

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta



RNDr. Jovana Sádlová, Ph. D.

Prvoci rodu *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae):
interakce s přenašeči a hostiteli.

Habilitační práce

Praha, 2019

Poděkování

Ráda bych poděkovala své rodině, přátelům a všem spolupracovníkům, kteří se podíleli na výzkumu popsaném v této práci. Za počáteční nasměrování na vědeckou dráhu vděčím především prof. Danielu Fryntovi a prof. Petru Volfovi. Daniel má jedinečnou zásluhu na tom, že jsem coby středoškolák našla odvahu dát se na cestu biologa a vědeckého pracovníka a Petr mě zase přivedl k parazitologii a studiu leishmanií a jejich přenašečů. Nelze tady jmenovat všechny starší kolegy a učitele, kteří mi potom byli vzorem, všechny mé vrstevníky, kteří vždycky tvořili inspirativní a přátelské prostředí při našem bádání a mé studenty, kteří svou energií a optimismem dokázali dodat pokusům i diskusím nad výsledky správnou tvůrčí atmosféru. Děkuji vám všem, bez vás by to nešlo a jen s vámi mohu být moje práce radostí!

Výzkum našeho týmu by byl ovšem nemyslitelný bez spolupráce se zahraničními partnery, už proto, že objektem našeho zájmu je parazit hojný v tropických a subtropických oblastech, v naší zemi ale téměř neznámý a opomíjený. Ráda bych jmenovala nejvýznamnější zahraniční partnery, se kterými jsme měla čest spolupracovat. V první řadě je to prof. Robert Killick-Kendrick (1929-2011), jeden ze zakladatelů našeho oboru, který společně se svou ženou Mirelle osobně založil i některé z kolonií, které dosud v Praze fungují, a zasvětil na počátku 90. let prof. Volfa do tajů péče o flebotomy. Velice si cením spolupráce s prof. Alonem Warburgem z Hebrew University v Jeruzalému, který spolupracuje dlouhodobě s naší laboratoří, vedl náš společný výzkum VL v Etiopii a pobýval několikrát i v Praze. Díky prof. Paulu Batesovi z Lancaster University máme možnost pracovat s unikátními izoláty leishmanií, s prof. Michaellem Milesem a Dr. Matthewem Yeo z London School of Hygiene and Tropical Medicine zase spolupracujeme na výzkumu sexuálního rozmnožování leishmanií, s prof. Debbie Smith a Dr. Johaneselem Doelem z University of York na výzkumu proteinů HASP a SHERP leishmanií, s Prof. Evou Gluenz a Dr. Tomem Beneke z Oxford University na výzkumu proteinů bičíku leishmanií, s Dr. Aysheshimem Kassahunem z Addis Ababa University jsme prováděli terénní výzkum v Etiopii. Jsem vděčná těmto i mnoha dalším skvělým zahraničním kolegům, s nimiž můžeme osobně úzce spolupracovat, což tvoří základ tvůrčí a přátelské atmosféry mezi „flebotomaři“ a „leishmaniaky“ napříč laboratořemi a zeměmi světa.

OBSAH

Seznam zkratk.....	1
1. ÚVOD DO STUDOVANÉ PROBLEMATIKY	
1. 1. TÉMA A ČLENĚNÍ PRÁCE.....	2
1. 2. LEISHMANIE A LEISHMANIÓZY.....	3
1. 3. VÝVOJ LEISHMANIÍ VE FLEBOTOMECH A FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KOMPETENCI PŘENAŠEČŮ.....	4
1. 4. SEXUÁLNÍ ROZMNOŽOVÁNÍ LEISHMANIÍ.....	5
1. 5. ALTERNATIVNÍ VEKTOŘI LEISHMANIÍ.....	6
1. 6. REZERVOÁROVÍ HOSTITELÉ LEISHMANIÍ.....	8
1. 7. MODELOVÉ DRUHY ZVÍŘAT PRO VÝZKUM LEISHMANIÓZ A EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE.....	9
2. VLASTNÍ VÝZKUM A JEHO DALŠÍ SMĚŘOVÁNÍ	
2. 1. VÝVOJ LEISHMANIÍ VE FLEBOTOMECH A FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KOMPETENCI PŘENAŠEČŮ.....	12
2. 2. SEXUÁLNÍ ROZMNOŽOVÁNÍ LEISHMANIÍ.....	15
2. 3. ALTERNATIVNÍ VEKTOŘI LEISHMANIÍ.....	16
2. 4. REZERVOÁROVÍ HOSTITELÉ LEISHMANIÍ A EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE HOSTITELŮ.....	17
3. SEZNAM CITACÍ.....	19
4. SOUBOR VYBRANÝCH PUBLIKACÍ.....	27
4. 1. Volf P., Hajmová M., Sádlová J. & Votýpka J. (2004): Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. International Journal for Parasitology 34: 1221—1227.....	28
4. 2. Rogers M.E., Hajmová M., Joshi M.B., Sádlová J. , Dwyer D.M., Volf P. & Bates P.A. (2008): <i>Leishmania</i> chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. Cellular Microbiology 10(6): 1363-1372.....	36
4. 3. Sádlová J. & Volf P. (2009): Peritrophic matrix of <i>Phlebotomus duboscqi</i> and its kinetics during <i>Leishmania major</i> development. Cell and Tissue Research 337: 313- 325.....	47
4. 4. Sadlova J. , Dvorak V., Seblova V., Warburg A., Votypka J. & Volf P. (2013): <i>Sergentomyia schwetzi</i> is not a competent vector for <i>Leishmania donovani</i> and other <i>Leishmania</i> species pathogenic to humans. Parasites & Vectors 6(1): 186.....	61
4. 5. Pruzinova K., Sadlova J. , Seblova V., Homola M., Votypka J. & Volf P. (2015): Comparison of bloodmeal digestion and the peritrophic matrix in four sand fly species. PLOS ONE 10: 6.....	75
4. 6. Sadlova J. , Homola M., Myskova J., Jancarova M. & Volf P. (2018): Refractoriness of <i>Sergentomyia schwetzi</i> to <i>Leishmania</i> spp. is mediated by the peritrophic matrix. PLOS Neglected Tropical Diseases 12: 4: e0006382.....	88

4. 7. Pruzinova K., **Sadlova J.**, Myskova J., Lestinova T., Janda J. & Volf P. (2018): *Leishmania* mortality in sand fly blood meal is not species-specific and does not result from direct effect of proteinases. **Parasites & Vectors** 11: 37.....108
4. 8. **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.....118
4. 9. Doehl J. S., **Sadlova J.**, Aslan H., Pruzinova K., Metangmo S., Votýpka J., Kamhawi S., Volf P. & Smith D. (2017): *Leishmania* HASP and SHERP genes are required for in vivo differentiation, parasite transmission and virulence attenuation in the host. **PLOS Pathogens** 13(1) e1006130.....134
4. 10. **Sadlova J.**, Myskova J., Lestinova T., Votýpka J., Yeo M. & Volf P. (2017): *Leishmania donovani* development in *Phlebotomus argentipes*: comparison of promastigote- and amastigote-initiated infections. **Parasitology** 144(4): 403-410.....170
4. 11. Volf P., Benková I., Myšková J., **Sádlová J.**, Campino L. and Ravel Ch. (2007): Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids. **International Journal for Parasitology** 37: 589-593.....179
4. 12. Volf P., **Sádlová J.** (2009): Sex in *Leishmania*. **Science** 324: 1644-1644.....185
4. 13. **Sadlova J.**, Yeo M, Seblova V, Lewis MD, Mauricio I, et al. (2011): Visualisation of *Leishmania donovani* fluorescent hybrids during early stage development in the sand fly vector. **PLoS ONE** 6(5): e19851.....189
4. 14. Seblova V., **Sadlova J.**, Carpenter S., et al. (2012): Development of *Leishmania* parasites in *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae) and implications for screening vector competence. **Journal of Medical Entomology** 49(5): 967-970.....199
4. 15. Seblova V., **Sadlova J.**, Carpenter S., Volf P. (2014): Speculations on biting midges and other bloodsucking arthropods as alternative vectors of *Leishmania*. **Parasites & Vectors** 7:222.....204
4. 16. Seblova V., **Sadlova J.**, Vojtkova B., Votýpka J., Carpenter S., Bates P. A. and 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.....207
4. 17. Maia C., Seblova V., **Sadlova J.**, Votýpka J., Volf P. (2011): Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 5(6): e1181.....223
4. 18. **Sadlova J.**, Seblova V., Votýpka J. Warburg A., Volf P. (2015): Xenodiagnosis of *Leishmania donovani* in BALB/c mice using *Phlebotomus orientalis*: a new laboratory model. **Parasites & Vectors** 8.....230
4. 19. Kassahun A., **Sadlova J.**, Dvorak V. et al. (2015): Detection of *Leishmania donovani* and *L. tropica* in Ethiopian wild rodents. **Acta Tropica** 145: 39-44.239
4. 20. Kassahun A., **Sadlova J.**, Benda P., Kostalova T., Warburg A., Hailu A., Baneth G., Volf P. and Votýpka J. (2015): Natural infection of bats with *Leishmania* in Ethiopia. **Acta Tropica** 150: 166-170.....246
- 4.21. **Sadlova J.**, Vojtkova B., Hrnčířová K., Lestinova K., Spitzová T., Becvar T., Votýpka J., Bates P. and 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.....252

Seznam zkratek

CL	kožní (kutánní) leishmanióza (Cutaneous Leishmaniasis)
VL	viscerální leishmanióza (Visceral Leishmaniasis)
MCL	muko-kutánní leishmanióza (Muco-Cutaneous Leishmaniasis)
PKDL	Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis
LPG	lipofosfoglykan (Lipophosphoglycan)
PM	peritrofická matrix (Peritrophic Matrix)
PSG	Promastigote Secretory Gel
SV	stomodeální valva (Stomodeal Valve)
GFP	zelený fluorescenční protein (Green Fluorescent Protein)
RFP	červený fluorescenční protein (Red Fluorescent Protein)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
RH	rezervoárový hostitel (Reservoir Host)
AP	anteriorní plug (Anterior Plug)
HASP	Hydrophilic Acylated Surface Protein
SHERP	Small Hydrophilic ER-associated Protein
C.	<i>Culicoides</i>
L.	<i>Leishmania</i>
Lu.	<i>Lutzomyia</i>
P.	<i>Phlebotomus</i>
S.	<i>Sergentomyia</i>
A.	<i>Arvicantis</i>
M.	<i>Mastomys</i>

1. ÚVOD DO STUDOVANÉ PROBLEMATIKY

1. 1. TÉMA A ČLENĚNÍ PRÁCE

Veškerý výzkum, který tato habilitační práce zahrnuje, vznikl na katedře parazitologie PŘF UK v laboratoři vedené prof. RNDr. Petrem Volfem, CSc. Na katedru jsem nastoupila v roce 1994 v rámci postgraduálního studia, po dokončení magisterského studia na katedře zoologie téže fakulty. Náš výzkum interakcí mezi leishmaniemi a jejich přenašeči – flebotomy byl možný díky unikátní kolekci kolonií flebotomů, kterou na katedře založil prof. Volf na počátku devadesátých let. Zatímco tenkrát čítala tři druhy flebotomů (*P. papatasi*, *P. duboscqi* a *Lu. longipalpis*), dodnes se tato kolekce rozrostla na devět druhů Starého světa a dva novosvětské, takže svým rozsahem nemá prakticky ve světě obdoby. Protože tato kolekce pokrývá přenašeče téměř všech důležitých druhů leishmanií patogenních pro člověka, umožňuje nám pracovat s širokým spektrem těchto parazitů a zkoumat nejrůznější aspekty jejich interakcí s přenašeči.

