

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta
katedra parazitologie**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Dominika Bačíková

**Vývoj bičíkovců rodu *Porcisia* a podrodu *Mundinia* ve
flebotomech (Diptera: Psychodidae) a tiplicích (Diptera:
Ceratopogonidae)**

Development of flagellates of the genus *Porcisia* and subgenus *Mundinia* in
phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and ceratopogonid midges
(Diptera: Ceratopogonidae)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: doc. RNDr. Jovana Sádlová Ph.D.

Praha 2022

Prohlášení

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

V Praze, dne 13.6.2022

.....
Dominika Bačiková

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat své školitelce doc. RNDr. Jovaně Sádlové, Ph.D. za velmi vstřícný přístup, velkou pomoc a ochotu. Dále bych ráda poděkovala mému konzultantovi Mgr. Tomáši Bečváři za odborné vedení a pomoc při pokusech týkajících se molekulární části práce. Mé díky patří také všem, kteří jakýmkoliv způsobem přispěli k tomu, aby byla práce dovedena do této podoby. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také mé rodině a přáteli, kteří mi byli oporou v době sepisování této práce.

ABSTRAKT

Hlavní část diplomové práce je věnována bičíkovcům rodu *Porcisia*, parazitujícím u amerických stromových dikobrazů, jejichž přenašeči dosud nebyli popsáni. Pomocí experimentálních infekcí byl studován vývoj obou známých zástupců tohoto rodu (*P. deanei* a *P. hertigi*) ve dvou druzích flebotomů (*Lutzomyia migonei*, *Lu. longipalpis*) a tiplících *Culicoides sonorensis*. Zatímco *P. hertigi* nepřežívala defekaci samic žádného z přenašečů, *P. deanei* tvořila silné zralé infekce u 51–61 % samic *Lu. longipalpis* a v menším procentu i v *Lu. migonei* (7 %) a *C. sonorensis* (7 %). *Porcisie* vykazovaly výrazně menší rozměry, než kontrolní druh *L. infantum*, ale tvořily stejné morfologické formy. Výjimečná byla lokalizace *P. deanei*, infekce byly detekovány u všech tří přenašečů převážně v malpigických trubících. Další pokusy prokázaly přítomnost *P. deanei* v moči *Lu. longipalpis* vylučované při prediurezi a úspěšný přenos parazita na BALB/c myš touto unikátní cestou. *Lutzomyia longipalpis* je tedy kompetentním přenašečem *P. deanei*, ale do přenosu mohou být na endemických lokalitách zapojeny i další druhy flebotomů či tiplíků.

Menší část práce je věnována porovnání morfologie zástupců podrodu *Mundinia* – *L. martiniquensis* a *L. orientalis* – při vývoji v tiplících *C. sonorensis* a flebotomech *Phlebotomus argentipes*. Oba druhy tvořily v obou přenašečích stejné morfologické formy a jejich relativní zastoupení ani rozměry se signifikantně nelišily.

Klíčová slova

Porcisia, *Mundinia*, flebotomus, tiplík, prediurese, malpigické trubice

ABSTRACT

The main part of the thesis is focused on flagellates of the genus *Porcisia*, parasitizing Neotropical porcupines with unknown vectors. The development of two known species of this genus (*P. deanei* and *P. hertigi*) in two sand fly species (*Lu. migonei*, *Lu. longipalpis*) and biting midges *C. sonorensis* was studied using experimental infections. While *P. hertigi* did not survive defecation in females of either vector, *P. deanei* formed strong mature infections in 51–61% of *Lu. longipalpis* and in a smaller percentage in *Lu. migonei* (7 %) and *C. sonorensis* (7 %). *Porcisia* showed significantly smaller size than the control species *L. infantum* but formed the same morphological forms. The localization of *P. deanei* was exceptional; infections were detected predominantly in Malpighian tubules. Further experiments demonstrated the presence of *P. deanei* in the urine of *Lu. longipalpis* excreted during prediuresis and successful transmission of parasites to BALB/c mice by this unique route. Thus, *Lu. longipalpis* is a competent vector of *P. deanei*, but other vector species may be involved in transmission at endemic localities.

A minor part is focused on the comparison of the morphology of two *Mundinia* species - *L. martiniquensis* and *L. orientalis* – during development in biting midges *C. sonorensis* and sand flies *Ph. argentipes*. Both species formed the same morphological forms in both vectors and their relative representation and measurements were not significantly different.

Keywords

Porcisia, *Mundinia*, phlebotomus, biting midges, prediuresis, Malpighian tubules

Seznam zkratek

AMG – abdominální mesenteron

C. – *Culicoides*

EN – dlouhé nektomonády

EP – endoperitrofický prostor

L. – *Leishmania*

Lu. – *Lutzomyia*

MC – metacykličtí promastigoti

LE – leptomonády (krátkí promastigoti)

MT – malpigické trubice

P. – *Porcisia*

PCR – polymerázová řetězová reakce

Ph. – *Phlebotomus*

PI – po infekci

PP – procykličtí promastigoti

PSG – promastigote secretory gel

SV – stomodeální valva

TMG – thorakální mesenteron

Obsah

Seznam tabulek	1
Seznam obrázků	2
1 Úvod a cíle práce.....	3
2 Literární přehled.....	5
2.1 Taxonomické zařazení rodu <i>Leishmania</i>	5
2.2 Rod <i>Leishmania</i> a jeho životní cyklus	6
2.3 Přenašeči leishmanií.....	8
2.4 Patologie a rozšíření leishmaniózy.....	10
2.5 Podrod <i>Mundinia</i>	12
2.5.1 <i>Leishmania enriettii</i>	13
2.5.2 <i>Leishmania martiniquensis</i>	14
2.5.3 <i>Leishmania macropodum</i>	14
2.5.4 <i>Leishmania orientalis</i>	15
2.5.5 <i>Leishmania</i> sp. z Ghany	15
2.6 Rod <i>Porcisia</i>	16
3 Materiál a metodika.....	17
3.1 Složení použitých roztoků.....	17
3.2 Kultivace leishmanií.....	17
3.3 Chov flebotomů.....	17
3.4 Experimentální infekce flebotomů a tiplíků.....	19
3.5 Pítky a vyšetření střev hmyzu	19
3.6 Příprava roztlakových preparátů a jejich barvení.....	19
3.7 Měření morfologických forem	20
3.8 Statistika.....	21
3.9 Přenosové experimenty	21
3.10 Izolace DNA.....	22
3.11 PCR detekce	22
3.12 Gelová elektroforéza	24
3.13 Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii.....	24
3.14 Pokusy s prediurezií	25
4 Výsledky	26

4.1	Vývoj rodu <i>Porcisia</i> v tiplicích <i>Culicoides sonorensis</i>	26
4.2	Vývoj rodu <i>Porcisia</i> ve flebotomech	28
4.2.1	Experimentální infekce <i>Lutzomyia migonei</i>	28
4.2.2	Experimentální infekce <i>Lutzomyia longipalpis</i>	30
4.3	Přítomnost <i>P. deanei</i> v moči <i>Lu. longipalpis</i>	36
4.4	Přenos <i>P. deanei</i> na BALB/c myši.....	37
4.5	Porovnání morfologických forem podrodu <i>Mundinia</i> v <i>Culicoides sonorensis</i> a <i>Phlebotomus argentipes</i>	39
5	Diskuze.....	42
5.1	Rod <i>Porcisia</i>	42
5.2	Podrod <i>Mundinia</i>	44
6	Závěr	46
7	Použitá literatura	47

Seznam tabulek

Tab. 1 – Použité primery	23
Tab. 2 – 1. krok nested PCR – složení reakční směsi	23
Tab. 3 – 2. krok nested PCR – složení reakční směsi	23
Tab. 4 – Průběh 1. kroku nested PCR (program SSU_NESTED).....	23
Tab. 5 – Průběh 2. kroku nested PCR (program LEISH_SSU)	24
Tab. 6 – Intenzita infekce <i>P. deanei</i> a <i>P. hertigi</i> v <i>C. sonorensis</i>	26
Tab. 7 – Rozměry a počty jednotlivých forem <i>P. deanei</i> a <i>P. hertigi</i> v <i>C. sonorensis</i>	27
Tab. 8 – Rozměry a počty jednotlivých forem <i>P. deanei</i> a <i>P. hertigi</i> v <i>Lu. migonei</i>	30
Tab. 9 – Rozměry jednotlivých forem <i>L. infantum</i> , <i>P. deanei</i> , <i>P. hertigi</i>	36
Tab. 10 – Počet porcisií a jejich metacyklických forem v moči <i>Lu. longipalpis</i> vylučované během prediureze.	37
Tab. 11 – Výsledky mikroskopické prohlídky <i>Lu. longipalpis</i> sajících na uších BALB/c myši a PCR detekce u DNA <i>P. deanei</i> a <i>L. infantum</i> z tkání myši.	38
Tab. 12 – Počty a rozměry jednotlivých forem <i>L. martiniquensis</i> a <i>L. orientalis</i> (v obou přenašečích).	41

Seznam obrázků

Obr. 1 Dendrogram rodů podčeledi Leishmaniinae	6
Obr. 2 Životní cyklus leishmanií.....	8
Obr. 3 Vybavení pro chov flebotomů.....	18
Obr. 4 Délka těla měřených promastigotů na celkovém materiálu z kultur i střevních roztlaků	21
Obr. 5 Schéma nested PCR	22
Obr. 6 Kapilárové sání <i>Lu. longipalpis</i>	25
Obr. 7 Zastoupení jednotlivých forem <i>P. hertigi</i> (v prvním dnu po infekčním sání) a <i>P. deanei</i> (ve třech časových intervalech) v <i>C. sonorensis</i>	27
Obr. 8 Intenzita infekce u <i>Lu. migonei</i> ve třech časových intervalech.....	29
Obr. 9 Lokalizace infekce u <i>Lu. migonei</i> ve třech časových intervalech.	29
Obr. 10 Intenzita infekcí ve čtyřech časových intervalech, porovnání <i>L. infantum</i> , <i>P. deanei</i> a <i>P. hertigi</i> v <i>Lu. longipalpis</i>	31
Obr. 11 Znázornění lokalizací u <i>P. deanei</i> 4., 7. a 11. den po infekčním sání.....	32
Obr. 12 <i>P. deanei</i> v malpigických trubicích <i>Lu. longipalpis</i>	32
Obr. 13 Morfologické formy <i>P. deanei</i> v <i>Lu. longipalpis</i> (zvětšení 1000x).....	33
Obr. 14 <i>P. deanei</i> v malpigické trubici <i>Lu. longipalpis</i> zachycená transmisním elektronovým mikroskopem (TEM JEOL1400).	34
Obr. 15 Zastoupení jednotlivých forem <i>L. infantum</i> , <i>P. deanei</i> a <i>P. hertigi</i> v <i>Lu. longipalpis</i> v pěti časových intervalech.	35
Obr. 16 Přítomnost <i>P. deanei</i> v prediuretické moči <i>Lu. longipalpis</i>	37
Obr. 17 PCR detekce DNA <i>P. deanei</i> a <i>L. infantum</i> (226 bp dlouhý úsek genu pro 18S ribosomální podjednotku).	39
Obr. 18 Zastoupení jednotlivých morfologických forem v tiplicích <i>C. sonorensis</i>	40
Obr. 19 Zastoupení jednotlivých morfologických forem ve flebotomech <i>Ph. argentipes</i>	41

1 Úvod a cíle práce

Bičíkovci rodu *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) jsou medicínsky a veterinárně významnou skupinou intracelulárních parazitů způsobujících onemocnění zvané leishmanióza. Onemocnění zahrnuje široké spektrum projevů od nejběžnější kožní formy, přes kožně-slizniční až po viscerální formu napadající vnitřní orgány a končící často fatálně. V současné době je rod *Leishmania* rozdělen na čtyři podrody – ke třem již dlouho zavedeným podrodům *Leishmania*, *Viannia* a *Sauroleishmania* byl v roce 2016 přidán čtvrtý podrod *Mundinia*, který se odštěpuje na bázi fylogenetického stromu rodu *Leishmania* a zahrnuje nyní pět druhů, dříve řazených do komplexu *L. enriettii*, z nichž tři jsou infekční pro člověka (Espinosa et al. 2016).

Leishmanie mají digenetický životní cyklus, který probíhá mezi širokou škálou obratlovcích hostitelů a dvoukřídlým krevsajícím hmyzem. Ještě nedávno bylo široce přijímáno jednoznačné paradigma, že přenašeči leishmanií jsou flebotomové (Diptera: Psychodidae). V posledním desetiletí ale postupně přibývalo důkazů, že jako přenašeči leishmanií podrodu *Mundinia* mohou fungovat zástupci jiné čeledi dvoukřídlého hmyzu – tiplíci (Diptera: Ceratopogonidae). Definitivní důkaz o kompetenci tiplíků přenášet mundinie přinesla publikace kolegů z naší laboratoře na katedře parazitologie PřF UK (Bečvář et al. 2021). Prvním cílem mé práce bylo na tyto pokusy navázat a porovnat detailně kritické momenty vývoje vybraných druhů mundinií ve flebotomech a tiplících. Pro toto téma byly zásadní pravidelné dodávky tiplíků z institutu v anglickém Pirbrightu, které byly nasmlouvány v rámci mezinárodního programu Infavec 2. Bohužel, kvůli vypuknutí pandemie covidu v kombinaci s Brexitem nebylo možné po celé dva roky tiplíky z Anglie získat – jedinou dodávku jsme dostali až v dubnu 2022. Toto téma tedy bylo zredukováno na porovnání morfologie mundinií v obou typech přenašečů, k čemuž jsem mohla využít i fixovaný materiál ze střevočích roztlaků infikovaných tiplíků z pokusů Mgr. Bečváře.

Jako náhradní téma jsme zvolily výzkum přenašečů rodu *Porcisia*. Tento rod byl, stejně jako podrod *Mundinia*, ustaven v práci Espinosa et al. (2016), a to ze dvou druhů bičíkovců parazitujících u amerických stromových dikobrazů (urzonů), dlouhá léta řazených do rodu *Leishmania*. Porcisie jsou spolu s rodem *Endotrypanum* nejbližší fylogeneticky příbuzné leishmanií. Jejich biologie je zatím velice málo prozkoumána – infekce urzonů byly vždy asymptomatické a přenašeči zůstávají téměř padesát let po jejich prvním nálezů neznámí. Ve své práci jsem testovala vývoj obou zástupců rodu *Porcisia* v potencionálních přenašečích – dvou družích jihoamerických flebotomů, které máme k dispozici v našem insektáriu a (díky zmíněné jediné zásilce z anglického Pirbrightu) také v tiplících druhu *Culicoides sonorensis*.

