovnání jejich genomů s ostatními druhy leishmanií chci navázat ve své dizertační práci a analyzovat vybrané geny pomocí metody CRISPR-Cas9 a experimentálních infekcí přenašečů a hostitelů mutantními a kontrolními liniemi.*

7. Reference

Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., ... & WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PloS one, 7(5), e35671.

Apiwathnasorn, C., Sucharit, S., Surathin, K., & Deesin, T. (1993). Anthropophilic and zoophilic phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) from Thailand. Journal of the American Mosquito Control Association, 9(2), 135-137.

Ashford, R. W. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clinics in Dermatology, 14(5), 523-532.

Ashford, R. W. (1997). The leishmaniases as model zoonoses. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 91, 693-701.

Ashford, R. W. (2000). The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. International Journal for Parasitology, 30(12-13), 1269-1281.

Barratt, J., Kaufer, A., Peters, B., Craig, D., Lawrence, A., Roberts, T., ... & Ellis, J. (2017). Isolation of novel trypanosomatid, *Zelonia australiensis* sp. nov. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) provides support for a Gondwanan origin of dixenous parasitism in the Leishmaniinae. PLoS Neglected Tropical Diseases, 11(1), e0005215.

Belehu, A., & Turk, J. L. (1976). Establishment of cutaneous *Leishmania enriettii* infection in hamsters. Infection and immunity, 13(4), 1235-1241.

Boisseau-Garsaud, A. M., Cales-Quist, D., Desbois, N., Jouannelle, J., Jouannelle, A., Pratlong, F., & Dedet, J. P. (2000). A new case of cutaneous infection by a presumed monoxenous trypanosomatid in the island of Martinique (French West Indies). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 94(1), 51-52.

Bryceson, A. D. M., Bray, R. S., Wolstencroft, R. A., & Dumonde, D. C. (1970). Immunity in cutaneous leishmaniasis of the guinea-pig. Clinical and Experimental Immunology, 7(3), 301.

Bualert, L., Charungkiattikul, W., Thongsuksai, P., Mungthin, M., Siripattanapipong, S., Khositnithikul, R., ... & Leelayoova, S. (2012). Autochthonous disseminated dermal and visceral leishmaniasis in an AIDS patient, southern Thailand, caused by *Leishmania siamensis*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 86(5), 821-824.

Butenko, A., Kostygov, A.Y., Sádlová, J., Kleschenko, Y., Bečvář, T., Podešvová, L. … & Volf, P. Comparative genomics of *Leishmania (Mundinia).* (nepublikováno)

Colombo, F. A., Odorizzi, R. M., Laurenti, M. D., Galati, E. A., Canavez, F., & Pereira-Chioccola, V. L. (2011). Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. Parasitology Research, 109(2), 267-274.

Coutinho, M. T. Z., & Linardi, P. M. (2007). Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals?. Veterinary Parasitology, 147(3-4), 320-325.

Coutinho, M. T. Z., Bueno, L. L., Sterzik, A., Fujiwara, R. T., Botelho, J. R., De Maria, M., ... & Linardi, P. M. (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. Veterinary Parasitology, 128(1-2), 149-155.

Dantas-Torres, F., Lorusso, V., Testini, G., de Paiva-Cavalcanti, M., Figueredo, L. A., Stanneck, D., ... & Otranto, D. (2010a). Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. Parasitology Research, 106(4), 857-860.

Dantas-Torres, F., Martins, T. F., de Paiva-Cavalcanti, M., Figueredo, L. A., Lima, B. S., & Brandão-Filho, S. P. (2010b). Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. Experimental Parasitology, 125(2), 184-185.

Dedet, J. P., Roche, B., Pratlong, F., Cales-Quist, D., Jouannelle, J., Benichou, J. C., & Huerre, M. (1995). Diffuse cutaneous infection caused by a presumed monoxenous trypanosomatid in a patient infected with HIV. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 89(6), 644-646.