Zpočátku jsem byla jako člen výzkumného týmu zapojena do různých interních i mezinárodních projektů vedených prof. Volfem. Od roku 2013 jsem jako hlavní řešitel projektu GAČR vedla výzkum zaměřený na vývoj a sexuální rozmnožování *L. donovani* ve flebotomech (2013 - 2016). Kromě vývoje leishmanií v přenašečích jsem se začala zabývat i přenosem leishmanií na hostitele a infektivitou hostitelů pro flebotomy. Kromě klasických laboratorních modelů (myš, křeček, morče) jsme s mými spolupracovníky a studenty zaváděli na katedře chov dalších druhů hlodavců (*Arvicanthis niloticus*, *Arvicanthis neumanni*, *Mastomys natalensis*, *Cricetulus migratorius*, *Phodopus sungorus*, *Lagurus lagurus*). Začali jsme studovat hostitelskou kompetenci těchto hlodavců pro různé druhy leishmanií, a to hlavně v rámci projektu GAČR zaměřeného na výzkum role subsaharských hlodavců rodu *Arvicanthis* a *Mastomys* jako hostitelů leishmanií, který vedu jako hlavní řešitel od roku 2017.

Ze svých 38 původních prací publikovaných v impaktovaných časopisech jsem se pokusila vybrat tu podstatnější část - 21 článků, které představují průřez hlavními směry mého výzkumu zhruba od roku 2004. Nejsou zde tedy zahrnuty práce, které byly již součástí mé disertační práce (pět publikací z let 1997-2006) ani práce, které úzce nesouvisí se zde prezentovanou tematikou (zbylých 12 publikací). Ústředním tématem je vývoj leishmanií ve flebotomech a mechanismy kontrolující vnímavost a rezistenci flebotomů vůči leishmaniím. Toto široké téma, zastoupené deseti publikacemi, shrnuje kapitola 2. 1. Do kapitoly 2. 2. jsou odděleny tři publikace, jejichž hlavní náplní je výzkum sexuálního rozmnožování leishmanií. Třetí kapitola je věnovaná výzkumu alternativních přenašečů leishmanií (tři publikace v kapitole 2. 3.) a poslední část shrnuje publikace věnované rezervoárovým hostitelům leishmanií a experimentálním infekcím hostitelů (pět publikací v kapitole 2.4.). Celá práce je uvedena literárním přehledem, rozděleným do šesti kapitol (kapitoly 1.2. až 1.7.), jehož cílem je zasvětit čtenáře do současného stavu poznání studované problematiky.

1. 2. LEISHMANIE A LEISHMANIÓZY

Leishmanie (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) jsou dvojhospitelští paraziti, jejichž životní cyklus se odehrává mezi savčím hostitelem a hmyzím přenašečem. Specifickými přenašeči leishmanií jsou flebotomové, drobní zástupci dvoukřídlého hmyzu (Diptera: Psychodidae). Spektrum savčích hostitelů leishmanií je široké, nejčastěji jsou to hlodavci, ale jsou i druhy leishmanií vázané např. na šelmy, damany, vačice, chudozubé, či klokany (shrnuto v [1]).

Parazit koluje mezi flebotomy a rezervoárovými hostiteli a člověk se většinou nakazí jen náhodně. Leishmaniózy jsou tedy typické zoonózy, rozšířené ve více než stovce zemí celého světa od tropů po jih mírného pásu. Z přibližně třiceti druhů leishmanií jich lidské onemocnění může vyvolávat dvacet [2]. V závislosti na druhu leishmanie i imunitní odpovědi hostitele má onemocnění různé podoby, přičemž jeden typ nemoci je působen několika druhy leishmanií a naopak, jeden druh leishmanie může na základě různých podmínek vyvolat různé typy onemocnění. Rozeznáváme několik základních a vzájemně poměrně odlišných typů leishmaniózy [3].

Pokud parazit působí výlučně ulcerace v místě sání flebotoma, hovoříme o **kožní (kutánní) leishmanióze (CL)**. Tyto vředy mají vlhký (*L. major*) nebo suchý charakter (*L. tropica*) a často se samy vyhojí, ale na jejich místě mohou zůstat trvalé jizvy jako doživotní stigma. I tato nejlehčí forma onemocnění má dopad na sociální život postižených lidí, zejména žen a dětí [4]. Těžší formou je **recidivující kožní leishmanióza (*L. tropica*)**, která se obtížně a dlouho léčí. **Difusní kožní leishmanióza** je známá z Jižní Ameriky (*L. amazonensis*) i Starého světa (*L. aethiopica*) a objevuje se zejména u pacientů s oslabenou buněčnou imunitou. Ložiska v kůži se plošně rozšiřují, takže výsledný projev onemocnění připomíná lepru. Spontánně se nehojí a i po léčbě dochází k častým relapsům. V případě **muko-kutánní leishmaniózy (tzv. espundia, MCL)** dochází k rozsáhlým destrukcím sliznic a chrupavek v oronasální a faryngeální oblasti. Parazit výrazně snižuje kvalitu života pacientů, kteří se musí vyrovnat se znetvořeným obličejem. Toto chronické onemocnění se samo nehojí a může končit i smrtelně. Typicky se vyskytuje v Jižní Americe (*L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*), kde je přibližně 90% onemocnění popisováno z Bolívie, Brazílie a Peru. Objevuje se ale i ve Starém světě, hlavně u pacientů se sníženou imunitou (*L. donovani*, *L. major* a *L. infantum*). **Viscerální leishmanióza (VL)**, rovněž známá jako kala-azar (tj. „černá nemoc“ v jazyce hindi), je nejtěžší formou onemocnění, která u neléčených případů končí často smrtí. Původcem onemocnění jsou druhy komplexu *L. donovani*. Mezi příznaky patří horečky, ztráta váhy, zduření uzlin, sleziny a jater a chudokrevnost. U části pacientů vyléčených z VL působené *L. donovani* se objeví po několika měsících až letech tzv. **PKDL (Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis)**, leishmanióza projevující se různými formami kožní vyrážky (makulózní v Asii, papulózní v Africe) [5].

Leishmaniózy patří mezi nejvýznamnější parazitární onemocnění světa – podle dat WHO postihují zhruba 12 milionů lidí, ročně přibývá více než milion dalších pacientů a každý rok podlehne této chorobě (viscerální formě) 10 – 20 tisíc lidí [6]. Ve skutečnosti budou čísla ještě daleko vyšší, protože většina případů onemocnění se do péče lékařů a potažmo statistik vůbec nedostane. Například podle studie z devadesátých let minulého století z Guatemaly bylo při aktivním vyhledávání pacientů nalezeno čtyřicetkrát více případů, než při jejich evidenci obvyklou cestou, kdy pacient sám vyhledá lékařské ošetření [7]. Dokonce i v případech viscerálních forem se do lékařské péče a evidence dostane jen část pacientů, a to i přes to, že

viscerální leishmanióza bez léčby vede nevyhnutelně ke smrti pacienta. Studie z let 1998 - 2002 z Jižního Súdánu uvádí, že v oblastech, kde na jednu nemocnici připadá území o rozloze až 100 tisíc km², vyhledá lékařskou pomoc sotva polovina nemocných, protože náročnou, mnohadenní cestu na vyšetření nemohou mnozí z nich kvůli špatnému zdravotnímu stavu podstoupit, případně ji nepřežijí. Podle odhadu autorů umírá 90% pacientů v této zemi, aniž byla jejich choroba rozpoznána [8]

Přes obrovský impakt na lidské zdraví patří leishmanióza do kategorie **opomíjených nemocí (neglected diseases)**. Důvodem je to, že postihuje především lidi v těch nejchudších zemích světa. Většina z 98 zemí, kde se leishmanióza vyskytuje, je řazena mezi země rozvojové, kde je lékařská péče drahá a špatně dostupná. Přibližně 90% všech pacientů s viscerální formou onemocnění je soustředěno v pouhých šesti zemích (Indie, Bangladéš, Súdán, Jižní Súdán, Etiopie a Brazílie) a 70% pacientů s kutánní formou v deseti zemích světa (Afgánistán, Írán, Sýrie, Alžírsko, Etiopie, Súdán, Brazílie, Kolumbie, Kostarika a Peru) [6]. Nejčastěji onemocní lidé chudí a podvyživení, lidé s oslabenou imunitou, lidé žijící v chatrných přibytcích nebo ti, kteří byli donuceni k vystěhování do endemických oblastí. Rozvoji onemocnění navíc přispívají lokální etnické a náboženské konflikty spojené s migracemi, hladověním a vyšším vystavením lidí flebotomům [9].

Smutnou skutečností je, že v mnoha zemích se k léčbě pacientů stále používají značně toxické preparáty na bázi solí pětimocného antimonu, vyvinuté již ve 40. letech minulého století (!). Léčba obnáší 3 až 6 týdnů každodenních intramuskulárních nebo intravenózních aplikací a může mít závažné vedlejší účinky. Méně toxické léky jako liposomální amphotericin B jsou dražší a proto se v chudších oblastech méně užívají (Indie, východní Afrika), zde je lékem první volby středně toxický paramomycin. Perorálně podávané léky jako miltefosin jsou levnější a méně toxické, ale v mnoha lokalitách již na ně vzniká rezistence. Proto se dnes často volí kombinovaná léčba, která umožňuje podávat nižší dávky léčiv po kratší dobu, takže se snižuje i jejich toxicita, cena i riziko vzniku rezistence (shrnutí v [10]).

1. 3. VÝVOJ LEISHMANIÍ VE FLEBOTOMECH A FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KOMPETENCI PŘENAŠEČŮ.

Životní cyklus leishmanií zahrnuje morfologicky a funkčně odlišná stádia: v obratlovčím hostiteli přežívají leishmanie intracelulárně ve formě **amastigotů**, zatímco v přenašeči se vyvíjejí extracelulární **promastigotní bičíkaté formy**. Z více než 800 známých druhů flebotomů jich jen necelá stovka funguje jako prokázání či předpokládání přenašeči leishmanií [11]. Vývoj leishmanií ve flebotomech je komplexní a často druhově specifický proces (shrnutí v [12][13][14]). V laboratorních podmínkách některé druhy flebotomů podporují vývoj různých druhů leishmanií (tzv. **permisivní vektor**), jiné pouze vývoj určitého druhu leishmanie (**specifičtí vektor**, např. *Phlebotomus papatasi* a *Leishmania major*). Tyto skupiny flebotomů se zřejmě liší hlavně charakterem molekul na povrchu střevního epitelu. Zatímco v případě vývoje *L. major* v *P. papatasi* je pro leishmanie klíčovou molekulou povrchový lipofosfoglykan (LPG), kterým se vážou na střevní galektin flebotoma [15][16], při vývoji v permisivních přenašečích se uplatňují jiné, na LPG nezávislé mechanismy vazby promastigotů na střevní epitel [17].

Faktory kontrolující kompetenci vektora působí hlavně v časně fázi vývoje leishmanií ve flebotomech. Trávení nasáté krve se odehrává v prostoru obklopeném během prvních hodin po sání tzv. **peritrofickou matrix (PM)**, která je složena z glykoproteinů a proteoglykanů vázaných na chitinové kostře. PM chrání před poškozením střevní epitel a rozděluje prostor mesenteronu na endo- a ektoperitrofický prostor, čímž zefektivňuje trávení krve [18][19]. U krevsajícího hmyzu má PM roli i v detoxifikaci hemu uvolňovaného při trávení krve [20].

V endoperitrofickém prostoru se amastigoti nasátí spolu s krví hostitele transformují na **procyklické promastigoty**, intensivně se dělicí formy s krátkým tělem a ještě kratším bičíkem. Tato časná stádia leishmanií musí čelit destruktivnímu působení trávicích enzymů flebotomů [21][22]. PM přitom zřejmě v prvních hodinách po sání působí jako ochranná bariéra, která brání rychlé difuzi trávicích enzymů do okolí leishmanií [23], ke konci trávení ale může PM představovat pro leishmanie bariéru, která brání jejich úniku do ektoperitrofického prostoru [24]. Únik parazitů z rozpadající se PM je doprovázen transformací procyklických promastigotů na **dlouhé nektomonády** [25], které se přichytávají bičíky mezi mikrovily střevního epitelu, aby odolaly vypuzení z mesenteronu peristaltickými pohyby střeva při defekaci nestrávených zbytků potravy. Pokud leishmanie nejsou schopny čelit jednomu z výše popsaných faktorů, tj. nedokážou (1) přežít v nehostinném prostředí mesenteronu během trávené krve, (2) uniknout z PM či (3) přichytit se ke střevnímu epitelu během defekace, dochází ke ztrátě infekce, jak se tomu děje u nekompatibilních druhů leishmanií a přenašečů.