Prvním cílem diplomové práce je ověřit kompetenci dvou druhů flebotomů (*Lutzomyia migonei*, *Lu. longipalpis*) a tiplíků (*Culicoides sonorensis*) porovnat vývoj a přenos *Porcisia deanei* a *P. hertigi*.

Cíle bude dosaženo pomocí:

- experimentálních infekcí laboratorně chovaných druhů flebotomů a tiplíků,
- sledování lokalizace a intenzity infekcí v přenašečích světelným mikroskopem v různých časových intervalech po infekci,
- vyhodnocení zastoupení morfologických forem parazitů z roztakových preparátů,

- experimentálním ověřením přenosu na hostitele.

Druhým cílem diplomové práce je porovnat tvorbu a relativní zastoupení jednotlivých morfologických forem dvou zástupců podrodu *Mundinia* v tiplících *Culicoides sonorensis* a flebotomech *Phlebotomus argentipes*.

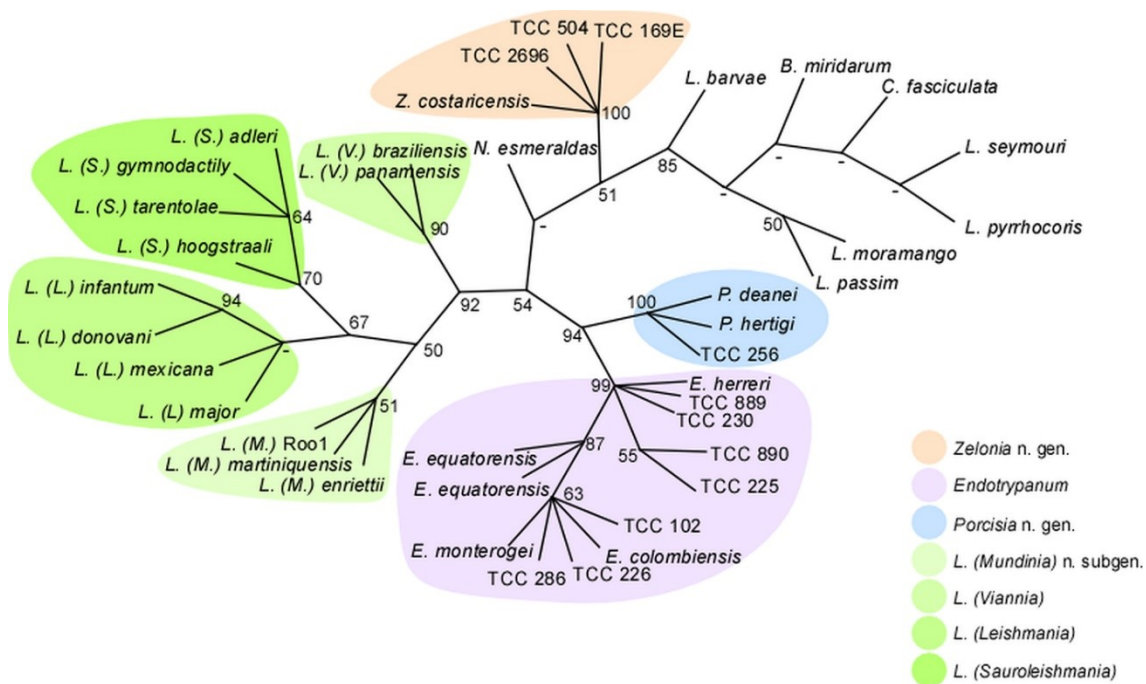
Cíle bude dosaženo vyhodnocením morfologie parazitů z roztakových preparátů, získaných pitvou experimentálně infikovaných přenašečů.

2 Literární přehled

2.1 Taxonomické zařazení rodu *Leishmania*

Leishmanie jsou bičíkovci, kteří infikují různé druhy savců a plazů v teplých oblastech celého světa a způsobují onemocnění zvané leishmanióza. Řadí se do čeledi Trypanosomatidae, řádu Kinetoplastida (Sharma a Singh 2008). Charakteristickým znakem zástupců řádu Kinetoplastida je přítomnost unikátní organely zvané kinetoplast. Jedná se o mitochondriální DNA, která se skládá z několika desítek maxikroužků kódujících typické mitochondriální proteiny a ribosomální RNA, a několika tisíc minikroužků kódujících tzv. guide RNA, které fungují při úpravách mRNA transkriptů z maxikroužků (Shlomai, 2004).

Všichni zástupci čeledi Trypanosomatidae parazitují na obratlovcích nebo bezobratlých a procházejí během svého životního cyklu výraznými morfologickými změnami (Ogden a Melby 2009). Je to různorodá skupina, která zahrnuje monoxenní druhy, jejichž vývojový cyklus se odehrává pouze v jednom (bezobratlém) hostiteli, a dixenní druhy, které se vyvíjejí jak v bezobratlém hostiteli, tak v obratlovcích či případně v rostlině. Do druhé skupiny, mezi dixenní parazity, spadá pět rodů – *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Phytomonas*, *Porcisia* a *Endotrypanum*. Dixenní trypanosomatida se vyvinula z monoxenních v evoluci nejméně třikrát nezávisle. K jednomu takovému přerodu došlo v podčeledi Leishmaniinae, u rodů *Leishmania*, *Endotrypanum* a *Porcisia*. Díky velkému medicínskému významu je rozsáhle studována zejména biologie zástupců rodu *Leishmania*, což vedlo mimo jiné k důkladnému poznání taxonomie tohoto rodu a jeho nejbližších příbuzných. Rod *Leishmania* se v současné době dělí na čtyři podrody – *Leishmania*, *Mundinia*, *Sauroleishmania* a *Viannia*, které jsou dobře definovány na základě své biologie (vývoj v přenašeči, okruh hostitelů, klinické projevy onemocnění) a fylogeneze. Mnoho z těchto parazitů bylo zkoumáno pomocí moderních genomických metod a srovnávací analýzy odhalily jejich vztahy a evoluční historii (Espinosa et al. 2016); přitom nejbližší fylogenetičtí příbuzní leishmanií, rody *Endotrypanum* a *Porcisia*, zůstaly spíše opomíjeny a nepřitahovaly takovou pozornost badatelů (Albanaz et al. 2021; Ogden a Melby 2009). Na rod *Porcisia* se zaměřím v kapitole 2.6.



Obr. 1 – Dendrogram rodů podčeledi Leishmaniinae
(Espinosa et al. 2016)

2.2 Rod *Leishmania* a jeho životní cyklus

Rod *Leishmania* byl pojmenován podle skotského patologa Williama Leishmana, který objevil parazita ve slezině vojáka, který zemřel na kachexii a splenomegálii. Nezávisle na něm irský lékař Charles Donovan našel stejného parazita ve slezinách pacientů s onemocněním kala-azar. Rod byl popsán v roce 1903 (Handman, 1999; Steverding, 2017).

Tento rod zahrnuje přibližně 50 druhů, z nichž 20 způsobuje lidská onemocnění. Leishmanióza je významná, i když opomíjená choroba, jež postihovala lidi po tisíciletí (Barrat et al. 2017). Paraziti infikují i další druhy savců (a podrod *Sauroleishmania* i plazy) a způsobují různé formy tohoto onemocnění. Přenáší je krevsající flebotomové (případně tiplicí) a infekce se projevuje řadou klinických příznaků od nejméně závažných kožních lézí přes destruktivní kožně-slizniční formu leishmaniózy až po fatální selhání vnitřních orgánů (Brushi a Gradoni 2018, Butenko et al. 2019; Pothirat et al. 2014). Leishmanióza je rozšířená hlavně v tropických a subtropických oblastech, ale i na jihu mírného pásma, a to v 98 zemích Evropy, Afriky, Asie a Ameriky. Více než 90 % nových případů se však vyskytuje v pouhých 13 zemích světa (Afgánistán, Alžírsko, Bangladéš, Bolívie, Brazílie, Kolumbie, Etiopie, Indie, Írán, Peru, Jižní Súdán, Súdán a Sýrie) (Alvar et al. 2012).

V současné době, jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, je rod *Leishmania* rozdělen na čtyři podrody: *Leishmania* a *Viannia*, jež mají savčí hostele, podrod *Sauroleishmania*, což jsou paraziti plazů, a jako čtvrtý byl v roce 2016 ustanoven podrod *Mundinia* (Espinosa et al. 2016), kterému se budu věnovat ve zvláštní kapitole.

Leishmanie se přenášejí sáním infikovaných samic flebotomů, které injikují do kůže savčího hostitele metacyklické promastigoty. V savčím hostiteli je vývoj parazita ve srovnání s vývojem v přenašeči poměrně uniformní v tom smyslu, že zde tvoří jediné morfologické stádium, bezbičíkaté amastigoty. Velkou výzvou, se kterou se leishmanie v hostiteli setkávají, je potřeba uniknout

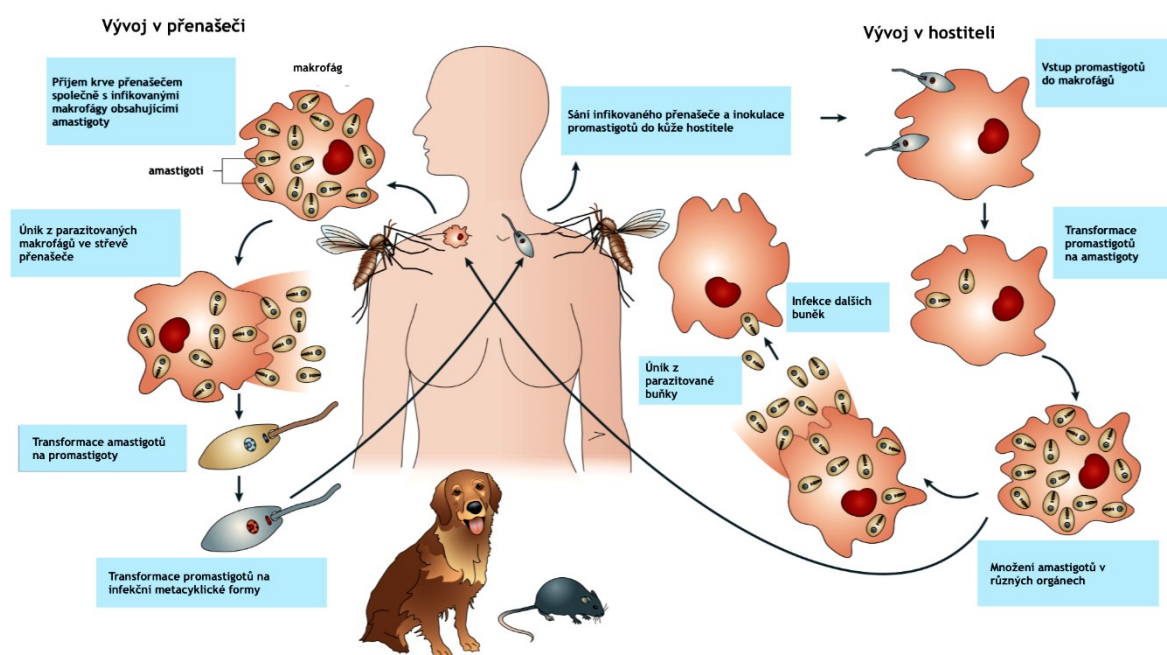
imunitní odpovědi hostitele. Zatímco imunitní systém má ústřední úlohu v obraně hostitele proti mnoha mikroorganismům, patogenní organismy vyvinuli mechanismy, jak se mu vyhnout a v některých případech, jako je právě *Leishmania*, ho i využít (Handman, 1999; Podinovskaia a Descoteaux 2015). *Leishmanie* infikují tzv. profesionální fagocyty (neutrofilů, monocytů a makrofágů) i dendritické buňky a fibroblasty. Hlavní hostitelskou buňkou je makrofág, který *leishmanie* v podstatě předělávají ke svým vlastním potřebám, přežívají a množí se v tzv. fagolysosomech, po prasknutí buňky se pak šíří dál do dalších neinfikovaných buněk. Po celou dobu životního cyklu v hostiteli zůstávají *leishmanie* ve formě amastigotů. Infikované monocytů a makrofágů cirkulují v periferní krvi a infiltrují kůži, odkud jsou nasáty společně s krví přenašečem (Steverding, 2017).

V přenašeči probíhá vývoj *leishmanií* extracelulárně v trávicím traktu a střídá se tu více bičíkatých morfologických forem – promastigotů. Podle způsobu vývoje ve střevě flebotomů můžeme rozlišit tři skupiny *leishmanií*. Suprapylariální vývoj podrodu *Leishmania* probíhá ve stomodeu (foregut) a mesenteronu (midgut), zatímco zástupci podrodu *Viannia* se kromě toho vyvíjejí i v zadním střevě (hindgut, proctodeum), kde se paraziti přichytávají ke stěně pyloru a v menší míře k ileu. Tento typ vývoje se označuje jako peripylariální (Lainson a Shaw 1987). U těchto dvou podrodů pak dochází k přenosu inokulací *leishmanií* při sání vektora. Hypopylariální vývoj je charakteristický pro podrod *Sauroleishmania*, parazity plazů, a vyznačuje se vývojem v zadní části střeva, kdy k přenosu dochází pozřením infikovaného přenašeče nebo kontaminativně (Lainson a Shaw 1987). U podrodu *Sauroleishmania* ale najdeme i peripylariální typ vývoje (Tichá et al. 2021). Protože většina medicínsky významných patogenů patří mezi druhy se suprapylariálním vývojem, je nejlépe prostudovaný, a zvolila jsem ho tedy pro podrobnější popis v této práci.