Desbois, N., Pratlong, F., Quist, D., & Dedet, J. P. (2014). *Leishmania (Leishmania) martiniquensis* n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), description of the parasite responsible for cutaneous leishmaniasis in Martinique Island (French West Indies). Parasite, 21.

Desjeux, P., & World Health Organization. (1991). Information on the epidemiology and control of the leishmaniases by country or territory (No. WHO/LEISH/91.30. Unpublished). World Health Organization.

Dostálová, A., & Volf, P. (2012). *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. Parasites & Vectors, 5(1), 276.

Dougall, A. M., Alexander, B., Holt, D. C., Harris, T., Sultan, A. H., Bates, P. A., ... & Walton, S. F. (2011). Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. International Journal for Parasitology, 41(5), 571-579.

Dougall, A., Shilton, C., Choy, J. L., Alexander, B., & Walton, S. (2009). New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in Northern Australian macropods. Epidemiology & Infection, 137(10), 1516-1520.

Espinosa, O. A., Serrano, M. G., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. G., & Shaw, J. J. (2016). An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. Parasitology, 145(4), 430-442.

Ferreira, M. G. P. A., Fattori, K. R., Souza, F., & Lima, V. M. F. (2009). Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. Veterinary Parasitology, 165(1-2), 150-154.

Giraud, E., Martin, O., Yakob, L., & Rogers, M. (2019). Quantifying *Leishmania* Metacyclic Promastigotes from Individual Sandfly Bites Reveals the Efficiency of Vector Transmission. Communications Biology, 2(1), 84.

Granjon, L., Ducroz, J.-F., 2013. Genus *Arvicanthis* Grass rats. In: Happold, D.C.D. (Ed.), Mammals of Africa: Volume III. Bloomsbury Publishing, London, pp. 379–380

Guimarães, V. C. F. V., Pruzinova, K., Sadlova, J., Volfova, V., Myskova, J., Brandão Filho, S. P., & Volf, P. (2016). *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. Parasites & Vectors, 9(1), 159.

Hargaden, M., & Singer, L. (2012). Guinea pigs – Anatomy, Physiology and Behavior In: Suckow, M. A., Stevens, K. A., & Wilson, R. P. (Eds.). (2012). The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents. Academic Press 2012, London, pp. 575–602.

Haydon, D. T., Cleaveland, S., Taylor, L. H., & Laurenson, M. K. (2002). Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. Emerging Infectious Diseases, 8(12), 1468-1473.

Hommel, M., Jaffe, C. L., Travi, B., & Milon, G. (1995). Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 89(sup1), 55-73.

Christophers, S. R., Shortt, H. E., & Barraud, P. J. (1925). The development of the parasite of Indian kala-azar in the sandfly *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti. Indian Journal of Medical Research, 12(3).

Chusri, S., Hortiwakul, T., Silpapojakul, K., & Siriyasatien, P. (2012). Consecutive cutaneous and visceral leishmaniasis manifestations involving a novel *Leishmania* species in two HIV patients in Thailand. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 87(1), 76-80.

Jariyapan, N., Daroontum, T., Jaiwong, K., Chanmol, W., Intakhan, N., Sor-Suwan, S., ... & Bates, P. A. (2018). *Leishmania (Mundinia) orientalis* n. sp. (Trypanosomatidae), a parasite from Thailand responsible for localised cutaneous leishmaniasis. Parasites & Vectors, 11(1), 351.

Kanjanopas, K., Siripattanapipong, S., Ninsaeng, U., Hitakarun, A., Jitkaew, S., Kaewtaphaya, P., ... & Leelayoova, S. (2013). *Sergentomyia (Neophlebotomus) gemmea*, a potential vector of *Leishmania siamensis* in southern Thailand. BMC Infectious Diseases, 13(1), 333.

Kwakye-Nuako, G., Mosore, M. T., Duplessis, C., Bates, M. D., Puplampu, N., Mensah-Attipoe, I., ... & Ayeh-Kumi, P. F. (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(11), 679-684.