V kompetentních přenašečích podstatná část populace leishmanií přežívá defekaci, množí se a kolonizuje thorakální část mesenteronu a stomodeální valvu (SV), svěrač oddělující mesenteron od předního střeva. Mezi 3-7 dnem po sání krve se nektomonády transformují na kratší leptomonády, které se množí a produkují tzv. **promastigote secretory gel (PSG)**, který hraje důležitou roli v přenosu infekce [26]. Z leptomonád vznikají jednak **haptomonády**, krátké široké formy přisedlé pomocí hemidesmosómů na kutikulární vrstvu stomodeální valvy a dále **metacykličtí promastigoti**, krátké motilní formy s velmi dlouhým bičíkem, které jsou adaptované na přežití v savčím hostiteli. Samotný přenos leishmanií na dalšího hostitele je usnadněn jednak narušením kutikulární vrstvy stomodeální valvy chitinázami leishmanií, jednak mechanickým ucpáním thorakálního mesenteronu masou leishmanií (haptomonád, leptomonád a metacyklů) zpevněných navíc PSG gelem [27]. Výše popsaný vývoj prodělávají ve flebotomech tzv. **suprapylariální leishmanie** (podrod *Leishmania*). U skupiny **peripylariálních leishmanií** (podrod *Viannia*) se infekce po opuštění PM vyvíjí nejprve v zadním střevě flebotomů, kde se haptomonády přichycují ke kutikulární výstelce zadního střeva, poté teprve dochází k přesunu leishmanií do přední části střeva [28]. U **hypopylariálních leishmanií** (zástupci podrodu *Sauroleishmania*) je vývoj omezen na abdominální mesenteron a zadní střevo, přenos na hostitele se pak odehrává kontaminativní cestou či pozřením přenašeče (shrnutí v [27]).

1. 4. SEXUÁLNÍ ROZMNOŽOVÁNÍ LEISHMANIÍ

Leishmanie byly dlouho považovány za organismy množící se čistě nepohlavně, přičemž jejich genetická rozmanitost byla přisuzována mechanismům, jako jsou rekombinace tandemových repetitivních genových rodin [29][30]. V posledních několika desetiletích se ale

začaly objevovat důkazy o tom, že v přírodě dochází alespoň občas ke **genetické výměně**. Byli nacházeni hybridní klony jak vnitrodruhové, tak i mezidruhové (shrnuto v [31]). Zatímco laboratorní pokusy zaměřené na potvrzení sexuálního rozmnožování leishmanií v hostiteli nebo *in vitro* nebyly úspěšné, genetická výměna byla posléze v laboratorních podmínkách prokázána v přenašečích: poprvé byly hybridní klony *L. major* získány z flebotomů druhu *P. duboscqi* infikovaných dvěma různými transgenními parentálními kmeny *L. major* [32]. Hybridní potomci byli většinou diploidní nebo triploidní a dědili ve většině genů alely obou rodičovských kmenů (ve shodě s meiotickým procesem), zatímco kinetoplastová DNA se dědila jen od jednoho z rodičů. Později byla schopnost sexuálního rozmnožování popsána u různých izolátů *L. major* získaných z různých míst areálu rozšíření druhu [33].

K bližšímu určení místa a doby vzniku hybridů ve flebotomech a jejich morfologie byly využity i fluorescenčně značené leishmanie - hybridní byli detekováni v natrávené krvi v endoperitrofickém prostoru dva dny po sání [34]. Podobná metoda (fluorescenční značení rodičovských linií) byla později využita pro průkaz intraklonální genetické výměny - sexuální reprodukce v rámci stejného genotypu leishmanií [35]. Experimentálně byla prokázána i mezidruhová genetická výměna mezi druhem působícím kožní a viscerální formu leishmaniózy (*L. major* a *L. infantum*) [36]. O sexuálním rozmnožování leishmanií lze tedy na základě současných znalostí konstatovat, že (i) sex je u nich (podobně jako u trypanosom) založen na meióze a následné fúzi haploidních gamet, (ii) neexistuje zde žádný striktně definovaný „mating type system“ a (iii) sexuální rozmnožování se vyskytuje pouze v přenašeči a není nutnou součástí životního cyklu leishmanií (shrnuto v [37]).

Fakt, že leishmanie jsou schopné množit se i sexuálně, má velký **epidemiologický význam**. Hybridní klony mohou získat určité selekční výhody a prosazovat se lépe, než jejich rodičovské kmeny a druhy. Například v Peru byli hybridní *L. braziliensis*/*L. peruviana* mezi izoláty z lidí a psů zastoupeni téměř stejně hojně jako *L. braziliensis* a daleko hojněji než *L. peruviana* a z několika pacientů s MCL byli izolováni výhradně tyto hybridní genotypy [38]. Mezi hybridními klony *L. major* získanými laboratorně byly i klony, které byly více virulentní, než oba parentální kmeny [32] a vysokou virulenci vykazovali i některé hybridní klony *L. braziliensis*/*L. peruviana* při experimentálních infekcích křečků [39]. Hybridní potomci mohou významně zvýšit svou fitness také úspěšnou kolonizací nových druhů přenašečů: přirození hybridní *L. major* a *L. infantum* byli schopni se vyvíjet v *P. papatasi*, který je rezistentní vůči *L. infantum* [40]. Epidemiologické důsledky takových událostí jsou tedy enormní a výzkum sexuálního rozmnožování leishmanií je rozhodně aktuální a potřebný [41].

1. 5. ALTERNATIVNÍ VEKTOŘI LEISHMANIÍ

V posledních letech se v literatuře objevují indicie, že flebotomové by nemuseli být výhradními přenašeči leishmanií. Díky citlivým metodám jako je PCR byla DNA leishmanií nalezena v zástupcích různých skupin krevsajících členovců. Ovšem na většinu těchto nálezů je třeba nahlížet kriticky, protože přítomnost DNA parazita v členovci ještě zdaleka neprokazuje, že daný druh je kompetentní parazita přenést.

Zapojení určitého druhu členovce do životního cyklu leishmanií může být uznáno, pouze pokud jsou splněna určitá **kritéria kompetence vektora**, která byla stanovena na základě dlouhodobých terénních pozorování i laboratorních pokusů [42][43]. Kromě přítomnosti stejného genotypu parazita v přenašeči a hostiteli, nutné ekologické vazby

(výskyt ve stejném habitatu, mikrohabitatu, sezóně) či ochoty přenašeče sít na daném hostiteli, je důležité především prokázat leishmanie v přenašeči i po jeho defekaci a ne pouze v krve nasáté v jeho střevě. Teprve po defekaci je totiž možné poznat, zda je daný druh leishmanie na přenašeče skutečně adaptován a dokáže v něm vyvinout zralou infekci. Ideální je testování vývoje leishmanií a přenosu na hostitele v laboratorních podmínkách. Ovšem k tomu je potřeba zavést v laboratoři chov daného druhu členovce, což je náročné a často problematické.

Leishmanie byly poměrně často detekovány v **klíšátech** (Chelicerata: Acarina), hlavně v kosmopolitně rozšířeném druhu *Rhipicephalus sanguineus*, jehož primárními hostiteli jsou psi (rezervoároví hostitelé *L. infantum*). Studie zaměřené na prevalenci leishmanií v klíšátech sebraných z infikovaných psů uvádějí často poměrně vysoká čísla (10% - 50% pozitivních klíštat)[44][45][46], ovšem tyto hodnoty nelze přímo srovnávat s prevalencí ve flebotomech, kdy se prověřují vzorky celé populace odchycem do světelných nebo lepových pastí. Významnější je, že DNA leishmanií byla zaznamenána i ve slinných žlázách klíštat [47][46], že leishmanie v klíšátech přežijí ekdyzi [44] a dochází i k jejich transovariálnímu přenosu [48][49]. Pokusů o experimentální průkaz přenosu leishmanií na hostitele pomocí klíštat je zatím poskrovnu. Autoři Coutinho et al. [50] popisují úspěšnou nákazu křečků, kterým byl perorálně či peritoneálně podán homogenát nasátých klíštat, sebraných z infikovaných psů. Tato práce je ovšem metodicky sporná, infekční byla pravděpodobně amastigotní stádia přítomna v čerstvě nasátých klíšátech, takže pokus nevyovídá nic o schopnosti leishmanií dokončit v klíšátech vývoj a při dalším sání nakazit dalšího hostitele. Zatím jediná studie popisuje přenos *L. infantum* přímo sáním infikovaných klíštat, ovšem jde o nepublikovanou disertační práci z roku 1986, kdy byl úspěšně nakažen jeden imunosuprimovaný pes (shrnuto v [51]). Roli klíštat v přenosu leishmanií nelze tedy vyloučit, ovšem je potřeba prověřit tuto možnost dalšími, dobře designovanými pokusy zacílenými na sledování životního cyklu leishmanií v klíšátech, tvorbu metacyklických stádií a experimentální přenos leishmanií na imunokompetentního hostitele.

Přítomnost leishmanií byla zjišťována také u **blech** (Insecta: Siphonaptera), hojného hematofágního ektoparazitického hmyzu s velkým potenciálem pro přenos patogenů. Nejčastějším objektem výzkumu v této oblasti byla kosmopolitní blecha kočičí *Ctenocephalides felis* parazitující hlavně na domácích kočkách a psech, ale i dalších druzích hostitelů. Není překvapivé, že v blechách *C. felis* sebraných z infikovaných psů byly často leishmanie prokázány [52] a jejich homogenát podaný perorálně či peritoneálně také vyvolal nákazu křečků [53][54]. Ovšem, stejně jako v případě klíštat, takový experiment sám o sobě neprokazuje schopnost leishmanií dokončit v blechách vývoj a přenést leishmanie na dalšího hostitele.

Zajímavější je situace s **tiplíky** (Diptera: Ceratopogonidae), kosmopolitně a hojně se vyskytujícím krevsajícím dvoukřídlym hmyzem. Publikace z roku 2011 popisuje terénní detekci přenašečů *L. macropodum*, australského druhu leishmanie popsáno z klokanů teprve v roce 2004 [55]. Autoři odchytily tisíce neinfikovaných flebotomů, ale zato překvapivě zjistili přítomnost leishmanií u 5.8% samic tiplíků rodu *Forcipomyia* (*Lasiohelea*). Důležité bylo, že autoři poté prohlíželi střeva tiplíků i mikroskopicky a pozorovali kolonizaci thorakálního mesenteronu i metacyklické promastigoty [56]. Později byly u tiplíků rodu *Culicoides* detekovány leishmanie i v jiných částech světa - *L. infantum* v Tunisku [57] a *L. braziliensis* a *L. amazonensis* v Brazílii [58]. Vnímavost tiplíků pro leishmanie byla testována také laboratorně. Zatímco evropský druh *C. nubeculosus* nepodporoval vývoj *L. infantum* a *L.*

major [59], v severoamerickém *C. sonorensis* byly leishmanie druhu *L. enriettii* (příbuzné australské *L. macropodum*) schopny přežít defekaci a kolonizovat stomodeální valvu i tvořit metacyklická stádia [60]. Tiplíky tedy můžeme považovat za velmi pravděpodobné přenašeče leishmanií z podrodu *Mundinia* (kam patří zmíněné druhy *L. macropodum* a *L. enriettii*), přestože zatím nebyl experimentálně potvrzen úspěšný přenos těchto leishmanií pomocí tiplíků na hostitele. Ovšem jako přenašeči leishmanií ostatních tří podrodů (*Leishmania*, *Viannia* a *Sauroleishmania*) fungují dle současných poznatků pouze flebotomové.

1. 6. REZERVOÁROVÍ HOSTITELÉ LEISHMANIÍ

Zatímco část životního cyklu leishmanií v přenašeči trvá týden až měsíc, většinu času (měsíce až roky) se leishmanie zdržují v tzv. **rezervoárových hostitelích (RH)**. Člověk se nakazí náhodně, leishmaniózy jsou tedy řazeny mezi klasické **zoonózy**. Za **antroponózy** – tedy onemocnění, kdy patogen koluje pouze mezi člověkem a přenašečem, jsou dnes považována pouze onemocnění způsobená *L. donovani* a *L. tropica* a to jen v určitých částech areálu výskytu. Mezi RH leishmanií jsou klíčoví zejména hlodavci a psovité šelmy, ale uplatňují se zde zástupci téměř všech řádů savců (shrnuto v [1], [61]).