Jakmile se amastigoti *leishmanií* ocitnou v přenašeči, změna prostředí indukuje nástup metabolických změn, které vedou k přeměně bezbičíkatých amastigotů na bičíkaté promastigoty (Handman, 1999). V přenašeči pak rozlišujeme několik odlišných forem promastigotů. Nejprve se objevují procykličtí promastigoti, kteří se dělí v endoperitrofickém prostoru, tedy v nasáté krvi obklopené peritrofickou matrix, což je obal tvořený chitinovou mřížkou obalenou proteiny a glykoproteiny, který je vylučován střevními buňkami (Kamhawi, 2006; Ramalho-Ortigao, 2010; Dostálová a Volf 2012). Po několika dnech se procykličtí promastigoti přeměňují na nedělicí se nektomonády, které unikají z rozpadající se peritrofické matrix a přichytávají se k mikrovillům střeva, aby nedošlo k jejich vydefekování. Tyto formy se poté mění v dělicí se leptomonádní promastigoty, dochází k anteriorní migraci a z leptomonád vznikají jednak haptomonády, které se přichytávají k výstelce stomodeální valvy a blokují tento svěrač při sání flebotoma, a jednak nedělicí se metacykličtí promastigoti připravení k přenosu do savčího hostitele. Leptomonády navíc vylučují chitinázy, které porušují chitinózní výstelku stomodeální valvy a produkují i tzv. promastigote secretory gel – PSG (Rogers et al. 2002), který tvoří gelovou zátku, která omezuje přítok krve do mesenteronu. Masa *leishmanií* obklopená PSG a nefunkčnost stomodeální valvy dohromady vytvářejí tzv. “blocked fly” mechanismus, kvůli kterému přenašeč nemůže normálně sát krev a paraziti jsou regurgitováni do obratlovčího hostitele (Ramalho-Ortigao et al. 2010).

Na rozvoj infekce v hostiteli mají výrazný imunomodulační efekt různé složky inokula, které se dostávají do hostitele při sání infikovaného flebotoma, především jeho sliny, ale také jeho střevní mikrobiota a exosomy a PSG gel produkovaný *leishmaniemi* v jeho střevě (Serafim et al. 2021). V

hostiteli sliny aktivují komplement a fungují jako chemoatraktanty pro monocyty, makrofágy a neutrofilů (Abdeladhim et al. 2014). Exosomy obsahují například proteázu gp63, která štěpí aktivní složku komplementu C3b na neaktivní iC3b a rovněž mají vliv na rozvoj infekce (Atayde et al. 2015). V poslední době se ukazuje, že na vývoj leishmanií v přenašeči má významný vliv také opakované sání flebotoma, protože ve střevě potom dochází k dediferenciaci metacyklických stádií na tzv. retroleptomonádní promastigoty v procesu zvaném reverzní metacyklogeneze. Jedním z klíčových znaků této nově popsané vývojové formy je jejich schopnost se opět množit, což vede k významnému vzrůstu počtu promastigotů a především metacyklů ve střevě flebotomů a následně silnějšímu projevu infekce u hostitele (Serafím et al. 2018).



Obr. 2 – Životní cyklus leishmanií
(převzato a upraveno podle Lipoldová a Demant 2006)

2.3 Přenašeči leishmanií

Hlavními přenašeči leishmanií jsou flebotomové, hematofágní hmyz z řádu Diptera a čeledi Psychodidae. Leishmanie jsou přenášeny sáním nakažených samic. Mezi více než 800 popsanými druhy flebotomů je 98 prokázaných nebo předpokládaných přenašečů lidských leishmanióz; mezi něž patří 42 druhů rodu *Phlebotomus* ve Starém světě a 56 druhů rodu *Lutzomyia* v Novém světě (Maroli et al. 2012). Dalším významným rodem flebotomů je rod *Sergentomya*, široce se vyskytující ve Starém světě a přednostně sající na studenokrevných obratlovcích. O jejich zapojení do přenosu leishmanií ale zatím chybí definitivní důkazy (Maia a Depaquit 2016). Méně významnými cestami přenosu leishmanií jsou: pohlavní přenos, přenos z matky na plod, infekce krevní transfúzí, či přenos jehlou mezi uživateli drog.

DNA leishmanií byla nalezena v různých krevsajících bezobratlých, avšak jen samotný nálezn DNA (typicky pomocí metody PCR) neznámá, že se v přenašeči parazit množí a je schopen dokončit vývoj. Pro označení členovce jako biologického přenašeče leishmaniózy by mělo být

splněno několik důležitých kritérií (Killick Kendrick, 1999; Maia a Depaquit 2016; Maroli et al. 2012; Ready, 2013):

- 1) Vektor musí být přitahován lidmi a sít na nich a/nebo na rezervoárovém hostiteli.
- 2) Vektor musí být přítomen ve stejném prostředí (biotopu) jako rezervoárový hostitel a musí být mezi nimi silná ekologická asociace, včetně sezónnosti výskytu.
- 3) Promastigoti musí být opakovaně izolováni z jednoznačně identifikovaných volně žijících potenciálních přenašečů, kteří neobsahují čerstvé zbytky krve.
- 4) V thorakálním mesenteronu a v oblasti stomodeální valvy přenašeče musí být pozorovány infekční formy nebo silné infekce, a to u přirozeně infikovaných volně žijících přenašečů nebo jedinců chovaných v laboratorních podmínkách.
- 5) Vektor musí být schopen přenést parazity při sání na rezervoárovém hostiteli, což musí být dokázáno v laboratorních podmínkách.
- 6) Matematické modelování musí prokázat při použití retrospektivních dat, že vektor je nezbytný pro udržení přenosu parazita.
- 7) Paraziti z volně odchycených přenašečů musí být totožní s parazity izolovanými z rezervoárového hostitele (porovnáním izolátů za použití izoenzymů nebo DNA).
- 8) Matematické modelování musí prokázat, že výskyt onemocnění významně klesá po významném poklesu hustoty konkrétního přenašeče.

V posledních letech přibývá faktů naznačujících, že flebotomové nemusí být jedinou skupinou hmyzu, která může leishmanie přenášet. Například existují i oblasti, kde je psí leishmanióza endemická, ale flebotomové tam nebyli nalezeni (Dantas-Torres et al. 2010a). Jako potencionální (tzv. alternativní) přenašeči leishmanií jsou nejčastěji zmiňováni a testováni tiplíci (Diptera: Ceratopogonidae), ale i další hematofágní členovci, jako blechy a klíšťata.

Práce Coutinha a Linardiho (2007) informovala o detekci DNA leishmanií u blech *Ctenocephalides felis* sebraných ze psů vykazujících příznaky leishmaniózy. Byly provedeny i úspěšné experimentální perorální infekce křečků macerátem nakažených blech. Poté v roce 2009 vyšla další metodicky podobná studie, popisující přítomnost DNA *Leishmania infantum* v blechách *C. felis* nasátých na nemocných psech, v kombinaci s detekcí DNA u křečků infikovaných intraperitoneálně blechami sebranými z nakažených psů (Ferreira et al. 2009). Výsledky obou těchto studií ale pouze naznačují, že leishmanie po nějakou dobu přežívají v blechách. Neposkytují však žádné další důkazy o tom, že se blechy podílejí na přirozeném přenosu parazita (Otranto a Dantas-Torres 2010).

Coutinho et al. (2005) prokázali, že macerát klíšťat *Rhipicephalus sanguineus* infikovaným sáním na nemocných psech vyvolá infekci experimentálního hostitele, křečka. Autoři ovšem neprokázali, že nasátí amastigoti by v klíšťatech byli schopni vývoje a transformace na metacyklická stádia. Studie z roku 2010 informovala o detekci kinetoplastové DNA (kDNA) *L. infantum* ve slinných žlázách klíštěte *R. sanguineus*. Avšak zda se leishmanie mohou dostat do slinných žláz klíšťat prostřednictvím hemolymfy nebo zda se tam paraziti dostanou, když klíště saje na infikovaném psovi, zůstává nejasné (Dantas-Torres, 2010a). Dalším zajímavým zjištěním bylo, že leishmanie v klíšťatech jsou schopné se přenášet i transovariálně, jak potvrdila studie Dantas-Torres et al. (2010b). Krátce poté Colombo et al. (2011) prokázali, že leishmanie v klíšťatech *R. sanguineus*

přežívají ekdyzi. V jiné pozdější studii bylo zkoumáno přes sto dospělých klíšťat *R. sanguineus* odebraných přibližně čtyřiceti psům žijícím v endemických oblastech psí leishmaniózy. Tato studie prokázala vysokou prevalenci DNA *L. infantum* u tohoto druhu klíšťat (Solano-Gallego et al. 2012). Tyto výsledky studií jsou zajímavé, avšak stále neprokazují vektorovou kompetenci klíšťat pro leishmanie.

První zmínky o tiplících, jakožto potencionálních přenašečích leishmanií, pochází již z roku 1925, kdy Christophers a kol. ve své studii zkoumali tiplíky druhu *Culicoides macrostoma*, které nechávali sát na pacientech infikovaných *Leishmania donovani*. Vypitvaní tiplíci však byli negativní, zatímco 25 % samic flebotomů druhu *Phlebotomus argentipes* vyšlo pozitivně (Christophers et al. 1925). Z toho důvodu se na dlouhou dobu od tématu tiplíků jakožto možných přenašečů leishmanií upustilo a znovu se začalo objevovat až začátkem tohoto století. V roce 2011 byly zveřejněny výsledky terénního výzkumu v Austrálii svědčící o tom, že tiplíci rodu *Forcipomyia* by mohli být potenciálními vektory *Leishmania macropodum* mezi klokany červenými (*Macropus rufus*) (Dougal et al. 2011).

V laboratorní studii z roku 2015 byly samice tiplíků druhu *Culicoides nubeculosus* a *Culicoides sonorensis* a samice flebotoma druhu *Lutzomyia longipalpis* experimentálně infikovány *Leishmania enriettii* a *Leishmania macropodum*. V *Lu. longipalpis* se oba druhy leishmanií vyvíjely relativně špatně. *C. nubeculosus* nebyl vůbec náchylný k infekci parazitem, ale v *Culicoides sonorensis* byly pozorovány zralé infekce s kolonizací stomodeální valvy (Seblova et al. 2015). Další studie z roku 2019 ukázala, že také *Leishmania orientalis* se špatně vyvíjí v *Lu. longipalpis*, avšak u infikovaných tiplíků *C. sonorensis* byla pozorována kolonizace stomodeální valvy a přítomnost metacyklických promastigotů (Chanmol et al. 2019). Nedávno pak Bečvář et al. (2021) provedli studii, v níž byly infikovány druhy flebotomů, jež sdílejí oblast rozšíření se čtyřmi druhy podrodu *Mundinia*. Brazílský druh *Lutzomyia migonei* byl infikován *L. enriettii*, subsaharský *Phlebotomus duboscqi* druhem *L. sp.* z Ghany a jihoasijský *Phlebotomus argentipes* druhy *Leishmania martiniquensis* a *L. orientalis*. Pro infekce *L. macropodum* byl zvolen permissivní druh *Lu. migonei*. A zároveň byl u všech pěti druhů podrodu *Mundinia* (8 kmenů) testován vývoj v tiplících *C. sonorensis*. U tiplíků *C. sonorensis* byla pozorována výrazně vyšší procenta infekcí v porovnání s flebotomy. Desátý den po infekčním sání převládaly těžké infekce (více než 1000 parazitů ve střevě) a stomodeální valva byla kolonizována téměř u všech infikovaných samic. Nejvyšší podíl samic *C. sonorensis* s těžkými infekcemi včetně úspěšné kolonizace stomodeální valvy byl zjištěn u *L. orientalis*, *L. martiniquensis* kmene Cu2 a ghanského druhu, zahrnujících u prvních dvou kmenů více než 60 % všech pitvaných samic. U těchto kmenů bylo rovněž pozorováno nejvyšší zastoupení metacyklických forem (5 % a 10 %). Naopak nízký podíl metacyklických forem (maximálně 3 %) byl pozorován u infekcí flebotomů. Jelikož tři druhy mundinií byly také úspěšně experimentálně přeneseny sáním tiplíků na hostitele (BALB/c myš), byla prokázána kompetence tiplíků přenášet leishmanie podrodu *Mundinia* (Bečvář et al. 2021).

2.4 Patologie a rozšíření leishmaniózy

Dnes žije více než miliarda lidí v endemických oblastech leishmaniózy. Mezi hlavní rizikové faktory patří dodnes všude ve světě chudoba, podvýživa, migrace obyvatelstva, válečné konflikty a klimatické změny. Změny teploty, srážek a vlhkosti mají významný vliv na vektory i rezervoárové

hostitele, což může umožnit přenos parazita i v oblastech, které dříve nebyly pro tuto chorobu endemické (WHO, 2022).

Vzhledem k tomu, že makrofágy jsou přítomny v nejrůznějších tkáních těla hostitele, mají paraziti velký potenciál šíření a mohou poškozovat různé tělesné funkce. V dermis způsobují **kožní formu onemocnění**, která může být lokalizovaná nebo difuzní (Lipoldová a Demant 2006). Projevuje se kožními lézemi, především vředy, na exponovaných částech těla, jako je obličej, ruce a nohy. Když se vředy hojí, zanechávají po sobě trvalé jizvy, což může vést ke stigmatizaci, zejména u žen a dívek (WHO, 2022). V Jižní Americe se před šedesátými lety minulého století kožní forma leishmaniózy nacházela především v zalesněných oblastech a tradičně se vázala na lovecké, dřevorubecké a důlní činnosti (Maroli et al. 2012). Také proto bylo toto onemocnění v Mexiku známo jako „ulcera de los chicleros“ (vřed u sběračů „chicle“, gumového latexu z lesního stromu *Manilkara zapota*) a jako „guerrilla sore“ ve Venezuele a Kolumbii. V roce 2020 se více než 85 % nových případů vyskytlo v deseti zemích: v Afghánistánu, Alžírsku, Brazílii, Kolumbii, Iráku, Libyi, Pákistánu, Peru, Syrské arabské republice a Tunisku. Odhaduje se, že na celém světě se ročně vyskytne 600 000 až 1 milion nových případů (WHO, 2022).

Další formou onemocnění je **mukokutánní leishmanióza**, která zpočátku způsobuje podobné kožní vředy jako kožní forma, které se sice hojí, ale následně se léze znovu objevují ve sliznici nosu, ústní dutiny, krku a okolních tkáních. Ty jsou často doprovázeny sekundárními infekcemi a masivní destrukcí sliznic a chrupavek (Handman, 1999; WHO, 2022). Tato forma zdravotního postižení může také vést k sociálnímu vyloučení a vyskytuje se hlavně v Bolívii, Brazílii, Etiopii a Peru (WHO, 2022).