Kweku, M. A., Odoom, S., Puplampu, N., Desewu, K., Nuako, G. K., Gyan, B., ... & Boakye, D. (2011). An outbreak of suspected cutaneous leishmaniasis in Ghana: lessons learnt and preparation for future outbreaks. Global Health Action, 4(1), 5527.

Leirs, H., 2013. Genus *Mastomys* multimammate mice. In: Happold, D.C.D. (Ed.), Mammals of Africa: Volume III. Bloomsbury Publishing, London, pp. 460–471.

Liautaud, B., Vignier, N., Miossec, C., Plumelle, Y., Kone, M., Delta, D., ... & Desbois, N. (2015). First case of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania martiniquensis*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 92(2), 317-319.

Lobsiger, L., Müller, N., Schweizer, T., Frey, C. F., Wiederkehr, D., Zumkehr, B., & Gottstein, B. (2010). An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. Veterinary parasitology, 169(3-4), 408-414.

Loría-Cervera, E. N., & Andrade-Narváez, F. J. (2014). Animal models for the study of leishmaniasis immunology. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 56(1), 1-11.

Machado, M. I., Milder, R. V., Pacheco, R. S., Silva, M., Braga, R. R., & Lainson, R. (1994). Naturally acquired infections with *Leishmania enriettii* Muniz and Medina 1948 in guinea-pigs from São Paulo, Brazil. Parasitology, 109(2), 135-138.

Maia, C., & Depaquit, J. (2016). Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*?. Parasite, 23.

Manomat, J., Leelayoova, S., Bualert, L., Tan-ariya, P., Siripattanapipong, S., Mungthin, M., ... & Piyaraj, P. (2017). Prevalence and risk factors associated with *Leishmania* infection in Trang Province, southern Thailand. PLoS Neglected Tropical Diseases, 11(11), e0006095.

Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., & Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. Medical and Veterinary Entomology, 27(2), 123-147.

McKenzie, K. K. (1984). Study of the Transmission of Canine Leishmaniasis by the Tick, *Rhipicephalus Sanguineus* (Latreille) and an Ultrastructural Comparison of the Promastigotes (Doctoral dissertation, Oklahoma State University).

Melby, P. C., Tryon, V. V., Chandrasekar, B., & Freeman, G. L. (1998). Cloning of Syrian hamster *(Mesocricetus auratus)* cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. Infection and Immunity, 66(5), 2135-2142.

Moreno, J., & Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends in Parasitology, 18(9), 399-405.

Müller, N., Welle, M., Lobsiger, L., Stoffel, M. H., Boghenbor, K. K., Hilbe, M., ... & von Bomhard, W. (2009). Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. Veterinary Parasitology, 166(3-4), 346-351.

Muniz, J., & Medina, H. (1948). Cutaneous Leishmaniasis in the Guinea-pig. Hospital (Rio de Janeiro, Brazil), 33(1), 7-25.

Myskova, J., Votypka, J., & Volf, P. (2008). *Leishmania* in sand flies: comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. Journal of Medical Entomology, 45(1), 133-138.

Noyes, H., Pratlong, F., Chance, M., Ellis, J., Lanotte, G., & Dedet, J. P. (2002). A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique (French West Indies) is the most divergent member of the genus *Leishmania* ss. Parasitology, 124(1), 17-24.

Nzelu, C. O., Kato, H., Puplampu, N., Desewu, K., Odoom, S., Wilson, M. D., ... & Boakye, D. A. (2014). First detection of *Leishmania tropica* DNA and *Trypanosoma* species in *Sergentomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) from an outbreak area of cutaneous leishmaniasis in Ghana. PLoS Neglected Tropical Diseases, 8(2), e2630.