Protože riziko lidských nálezů je bezprostředně závislé na biologii a ekologii rezervoárových zvířat a přenašečů, je identifikace RH zásadním předpokladem poznání epidemiologie leishmanióz a potažmo možnosti regulace populací rezervoárových zvířat. Identifikace RH ovšem není jednoduchá, vyžaduje kombinaci dlouhodobých terénních i laboratorních studií. Správný RH musí splňovat mnoho parametrů, zejména musí žít dostatečně dlouho, aby se parazit udržel i v období mimo výskyt přenašečů, jeho populace musí mít dostatečnou hustotu a leishmanie musí být lokalizovány v těle zvířat tak, aby byly dostupné sání přenašečů. Infekce by také měly být pro zvířata natolik benigní (nebo vzácné), aby výrazně neomezovaly populace RH. Nález leishmanií v odchyceném zvířeti tedy ještě sám o sobě neznamená, že jde o jejich RH [61],[62]. Může jít o **náhodné hostitele**, kteří se sice leishmaniemi nakazí, ale nejsou schopni nakazit přenašeče a zajistit další kolování parazita.

Dříve byli rozlišováni primární RH, kteří byli schopni udržovat nákazu dlouhodobě a sekundární RH, kteří byli také schopni nakazit flebotomy a šířit patogen na náhodné hostitele, ale dlouhodobě v sobě patogen neudrželi [63]. Protože toto dělení bylo víceméně umělé (tyto parametry se mohou měnit lokálně i sezónně) a mohlo vést k nedocení významu sekundárních hostitelů, od tohoto dělení se upouští [64]. Dle novější koncepce autorů Chaves et al. [65] tedy rozlišujeme pouze RH, z nichž mohou být leishmanie přeneseny na jiné hostitele („sources“) a náhodné hostitele („sinks“), kteří se v dalším koloběhu parazita neuplatní. Testování rezervoárových schopností zvířat se provádí v laboratorních podmínkách pomocí experimentálních nálezů a **xenodiagnostiky** (naivním flebotomům je umožněno sání na nakažených hostitelích a po určité době se v nich detekuje přítomnost leishmanií).

1. 7. MODELOVÉ DRUHY ZVÍŘAT PRO VÝZKUM LEISHMANIÓZ A EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE.

Jak bylo uvedeno v předchozím textu, lidské leishmaniózy mají mnoho forem od asymptomatických infekcí přes lehké kožní projevy až po závažné viscerální formy. Výsledná forma onemocnění je dána především druhem a virulencí parazita, ale důležitou roli hraje i genetické pozadí a imunitní systém hostitele. Proto je při experimentálních infekcích důležitá volba vhodného **modelového zvířete** pro výzkum leishmanióz.

Jako v biomedicinském výzkumu obecně, i při výzkumu leishmanióz jsou nejoblíbenějším modelem **laboratorní myši** (*Mus musculus domesticus*). Kromě snadného chovu je velkou výhodou to, že existuje mnoho komerčně dostupných inbredních linií myší s různými fenotypy. Díky výzkumu na myších byla rozpoznávána role různých typů imunitních buněk, cytokinů, signálních kaskád a efektorových mechanismů zapojených do imunitní odpovědi proti leishmaniím. Experimentální infekce vnímavých kmenů myší (BALB/c) a rezistentních kmenů (C57BL/6) druhem *L. major* umožnily porozumět mechanismu resistance. U vnímavých myší se rozvíjela odpověď Th2 typu zatímco vyhojení infekcí u rezistentních myší korelovalo s rozvojem Th1 typu imunitní odpovědi (aktivace makrofágů a produkce toxického NO (shrnuto v [66])). Výzkum na myších také pomohl objasnit roli slin flebotomů při rozvoji infekce. Zatímco u naivních hostitelů přítomnost slin zrychluje rozvoj lézí a zvyšuje počet leishmanií („enhancing effect“), expozice zvířat neinfikovaným flebotomům nebo vakcinace zvířat slinami flebotomů či slinnými proteiny před inokulací leishmanií vede k ochrannému efektu (shrnuto v [67]). Ukázalo se také, že imunitní odpověď jednoho kmene myší vůči různým druhům leishmanií je odlišná, například C57BL/6 myši rezistentní vůči *L. major* tvoří chronické léze při infekci *L. amazonensis*, aniž by docházelo k Th2 typu odpovědi. BALB/c myši vnímavé k *L. major* jsou zase schopné vyvinout efektivní Th1 imunitní odpověď vůči *L. donovani* (shrnuto v [68]).

Křeček syrský (*Mesocricetus auratus*) je velmi vnímavý k infekcím visceralizujícími druhy leishmanií (*L. donovani*, *L. infantum*) a protože infekce mají progresivní průběh a podobné klinicko-patologické rysy jako u progresivní VL člověka, využívá se jako časté modelové zvíře pro výzkum imunitní odpovědi proti těmto druhům leishmanií [69]. Ačkoliv cytokiny produkované v křečcích po infekci *L. donovani* odpovídají Th1 typu imunitní odpovědi, nedochází k aktivaci NO syntázy v makrofázích a hlavní efektorový mechanismus, který slouží k potlačení infekcí v myších, tu tedy chybí [70][71]. Také na tomto modelu bylo prokázáno, že imunizace proteiny slinných žláz flebotomů chrání křečky před fatálním průběhem infekce *L. infantum* ([72]).

Morče (*Cavia porcellus*) je využíváno jako modelové zvíře pro testování CL působené druhem *L. enriettii*. Kožní léze se vyhojují, podobně jako u lidské CL [73][74]. Naopak vůči *L. braziliensis* jsou zřejmě morčata rezistentní [75].

Psi (*Canis lupus f. familiaris*) jsou, společně s divokými psovitými šelmami, hlavní RH *L. infantum*, využívají se tedy také jako modelová zvířata pro výzkum VL. Psí VL má velmi variabilní klinické symptomy – infekce mohou být asymptomatické, mírné (oligosymptomatické) ale i zcela fatální [76]. Výzkum role jednotlivých imunitních buněk a

jejich produktů u asymptomatických a symptomatických psů tedy významně přispívá k poznání mechanismů imunitních reakcí vůči visceralizujícím druhům leishmanií [77][78].

Využívání byli také **nehumánní primáti**, hlavně kvůli podobnosti jejich anatomie, fyziologie a imunity s člověkem. Například makaci (makak rhesus, *Macaca mulata*) jsou k leishmaniím vnímaví a tvorba lézí u zvířat infikovaných *L. amazonensis*, *L. braziliensis* i *L. major* má velmi podobný průběh, jako u člověka [79][80][81]. Z novosvětských druhů se mirikiny obecné (*Aotus trivirgatus*) projeví jako vnímavé vůči VL působené *L. donovani*, rezistentní jsou naopak kotulové veverovití (*Saimiri sciureus*) ([82][83]. Z etických i finančních důvodů nejsou pokusy na primátech příliš časté, takže imunitní odpověď opic a poloopic na leishmaniové infekce není tak detailně probádaná, jako je tomu v případech výše zmíněných modelových zvířat. Přesto se často používají jako finální model pro testování různých typů vakcín proti leishmaniózám (shrnutí v [68]).

Trendem posledních let je využití **divokých hlodavců**, především těch druhů, které slouží jako přirození RH leishmanií. Tito hlodavci jsou (stejně jako člověk) geneticky polymorfní a lze na nich studovat jednak přirozenou dynamiku infekcí (amplifikaci leishmanií v různých orgánech a jejich expozici přenašečům v kůži či krvi) a jednak vztah mezi hostitelem a patogenem – tedy přirozenou rovnováhu mezi imunitní odpovědí hostitele s množením a úspěšným přežíváním leishmanií (shrnutí v [68]). Protože tato zvířata nebývají komerčně dostupná a jejich chov nebývá tak snadný, zatím bylo studováno poměrně málo druhů.

Sigmodon hispidus (křeček bavlíkový, Cricetidae, Sigmodontinae) obývajících Střední Ameriku, Mexico a jihovýchod USA je používán už desetiletí pro testování celé řady infekčních patogenů, od virů po helminty. Díky tomu bylo vyvinuto mnoho specifických a komerčně dostupných reagens (buněčné linie, monoklonální protilátky specifické pro jejich cytokiny a chemokiny) a byly publikovány i sekvence některých genů (shrnutí v [84]). Vysoce vnímaví jsou tito hlodavci k experimentální nákaze *L. mexicana* působící CL ([85]) i vůči visceralizující *L. donovani*: infekce se v nich progresivně vyvíjí, ale není pro ně fatální jako pro křečky ([86][87]).

Brazilští hlodavci druhu ***Thrichomys laurentius*** (Echimyidae) byli experimentálně infikováni druhem *L. infantum* a *L. braziliensis*. Zajímavé je, že oba druhy, z nichž jeden působí u člověka VL a druhý CL, vyvolaly u tohoto hlodavce zcela shodné pattern infekcí – leishmanie přetrvávaly v kůži i vnitřních orgánech zvířat (játrech a slezině) mnoho měsíců, aniž by produkovaly léze či jiné patologické změny [88].

Pro studium CL působené druhem *L. mexicana* byl zaveden modelový hostitel ***Peromyscus yucatanicus*** (Cricetidae, Neotominae), přirozený rezervoár tohoto druhu leishmanie [89]. Klinické a histopatologické rysy onemocnění těchto amerických křečků jsou podobné lidské CL. Na rozdíl od myšího modelu u nich tvorba NO v makrofázích nevede k eradikaci leishmanií [90][91].

Již ve 30. letech minulého století byly zaváděny experimentální infekce asijských **křečků čínských** (*Cricetulus griseus*, Cricetidae, Cricetinae). Křečci byli ve starší literatuře popisováni jako mimořádně vnímaví k leishmaniím, s histopatologickými příznaky onemocnění podobnými jako u člověka [92]. Později byli coby modely pro výzkum leishmaniózy opomíjeni, ač to jsou zvířata komerčně dostupná a snadno chovatelná. V

posledních letech pak byli znovu využiti jako modelová zvířata pro testování VL v Číně [93], [94].

Se zaváděním nových modelových zvířat se tedy jasně ukazuje, že imunitní odpověď na stejný druh leishmanie je u různých hostitelů značně rozdílná a mechanismy, které fungují u zdánlivě standardního modelu inbredních kmenů myší, nemají zdaleka universální platnost. Vhodné modelového zvíře by mělo vykazovat takové patologické rysy onemocnění a imunitní odpověď vůči danému druhu leishmanie, které by se optimálně blížily projevům lidských leishmanióz. Nelze tedy vystačit s jedním či dvěma modely pro výzkum celého spektra různých forem leishmanióz. To se ukazuje například při testování vakcín [95] a proto je nezbytné hledat, vytvářet a testovat nové zvířecí modely, které by se co nejvíce odpovídaly spektru požadovaných kritérií.

2. VLASTNÍ VÝZKUM A JEHO DALŠÍ SMĚŘOVÁNÍ

2.1. VÝVOJ LEISHMANIÍ VE FLEBOTOMECH A FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KOMPETENCI PŘENAŠEČŮ.

Jedním z prvních dílčích témat, kterým jsem se v této oblasti výzkumu věnovala, byl mechanismus přenosu leishmanií na savčího hostitele. Bylo známo, že přenos infekčních stádií je umožněn regurgitací flebotoma při sání na hostiteli – u infikovaných jedinců je oblast kardiie mechanicky zablokována masou haptomonád, leptomonád a PSG gelu, který leptomonády produkují [27]. V naší práci jsme pomocí histologických a elektron-mikroskopických řezů potvrdili, že leishmanie navíc aktivně porušují chitinovou vrstvu na povrchu stomodeální valvy, čímž zřejmě zvyšují regurgitaci flebotomů. Kromě tří různých druhů flebotomů byl stejný efekt pozorován i u komárů *Culex pipiens* infikovaných trypanosomou *T. culicavium*, takže jde pravděpodobně o univerzálnější strategii využívanou dvojhositelskými trypanosomatidy v hmyzích přenašečích [96]. Ve spolupráci s kolegy z Liverpool School of Tropical Medicine (UK) a National Institutes of Health (NIH, Bethesda, USA) jsme potom ověřili efekt porušení chitinové vrstvy stomodeální valvy flebotomů na přenos leishmanií pomocí mutantních linií *L. mexicana* s over-expresí leishmaniové chitinázy. Jednoznačně se podařilo prokázat vliv exprese tohoto enzymu na přenos infekce. Ve srovnání s kontrolní skupinou sály samice infikované mutantní linií 2,5 krát déle a u infikovaných myší byl poté pozorován signifikantně rychlejší růst lézí i větší počet leishmanií [97].