Metastatické šíření infekce do sleziny a jater vede k **viscerální leishmanióze** (známé v Indii jako kala-azar), která je nejtěžší formou onemocnění. Paraziti se mohou dostat i do dalších orgánů, například do lymfatických uzlin, kostních buněk a plic a ve vzácných případech i do mozku (Lipoldová a Demant 2006). Onemocnění se vyznačuje nepravidelnými záchvaty horečky, výrazným úbytkem tělesné hmotnosti, otokem sleziny a jater a závažnou anémií. Pokud není onemocnění léčeno, může být úmrtnost do 2 let až 100 %. Nejvíce případů se vyskytuje v Brazílii, východní Africe a v Indii. Odhaduje se, že celosvětově se ročně vyskytne 50 000 až 90 000 nových případů. V roce 2020 se více než 90 % nových případů hlášených WHO vyskytlo v deseti zemích: Brazílii, Číně, Etiopii, Eritrei, Indii, Keni, Somálsku, Jižním Súdánu, Súdánu a Jemenu (WHO, 2022).

Post-kala-azar dermální leishmanióza se obvykle vyskytuje u pacientů, kteří se zotavili z viscerální leishmaniózy způsobené *Leishmania donovani*. Je pozorována ve východní Africe i na Indickém poloostrově. Vyznačuje se makulární vyrážkou v kombinaci s makulopapulární nebo nodulární vyrážkou. Obvykle se objevuje 6 měsíců až několik let po zdánlivém vyléčení viscerální leishmaniózy, ale může se objevit dříve nebo dokonce současně s ní. Ve většině případů se vyrážka spontánně vyhojí. U pacientů se posléze vyvine imunita podobná vyléčeným pacientům s viscerální formou leishmaniózy (Zijlstra, 2016).

Způsob patologie závisí jak na druhu leishmanie, tak na genotypu a imunitním stavu hostitele, je ovlivňován i slinami přenašeče i dalšími faktory. Různé druhy leishmanií tedy vyvolávají odlišné symptomy, ale i pacienti, kteří jsou infikováni stejným druhem, mohou mít různé symptomy a mohou se lišit v odpovědi na léčbu (Lipoldová a Demant 2006).

U většiny lidí, kteří se parazitem nakazí, se ovšem během života neobjeví žádné příznaky. Pojem leishmanióza proto označuje stav, kdy člověk onemocní v důsledku infekce, nikoli stav, kdy je parazitem infikován (WHO, 2022).

2.5 Podrod *Mundinia*

Mundinia je nejnověji popsáným podrodem rodu *Leishmania* (Espinosa et al. 2016), který zahrnuje druhy dříve známé jako komplex *Leishmania enriettii*. V současnosti se podrod *Mundinia* skládá z 5 druhů, jejichž zeměpisné rozšíření pokrývá všechny kontinenty kromě Antarktidy. V této skupině nalezneme jak lidské patogeny – *Leishmania orientalis*, *Leishmania martiniquensis* a doposud nepojmenovaný druh z Ghany, tak druhy nepatogenní pro člověka, konkrétně *Leishmania enriettii* a *Leishmania macropodum*, jež jsou parazity divokých savců (Espinosa et al. 2016; Paranaíba et al. 2018).

Leishmania enriettii je dlouho známý parazit popsáný již ve čtyřicátých letech minulého století, který byl původně řazen do komplexu *Leishmania mexicana* (Lainson a Shaw 1987). Až po popisu a zahrnutí *L. martiniquensis* do molekulárně fylogenetických analýz byly *L. enriettii* a *L. martiniquensis* zařazeny do společné samostatné skupiny (Noyes et al. 2002). Studie cytochromu b, kódovaného v mitochondriálním genomu a hojně využívaného pro fylogenetické studie, pak potvrdily jedinečnost skupiny parazitů kolem *L. enriettii* a došlo k vytvoření tzv. komplexu *L. enriettii* (Asato et al. 2009). Všech pět druhů podrodu *Mundinia* bylo do fylogenetické analýzy zařazeno ve studii Kwakye-Nuako et al. 2015. V roce 2016 byl tomuto komplexu přiřazen status podrodu v rámci rodu *Leishmania* na základě analýzy genů pro Hsp70 a gGPDH (Espinosa et al. 2016).

Podle všech fylogenetických studií představují druhy podrodu *Mundinia* nejstarší a nejružnorodější skupinu v rámci rodu *Leishmania*. Přítomnost tohoto podrodu na různých kontinentech je s největší pravděpodobností odrazem toho, že se tato starobylá skupina vyvinula ještě před rozpadem Gondwany (Barrat et al. 2017).

Mnoho důležitých údajů ohledně biologie těchto parazitů není zatím dostatečně známo. O rezervoárových hostitelích jakéhokoliv druhu podrodu *Mundinia* je dosud známo velmi málo informací. Rovněž identita hmyzích vektorů, zodpovědných za jejich přenos, dosud nebyla jasně potvrzena pro žádný druh. Předpokládalo se, že tyto paraziti, podobně jako ostatní leishmanie, budou přenašeni flebotomy (Diptera: Phlebotominae) rodu *Phlebotomus* nebo *Sergentomyia* ve Starém světě či *Lutzomyia* v Novém světě, jak je tomu u jiných známých druhů leishmanií. Avšak následně se ukázalo, že situace může být zajímavější. V roce 2004 byl v Austrálii poprvé popsán výskyt leishmaniózy (Rose et al. 2004). Další terénní výzkum pak odhalil přítomnost *Leishmania macropodum* u 6 % tiplíků rodu *Forcipomyia* (Diptera: Ceratopogonidae), zatímco všichni odchycení flebotomové byli negativní. Byly provedené i pitvy, při kterých byla mikroskopicky prokázána přítomnost metacyklických stádií a kolonizace stomodeální valvy tiplíků (Dougal et al. 2011). Následně laboratorní experimenty odhalily vnímavost tiplíků *C. sonorensis* k *L. enriettii*, *L. macropodum* (Seblova et al. 2015) a *L. orientalis* (Chanmol et al. 2019) načež Bečvář et al. (2021) definitivně prokázali, že všechny druhy podrodu *Mundinia* se vyvíjejí v tiplících *C. sonorensis* lépe než v různých druzích flebotomů a tři druhy byly přeneseny sáním tiplíků na savčího hostitele. Z toho vyplývá, že zástupci podrodu *Mundinia* mohou být přenašeni nikoliv pouze flebotomy, jako je

tomu u jiných druhů leishmanií, ale i tiplíky. Skutečnost, že tyto druhy nemusí být vázány na flebotomy, mohla vysvětlit jejich široké geografické rozšíření (Barrat et al. 2017).

2.5.1 *Leishmania enriettii*

Jedná se o první popsáný druh v rámci podrodu *Mundinia*, který byl poprvé izolován z kůže domácích morčat (*Cavia porcellus*) ve státě Paraná v Brazílii v roce 1948 (Muniz a Medina 1948). Nejde o lidský patogen, následně byl opakovaně izolován v různých lokalitách v Brazílii opět pouze z domácích morčat (Machado et al. 1994; Luz et al. 1967) a je zajímavé, že jednotlivé případy byly odděleny dlouhými časovými intervaly, ač morčata jsou oblíbenými domácími mazlíčky a podle několika experimentálních studií jsou velmi náchylná k infekci (Bečvář et al. 2020; Seblova et al. 2015). Tyto sporadické infekce morčat byly charakterizovány výskytem kožních lézí na uších, nose, chodidlech a varlatech (Machado et al. 1994). Jejich vzácný výskyt může mít dvě různá vysvětlení. Zaprvé, prevalence infekce je ve skutečnosti mnohem vyšší, ale majitelé infikovaných morčat je neberou k veterinárním kontrolám, proto nejsou paraziti detekováni. Nebo jsou morčata pouze náhodnými hostiteli a rezervoároví hostitelé (a primární hmyzí vektorři) nejsou přítomni v těsné blízkosti domácností. V tomto případě mohou být dočasně zapojeni sekundární vektorři a/nebo hostitelé do přenosu na domácí lokality a domácí morčata (Bečvář et al. 2020).

Vývoj *L. enriettii* byl také testován na modelu křečků zlatých (*Mesocricetus auratus*), kde byly infekce charakteristické vývojem dočasných lézí v místě inokulace a jejich následným hojením (Loría-Cervera a Andrade-Narváez 2014). Při pokusech s divokými morčaty (*Cavia aperea*), makaky rhesus a psy pak žádná zvířata nevykazovala známky infekce, takže domácí morčata zůstávají v současnosti nejlepším laboratorním modelem pro *L. enriettii* (Bečvář et al. 2020).

Identita přenašečů, stejně jako rezervoárových hostitelů, zůstává doposud záhadou. V roce 1967 byl zaznamenán opětovný výskyt spontánních leishmanióz morčat způsobených *L. enriettii* ve státě Paraná a zkoumaly se možné populace vektorů v blízkosti výskytu, kde v odchytech převládala *Lutzomyia monticola*. Následně bylo deset exemplářů *Lu. monticola* necháno nasát na lézích nakaženého morčete. I když šest z nich prodělalo těžké promastigotní infekce, paraziti v laboratorních podmínkách nevyvolali infekci v kůži laboratorního morčete (Machado et al. 1994; Lainson, 1997). Ve studiích z let 2015 a 2020 byl pozorován poměrně úspěšný vývoj *L. enriettii* v tiplících druhu *C. sonorensis* (Bečvář et al. 2020; Seblova et al. 2015). Tyto laboratorní experimenty naznačují, že tyto paraziti mohou být přenášeni i jinými vektory než flebotomy.

Objev *L. enriettii* byl významný i z hlediska výzkumu leishmanií a leishmaniózy. Díky bujnému růstu amastigotů v kůži morčat a snadnému pěstování promastigotů v jednoduchých médiích s krevním agarem se tento pro člověka nepatogenní parazit brzy stal oblíbeným modelem imunologů, biochemiků a molekulárních biologů po celém světě a oblíbeným předmětem chemoterapeutických studií. Neméně důležité však bylo, že tento objev značně posílil rostoucí víru, že u volně žijících či domácích zvířat nejenže může cizopasit mnoho dosud nepopsaných druhů leishmanií, ale že velká většina lidských leishmanií jsou zoonózy, kdy různé druhy zvířat působí jako zdroj leishmanií, které jsou zodpovědné za tyto lidské choroby (Lainson, 1997; Rosa et al. 2020).

2.5.2 *Leishmania martiniquensis*

V roce 1995 byla vydána studie Dedet et al. (1995), která uvádí přítomnost neobvyklého zástupce trypanosomatid izolovaného z HIV pozitivního pacienta s difúzní kožní formou leishmaniózy na karibském ostrově Martinik. Původně se mělo za to, že jde o zástupce monoxenních trypanosomatid, ale po letech následná fylogenetická analýza prokázala, že patří do rodu *Leishmania* a řadí se k tehdejšímu komplexu *L. enriettii* (Barrat et al. 2017; Espinosa et al. 2016). V roce 1997 byl nalezený stejný parazit u imunokompetentního pacienta opět na ostrově Martinik. Muž měl kožní lézi na pravém obočí. Zpočátku papulózní, následně ulcerující léze vyústila v malou jizvu. Boisseau-Garsaud et al. (2000) z toho vyvodili, že u imunokompromitovaného pacienta způsobuje *L. martiniquensis* difúzní kožní infekci, zatímco u imunokompetentního pacienta pouze lokalizovanou kožní lézi (Boisseau-Garsaud et al. 2000). Následně byl tento druh leishmanie nacházen na dalších místech a podle nedávných zjištění má téměř celosvětovou distribuci s jedním či více případy hlášenými z různých kontinentů (Müller et al. 2009; Lobsiger et al. 2010; Reuss et al. 2012; Pothirat et al. 2014). V roce 2014 tento druh získal název *Leishmania martiniquensis* podle místa, na němž byl prvně izolován (Desbois et al. 2014).

Tento parazit je známý také z Thajska, kde od roku 1996 bylo hlášeno několik lidských případů, většinou se jednalo o viscerální a diseminovanou formu leishmaniózy (Intakhan et al. 2020; Pothirat et al. 2014), přičemž původně byly tyto leishmanie nesprávně identifikované jako "*Leishmania siamensis*" (Pothirat et al. 2014). Kromě toho byli však tyto parazité izolováni i z jiných savčích hostitelů, jako jsou koně a krávy. Autochtonní případy kožní leishmaniózy byly hlášeny u koní z Floridy (Reuss et al. 2012). Další případy kožní leishmaniózy u koní byly popsány v Německu a Švýcarsku a u skotu ve Švýcarsku (Müller et al. 2009; Lobsiger et al. 2010). Dále byly také hlášeny nálezy z koní i v Česku a Rakousku, ty však doposud nebyly publikovány.

Současné geografické rozšíření *L. martiniquensis* může souviset s lidskými činnostmi, jako je mezinárodní přeprava a obchod, spojený s šířením možných rezervoárových druhů zvířat (Barrat et al. 2017). Identita rezervoárových zvířat zůstává záhadou a rovněž tak přenašeči. DNA byla nalezena ve flebotomech rodu *Sergentomyia* - *S. gemmea* a *S. barraudi* (Kanjapopas et al. 2013; Chusri et al. 2014; Leelayoova et al. 2017). Avšak samotná DNA zjištěná metodou PCR ještě nedokazuje, že se jedná skutečně o přenašeče. Přenašeči mohou být s velkou pravděpodobností tiplíci, protože Bečvář et al. v roce 2021 prokázali laboratorní přenos *L. martiniquensis* tiplíky *C. sonorensis* (Bečvář et al. 2021).

2.5.3 *Leishmania macropodum*

Austrálie byla považována za prostou leishmanií až do objevu *L. macropodum* v roce 2004, jediného druhu rodu *Leishmania*, vyskytujícího se na tomto kontinentě. Tento první výskyt byl zaznamenán u klokanů rudých (*Macropus rufus*) chovaných v zajetí v severní části kontinentu, u nichž způsoboval kožní formu leishmaniózy (Rose et al. 2004). V roce 2009 byly hlášeny infekce *L. macropodum* u tří dalších druhů australských klokanů chovaných v zajetí: *Macropus robustus woodwardi*, *Macropus bernardus*, *Macropus agilis agilis*. Kožní léze byly lokalizovány na ocase, vnitřním předloktí, zadních nohou a uších. Závažnost a počet lézí se u postižených jedinců lišily. Je zajímavé, že na kloace byly u dvou zvířat pozorovány rovněž léze, což svědčí o možné slizniční infekci (Dougal et al. 2009).