Ozbel, Y., Sanjoba, C., Alten, B., Asada, M., Depaquit, J., Matsumoto, Y., ... & Matsumoto, Y. (2011). Distribution and ecological aspects of sand fly (Diptera: Psychodidae) species in Sri Lanka. Journal of Vector Ecology, 36, S77-S86.

Paraense, W. L. (1953). The spread of *Leishmania enriettii* through the body of the Guinea pig. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 47(6), 556-60.

Paranaíba, L. F., de Assis, R. R., Nogueira, P. M., Torrecilhas, A. C., Campos, J. H., de Oliveira Silveira, A. C., ... & Melo, M. N. (2015). *Leishmania enriettii*: biochemical characterisation of lipophosphoglycans (LPGs) and glycoinositolphospholipids (GIPLs) and infectivity to *Cavia porcellus*. Parasites & Vectors, 8(1), 31.

Paranaiba, L. F., Pinheiro, L. J., Macedo, D. H., Menezes-Neto, A., Torrecilhas, A. C., Tafuri, W. L., & Soares, R. P. (2018). An overview on *Leishmania (Mundinia) enriettii*: biology, immunopathology, LRV and extracellular vesicles during the host–parasite interaction. Parasitology, 145(10), 1265-1273.

Paula, C. D. R., Friedman, H., & Sampaio, R. N. R. (2005). Use of *Cavia porcellus* (guinea pigs) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 11(4), 605-609.

Pothirat, T., Tantiworawit, A., Chaiwarith, R., Jariyapan, N., Wannasan, A., Siriyasatien, P., ... & Bates, P. A. (2014). First isolation of *Leishmania* from Northern Thailand: case report, identification as *Leishmania martiniquensis* and phylogenetic position within the *Leishmania enriettii* complex. PLoS Neglected Tropical Diseases, 8(12), e3339.

Pritt, S. (2012). Guinea pigs – Taxonomy and History. In: Suckow, M. A., Stevens, K. A., & Wilson, R. P. (Eds.). (2012). The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents. Academic Press 2012, London, pp. 563–574.

Quinnell, R. J., & Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Parasitology, 136(14), 1915-1934.

Ramalho-Ortigao, M., Saraiva, E. M., & Traub-Csekö, Y. M. (2010). Sand fly-*Leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy. The Open Parasitology Journal, 4, 195.

Ready, P. D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. Annual Review of Entomology, 58.

Reuss, S. M., Dunbar, M. D., Mays, M. B. C., Owen, J. L., Mallicote, M. F., Archer, L. L., & Wellehan Jr, J. F. (2012). Autochthonous *Leishmania siamensis* in horse, Florida, USA. Emerging Infectious Diseases, 18(9), 1545.

Robledo, S. M., Carrillo, L. M., Daza, A., Restrepo, A. M., Muñoz, D. L., Tobón, J., ... & Upegui, Y. A. (2012). Cutaneous leishmaniasis in the dorsal skin of hamsters: a useful model for the screening of antileishmanial drugs. JoVE (Journal of Visualized Experiments), (62), e3533.

Rogers, M. E., Hajmová, M., Joshi, M. B., Sadlova, J., Dwyer, D. M., Volf, P., & Bates, P. A. (2008). *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. Cellular Microbiology, 10(6), 1363-1372.

Rogers, M. E., Chance, M. L., & Bates, P. A. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Parasitology, 124(5), 495-507.

Rose, K., Curtis, J., Baldwin, T., Mathis, A., Kumar, B., Sakthianandeswaren, A., ... & Handman, E. (2004). Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. International Journal for Parasitology, 34(6), 655-664.

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(12), 1765-1779.

Sadlova, J., Vojtkova, B., Hrncirova, K., Lestinova, T., Spitzova, T., Becvar, T., ... & Volf, P. (2019). Host competence of African rodents *Arvicanthis neumanni, A. niloticus* and *Mastomys natalensis* for *Leishmania major*. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 8, 118-126.