Chitináza leishmanií byla staršími autory popsána také jako hlavní enzym, který umožní leishmaniím opustit endoperitrofický prostor obklopený peritrofickou matrix (PM), vrstvou složenou z chitinové kostry obalené glykoproteiny a proteoglykany, která se tvoří okolo nasáté krve. Na modelu *P. papatasi* – *L. major* bylo popsáno, že leishmanie unikají do ektoperitrofického prostoru přední části PM, kterou aktivně porušují svou chitinázou [98]. V naší práci jsme podrobně popsali morfologii, ultrastrukturu a kinetiku tvorby a rozpadu PM flebotomů druhu *P. duboscqi*. Ovšem PM se rozpadala u samic infikovaných *L. major* s naprosto stejnou dynamikou, jako u neinfikované kontrolní skupiny. Náš závěr tedy byl, že hlavní roli v rozpadu PM *P. duboscqi* hrají vlastní chitinázy flebotoma a parazit jen čeká na tento přirozený rozpad PM. Vzhled anteriorní části PM se nelišil u infikovaných a neinfikovaných samic – zde v oblasti tzv. anteriorního plugu (AP) zůstává PM transparentní, protože je tvořena v anteriorní části mesenteronu, není ve styku s trávenou krví a nebarví se proto hemem, na rozdíl od PM tvořené v posteriorním mesenteronu, kde dochází k trávení krve. Nicméně je PM v oblasti AP uzavřená a pro leishmanie neprostupná a leishmanie unikají při přirozeném rozpadu PM na jejím zadním konci. Popsali jsme také roli AP v migraci leishmanií – nektomonády migrovaly z abdominální do thorakální části mesenteronu až po rozpadu PM, do té doby AP uzavíral přechod mezi oběma částmi střeva [25].

Fakt, že rozpad PM neinicují leishmanie, ale je to proces kompletně řízený enzymy flebotomů, nám nepřímo potvrdil i další výzkum zaměřený na druh *Sergentomyia schwetzi*, jehož kolonii jsme založili ze samic získaných během terénního výzkumu v Etiopii. Zástupci tohoto druhu patří na endemických lokalitách k nejhojnějším flebotomům, jsou ochotni sát

na člověka a byli tedy podezřelí z přenosu leishmanií patogenních pro člověka. Experimentální infekce *S. schwetzi* třemi druhy leishmanií (*L. donovani*, *L. major* a *L. infantum*) ovšem prokázaly, že ani jeden z těchto druhů leishmanií není schopen v *S. schwetzi* dokončit vývoj. Zatímco v kontrolních druzích flebotomů (*P. duboscqi* a *Lu. longipalpis*) se tvořily zralé infekce s kolonizací SV, v *S. schwetzi* byly leishmanie defekovány spolu se zbytky nestrávené krve. Důvodem bylo zřejmě jiné načasování rozpadu PM, než u kompetentních druhů flebotomů [99].

V dalším výzkumu jsme proto podrobně srovnali dynamiku tvorby PM u *S. schwetzi* a tří druhů flebotomů, které fungují jako kompetentní přenašeči *L. major* nebo *L. donovani* (*P. papatasi*, *P. orientalis* a *P. argentipes*). Srovnávali jsme také další parametry trávení krve: objem nasáté krve, dynamiku proteolytické aktivity a časový průběh defekace. Zásadní parametr, který odlišoval *S. schwetzi* od ostatních druhů, byl časový interval mezi rozpadem PM a defekací samic – u *S. schwetzi* byl extrémně krátký a nedával leishmaniím prostor pro úspěšnou kolonizaci mesenteronu [100].

Tato hypotéza byla definitivně potvrzena v další publikaci. Do suspenze králičí krve a leishmanií, kterou byly infikovány samice *S. schwetzi*, byla přidána chitináza získaná kultivací houby *Beauveria bassiana*. U těchto samic byla PM porušena, leishmanie byly schopné unikat do ektoperitrofického prostoru a vytvořit v *S. schwetzi* zralé infekce s kolonizací SV a tvorbou metacyklických stádií, zatímco u kontrolních samic (které sály krev bez přidání exogenní chitinázy) byly leishmanie defekovány [101].

Stejnou kombinaci druhů flebotomů jsme využili i v dalším navazujícím výzkumu faktorů ovlivňujících kompetenci přenašečů. Dlouho se traduje hypotéza, že významnou roli specifické bariéry, která brání vývoji leishmanií v nekompetentních vektorech, hrají jejich trávicí enzymy ([21][102]). Výsledky našich pokusů *in vivo* tuto hypotézu ovšem nepotvrdily, protože leishmanie v rezistentních druzích (*P. papatasi* a *S. schwetzi*) nebyly poškozeny, ale přežily aktivitu trávicích enzymů až do okamžiku defekace. Provedli jsme proto další pokusy *in vitro* a vystavili leishmanie homogenátu střev vypitvaných z různých druhů nasátých flebotomů. Také v tomto experimentálním uspořádání se potvrdilo, že leishmanie nemají vyšší mortalitu v prostředí střev rezistentních druhů flebotomů. Nejvyšší mortalitu navíc vykazovali překvapivě promastigoti 24 h po transformaci a ne transformující se formy, jak bylo dříve popsáno [23]. Důležité je, že leishmanie byly rezistentní k samotné proteináze, ale citlivé ke kombinaci králičí krve a proteinázy. Mortalita tedy nebyla působena přímo trávicími enzymy, ale toxickými produkty trávení krve, což také svědčí proti hypotéze, že trávicí enzymy hrají jednu z hlavních rolí ve vnímavosti či rezistenci flebotomů vůči leishmaniím [103].

Na dalším tématu jsme spolupracovali s kolegy z University of York (UK). Výzkum byl zaměřen na proteiny HASP a SHERP *L. major*, o kterých bylo v podmínkách *in vitro* známo, že jsou exprimovány hlavně u metacyklických stádií leishmanií schopných kolonizovat makrofágy hostitele. Cílem naší práce bylo otestovat roli těchto proteinů pro vývoj leishmanií ve flebotomech. Potvrdili jsme, že protein HASP je ve flebotomech exprimován pouze u metacyklických forem, může být tedy využit jako první známý proteinový marker metacyklů leishmanií. Protein SHERP byl detekován nejen u metacyklických stádií, ale i u leptomonád. Pomocí mutantních linií s delecí *LmcDNA16* lokusu na chromozómu 23, který obsahuje geny obou sledovaných proteinů, jsme dále prokázali jejich význam pro diferenciaci leishmanií v přenašeči. Zatímco kontrolní linie leishmanií kolonizovaly stomodeální valvu

flebotomů druhu *P. papatasi*, linie s delecí lokusu se diferencovaly normálně pouze do stádií dlouhých nektomonád [104].

V další fázi byly *in vivo* a *in vitro* testovány mutantní linie v jednotlivých genech (HASPA1, HASPA2, HASPB, SHERP1, SHERP2) a do výzkumu se zapojili i kolegové z NIH. Zjistili jsme, že tyto geny mají význam i v produkci PSG gelu, který je důležitý pro kolonizaci SV a přenos leishmanií na hostitele. Díky testování mnoha mutantních linií *L. major* jsme také poprvé prokázali specifickou expresi HASPA proteinů: HASPA2 je exprimován pouze u extracelulárních promastigotů zatímco HASPA1 pouze u intracelulárních amastigotů. Zajímavé bylo i zjištění, že homogenát střev flebotomů ovlivňuje diferenciaci leishmanií *in vitro*, vývoj leishmanií ve flebotomech je tedy modulován molekulárními interakcemi mezi parazitem a přenašečem [105].

Další naše práce byla metodického charakteru. Experimentální infekce flebotomů leishmaniami mohou být v laboratoři prováděny buď přímo z promastigotních kultur nebo s použitím amastigotů, tkáňových forem leishmanií. Druhá varianta je sice přirozenější, ale představuje technicky obtížnější a zdouhavější postup. Naším cílem bylo srovnat experimentální infekce flebotomů, které byly iniciovány buď promastigotními nebo amastigotními formami leishmanií. Flebotomové druhu *P. argentipes* byli infikováni promastigoty z log-fáze kultury či amastigoty *L. donovani* získanými z kultury makrofágů. Zjistili jsme, že významný rozdíl byl jen v časných fázích infekce flebotomů, kdy se lišilo množství leishmanií i zastoupení jejich morfologických forem. U zralých infekcí již rozdíly nebyly patrné, v obou případech se vyvinuly silné infekce s kolonizací SV a přítomností metacyklických stádií. Prokázali jsme tedy, že v experimentech, které jsou zaměřeny na sledování zralých infekcí, mohou být amastigotní infekce plně nahrazeny jednodušší metodou promastigotních infekcí [106].

Výzkum interakcí leishmanie – přenašeč pokračuje v několika směrech:

Ve spolupráci s laboratoří prof. Evy Gluenz (Oxford University) zkoumáme roli jednotlivých proteinů bičíku leishmanií při jejich vývoji v přenašečích. Pomocí unikátní metody DNA barcodingu jednotlivých mutantních linií provádíme směsné infekce flebotomů mnoha liniemi najednou a sledujeme rozdíl v jejich schopnosti vývoje v přenašeči. Tato práce byla shrnuta v publikaci, která byla v prosinci 2018 zaslána do PLOS Pathogens.

Pracujeme s leishmaniami podrodu *Sauroleishmania*, jejichž hostiteli jsou primárně plazi. Pro člověka nejsou patogenní a také proto je známo velice málo detailů jejich životního cyklu, většina publikovaných dat pochází z počátku minulého století. Chceme tuto mezeru zaplnit a provádíme proto experimentální infekce flebotomů a gekonů různými druhy podrodu *Sauroleishmania*: *L. (S.) adleri*, *L. (S.) hoogstraali*, *L. (S.) tarentolae* a *L. (S.) gymnodactyli*.

Podobný cíl má také náš výzkum leishmanií podrodu *Mundinia*. Tento podrod leishmanií byl ustaven teprve v roce 2016 a podobně jako v případě podrodu *Sauroleishmania*, ani zde není známo téměř nic o přenašečích ani hostitelích těchto leishmanií. Testujeme tedy schopnost pěti druhů podrodu – *L. (M.) enriettii*, *L. (M.) martiniquensis*, *L. (M.) orientalis*, *L. (M.) macropodum* a *L. (M.)* sp. z Ghany vyvíjet se v těchto druzích u nás chovaných flebotomů, které s nimi v přírodě sdílejí společný areál, např. *L. (M.)*

enriettii – *Lu. migonei*, *L. (M.) martiniquensis* a *L. (M.) orientalis* – *P. argentipes*, *L. (M.)* sp. z Ghany – *P. duboscqi*).

2.2. SEXUÁLNÍ ROZMNOŽOVÁNÍ LEISHMANÍÍ

Sexualita leishmanií a tvorba hybridů na vnitrodruhové i mezidruhové úrovni jsou témata posledních dvou desetiletí, dříve byly leishmanie tradičně považovány za čistě asexuální organismy. V naší laboratoři jsme testovali přirozeně vzniklé hybridy *L. infantum* a *L. major* izolované z pacienta s HIV v Portugalsku [107]. Zatímco *L. infantum* přenášená několika druhy flebotomů podrodu *Larrousius* je původcem závažné viscerální leishmaniózy, *L. major* vázaná na specifické přenašeče *P. papatasi* či *P. duboscqi* je původce lehčí kožní formy leishmaniózy. Experimentální infekce *P. papatasi* prokázaly, že hybridní izolát je schopen vývoje v tomto přenašeči, ve kterém se rodičovská *L. infantum* vyvíjet nedokáže. Pozorovali jsme silné infekce flebotomů s kolonizací SV a tvorbou metacyklických stádií. Nepřímá imunofluorescence s protilátkami specifickými pro lipophosphoglycan (LPG) *L. major* ukázala, že hybridní leishmanie (na rozdíl od *L. infantum*) na svém povrchu exprimují tuto molekulu důležitou pro vývoj ve specifickém přenašeči. Hybridi tedy získali možnost šířit se pomocí dalšího vektora, antropofilního a agresivního druhu flebotoma, často žijícího v blízkosti člověka. Význam tohoto faktu byl vědecké veřejnosti zdůrazněn v Science [41].