Při terénním výzkumu zaměřeném na hledání přenašeče byli odchycení flebotomové identifikováni na úrovni druhu a byli testováni na leishmaniovu DNA pomocí kvantitativní real-time PCR. Zatímco všichni odchycení flebotomové byli negativní, zkoumání alternativních vektorů přineslo překvapivé výsledky. U tiplíků rodu *Forcipomyia* (podrodu *Lasiohelea*) byla prevalence DNA leishmanií až 15 %, u některých jedinců v silných infekcích. Při pitvách střev byl výskyt promastigotů včetně metacyklických infekčních stádií potvrzen mikroskopicky, byla pozorována i kolonizace stomodeální valvy a materiál podobný PSG (Dougal et al. 2011). Tento parazit získal v té době název *Leishmania „australiensis“*, toto označení však nebylo nikdy formálně popsáno v souladu s Mezinárodním kodexem zoologické nomenklatury, tím pádem tento název nebyl taxonomicky platný, jednalo se o *nomen nudum* a k formálnímu popisu došlo až v roce 2017 (Barrat et al. 2017).

2.5.4 *Leishmania orientalis*

Leishmania orientalis, dříve chybně označovaná jako „*Leishmania siamensis*“, byla v minulosti často zaměňována s *L. martiniquensis* (Pothirat et al. 2014). Použití názvu „*Leishmania siamensis*“ se poprvé objevilo v roce 2008, kdy ho Sukmee et al. použili pro sekvenci DNA potenciálně nového druhu, kterou vložili do GenBank, a poté v roce 2009 v publikaci od autorů Müller et al. (2009); od té doby byl tento název hojně používán v literatuře, ačkoliv je tento název taxonomicky neplatný (*nomen nudum*) (Espinosa et al. 2016). V roce 2018 byl tento parazit již formálně popsán a získal již zmíněný název *L. orientalis* (Sukmee et al. 2008).

Jedná se o lidský patogen způsobující v Thajsku jak kožní, tak viscerální leishmaniózu. Studie z roku 2018 popisuje jak izolát *L. orientalis* z pacienta z thajské provincie Nan, u kterého byla diagnostikována prostá kožní leishmanióza, tak rovněž uvádí izoláty z pacientů infikovaných zároveň virem HIV, kteří byli postiženi diseminovanou kožní leishmaniózou, přičemž jeden z nich měl také viscerální formu onemocnění (Jariyapan et al. 2018).

Tento druh nebyl zatím izolován ze žádných druhů savců kromě člověka a identita jejich rezervoárových hostitelů tím pádem zůstává záhadou. Siripattanapipong et al. (2018) popisují nález DNA „*L. siamensis*“ z flebotoma *Sergentomyia iyengari*, což naznačuje, ale nedokazuje, že by tyto flebotomové mohli sloužit jako přenašeči. Byl však prokázán velmi úspěšný vývoj této leishmanie v tiplících druhu *C. sonorensis* (Chanmol et al. 2019; Bečvář et al. 2021) a také úspěšný přenos tímto druhem tiplíka na hostitele (Bečvář et al. 2021).

2.5.5 *Leishmania sp. z Ghany*

Poslední známý parazit podrodu *Mundinia* byl teprve nedávno, v roce 2015, identifikován jako příčina lidské kožní leishmaniózy v Ghaně (Kwakye-Nuako et al. 2015), avšak doposud nebyl vědecky pojmenován.

V ghanské oblasti Volta je kožní leishmanióza významnou, nově se objevující chorobou s vysokou prevalencí. Hlášené infekce se vyskytly hlavně v okrese Ho. Získala místní název „agbamekanu“, což znamená „dárek od někoho, kdo se vrátil z cesty“, a odkazuje na místní přesvědčení, že nákaza byla zavlečena ze sousedního Toga (Kwakye-Nuako et al. 2015).

Neexistují zatím přímé důkazy o identitě jejich přirozených rezervoárových hostitelů a přenašečů (Sádlová et al. 2020). Bečvář et al. (2021) experimentálně prokázali, že tento druh se

úspěšně vyvíjí v tiplicích *C. nubeculosus* a podařilo se jim i parazita úspěšně přenést na hostitele (pomocí sání samic na BALB/c myši). Je proto možné, že tiplici se rovněž mohou podílet na přenosu ghanských parazitů.

Experimentální infekce *Arvicantis niloticus* a *Mastomys natalensis*, druhů hlodavců přítomných v endemických lokalitách, nepotvrdily ve studii z roku 2020 jejich hostitelskou kompetenci pro tohoto parazita. Ačkoliv leishmanie přežily v *Mastomys natalensis* i 20 týdnů a rozšířily se do různých tkání, byly přítomny pouze v malém množství a nebyly schopny nakazit přenašeče (Sádlová et al. 2020).

Správné pochopení epidemiologie tohoto druhu, včetně zmíněné identifikace přenašeče a rezervoárových hostitelů, je důležité pro zvážení vhodných opatření na pomoc postiženým onemocněním agbamekanu (Kwakye-Nuako et al. 2015).

2.6 Porcisia

Rody *Endotrypanum* a *Porcisia* lze považovat za nejbližší fylogeneticky příbuzné rodu *Leishmania* (Espinosa et al. 2016; Albanaz et al. 2021). Rod *Endotrypanum* je omezen na Střední a Jižní Ameriku, zahrnuje izoláty z lenochodů a je přenášen flebotomy. Rod *Porcisia* zahrnuje dva druhy, *Porcisia hertigi* a *Porcisia deanei*, dříve označované jako komplex *Leishmania hertigi*, které v tropických oblastech Ameriky žijí v dikobrazech čeledi *Erethizontidae* (Espinosa et al. 2016).

Druh *P. hertigi* byl poprvé objeven v roce 1971 Aristidem Herrerem v dikobrazovi *Coendou rothschildi* ve střední Panamě (*C. rothschildi* je po taxonomické revizi pojmenován jako *C. quichua*, Voss et al. 2015), později byl detekován i na Kostarice (Zeledon et al. 1977). Herrer zjistil, že 88 % dikobrazů, které vyšetřoval, bylo nakaženo. Infekce byly vesměs asymptomatické, s malým počtem amastigotů rozptýlených v pokožce i vnitřních orgánech.

V roce 1974 Leonidas Deane a jeho kolegové popsali přítomnost malého počtu velkých amastigotů ve slezině a játrech dikobrazů *C. prehensilis* v obci José de Freitas ve státě Piauí v Brazílii (Deane et al. 1974). Parazit nebyl izolován a taxonomicky popsán. Následně Lainson a Shaw (1977) zkoumali 18 dikobrazů ve státě Pará v Brazílii a u 11 z nich izolovali parazity z kůže a vnitřností. Dvě zvířata byla *C. prehensilis* a všechna ostatní byla z tehdy nepopsaného druhu rodu *Coendou*. V játrech a slezině jednoho zvířete byli nalezeni velcí amastigoti, v malém počtu. Morfologické znaky parazita přesně odpovídaly charakteristikám amastigotů v dikobrazech v Piauí, uváděným v práci Deane et al. (1974). Šlo tedy velmi pravděpodobně o stejného parazita. Vzhledem k morfologické a biochemické odlišnosti od *L. hertigi* byl parazit pojmenován *Leishmania hertigi daenei* a později získal druhový status jako *Porcisia deanei* (Lainson a Shaw 1989). Později byl popsán z dikobrazů i v jiné oblasti Brazílie (Silva et al. 2013) sice jako *L. hertigi*, ale jde velice pravděpodobně také o *P. deanei* (Espinosa et al. 2016). Kromě druhů rodu *Coendou* dosud tento parazit nebyl nalezen u žádného jiného savčího hostitele a jeho přenašeč zůstává neznámý (Lainson, 2010). Dosud jediný nález DNA rodu *Porcisia* v přenašeči byl popsán nedávno, a to z flebotomů druhu *Lutzomyia autunesi* ve státě Mato Grosso v Brazílii (Thies et al. 2018).

3 Materiál a metodika

3.1 Složení použitých roztoků

Fyziologický roztok: 150 mM NaCl

Ředící roztok (pro počítání leishmanií v Barkerově komůrce): 0,85% NaCl + 1% formaldehyd (CH₂O)

Anestetika: 2% xylazin (Rometar, 25 mg/kg) + 10% ketamin (Narketan, 62 mg/kg) + sterilní fyziologický roztok

Médium pro kultivaci leishmanií: médium M199 (Sigma) + tepelně inaktivované 10% FCS (Gibco) + 1% BME vitamíny (Sigma) + 250 ug/ml amikacin (Brystol- Myers Squibb) + 2% sterilní moč

Roztoky pro zpracování vzorků pro transmisní el. mikroskopii

Karnovského fixáž s přidavkem glukózy: 50 ml 0,2 M kakodylátový pufr (pH 7) + 20 ml 20% vodný roztok formaldehydu + 10 ml 25% roztok gluteraldehydu (SPI) + 1 g glukózy + doplnit do 100 ml dH₂O

Vypírací pufr: 50 ml 0,2M kakodylátový pufr (pH 7) + 2,7 g 1,35% glukózy + 50ml dH₂O

3.2 Kultivace leishmanií

V mojí diplomové práci byly použity druhy *Leishmania infantum* (MHOM/TR/2000/OG-VL), *Porcisia deanei* (MCOE/BR/91/M13451; TCC 258), *Porcisia hertigi* (MCOE/PA/80/C8; TCC 260), *Leishmania orientalis* (MHOM/TH/2014/LSCM4), *Leishmania martiniquensis* (MHOM/TH/2019/CU2) a *Leishmania sp.* z Ghany (MHOM/GH/2012/GH5).

Kultury leishmanií jsou uchovávány v kryobance v tekutém dusíku v zamrazovacích ampulích CryoTubeTM Vials (NUNC) v médiu obsahujícím 5–10 % kryokonzervační látky DMSO (Sigma-Aldrich). Po rozmražení jsou kultury přeneseny do tekutého kultivačního média M199 a uskladněny v termostatu při teplotě 23 °C v plochých kultivačních zkumavkách (NUNC). Po 4–5 ti dnech je kultura přeočkována do nového média (použitím 3–5 kapek na 1–1,5 ml starší kultury).

3.3 Chov flebotomů

Pro účely mojí diplomové práce byly použity druhy flebotomů pocházející z chovů katedry parazitologie – *Lutzomyia migonei* a *Lutzomyia longipalpis* (obě původem z Brazílie) a *Phlebotomus argentipes* (původem z Indie).

Kolonie flebotomů jsou umístěny v insektáriu, kde jsou udržovány optimální podmínky pro jejich vývoj – vlhkost 60–70 %, teplota 25–26 °C, fotoperioda 14 hodin světla a 10 hodin tmy. Larvy (L1–L4) jsou chovány v kelímcích vylitých sádrou, čímž je v nich udržována přiměřená vlhkost. Kelímky jsou uzavřeny plastovým víčkem s monofilem a uskladněny v plastových krabicích se dnem pokrytým navlčeným vysterilizovaným pískem, jenž opět udržuje v krabici vhodnou vlhkost. Všechna larvální stádia jsou krmena třikrát týdně fermentovanou směsí králíčího trusu. Poslední larvální stádia se v kelímcích kuklí a následně vylétávají dospělí jedinci. Dospělci jsou vypouštěni třikrát týdně do nylových sítí uchycených na kovových konstrukcích, které jsou umístěny do igelitových pytlů. Na síť je vložen tác s navlčenou vatou, jež zajišťuje vhodné vlhkostní podmínky

pro přežívání dospělců (vlhkost uvnitř pytlů dosahuje 70–95 %). Dospělci jsou krmeni 50% roztokem sacharózy, který je napuštěný do kousku vaty umístěné na Petriho misce. Samicím je jednou týdně nabídnut k sání krve hostitel – uspaná BALB/c myš nebo bílý králík částečně znehybněný ve fixačním postroji. Několik dní poté jsou nasáté samice pomocí exhaustoru přemístěny do sádrov vylitých, navlhčených kelímků, ve kterých kladou vajíčka a následně umírají. Z vajíček se líhnou L1 larvy a tím se cyklus uzavírá (více o chovu flebotomů viz Volf a Volfova 2011).



Obr. 3 – Vybavení pro chov flebotomů

- a) skleněné exhaustory a krmítko používané pro infekční sání flebotomů
- b) síť s flebotomy navázaná na kovových konstrukcích
- c) digestoř pro fermentaci potravy pro larvy
- d) místnost pro umístění kolonií s vhodnou teplotou, vlhkostí a fotoperiodou
- e) termostat s uloženými plastovými krabicemi s kelímký (larvy, kukly) a sítě s dospělci
- f) kelímký v plastových krabicích se dnem pokrytým navlhčeným pískem
(převzato a upraveno Lawyer et al. 2017; Volf a Volfová 2011)

3.4 Experimentální infekce flebotomů a tiplíků

Pro experimentální infekce flebotomů sáním přes membránu je potřeba si připravit kůže z 1–3 dnů starých usmrcených kuřat. Kůže se získávají ze hřbetní strany peří zbaveného kuřete. Stažená kůže je promyta ve sterilním fyziologickém roztoku a zbavena tuku, následně v 70% ethanolu a znova ve fyziologickém roztoku. Kůžičky jsou poté uskladněny v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Volf a Volfová 2011).

Před infekčním sáním je ještě potřeba si vymrazit danou kulturu leishmanií a nechat ji kultivovat. Kultura musí být v exponenciální fázi růstu, tzv. log fázi, po 3–4 dnech kultivace.

Den před pokusem jsou samice flebotomů odděleny z kolonie do malé síťky ($20 \times 20 \times 20$ cm) natažené na tenkou ocelovou konstrukci a je jim sebrán cukr, aby další den lépe sály.