Seblova, V., Sadlova, J., Vojtkova, B., Votypka, J., Carpenter, S., Bates, P. A., & Volf, P. (2015). The biting midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) is capable of developing late stage infections of *Leishmania enriettii*. PLoS Neglected Tropical Diseases, 9(9), e0004060.

Serafim, T. D., Coutinho-Abreu, I. V., Oliveira, F., Meneses, C., Kamhawi, S., & Valenzuela, J. G. (2018). Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. Nature Microbiology, 3(5), 548.

Sharma, U., & Singh, S. (2009). Immunobiology of leishmaniasis. Indian Journal of Experimental Biology, 47(6), 412-423.

Silva, E. S., Gontijo, C. M., & Melo, M. N. (2005). Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. Trends in Parasitology, 21(12), 550-552.

Siripattanapipong, S., Leelayoova, S., Ninsaeng, U., & Mungthin, M. (2018). Detection of DNA of *Leishmania siamensis* in *Sergentomyia (Neophlebotomus) iyengari* (Diptera: Psychodidae) and molecular identification of blood meals of sand flies in an affected area, Southern Thailand. Journal of Medical Entomology, 55(5), 1277-1283.

Stamper, L. W., Patrick, R. L., Fay, M. P., Lawyer, P. G., Elnaiem, D. E. A., Secundino, N., ... & Peters, N. C. (2011). Infection parameters in the sand fly vector that predict transmission of *Leishmania major.* PLoS Neglected Tropical Diseases, 5(8), e1288.

Stierhof, Y. D., Bates, P. A., Jacobson, R. L., Rogers, M. E., Schlein, Y., Handman, E., & Ilg, T. (1999). Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. European Journal of Cell Biology, 78(10), 675-689.

Sukmee, T., Siripattanapipong, S., Mungthin, M., Worapong, J., Rangsin, R., Samung, Y., ... & Rujirojindakul, P. (2008). A suspected new species of *Leishmania*, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. International Journal for Parasitology, 38(6), 617-622.

Supsrisunjai, C., Kootiratrakarn, T., Puangpet, P., Bunnag, T., Chaowalit, P., & Wessagowit, V. (2017). Disseminated autochthonous dermal leishmaniasis caused by *Leishmania siamensis* (PCM2 Trang) in a patient from central Thailand infected with human immunodeficiency virus. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 96(5), 1160-1163.

Thomaz-Soccol, V., Pratlong, F., Langue, R., Castro, E., Luz, E., & Dedet, J. P. (1996). New isolation of *Leishmania enriettii* Muniz and Medina, 1948 in Paraná state, Brazil, 50 years after the first description, and isoenzymatic polymorphism of the *L. enriettii* taxon. Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 90(5), 491-495.

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

WHO 2010; www.who.int/leishmaniasis/en

Sekundární citace:

Luz, E., Giovannoni, M., & Borba, A. M. (1967). Infecção de *Lutzomyia monticola* por *Leishmania enriettii*. *An Fac Med Univ Fed Paraná*, *9*, 121-8. In **Machado, M. I., Milder, R. V., Pacheco, R. S., Silva, M., Braga, R. R., & Lainson, R.** (1994). Naturally acquired infections with *Leishmania enriettii* Muniz and Medina 1948 in guinea-pigs from São Paulo, Brazil. Parasitology, 109(2), 135-138.

8. Přílohy

Příloha 1: Hmotnost (g) experimentálně nakažených morčat v průběhu pokusu.