Sexuální rozmnožování leishmanií nebylo nikdy pozorováno v savčích hostitelích, probíhá zřejmě pouze v přenašečích. Cílem další naší práce bylo zjistit, v jaké části trávicího traktu flebotomů k tomu dochází a jaká stádia leishmanií se genetické výměny účastní. Ve spolupráci s kolegy z London School of Hygiene and Tropical Medicine jsme prováděli experimentální koinfekce dvou druhů flebotomů dvěma kmeny *L. donovani*, které se lišily rezistencí vůči selekčním antibiotikům (hygromycin vs. neomycin) a fluorescenční značkou (GFP vs. RFP). Střeva flebotomů byla buď použita na kultivace nebo přímo prohlížena pod fluorescenčním mikroskopem či sledována průtokovým cytometrem (FACS) s následnou konfokální mikroskopií selektovaných buněk. Genetické výměny byly v těchto pokusech velmi vzácné a kultivační pokusy na médiu s oběma selekčními antibiotiky byly neúspěšné. Nicméně hybridy byli pozorováni mikroskopicky či zachyceni FACS analýzou v obou druhých flebotomů a to již od druhého dne po sání v částečně natrávené krvi v endoperitrofickém prostoru, a to ve stádiu krátkých procyklických promastigotů [34].

Výzkum v této oblasti pokračuje - vybrali jsme dva čerstvé izoláty *L. donovani* z Etiopie, prováděli amastigotní i promastigotní infekce flebotomů a sledovali výskyt hybridů u přirozených přenašečů i rezistentních druhů flebotomů v různých fázích infekce. Prokázali jsme tvorbu hybridů ve dvou přirozených přenašečích *L. donovani* a získali hybridní izoláty z 10% infikovaných *P. argentipes* a 16% infikovaných *P. orientalis*. Naši kolegové z Londýna dokončují celogenomovou sekvenaci a následnou analýzu těchto izolátů a rodičovských kmenů.

2.3. ALTERNATIVNÍ VEKTOŘI LEISHMANIÍ

Jedinými dosud prokázanými alternativními přenašeči leishmanií (tedy kromě flebotomů) jsou tiplíci (Diptera: Ceratopogonidae). V Austrálii byli v roce 2011 tiplíci podrodu *Forcipomyia* (*Lasiohelea*) prokázáni jako přenašeči pro člověka nepatogenních leishmanií druhu *L. macropodum* [56]. Proto jsme se rozhodli otestovat, zda jsou v tiplících schopny dokončit vývoj pro člověka patogenní druhy leishmanií *L. infantum* a *L. major*. Od kolegů z Institute for Animal Health (IAH, Pirbright, UK) jsme získali tiplíky druhu *Culicoides nubeculosus*. Leishmanie se v nich zdárně vyvíjely pouze do okamžiku defekace, poté se infekce ztrácely. Z metodického hlediska bylo zajímavé, že i 7. den po infekci bylo možné pomocí PCR leishmanie v tiplících detekovat, ačkoliv při mikroskopickém pozorování již infekce přítomny nebyly a rozhodně by tito tiplíci nebyli schopni nakazit hostitele. Tato velmi citlivá metoda tedy musí být interpretována obezřetně zejména při terénních záchytech pozitivních vzorků, kdy je třeba také mikroskopicky potvrdit kvalitu infekce, její lokalizaci a popřípadě přítomnost metacyklických stádií [59].

Tento fakt jsme znovu zdůraznili jako reakci na článek tuniských autorů, kteří popsali nálezy DNA *L. infantum* ve dvou druzích tiplíků v Tunisku a vyvodili z toho, že tito tiplíci slouží jako přenašeči *L. infantum* [57]. Je třeba si uvědomit, že (a) PCR může zachytit i mrtvé buňky či samotnou DNA a (b) parazit sice může nespecificky přežívat v krevsajícím hmyzu časnou fází infekce, ale není přenesen na hostitele, protože ke ztrátě infekce obvykle dochází při defekaci nestrávených zbytků krve. Pro důkaz, že daný druh přenašeče skutečně podporuje vývoj daného druhu parazita, je tedy třeba podložit výsledky PCR mikroskopickým pozorováním vydefekovaných samic se silnou infekcí parazitů a jejich lokalizací slučitelnou s přenosem infekčních stádií [108].

V roce 2014 jsme získali možnost pracovat s dalším druhem tiplíka z IAH v Pirbrightu, severoamerickým *Culicoides sonorensis*. Testovali jsme tentokrát leishmanie podrodu *Mundinia* – australský izolát AM-2004 (*L. macropodum*) a brazilskou *L. enriettii* ve dvou druzích tiplíků (*C. nubeculosus*, *C. sonorensis*) a v permissivních flebotomech *L. longipalpis*. Navíc jsme sledovali vývoj *L. enriettii* v morčatech a křečcích. Tiplíci druhu *C. nubeculosus* nepodporovali vývoj leishmanií z podrodu *Mundinia* a ani v *L. longipalpis* netvořily tyto leishmanie zralé infekce. Naopak, v *C. sonorensis* jsme pozorovali zralé infekce včetně kolonizací stomodeální valvy. V morčatech tvořila *L. enriettii* progresivní infekce s ulcerujícími lézemi a xenodiagnostické pokusy ukázaly, že se při sání v místě lézí nakazilo větší procento tiplíků *C. sonorensis*, než flebotomů *L. longipalpis* (až 80% vs. max. 50%). Tyto výsledky podporují tezi, že tiplíci mohou být zapojeni do přenosu některých druhů leishmanií, a to právě zástupců podrodu *Mundinia* [60].

V současné době se chystáme v tiplících *C. sonorensis* testovat další leishmanie podrodu *Mundinia* - *L. martiniquensis*, *L. orientalis* a dosud druhově nepojmenovanou *L. sp.* z Ghany. U žádného z těchto pro člověka patogenních druhů není přenašeč znám a tak je mimořádně zajímavé zjistit, jak úspěšný bude jejich vývoj v tiplících.

2.4. REZERVOÁROVÍ HOSTITELÉ LEISHMANIÍ A EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE HOSTITELŮ.

Pro rozvoj infekcí v hostiteli má veliký význam množství leishmanií, které flebotomové vpraví do těla hostitele během sání. Znalost tohoto parametru je základním předpokladem pro provádění relevantních experimentálních infekcí v laboratořích. Cílem naší práce bylo zjistit rozmezí počtu přenášených leishmanií na modelu dvou druhů flebotomů (*P. perniciosus* a *Lu. longipalpis*) nakažených dvěma kmeny *L. infantum*, kterým bylo umožněno sání na anestetizovaných BALB/c myších. Infikované samice, které přenesly leishmanie na myš, strávily sáním signifikantně delší čas, než samice, které leishmanie nepřenesly. Počty přenesených leishmanií stanovené pomocí qPCR se pohybovaly od desítek po 4×10^4 leishmanií. Jelikož se pro iniciace experimentálních infekcí běžně používají daleko vyšší počty ($10^7 - 10^8$ leishmanií), je třeba tyto výsledky brát v potaz při designování pokusů [110].

S touto znalostí jsme zavedli nový laboratorní model pro testování viscerální leishmaniózy působené *L. donovani* na BALB/c myších. Myši byly intradermálně inokulované leishmaniami získanými z infikovaných flebotomů, proto inokulum obsahovalo převážně metacyklické infekční formy leishmanií v množství odpovídajícím přirozené nákaze. Myši byly poté v dvoutýdenních intervalech vystavovány sání naivních flebotomů pro testování jejich infektivy pro hostitele. Po skončení pokusu byly z myší odebrány vzorky tkání pro určení lokalizace infekce v jejich těle. Ačkoliv myši nevykazovaly vnější známky infekce, jejich infektivita pro flebotomy byla v místě inokulace velmi vysoká, pohybovala se okolo 20%. Paraziti byli detekováni jak v místě inokulace (ušní boltce), tak ve spádových uzlinách, ve slezině, játrech, krvi a někdy i na dalších exponovaných místech. BALB/c myši jsou tedy výborným laboratorním modelem pro studium asymptomatického typu onemocnění působeného *L. donovani* [111].

Náš výzkum se ubíral i směrem hledání rezervoárových zvířat v endemických lokalitách, konkrétně v Etiopii, kde sice VL ohrožuje životy tisíců lidí, ale role RH *L. donovani* stále není jasná. Tento výzkum probíhal v rámci mezinárodního grantu od nadace Billa a Melindy Gatesových a spolupracovali jsme s kolegy z izraelské Hebrew University a etiopské Addis Ababa University. Odchyt hlodavců probíhal na 41 lokalitách, odchyceno bylo 586 hlodavců 21 rodů a 38 druhů. DNA leishmanií byla detekována pomocí qPCR kinetoplastové DNA a druhová příslušnost ověřena sekvenací ITS1 genu. Kinetoplastová DNA leishmanií byla přítomna u 8.2% hlodavců, přičemž *L. donovani* byla prokázána u *Arvicanthis* sp., *Mastomys erythroleucus* a *Gerbilliscus nigricaudus* a *L. tropica* u *Arvicanthis* sp., *Acomys* sp. a *Gerbillus nanus*. Tato práce prokázala, že hlodavce je třeba považovat za potenciální rezervoárové hostitele leishmanií v těchto endemických lokalitách [112]. Další výzkum byl poté cílený na detekci leishmanií u netopýřů. Přirozené infekce netopýřů leishmaniami byly popsány z Nového světa, ale ze Starého světa dosud takové důkazy chyběly. Na různých lokalitách Etiopie bylo odchyceno 163 netopýřů – zástupců 23 druhů osmnácti rodů. Z tohoto počtu byla kDNA leishmanií přítomna u 4.9% jedinců, přičemž sekvenace genů pro ITS prokázala, že šlo o *L. tropica* (u netopýřů druhu *Cardioderma cor*) a *L. major* (u druhu *Nycteris hispida*). Popsali jsme tedy poprvé přítomnost leishmanií u netopýřů Starého světa, což je výzvou pro další výzkum jejich potenciální rezervoárové role [113].

Na tento terénní výzkum navazují v současné době laboratorní experimenty. Na katedře parazitologie jsme zavedli chov subsaharských druhů hlodavců *Arvicanthis*

neumanni, *A. niloticus* a *Mastomys natalensis*. V rámci projektu podporovaného agenturou GAČR je testujeme jako možné rezervoárové hostitelé (RH) tří druhů subsaharských leishmanií. V roce 2018 jsme dokončili sérii pokusů s *L. major*, původcem CL. Hlavními RH *L. major* jsou *Rhombomys opimus* ve Střední Asii a *Psammomys obesus* a hlodavci rodu *Meriones* v oblasti Severní Afriky a Předního východu, ovšem RH *L. major* v subsaharské Africe dosud známi nejsou. Paraziti nebo jejich DNA byli detekováni v několika druzích hlodavců žijících v této oblasti, mezi nimi nejčastěji právě v zástupcích rodů *Arvicanthis* a *Mastomys*. Samotná přítomnost parazita ale neznámá, že jde opravdu o RH. Je nutno odlišit skutečného RH od hostitele náhodného, který není schopen nakazit přenašeče a podporovat tedy životní cyklus parazita. Takový důkaz se dá nejlépe provést pomocí xenodiagnostiky, tedy sání naivních přenašečů (flebotomů) na nakaženém hostiteli s následným průkazem leishmanií ve flebotomech. Pomocí experimentálních infekcí hlodavců jsme mohli porovnat tři druhy hostitelů v délce trvání infekce, množství a lokalizaci leishmanií v jejich těle a jejich infektivitu a atraktivitu pro flebotomy. Výsledky ukazují, že ve všech třech studovaných druzích hlodavců lze leishmanie prokázat po několika měsících a bez viditelných zdravotních komplikací a že tyto hlodavci jsou infekční pro flebotomy. Ovšem v případě *Mastomys natalensis* jsme zaznamenali vyšší procento nakažených jedinců, generalizovanější distribuci leishmanií a delší období infekivity pro flebotomy než u druhů rodu *Arvicanthis*, což naznačuje, že zástupci rodu *Mastomys* hrají významnější rezervoárovou roli v koloběhu *L. major* v subsaharské oblasti. Je zajímavé, že infektivita různých použitých izolátů *L. major* se významně lišila, izolát z Předního východu působil slabší infekce než subsaharské izoláty.