V den pokusu je kultura promyta ve fyziologickém roztoku a promastigoti jsou spočítáni za pomoci Bürkerovy komůrky a naředěni na koncentraci 1×10^6 buněk / 1 ml. 300 μl kultury je smícháno s 2700 μl tepelně deaktivované beraní krve (35 minut ve vodní lázni s $56\text{ }^{\circ}\text{C}$). Kuřecí kůžičky jsou nataženy a parafilmem připevněny na skleněná krmítka, do nichž je pomocí tenké pasteuovy pipety přenesena suspenze krve s promastigoty. Krmítka jsou uchycena do stojanu a síťky s flebotomy jsou za pomoci kuliček a gumiček upevněny na krmítka. Krev v krmítech je ohřívána na teplotu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomocí vodní lázně s vnější cirkulací. Takto jsou samice ponechány sát po dobu 1–2 hodin. Následně jsou síťky opatrně sundány z krmítka a pomocí exhaustoru jsou z nich odebrány nenasáté samice. Nasáté samice v síťkách jsou umístěny v termostatu při teplotě $26\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jako potrava jim slouží 50% roztok sacharózy na kousku vaty a vlhkost jim zajišťuje vata navlhčená destilovanou vodou.

3.5 Pitvy a vyšetření střev hmyzu

Flebotomové v různých časových intervalech po infekčním sání byli uspáni na ledu a jejich střeva byla vypitvána pod binokulární lupou. Nejprve byly samice v kapce fyziologického roztoku pomocí pinzety a ručně připraveného pitevního náčiní (entomologické minucie zasazené ve špejli) zbaveny hlavy a končetin, následně bylo vytaženo střevo, které bylo přeneseno do nové kapky fyziologického roztoku a přikryto krycím sklíčkem. Takto vzniklý preparát byl prohlížen pod světelným mikroskopem. Do protokolu byla zaznamenávána intenzita a lokalizace infekce. Intenzitu infekce rozlišujeme: slabou (méně než 100 promastigotů), střední (100–1000 promastigotů) a silnou (více než 1000 promastigotů) (Myskova et al. 2008).

3.6 Příprava roztlakových preparátů a jejich barvení

Roztlakové preparáty byly připraveny vždy v den pitev ze střev nakažených přenašečů, u kterých byly pozorovány silné či střední infekce. U samic nakažených *Porcisia deanei* a *Porcisia hertigi* byly v prvním dnu po infekci provedeny roztlakové preparáty ze všech vypitvaných střev, protože procyklická stádia porcisií nejsou při mikroskopické prohlídce střev dobře odlišitelná od krvinek. Pro zjištění procenta infikovaných samic byly proto prohlíženy roztlakové preparáty všech pitvaných střev.

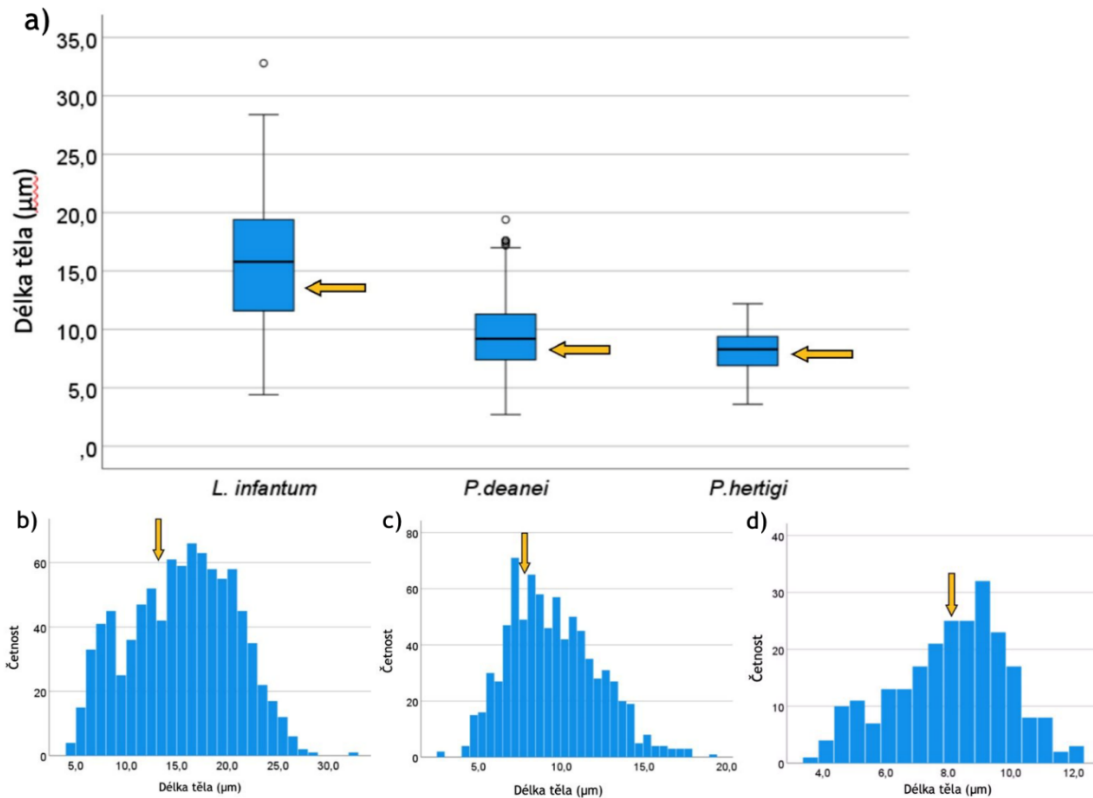
Pro přípravu roztlakových preparátů byla vypitvaná střeva v kapce fyziologického roztoku na podložním skle opatrně rozmáčkuta a rozetřena krycím sklem. Následně byl roztěr na sklíčku fixován methanolem. Po zaschnutí byl na vzorky nanesen roztok Giemsy-Romanovského (Sigma) (ředěno 20 \times destilovanou vodou). Barvivo bylo takto na roztlacích ponecháno po dobu 20 minut.

Poté byly vzorky opláchnuty vodovodní vodou, usušeny a následně již mohly být mikroskopicky vyhodnoceny.

3.7 Měření morfologických forem

Zastoupení jednotlivých morfologických forem bylo měřeno u *Porcisia deanei*, *P. hertigi*, *Leishmania infantum*, *L. orientalis* a *L. martiniquensis* (kmen Cu2), jak z roztěrů kultur, tak z roztlakových preparátů vypitvaných střev flebotomů (*Lutzomyia migonei*, *Lu. longipalpis*, *Phlebotomus argentipes*) a tiplíků (*Culicoides sonorensis*).

Jednotlivé formy leishmanií byly prohlíženy pod světelným mikroskopem (Olympus BX51) se zabudovanou kamerou (DP-70) při zvětšení 1000krát za použití imerzního oleje a foceny v programu QuickPHOTO MICRO 2.2 (Olympus). V programu ImageJ (Java) byla poté měřena délka těla, délka bičíku a šířka těla buňky. Na základě kritérií podle Sádlová et al. (2010) byly u druhu *Leishmania* rozlišovány čtyři morfologické formy – **procykliční promastigoti**: formy přítomné před defekací krve s bičíkem kratším než tělo, **dlouhé nektomonády**: délka těla $\geq 14 \mu\text{m}$ a délka bičíku $<$ dvojnásobek délky těla, **krátkí promastigoti (leptomonády)**: délka těla $< 14 \mu\text{m}$ a délka bičíků $<$ dvojnásobek délky těla, **metacykliční promastigoti**: délka bičíku \geq dvojnásobná délka těla. Pro celkově menší promastigoty rodu *Porcisia* nelze aplikovat hranici $14 \mu\text{m}$ pro rozlišení nektomonád od krátkých promastigotů jako je tomu u leishmanií. Proto jsme na základě srovnání rozměrů buněk obou rodů stanovili rozhraní $8 \mu\text{m}$ pro rozlišení těchto forem (Obr. 4). Haptonomády byly také nalezeny, ale jen ojediněle. Tyto formy nebyly zahrnuty do kvantitativního srovnání, protože zůstávají přichyceny ke střevu a jejich zastoupení v roztěrech by bylo proto podhodnoceno (Sádlová et al. 2010). Získaná data byla statisticky vyhodnocena v programu SPSS.



Obr. 4 – Délka těla měřených promastigotů na celkovém materiálu z kultur i střevních roztlaků

a) porovnání délky těla u *L. infantum*, *P. deanei* a *P. hertigi*

b) četnost délek buněk *L. infantum*

c) četnosti délek buněk *P. deanei*

d) četnost délek buněk *P. hertigi*

3.8 Statistika

Rozdíly v procentech infikovaných samic a poměru morfologických forem byly analyzovány chí-kvadrátovým testem, morfologické rozdíly mezi promastigoty mundinií ve flebotomech a tiplících t-testem. Všechny statistické analýzy byly provedeny programem SPSS verze 27.

3.9 Přenosové experimenty

Přibližně 20 samic *Lu. longipalpis* infikovaným sáním na krmítku bylo odděleno do malých plastových epruvet uzavřených jemnou nylonovou sítkou. Epruvety byly přiloženy k uším BALB/c myši v celkové anestezii po dobu zhruba jedné hodiny. Nasáté samice byly bezprostředně po sání uspány a vypitvány a jejich střeva byla vyšetřována na přítomnost parazitů pod světelným mikroskopem. Bezprostředně po sání nebo 4 dny po přenosovém pokusu byly myši usmrceny a byly jim odebrány vzorky pro pozdější molekulární analýzu. Oba ušní boltce a případně i spádové mízní uzliny (u myši odebíraných 4 dny po sání flebotomů) byly umístěny do 1,5 ml plastových zkumavek naplněných 100 μl destilované vody a uskladněny v -20°C .

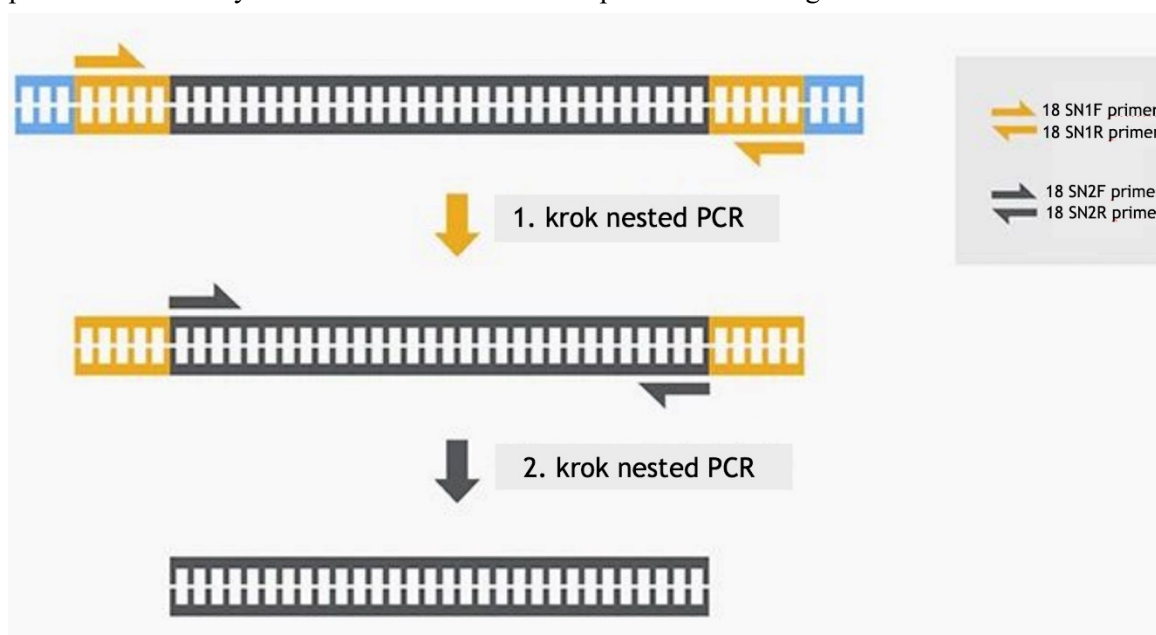
3.10 Izolace DNA

DNA byla izolována pomocí High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) a bylo postupováno podle protokolu dodaného výrobcem (Isolation of Nucleic Acids from Mammalian Tissue). DNA byla eluována do 200 µl elučního pufru (Roche) a následně uskladněna v mrazáku v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro zjištění úrovně čistoty a koncentrace vyizolované DNA byly vzorky měřeny na spektrofotometru (NanoDrop ND-1000 Thermo Scientific) podle manuálu dodaného výrobcem.

3.11 PCR detekce

Pro zjištění přítomnosti leishmanií ve tkáních BALB/c myši byla použita metoda nested PCR, která byla vyvinuta ke zvýšení citlivosti a specifity PCR. Jedná se obvykle o dvě po sobě jdoucí amplifikační reakce, v nichž každá využívá jinou dvojici primerů. Produkt první amplifikační reakce se používá jako templát pro druhou PCR. Vyšší citlivost vyplývá z vysokého celkového počtu cyklů. Vyšší specifita je dána použitím druhé sady primerů nasedajících na sekvence, které se nacházejí pouze v produktech první reakce, čímž se ověřuje identita produktu první PCR reakce (Nolte a Hill 2011).

Jako templát pro první PCR byla použita vyizolovaná DNA z uší a uzlin BALB/c myši. Jako pozitivní kontrola sloužila DNA izolovaná z kultury *Leishmania major* a jako negativní kontrola vzorek, ve kterém byla DNA nahrazena vodou. V první reakci byly použity 18SN1F a 18SN1R primery (uvedeny v Tab. 1), které cílí na 332 bp dlouhou sekvenci 18S malé ribozomální podjednotky. Komponenty reakční směsi jsou sepsány v Tab. 2. Reakce probíhala podle protokolu uvedeného v Tab. 4. Získaná DNA sloužila jako templát pro další PCR reakci. V reakci byly použity 18SN2F a 18SN2R primery (uvedeny v Tab. 2), které cílí na 226 pb dlouhý úsek nacházející se uvnitř produktu z předchozí PCR. Reakce probíhala za použití komponent sepsaných v Tab. 3, podle protokolu uvedeného v Tab. 5. Schéma nested PCR je zobrazeno na Obr. 5. Přítomnost výsledných produktů byla ověřována pomocí agarózové elektroforézy.