Kmen leishmanie	**MAR1**	**MAR1**	**MAR1**	***L*. sp. z Ghany**	***L*. sp. z Ghany**	***L*. sp. z Ghany**	**kontrola**
Označení zvířete	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
T1 PI	464	479	480	467	483	459	459
T2 PI	497	503	512	482	505	462	526
T3 PI	548	545	560	505	585	500	569
T4 PI	571	586	594	545	614	510	591
T5PI	625	595	614	593	634	540	628
T6 PI	693	651	639	633	685	598	662
T7 PI	713	653	661	667	697	624	692
T8 PI	787	754	755	749	751	696	780
T9 PI	780	807	779	743	778	734	808
T10 PI	880	829	811	802	789	744	854
T11 PI	888	856	823	820	753	774	874
T12 PI	919	876	863	833	727	797	887
Kmen leishmanie	**Cu1R1**	**Cu1R1**	**Cu1R1**	**LSCM4**	**LSCM4**	**LSCM4**	**kontrola**
Označení zvířete	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**
T1 PI	463	442	443	444	508	463	461
T2 PI	490	484	562	535	540	553	477
T3 PI	542	549	569	538	590	557	513
T4 PI	621	586	595	592	624	600	556
T5PI	628	630	656	630	674	621	602
T6 PI	651	647	661	667	704	646	647
T7 PI	691	692	697	690	738	670	676
T8 PI	711	710	710	763	780	683	753
T9 PI	710	700	802	775	805	684	769
T10 PI	741	730	728	793	832	710	795
T11 PI	776	756	765	808	851	735	795
T12 PI	792	768	772	826	853	750	836
Kmen leishmanie	**LV756**	**LV756**	**LV756**	**LV90**	**LV90**	**LV90**	**kontrola**
Označení zvířete	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**
T1 PI	569	634	610	492	540	548	566
T2 PI	500	567	558	434	490	438	526
T3 PI	526	575	558	492	502	470	524
T4 PI	557	669	637	540	470	528	576
T5PI	560	721	664	560	558	551	571
T6 PI	573	729	667	574	533	560	605
T7 PI	616	768	719	631	562	655	633
T8 PI	615	792	763	670	590	653	659
T9 PI	582	852	799	700	571	614	637
T10 PI	633	892	840	730	647	722	705
T11 PI	655	920	853	746	699	766	736
T12 PI	680	938	887	763	731	805	760

Příloha 2: Hmotnost (g) experimentálné nakažených *A. niloticus* v průběhu pokusu.

***L*. sp. z Ghany**							**kontrola**	**kontrola**	**kontrola**	**kontrola**
Označení zvířete	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
T1 PI	184	245	230	204	170	184	123	136	210	201
T2 PI	186	239	206	211	188	196	127	140	208	204
T4 PI	194	243	214	212	191	197	120	135	221	208
T6 PI	187	244	209	213	200	202	116	133	233	209
T8 PI	191	264	223	214	210	223	122	142	242	209
T10 PI	190	249	219	236	215	222	107	147	254	208
T12 PI	189	243	214	241	217	225	0	147	261	208
T14 PI	206	248	221	231	223	218	0	140	262	215
T16 PI	219	251	228	230	230	221	0	144	278	217
T18 PI	231	267	243	250	246	235	0	156	296	237
T20 PI	229	260	243	242	230	225	0	148	285	234
T22 PI	230	269	248	256	235	222	0	127	301	238
T24 PI	229	274	258	268	245	203	0	124	319	249

LV 109 z kultury							**kontrola**	**kontrola**	**kontrola**	**kontrola**
Označení zvířete	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
T1 PI	240	233	257	134	161	164	199	302	199	280
T2 PI	229	238	258	122	156	153	191	300	190	279
T4 PI	217	239	262	123	163	155	199	302	183	283
T6 PI	184	241	257	112	164	150	192	298	183	283
T8 PI	164	245	257	0	171	153	194	305	189	290
T10 PI	156	250	261	0	177	148	198	306	190	298
T12 PI	0	239	259	0	173	150	190	309	189	294
T14 PI	0	243	247	0	179	151	193	316	199	292
T16 PI	0	249	247	0	183	153	202	322	210	300
T18 PI	0	259	261	0	197	163	221	335	223	313
T20 PI	0	246	252	0	200	156	208	329	205	295
T22 PI	0	248	257	0	201	163	207	332	214	292
T24 PI	0	254	262	0	207	175	206	343	218	290