V současné době ověřujeme vnímavost hlodavců rodu *Arvicanthis* a *Mastomys* k dalším druhům leishmanií patogenních pro člověka v subsaharské Africe - *L. donovani* a *L. sp.* z Ghany.

Dalším naším cílem je testování morčat jako modelových zvířat pro výzkum leishmaniózy působených leishmaniemi podrodu *Mundinia*. Morčata jsou jediným dosud známým zvířetem, ve kterém se úspěšně vyvíjí *L. enriettii*, s ostatními druhy podrodu *Mundinia* nebyly experimentální infekce hostitelů zatím prováděny.

Pracujeme také na zavedení modelového využití dalších druhů hlodavců ve výzkumu leishmaniózy. Ověřujeme hostitelskou kompetenci křečků čínských (*Cricetulus migratorius*), křečků džungarských (*Phodopus sungorus*) a pestrůšek písečných (*Lagurus lagurus*) pro různé druhy leishmanií. Podle předběžných výsledků experimentálních infekcí *L. major* jsou křečci čínští dobrým modelem přirozeného hostitele tohoto parazita, křečci džungarští jsou velmi vnímaví a nedokážou onemocnět kontrolovat obdobně jako imunodeficientní BALB/c myši („non-healing phenotype“). Naproti tomu pestrůšky jsou sice také vnímavé a parazit se šíří do vnitřních orgánů, ale dochází u nich k hojení lézí („healing phenotype“). Dále testujeme vnímavost těchto druhů hlodavců pro *L. donovani*, *L. braziliensis* a *L. peruviana*.

3. SEZNAM CITACÍ.

- [1] R. W. Ashford, "The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses," *Int. J. Parasitol.*, vol. 30, no. 12–13, pp. 1269–1281, 2000.
- [2] M. Akhoundi *et al.*, "A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 10, no. 3, pp. 1–40, 2016.
- [3] R. Mejia, "Clinical aspects in immunocompetent and immunocompromised patients," in *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*, F. Bruschi and L. Gradoni, Eds. Springer, 2018, pp. 127–136.
- [4] R. Reithinger, K. Aadil, J. Kolaczinski, M. Mohsen, and S. Hami, "Social impact of leishmaniasis, Afghanistan," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 11, no. 4, pp. 634–636, 2005.
- [5] E. E. Zijlstra, "The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL)," *Parasite. Vector.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–9, 2016.
- [6] J. Alvar *et al.*, "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence," *PLoS One*, vol. 7, no. 5, 2012.
- [7] H. W. Copeland, B. A. Arana, and T. R. Navin, "Comparison of active and passive case detection of cutaneous leishmaniasis in Guatemala," *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 43, no. 3, pp. 257–259, 1990.
- [8] S. M. Collin, P. G. Coleman, K. Ritmeijer, and R. N. Davidson, "Unseen Kala-azar deaths in south Sudan (1999–2002)," *Trop. Med. Int. Heal.*, vol. 11, no. 4, pp. 509–512, 2006.
- [9] L. Gradoni, "A brief introduction to leishmaniasis epidemiology," in *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*, L. Bruschi, F., Gradoni, Ed. 2018, pp. 1–13.
- [10] R. Monge-Maillo, B. and López-Vélez, "Treatment of visceral leishmaniasis," in *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*, L. Bruschi, F., Gradoni, Ed. 2018, pp. 169–190.
- [11] R. Article, M. Maroli, M. D. Feliciangeli, L. Bichaud, R. N. Charrel, and L. Gradoni, "Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern," *Med. Vet. Entomol.*, vol. 27, no. 2, pp. 123–147, 2013.
- [12] S. Kamhawi, "Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?," *Trends Parasitol.*, vol. 22, no. 9, pp. 439–445, 2006.
- [13] M. Ramalho-Ortigao, "Sand fly-*Leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy," *Open Parasitol. J.*, vol. 4, no. 1, pp. 195–204, 2010.
- [14] P. Bates and M. Rogers, "New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*," *Curr. Mol. Med.*, vol. 4, no. 6, pp. 601–609, 2004.
- [15] P. F. P. Pimenta *et al.*, "Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand

- flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan," vol. 91, pp. 9155–9159, 1994.
- [16] S. Kamhawi *et al.*, "A role for insect galectins in parasite survival," vol. 119, no. 1999, pp. 329–341, 2004.
- [17] J. Myskova, M. Svobodova, S. M. Beverley, and P. Volf, "A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies," vol. 9, pp. 317–324, 2007.
- [18] M. J. Lehane, "Peritrophic matrix structure and function," *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 42, no. 100, pp. 525–50, 1997.
- [19] W. Peters, *Peritrophic membranes*. Berlin: Springer, 1992.
- [20] V. Pascoa *et al.*, "*Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion," *Insect Biochem. Mol. Biol.*, vol. 32, no. 5, pp. 517–523, 2002.
- [21] Borovsky, D. and Y. Schlein, "Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence," *Med. Vet. Entomol.*, vol. 1, pp. 235–242, 1987.
- [22] Y. Schlein and H. Romano, "*Leishmania major* and *L. donovani*: Effects on proteolytic enzymes of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae)," *Exp. Parasitol.*, vol. 62, no. 3, pp. 376–380, 1986.
- [23] P. F. P. Pimenta, G. B. Modi, S. T. Pereira, M. Shahabuddin, and D. L. Sacks, "A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut," *Parasitology*, vol. 115, no. 4, pp. 359–369, 1997.
- [24] L. C. Feng, "The role of the peritrophic matrix in *Leishmania* and *Trypanosoma* infections of sand flies," *Peking Nat. Hist. Bull.*, vol. 19, pp. 327–334, 1951.
- [25] J. Sadlova and P. Volf, "Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development.," *Cell Tissue Res.*, vol. 337, pp. 313–325, 2009.
- [26] M. E. Rogers, M. L. Chance, and P. A. Bates, "The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*," *Parasitology*, vol. 124, no. 5, pp. 495–507, 2002.
- [27] P. A. Bates, "Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies," *Int. J. Parasitol.*, vol. 37, no. 10, pp. 1097–1106, 2007.
- [28] J. J. Lainson, R., Ward, R.D., Shaw, "*Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes," *Proc. R. Soc. Lond. B*, vol. 199, pp. 309–320, 1977.
- [29] M. Tibayrenc and F. J. Ayala, "The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on," *Trends Parasitol.*, vol. 18, no. 9, pp. 405–410, 2002.
- [30] K. Victoir and J. Dujardin, "How to succeed in parasitic life without sex ? Asking *Leishmania*," *Trends Parasitol.*, vol. 18, no. 2, pp. 81–85, 2002.
- [31] M. A. Miles, M. Yeo, and I. L. Mauricio, "Genetics: *Leishmania* exploit sex," *Science*, vol. 324, no. 5924, pp. 187–189, 2009.

- [32] N. S. Akopyants *et al.*, “Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly,” *Science*, vol. 324, no. 5924, pp. 265–268, 2009.
- [33] E. Inbar *et al.*, “The mating competence of geographically diverse *Leishmania major* strains in their natural and unnatural sand fly vectors,” *PLoS Genet.*, vol. 9, no. 7, 2013.
- [34] J. Sadlova *et al.*, “Visualisation of *Leishmania donovani* fluorescent hybrids during early stage development in the sand fly vector,” *PLoS One*, vol. 6, no. 5, 2011.
- [35] E. Calvo-Álvarez *et al.*, “First evidence of intraclonal genetic exchange in trypanosomatids using two *Leishmania infantum* fluorescent transgenic clones,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 8, no. 9, 2014.
- [36] A. Romano, E. Inbar, A. Debrabant, M. Charmoy, P. Lawyer, and F. Ribeiro-gomes, “Cross-species genetic exchange between visceral and cutaneous strains of *Leishmania* in the sand fly vector,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 47, pp. 16808–16813, 2014.
- [37] D. A. Maslov, F. R. Opperdoes, A. Y. Kostygov, H. Hashimi, J. Lukeš, and V. Yurchenko, “Recent advances in trypanosomatid research: genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution,” *Parasitology*, vol. 146, pp. 1–27, 2018.
- [38] D. Nolder, N. Roncal, C. R. Davies, A. Llanos-Cuentas, and M. A. Miles, “Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of mucocutaneous leishmaniasis,” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 76, no. 3, pp. 573–578, 2007.
- [39] S. Cortes *et al.*, “In vitro and in vivo behaviour of sympatric *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, *L. (V.) peruviana* and their hybrids,” *Parasitology*, vol. 139, no. 2, pp. 191–199, 2012.
- [40] P. Volf, I. Benkova, J. Myskova, J. Sadlova, L. Campino, and C. Ravel, “Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids,” *Int. J. Parasitol.*, vol. 37, no. 6, pp. 589–593, 2007.
- [41] J. Volf, P., Sadlova, “Sex in *Leishmania*,” *Science*, vol. 324, p. 1644, 2009.
- [42] R. Killick-Kendrick, “The biology and control of Phlebotomine sand flies,” *Clin. Dermatol.*, vol. 17, no. 3, pp. 279–289, 1999.
- [43] P. D. Ready, “Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents,” *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 58, no. 1, pp. 227–250, 2013.
- [44] F. A. Colombo, R. M. F. N. Odorizzi, M. D. Laurenti, E. A. B. Galati, F. Canavez, and V. L. Pereira-Chioccola, “Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs,” *Parasitol. Res.*, vol. 109, no. 2, pp. 267–274, 2011.
- [45] L. Solano-Gallego *et al.*, “Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis,” *Parasit. Vector.*, vol. 5, no. 1, p. 98, 2012.
- [46] V. Medeiros-Silva *et al.*, “Successful isolation of *Leishmania infantum* from *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) collected from naturally infected dogs,” *BMC Vet. Res.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–7, 2015.

- [47] F. Dantas-Torres *et al.*, "Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy," *Parasitol. Res.*, vol. 106, no. 4, pp. 857–860, 2010.
- [48] F. Dantas-Torres, T. F. Martins, M. D. Paiva-Cavalcanti, L. A. Figueredo, B. S. Lima, and S. P. Brandão-Filho, "Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*," *Exp. Parasitol.*, vol. 125, no. 2, pp. 184–185, 2010.
- [49] F. Dantas-Torres, M. S. Latrofa, and D. Otranto, "Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*," *Parasite. Vector.*, vol. 4, no. 1, pp. 2–5, 2011.
- [50] M. T. Zanatta Coutinho *et al.*, "Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis," *Vet. Parasitol.*, vol. 128, no. 1–2, pp. 149–155, 2005.
- [51] F. Dantas-Torres, "Ticks as vectors of *Leishmania* parasites," *Trends Parasitol.*, vol. 27, no. 4, pp. 155–159, 2011.
- [52] R. C. S. de Moraes *et al.*, "Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR," *Exp. Appl. Acarol.*, vol. 59, no. 4, pp. 473–481, 2013.
- [53] M. T. Z. Coutinho and P. M. Linardi, "Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals?," *Vet. Parasitol.*, vol. 147, no. 3–4, pp. 320–325, 2007.
- [54] M. G. P. A. Ferreira, K. R. Fattori, F. Souza, and V. M. F. Lima, "Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp.," *Vet. Parasitol.*, vol. 165, no. 1–2, pp. 150–154, 2009.
- [55] K. Rose *et al.*, "Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms," *Int. J. Parasitol.*, vol. 34, no. 6, pp. 655–664, 2004.
- [56] A. M. Dougall *et al.*, "Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia," *Int. J. Parasitol.*, vol. 41, no. 5, pp. 571–579, 2011.
- [57] D. Slama, N. Haouas, L. Remadi, H. Mezhoud, H. Babba, and E. Chaker, "First detection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae)," *Parasite. Vector.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–3, 2014.
- [58] J. M. M. Rebêlo *et al.*, "Detection of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* in *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in the Brazilian Amazonia," *J. Vector Ecol.*, vol. 41, no. 2, pp. 303–308, 2016.
- [59] V. Seblova *et al.*, "Development of *Leishmania* parasites in *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae) and implications for screening vector competence," *J. Med. Entomol.*, vol. 49, no. 5, pp. 967–970, 2012.
- [60] V. Seblova *et al.*, "The biting midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) is capable of developing late stage infections of *Leishmania enriettii*," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 9, no. 9, pp. 1–15, 2015.