Obr. 5 – Schéma nested PCR

(převzato z www.thermofisher.com a upraveno)

Tab. 1 – Použité primery

Primer	Směr	Sekvence (5'→3)
10 μM 18SN1F	forward	GGATAACAAAGGAGCAGCCTCTA
10 μM 18SN1R	reverse	CTCCACACTTTGGTTCTTGATTGA
10 μM 18SN2F	forward	AGATTATGGAGCTGTGCGACAA
10 μM 18SN2R	reverse	TAGTTCGTCTTGGTGCGGTC

Tab. 2 – 1. krok nested PCR – složení reakční směsi

Komponenty	Objem [μl]
Emerald Green Master mix (2x koncentrovaný)	10
10 μM 18SN1F primer (forward)	0,5
10 μM 18SN1R primer (reverse)	0,5
DNA	3
ddH ₂ O	6
	20

Tab. 3 – 2. krok nested PCR – složení reakční směsi

Komponenty	Objem [μl]
Emerald Green Master mix (2x koncentrovaný)	10
10 μM 18SN2F primer (forward)	0,5
10 μM 18SN2R primer (reverse)	0,5
DNA	3
ddH ₂ O	6
	20

Tab. 4 – Průběh 1. kroku nested PCR (program SSU_NESTED)

Počet opakování	Teplota [°C]	Čas
1	94	3:00
40	94	0:30
	60	0:30
	72	0:25
1	72	5:00
	12	∞

Tab. 5 – Průběh 2. kroku nested PCR (program LEISH_SSU)

Počet opakování	Teplota [°C]	Čas
1	94	3:00
40	94	0:30
	60	0:30
	72	0:20
1	72	5:00
	12	∞

3.12 Gelová elektroforéza

Agaróza byla smíchána s 1× TAE pufrem v Erlenmayerově baňce v takovém poměru, aby vznikl 1–1,5% agarózový gel. Směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě (když začínal roztok vřít, tak byl několikrát vyjmut z mikrovlnné trouby a promíchán) až do doby, kdy došlo k úplnému rozpuštění agarózy. Do roztoku bylo následně přidáno barvivo SYBR Safe (Invitrogen) v poměru 1 : 1000, celá směs byla zamíchána a nalita do připravené formy. Poté byl ještě do formy vložen hřeben a směs byla ponechána ztuhnout do podoby tuhého gelu, a následně byl hřeben vyjmut. Forma s gelem byla přemístěna do elektroforetické vany (tak, aby jamky byly u záporného pólu), ve které byla převrstvena 1× TAE pufrem. Do vzniklých jamek byly od druhé jamky postupně nanášeny jednotlivé PCR reakce (10 µl každého vzorku) a do první jamky bylo aplikováno 10 µl DNA markeru (100 bp DNA ladder (Fermentas)). Zařízení bylo posléze zapojeno do zdroje napětí (70 V až zhruba 110 V po dobu 30–60 minut v závislosti na velikosti gelu) a vzorky putovaly směrem ke kladné elektrodě. Po separaci vzorků na základě velikosti byla DNA detekována UV transluminátorem.

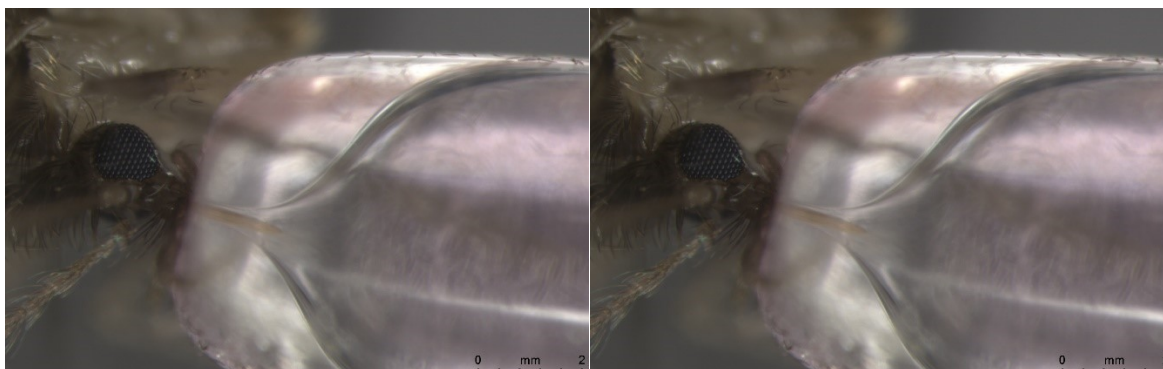
3.13 Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii

Vypitvaná střeva nebo celá těla infikovaných flebotomů zbavená hlavy, křídel, nohou a posledních zadečkových článků byla přenesena do Karnovského fixáže a byla takto ponechána v lednici při 4 °C po dobu maximálně 24 hodin. Poté byla 3× po dobu 15 minut vyprána ve vypíracím pufru. Následovala postfixace v 2% OsO₄ v 0,1 M kakodylátovém pufru při teplotě 4 °C po dobu 2 hodin a praní v destilované vodě při pokojové teplotě po dobu zhruba 10 minut. Dále byla provedena dehydratace pomocí ethanolu naředěného na různé koncentrace. Vždy byla kapalina odsáta pasteurovou pipetou a nahrazena novou koncentrací ethanolu. Nejprve byl ke tkáním přidán 35% ethanol po dobu 15 minut, dále 50% – 15 minut, 70% – 30 minut, 80% – 15 minut, 96% – 15 minut a 100% – 15 minut. Další odvodnění bylo provedeno pomocí 100% acetonu 3× po dobu 15 minut. Následovalo prosvycování zalévací pryskyřicí Poly/Bed 812/Araldite 502 (Polyscieces, Inc.) ředěné 100% acetonem postupně v různých koncentracích. Nejprve 3: 1 (aceton: pryskyřice) po dobu 2 hodin, 1: 1 po dobu 4 hodin a 1: 3 po dobu 12 hodin. Potom byly vzorky převedeny do čisté pryskyřice. Pryskyřice byla 3× po dobu 12 hodin odsáta a nahrazena novou. Vzorky byly následně přemístěny do gumových forem, zality čistou pryskyřicí a umístěny do termostatu, kde docházelo k tvrdnutí bločků při 65 °C po dobu 48 hodin. Bločky po ztvrdnutí byly předřezány na polosilné řezy o velikosti 0,5–0,9 µl na ultramikrotomu Ultracut E (Reichert-Jung) pomocí skleněného nože na

vodní hladině. Polosilné řezy byly přeneseny za pomoci přilepeného vlasu na špejli do kapky destilované vody na podložním skle. Kus filtračního papíru byl za pomoci pinzety ponořen do lahve s xylenem a následně přenesen nad kapku destilované vody s řezy, kde jím bylo opatrně pohybováno nad řezy, dokud nedošlo k jejich roztažení parami xylenem. Podložní sklo bylo následně umístěno na elektrickou plotnu rozehřátou na 80 °C, kde se řezy ještě více roztáhly a připekly k podložnímu sklíčku. Řezy na sklíčku byly poté barveny 5% Stirlingovou gentianovou violetí po dobu 1–2 minut opět na elektrické plotně při 80 °C a následně opláchnuty v destilované vodě. Polosilné řezy na podložním skle byly mikroskopicky prohlédnuty a vybrány ty, které obsahovaly hledané oblasti střeva. Vybrané vzorky byly odevzdány na přípravu ultratenkých řezů paní laborantce E. Kirchmanové z Laboratoře elektronové mikroskopie Patologicko-anatomického ústavu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Připravené ultratenké řezy byly pod elektronovým mikroskopem (TEM JEOL1400) prohlíženy a nalezené hledané objekty fotografovány.

3.14 Pokusy s prediurezií

Samice *Lu. longipalpis* 10–14 dní po infekci *P. deanei* byly zafixovány křídly na oboustranné lepící pásce a na proboscis jim byla nasazena na konci zúžená skleněná kapilára naplněná médiem M199 (Sigma). Během sání byly na podložní sklíčko zachytávány kapky moči vylučované samicí v procesu prediurese. Bezprostředně po skončení pokusu byly samice vypitvány na podložním skle v kapce fyziologického roztoku pro zjištění infekce. Krycí skla s kapkami vyloučenými infikovanými samicemi byla zafixována methanolem a následně barvena roztokem Giemsa-Romanovského (Sigma). Takto obarvené preparáty byly zamontovány na podložní sklíčka a poté mikroskopicky analyzovány.



Obr. 6 – Kapilárové sání *Lu. longipalpis*
Foceno stereomikroskopem Leica M250 FA (zvětšení 100×)

4 Výsledky

Výsledky předkládané diplomové práce jsou rozděleny na dvě části. První část se zabývá vývojem rodu *Porcisia* v potenciálních přenašečích, konkrétně dvou druhích flebotomů (*Lu. migonei* a *Lu. longipalpis*) a tiplících druhu *C. sonorensis* (kapitoly 4.1–4.4), druhá část je věnována porovnání morfologických forem podrodu *Mundinia* při vývoji v *C. sonorensis* a *Ph. argentipes* (kapitola 4.5).

4.1 Vývoj rodu *Porcisia* v tiplících *Culicoides sonorensis*

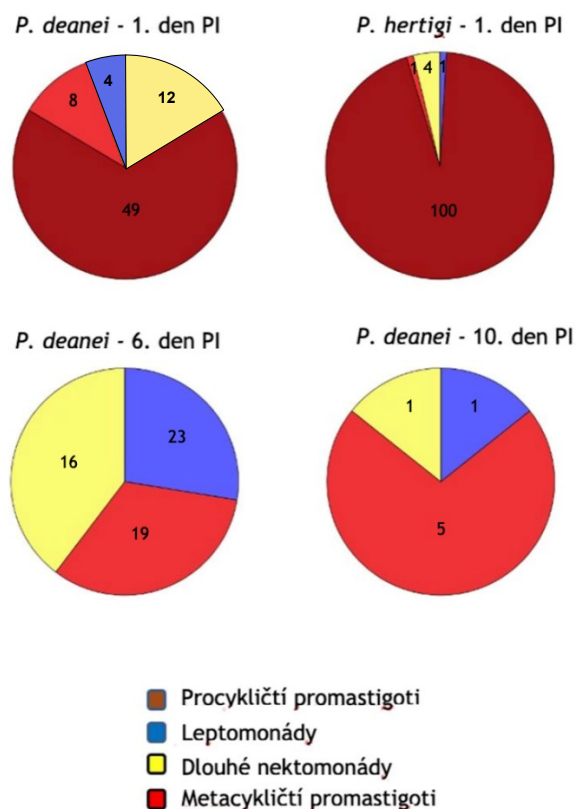
Intenzita a lokalizace infekcí byla sledována vždy 1., 3., 6. a 10. den po infekčním sání. Celkem bylo prohlédnuto 115 samic. Infekční dávka byla 10^6 leishmanií / ml krve.

První den po sání, tedy před defekací samic, byla infekce detekována u samic nakažených *P. deanei* a 45 % samic nakažených *P. hertigi*. Po defekaci pak z 50 vypitvaných samic nakažených *P. hertigi* nebyla infikovaná žádná a ze 39 vypitvaných samic nakažených *P. deanei* byly pozitivní pouze tři samice (dvě šestý den po infekčním sání a v jedna desátý den po infekčním sání, viz Tab. 6). Zajímavé je, že u všech tří pozitivních samic byli promastigoti *P. deanei* lokalizováni v MT (malpigických trubicích).

Tab. 6 – Intenzita infekce *P. deanei* a *P. hertigi* v *C. sonorensis*

Čas po experiment. infekci (PI)	Druh	Silná	Střední infekce	Slabá infekce	Neinfikované střevo	Celkem
1. den	<i>P. deanei</i>	5	4	0	4	13
	<i>P. hertigi</i>	4	5	0	11	20
3. den	<i>P. deanei</i>	0	0	0	15	15
	<i>P. hertigi</i>	0	0	0	17	17
6. den	<i>P. deanei</i>	0	2	0	19	21
	<i>P. hertigi</i>	0	0	0	24	24
10. den	<i>P. deanei</i>	0	1	0	2	3
	<i>P. hertigi</i>	0	0	0	9	9

První den po infekčním sání převažovali v trávené krvi u obou druhů porcisií procykličti promastigoti, ale byly tu již zastoupeny i dlouhé nektomonády, krátkí promastigoti a metacykličti promastigoti. S narůstajícím časem od infekčního sání se u *P. deanei* zvyšovalo zastoupení metacyklů. Šestý den po infekci metacykličti promastigoti zaujímali 33 % a desátý den až 71 %, ovšem výsledek zde může být ovlivněn malým počtem promastigotů, který se podařilo zachytit. Zastoupení jednotlivých forem graficky znázorňuje Obr. 7 a počty a rozměry jednotlivých forem uvádí Tab. 7.



Obr. 7 – Zastoupení jednotlivých forem *P. hertigi* (v prvním dnu po infekčním sání) a *P. deanei* (ve třech časových intervalech) v *C. sonorensis*.

Čísla uvnitř výsečí kruhu uvádí počet forem promastigotů.

Tab. 7 – Rozměry a počty jednotlivých forem *P. deanei* a *P. hertigi* v *C. sonorensis*.

Druh	Den PI	Forma	Počet forem	Délka těla		Šířka těla		Délka bičíku	
				Průměr (odchylka)	min–max	Průměr (odchylka)	min–max	Průměr (odchylka)	min–max
<i>P. deanei</i>	1	PP	49	6,9 (± 1,4)	4,8–13	2,3 (± 0,4)	1,6–3,1	1,4 (± 2,1)	0,0–6,7
		EN	12	9,2 (± 1,0)	8,0–10,9	2,2 (± 0,4)	1,4–2,9	10,1 (± 6,6)	0,0–18,4
		MC	8	6,9 (± 1,4)	4,7–9,3	2,1 (± 0,3)	1,6–2,5	16,9 (± 2,0)	13,7–19,6
		LE	4	6,0 (± 1,1)	4,7–7,4	2,0 (± 0,1)	1,9–2,1	7,9 (± 2,1)	6,3–10,7
	6	EN	16	9,5 (± 1,0)	8,1–11,7	2,1 (± 0,5)	1,3–2,9	10,6 (± 5,5)	1,9–17,2
		MC	19	7,4 (± 1,8)	4,7–10,7	2,0 (± 0,4)	1,4–2,9	16,1 (± 3,3)	11,4–22,7
		LE	23	6,3 (± 0,9)	4,4–7,8	2,1 (± 0,5)	1,2–3,2	7,3 (± 4,1)	0,8–13,6
	10	EN	1	9,7	9,7–9,7	1,6	1,6–1,6	2,3	2,3–2,3
		MC	5	6,7 (± 1,7)	4,6–8,3	2,3 (± 0,2)	2,0–2,4	19,3 (± 3,8)	13,2–23,6
		LE	1	7,9	7,9–7,9	1,6	1,6–1,6	13,4	13,4–13,4
<i>P. hertigi</i>	1	PP	100	5,2 (± 1,1)	2,9–8,7	2,4 (± 0,5)	1,5–4,8	0,1 (± 0,5)	0,0–2,4
		EN	1	10,8	10,8–10,8	2,8	2,8–2,8	12,4	12,4–12,4
		MC	1	4,3	4,3–4,3	1,9	1,9–1,9	10,5	10,5–10,5
		LE	4	6,2 (± 6,2)	4,9–7,2	2,9 (± 2,9)	2,2–3,9	8,9 (± 8,9)	6,1–13,8

PI = po experimentální infekci. PP = procyclickí promastigoti, EN = dlouhé nektomonády, MC = metacycklickí promastigoti, LE = leptomonády (krátké promastigoti).