LV109 z TMG							kontrola	kontrola	kontrola	kontrola
Označení zvířete	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T1 PI	120	98	123	284	243	199	165	145	232	224
T2 PI	112	103	125	286	250	199	121	145	234	229
T4 PI	117	126	144	293	252	209	124	164	251	240
T6 PI	116	132	153	295	257	218	123	170	255	241
T8 PI	114	131	156	289	259	218	125	154	255	244
T10 PI	115	133	173	288	259	215	126	158	257	244
T12 PI	113	147	182	300	267	224	128	158	265	253
T14 PI	115	152	191	307	268	224	127	165	263	262
T16 PI	127	150	195	322	272	220	135	163	253	269
T18 PI	122	142	202	320	270	211	128	170	249	265
T20 PI	130	134	209	336	282	199	127	180	261	278
T22 PI	137	126	224	348	280	192	127	185	268	289
T24 PI	142	136	226	359	284	190	127	192	254	293

Příloha 3: Hmotnost (g) experimentálně nakažených *M. natalensis* v průběhu pokusu.

Skupina 1 *L.* sp. z Ghany						
Označení zvířete	1	2	3	4	5	6
T1 PI	68	61	53	69	69	51
T2 PI	62	61	55	69	71	52
T3 PI	70	60	57	74	70	53
T4 PI	79	62	59	72	69	55
T5 PI	74	60	60	72	69	54
T6 PI	72	58	60	72	72	51
T7 PI	80	64	63	74	73	53
T8 PI	77	63	63	75	73	55
T9 PI	78	65	64	73	78	61
T10 PI	80	66	63	73	80	67
T11 PI	82	65	62	78	75	71
T12 PI	80	63	64	77	0	73
T13 PI	85	64	63	79	0	74
T14 PI	86	65	64	79	0	74
T15 PI	83	66	65	80	0	74
T16 PI	78	0	66	77	0	72
T17 PI	87	0	67	79	0	69
T18 PI	85	0	68	77	0	64
T19 PI	87	0	68	77	0	64

Skupina 2 *L. major* **LV109**						
Označení zvířete	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
T1 PI	88	95	74	79	90	62
T2 PI	84	91	76	77	79	62
T3 PI	85	95	80	77	82	68
T4 PI	92	106	86	80	87	80
T5 PI	92	108	84	79	89	78
T6 PI	93	113	72	77	92	70
T7 PI	95	122	75	73	93	74
T8 PI	95	118	98	83	97	76
T9 PI	94	123	96	80	95	80
T10 PI	102	126	100	85	100	84
T11 PI	103	125	108	88	94	80
T12 PI	104	128	108	84	105	73
T13 PI	106	128	112	84	115	68
T14 PI	101	122	109	78	104	0
T15 PI	109	126	108	0	112	0
T16 PI	104	127	107	0	114	0
T17 PI	107	130	110	0	112	0
T18 PI	102	133	105	0	105	0
T19 PI	102	128	109	0	105	0

Skupina 3 **Bez infekce**						
Označení zvířete	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
T1 PI	55	54	71	58	76	60
T2 PI	56	56	68	56	75	62
T3 PI	58	57	71	59	82	66
T4 PI	64	66	79	59	78	68
T5 PI	63	66	76	58	76	68
T6 PI	61	65	60	57	72	69
T7 PI	64	68	63	60	73	70
T8 PI	70	68	82	62	86	74
T9 PI	69	68	87	63	88	75
T10 PI	70	72	91	71	99	85
T11 PI	68	73	94	74	104	87
T12 PI	67	75	93	71	98	86
T13 PI	76	80	100	83	103	94
T14 PI	74	76	100	78	106	94
T15 PI	73	73	99	76	101	88
T16 PI	73	70	97	74	99	90
T17 PI	75	72	95	74	103	87
T18 PI	72	70	92	71	99	85
T19 PI	72	69	96	71	98	88