- [61] R. W. Ashford, "Leishmaniasis reservoirs and their significance in control," *Clin. Dermatol.*, vol. 14, no. 5, pp. 523–532, 1996.
- [62] F. S. Oliveira, R. P. Brazil, and R. S. Pacheco, "Response to Silva et al. : Usefulness of PCR-based methods for screening *Leishmania* in epidemiological studies.," *Trends Parasitol.*, vol. 21, no. 12, pp. 552–553, 2005.
- [63] J. J. Shaw and R. Lainson, "Ecology and epidemiology: New World.," in *The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Volume I.*, 1987, pp. 291–364.
- [64] D. T. Haydon, S. Cleaveland, L. H. Taylor, and M. K. Laurensen, "Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical challenge," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 8, no. 12, pp. 1468–1473, 2002.
- [65] L. F. Chaves, M. J. Hernandez, A. P. Dobson, and M. Pascual, "Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis," *Trends Parasitol.*, vol. 23, no. 7, pp. 311–316, 2007.
- [66] D. Sacks and N. Noben-Trauth, "The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 11, pp. 845–858, 2002.
- [67] T. Lestinova, I. Rohousova, M. Sima, C. I. de Oliveira, and P. Volf, "Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 11, no. 7, pp. 1–26, 2017.
- [68] N. E. Loría-Cervera and J. F. Andrade-Narváez, "Animal models for the study of leishmaniasis immunology," *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, vol. 56, no. 1, pp. 1–11, 2014.
- [69] M. E. Wilson, S. M. B. Jeronimo, and R. D. Pearson, "Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species," *Microb. Pathog.*, vol. 38, no. 4, pp. 147–160, 2005.
- [70] P. C. Melby, B. Chandrasekar, W. Zhao, and J. E. Coe, "The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: Progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response," *J. Immunol.*, vol. 166, no. 3, pp. 1912–1920, 2001.
- [71] L. E. Perez *et al.*, "Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen," *J. Immunol.*, vol. 176, no. 9, pp. 5519–5528, 2006.
- [72] R. Gomes *et al.*, "Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 22, pp. 7845–7850, 2008.
- [73] J. El-On, A. Witztum, and L. F. Schnur, "Protection of guinea pigs against cutaneous leishmaniasis by combined infection and chemotherapy," *Infect. Immun.*, vol. 51, no. 2, pp. 704–706, 1986.
- [74] A. D. Bryceson, R. S. Bray, R. A. Wolstencroft, and D. C. Dumonde, "Cell mediated immunity in cutaneous leishmaniasis of the guinea-pig.," *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 64, no. 4, p. 472, 1970.
- [75] C. D. R. Paula, H. Friedman, and R. N. R. Sampaio, "Use of *Cavia porcellus* (guinea pigs)

- as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis*," *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, vol. 11, no. 4, pp. 605–609, 2005.
- [76] C. Maia, M. Nunes, J. Cristóvão, and L. Campino, "Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up," *Acta Trop.*, vol. 116, no. 3, pp. 193–199, 2010.
- [77] E. Pinelli, R. Killick-Kendrick, J. Wagenaar, W. Bernadina, D. E. L. Real, and J. Ruitenbergh, "Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*," *Infect. Immun.*, vol. 62, no. 1, pp. 229–235, 1994.
- [78] D. Menezes-Souza *et al.*, "Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status," *Vet. Parasitol.*, vol. 177, no. 1–2, pp. 39–49, 2011.
- [79] V. F. Amaral, C. Pirmez, A. J. S. Gonçalves, V. Ferreira, and G. Grimaldi Jr, "Cell populations in lesions of cutaneous leishmaniasis of *Leishmania (L.) amazonensis*-infected Rhesus Macaques, *Macaca mulatta*," *Cell*, vol. 95, no. 2, pp. 209–216, 2000.
- [80] V. F. Amaral *et al.*, "*Leishmania (Leishmania) major*-infected Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*) develop varying levels of resistance against homologous re-infections," *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 96, no. 6, pp. 795–804, 2001.
- [81] R. J. Probst, B. T. Wellde, and P. G. Lawyer, "Rhesus monkey model for *Leishmania major* transmitted by *Phlebotomus papatasi* sand fly bites," *Med. Vet. Entomol.*, pp. 12–21, 2001.
- [82] J. R. Broderson, W. L. Chapman, and W. L. Hanson, "Experimental visceral leishmaniasis in the owl monkey," *Vet. Pathol.*, vol. 23, pp. 293–302, 1986.
- [83] V. A. Dennis, R. Lujan, W. L. Chapman, and L. Hanson, "*Leishmania donovani*: Cellular and humoral immune responses primary and challenge infections in squirrel monkeys, *Saimiri sciureus*," *Exp. Parasitol.*, vol. 334, pp. 319–334, 1986.
- [84] S. Niewiesk and G. Prince, "Diversifying animal models: the use of hispid cotton rats (*Sigmodon hispidus*) in infectious diseases," *Lab. Anim.*, vol. 36, no. 4, pp. 357–372, 2002.
- [85] R. Lainson and J. Strangways-Dixon, "The epidemiology of dermal leishmaniasis in British Honduras. Part II. Reservoir hosts of *Leishmania mexicana* among the forest rodents," *Trop. Med. Hygiene*, vol. 58, no. 2, pp. 136–153, 1964.
- [86] J. D. Fulton and Niven J.S.F., "Studies on protozoa. Part 3. Visceral leishmaniasis in the cotton rat (*Sigmodon hispidus*)," *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 44, no. 6, pp. 717–724, 1951.
- [87] J. D. Fulton, L. P. Joyner, and R. L. Chandler, "Studies on protozoa. Part 2. The golden hamster (*Cricetus auratus*) and cotton rat (*Sigmodon hispidus*) as experimental hosts for *Leishmania donovani*," *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 44, no. 1, pp. 105–109, 1950.
- [88] A. L. R. Roque, E. Cupolillo, R. S. Marchevsky, and A. M. Jansen, "*Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: Patterns of experimental infection," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 4, no. 2,

2010.

- [89] N. R. Van Wynsberghe, S. B. Canto-Lara, E. I. Sosa-Bibiano, N. A. Rivero-Cardenas, and F. J. Andrade-Narvaez, "Comparison of small mammal prevalence of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in five foci of cutaneous leishmaniasis in the State of Campeche, Mexico," *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, vol. 51, no. 2, pp. 87–94, 2009.
- [90] E. I. Sosa-Bibiano, N. R. Van Wynsberghe, S. B. Canto-Lara, and F. J. Andrade-Narvaez, "Preliminary study towards a novel experimental model to study localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) mexicana*," *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, vol. 54, no. 3, pp. 165–170, 2012.
- [91] E. N. Loría-Cervera *et al.*, "Nitric oxide production by *Peromyscus yucatanicus* (Rodentia) infected with *Leishmania (Leishmania) mexicana*," *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 108, no. 2, pp. 172–177, 2013.
- [92] C. W. Young and P.-Y. Liu, "Susceptibility of field, house and laboratory rodents to infection with *Leishmania donovani*," *Exp. Biol. Med.*, vol. 23, no. 5, pp. 392–395, 1926.
- [93] G. Li-ren, Y. Yuan-qing, Q. Jing-qi, and S. Wei-xia, "Discovery and study of *Leishmania turanica* for the first time in China," *Bull. World Health Organ.*, vol. 73, no. 5, pp. 667–672, 1995.
- [94] Z. R. Lun *et al.*, "Visceral leishmaniasis in China: An endemic disease under control," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 28, no. 4, pp. 987–1004, 2015.
- [95] C. H. N. Costa *et al.*, "Vaccines for the leishmaniases: Proposals for a research agenda," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 5, no. 3, pp. 1–9, 2011.
- [96] P. Volf, M. Hajmova, J. Sadlova, and J. Votypka, "Blocked stomodeal valve of the insect vector: Similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models," *Int. J. Parasitol.*, vol. 34, no. 11, pp. 1221–1227, 2004.
- [97] M. E. Rogers *et al.*, "*Leishmania chitinase* facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice," *Cell. Microbiol.*, vol. 10, no. 6, pp. 1363–1372, 2008.
- [98] Y. Schlein, R. L. Jacobson, and J. Shlomai, "Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 245, no. 1313, pp. 121–126, 1991.
- [99] J. Sadlova, V. Dvorak, V. Seblova, A. Warburg, J. Votypka, and P. Volf, "*Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to humans," *Parasit. Vector.*, vol. 6, no. 1, p. 186, 2013.
- [100] K. Pruzinova, J. Sadlova, V. Seblova, M. Homola, J. Votypka, and P. Volf, "Comparison of bloodmeal digestion and the peritrophic matrix in four sand fly species differing in susceptibility to *Leishmania donovani*," *PLoS One*, vol. 10, no. 6, pp. 1–15, 2015.
- [101] J. Sadlova, M. Homola, J. Myskova, M. Jancarova, and P. Volf, "Refractoriness of *Sergentomyia schwetzi* to *Leishmania* spp. is mediated by the peritrophic matrix," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 12, no. 4, p. e0006382, 2018.
- [102] Y. Schlein and R. L. Jacobson, "Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloodmeal," *Parasitology*, vol. 117, no. 5, pp. 467–473, 1998.

- [103] K. Pruzinova, J. Sadlova, J. Myskova, T. Lestinova, J. Janda, and P. Volf, “*Leishmania* mortality in sand fly blood meal is not species-specific and does not result from direct effect of proteinases,” *Parasite. Vector.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–9, 2018.
- [104] J. Sadlova, H. P. Price, B. A. Smith, J. Votypka, P. Volf, and D. F. Smith, “The stage-regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*,” *Cell. Microbiol.*, vol. 12, no. 12, 2010.
- [105] J. S. P. Doehl *et al.*, “*Leishmania* HASP and SHERP genes are required for *in vivo* differentiation, parasite transmission and virulence attenuation in the host,” *PLoS Pathog.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–35, 2017.
- [106] J. Sadlova, J. Myskova, T. Lestinova, J. Votypka, M. Yeo, and P. Volf, “*Leishmania donovani* development in *Phlebotomus argentipes*: Comparison of promastigote- and amastigote-initiated infections,” *Parasitology*, vol. 144, no. 4, pp. 403–410, 2017.
- [107] C. Ravel, S. Cortes, F. Pratlongs, F. Morio, J. Dedet, and L. Campino, “First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*,” *Int. J. Parasitol.*, vol. 36, pp. 1383–1388, 2006.
- [108] V. Seblova, J. Sadlova, S. Carpenter, and P. Volf, “Speculations on biting midges and other bloodsucking arthropods as alternative vectors of *Leishmania*,” *Parasite. Vector.* vol. 7, no. 1, pp. 1–2, 2014.
- [109] V. Seblova *et al.*, “The biting midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) is capable of developing late stage infections of *Leishmania enriettii*,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 9, no. 9, 2015.
- [110] C. Maia, V. Seblova, J. Sadlova, J. Votypka, and P. Volf, “Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: A comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 5, no. 6, pp. 1–6, 2011.
- [111] J. Sadlova, V. Seblova, J. Votypka, A. Warburg, and P. Volf, “Xenodiagnosis of *Leishmania donovani* in BALB/c mice using *Phlebotomus orientalis*: A new laboratory model,” *Parasite. Vector.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–8, 2015.
- [112] A. Kassahun *et al.*, “Detection of *Leishmania donovani* and *L. tropica* in Ethiopian wild rodents,” *Acta Trop.*, vol. 145, pp. 39–44, 2015.
- [113] A. Kassahun *et al.*, “Natural infection of bats with *Leishmania* in Ethiopia,” *Acta Trop.*, vol. 150, pp. 166–170, 2015.