4.2 Vývoj rodu *Porcisia* ve flebotomech

Vývoj zástupců rodu *Porcisia* (*P. deanei* a *P. hertigi*) byl dále zkoumán ve dvou druzích jihoamerických flebotomů, kteří s nimi sdílejí stejný areál rozšíření – *Lutzomyia longipalpis* (s oběma druhy porcisií) a *Lutzomyia migonei* (s *P. deanei*).

Tyto dva druhy flebotomů jsou prokázány přenašeči *Leishmania infantum*, která sloužila jako kontrolní druh pro experimentální infekce. Infekční dávka byla opět vždy 10^6 leishmanií / ml krve.

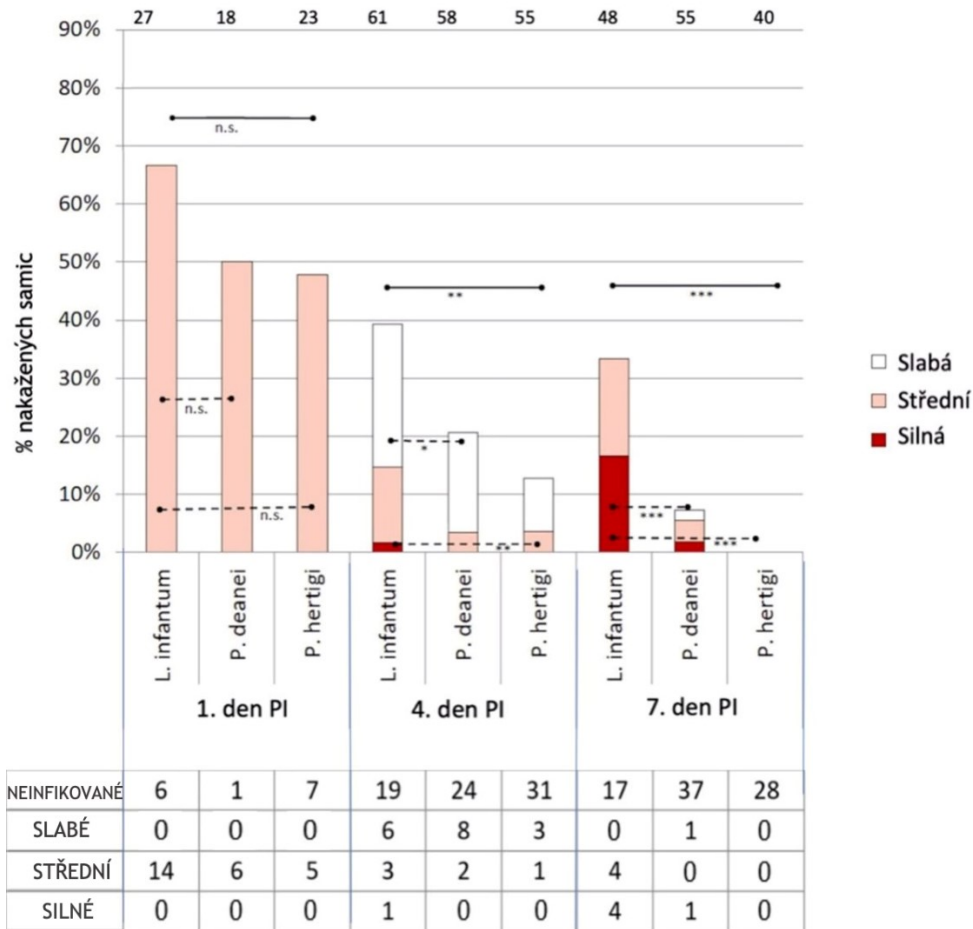
4.2.1 Experimentální infekce *Lutzomyia migonei*

Pitvy nakažených samic *Lu. migonei* byly provedeny vždy ve třech časových intervalech – 1., 4. a 7. den po experimentální nákaze. Celkem bylo prohlédnuto 131 samic infikovaných *P. deanei*, 118 samic infikovaných *P. hertigi* a 136 samic infikovaných *L. infantum*. Porovnání podílu infikovaných samic mezi jednotlivými druhy parazita bylo statisticky testováno pomocí chí-kvadrátového testu. Míru a intenzitu infekcí popisuje Obr. 8 a lokalizaci infekcí Obr. 9.

První den po infekčním sání se míra infekce druhů rodu *Porcisia* významně nelišila od kontrolního druhu *L. infantum* ($P = 0,344$, d.f. = 2, $\chi^2 = 2,132$). Avšak od čtvrtého dne kontrolní druh tvořil i silné infekce a kolonizoval stomodeální valvu u 87 % infikovaných samic, zatímco u druhů rodu *Porcisia* podíl infikovaných samic s narůstajícím časem od infekčního sání klesal ($P = 0,003$, d.f. = 2, $\chi^2 = 11,770$ čtvrtý den po infekci; $P < 0,001$, d.f. = 2, $\chi^2 = 23,500$ sedmý den po infekci).

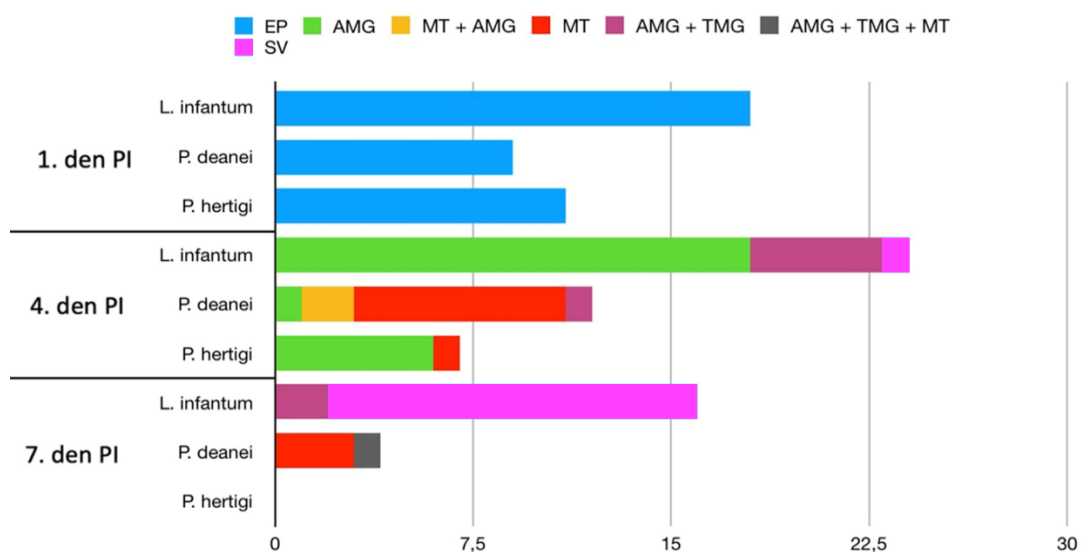
První den po infekci byli promastigoti vždy lokalizováni v endoperitrofickém prostoru, v nasáté krvi uvnitř peritrofické matrix. Čtvrtý den po infekci se *P. hertigi* vyskytovala pouze u nevydefekovaných samic (v abdominálních mesenteronu a MT) a s následnou defekací se infekce vytratily. Sedmý den po infekci už byly všechny samice negativní. *Porcisia deanei* ojediněle defekaci přežila a byla nalezena i sedmý den po infekci. Čtvrtý den po infekci byla zachycena u nevydefekovaných samic opět v MT a abdominálním mesenteronu, u vydefekovaných samic byly nacházeny infekce lokalizované převážně jen v MT. Sedmý den převažovaly infekce MT a také byla nalezena jedna silná infekce lokalizovaná v abdominálním a thorakálním mesenteronu a MT. Avšak samic, ve kterých *P. deanei* přežila defekaci, bylo pouze 7 %, takže nemělo význam s *Lu. migonei* provádět přenosové experimenty.

Morfologická analýza mohla být založena jen na omezeném vzorku, ale prokázala tvorbu metacyklických stádií v *Lu. migonei* u obou druhů porcisií (Tab. 8).



Obr. 8 – Intenzita infekce u *Lu. migonei* ve třech časových intervalech.

PI = po infekci. Čísla nad sloupci uvádí počet vypitvaných samic. Plné spojovací čáry značí rozdíl mezi všemi třemi testovanými druhy; přerušované čáry zase rozdíl mezi dvěma navzájem propojenými druhy. n.s (nesignifikantní) = $P > 0,05$, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$.



Obr. 9 – Lokalizace infekce u *Lu. migonei* ve třech časových intervalech.

EP = endoperitrofický prostor, AMG = abdominální mesenteron, MT = malpighické trubice, TMG = thorakální mesenteron, SV = stomodeální valva.

Tab. 8 – Rozměry a počty jednotlivých forem *P. deanei* a *P. hertigi* v *Lu. migonei*.

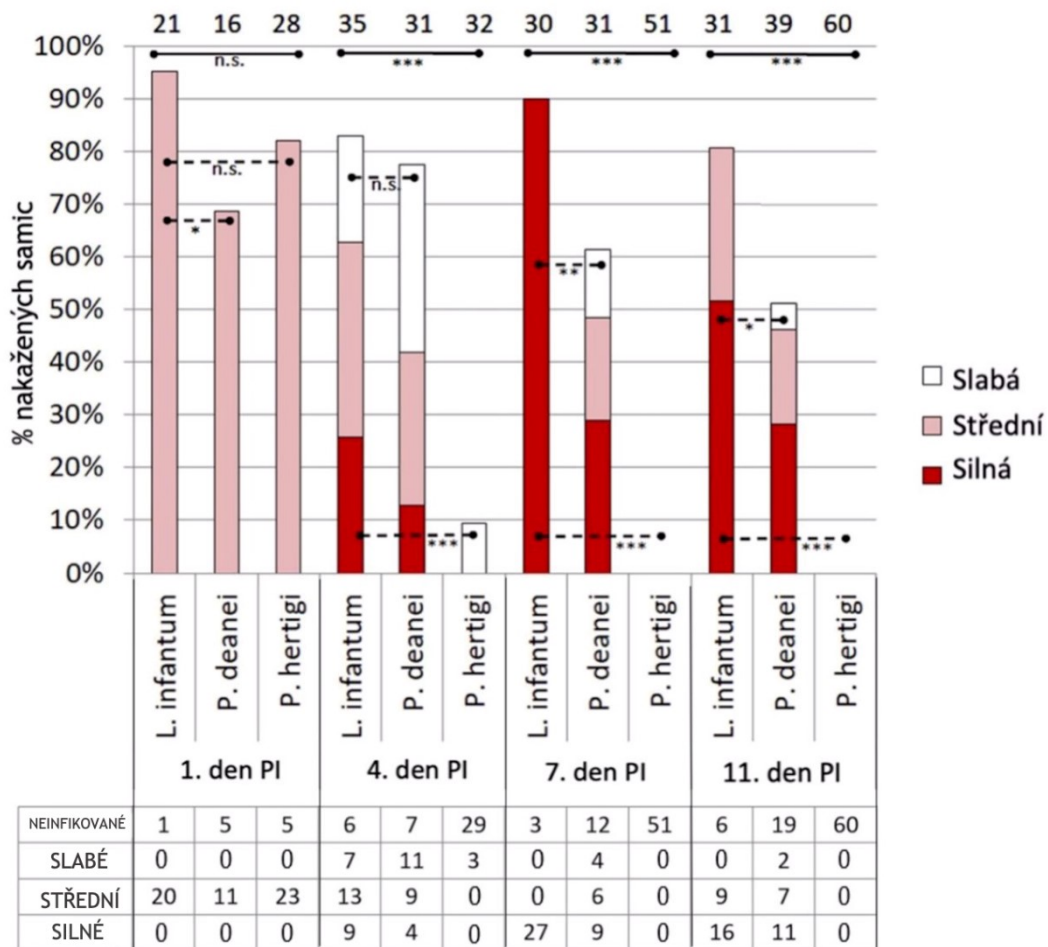
Druh	Den PI	Forma	Počet forem	Délka těla		Šířka těla		Délka bičíku	
				Průměr (odchylka)	min–max	Průměr (odchylka)	min–max	Průměr (odchylka)	min–max
<i>P. deanei</i>	4	PP	8	12,0 (± 1,6)	9,1–13,5	2,1 (±0,8)	1,1–3,3	7,6 (± 2,8)	3,6–11,5
		EN	14	11,5(± 2,6)	8,4–17,9	1,9 (± 0,9)	1,0–4,4	22,9 (± 7,2)	11,2–34,9
		MC	4	6,6 (± 1,0)	5,1–7,38	2,0 (± 0,6)	1,2–2,6	17,9 (± 3,9)	14,8–23,5
		LE	2	6,9 (± 0,6)	6,5–7,4	2,4 (± 0,4)	2,1–2,7	8,3 (± 1,8)	7,1–9,6
	7	EN	5	11,5 (± 1,6)	10,3–14,2	1,7 (± 0,5)	1,2–2,4	18,8 (± 3,8)	13,0–22,9
		LE	1	7,9	7,9–7,9	2,3	2,3–2,3	7	7,0–7,0
<i>P. hertigi</i>	4	LE	1	7,5	7,5–7,5	2,3	2,3–2,3	8,2	8,2–8,2
		MC	2	6,6 (± 1,6)	5,5–7,8	2,1 (± 0,8)	1,6–2,7	22,7 (± 0,3)	22,5–23,0

PP = procykliční promastigoti, EN = dlouhé nektomonády, MC = metacykliční promastigoti, LE = leptomonády (krátké promastigoti).

4.2.2 Experimentální infekce *Lutzomyia longipalpis*

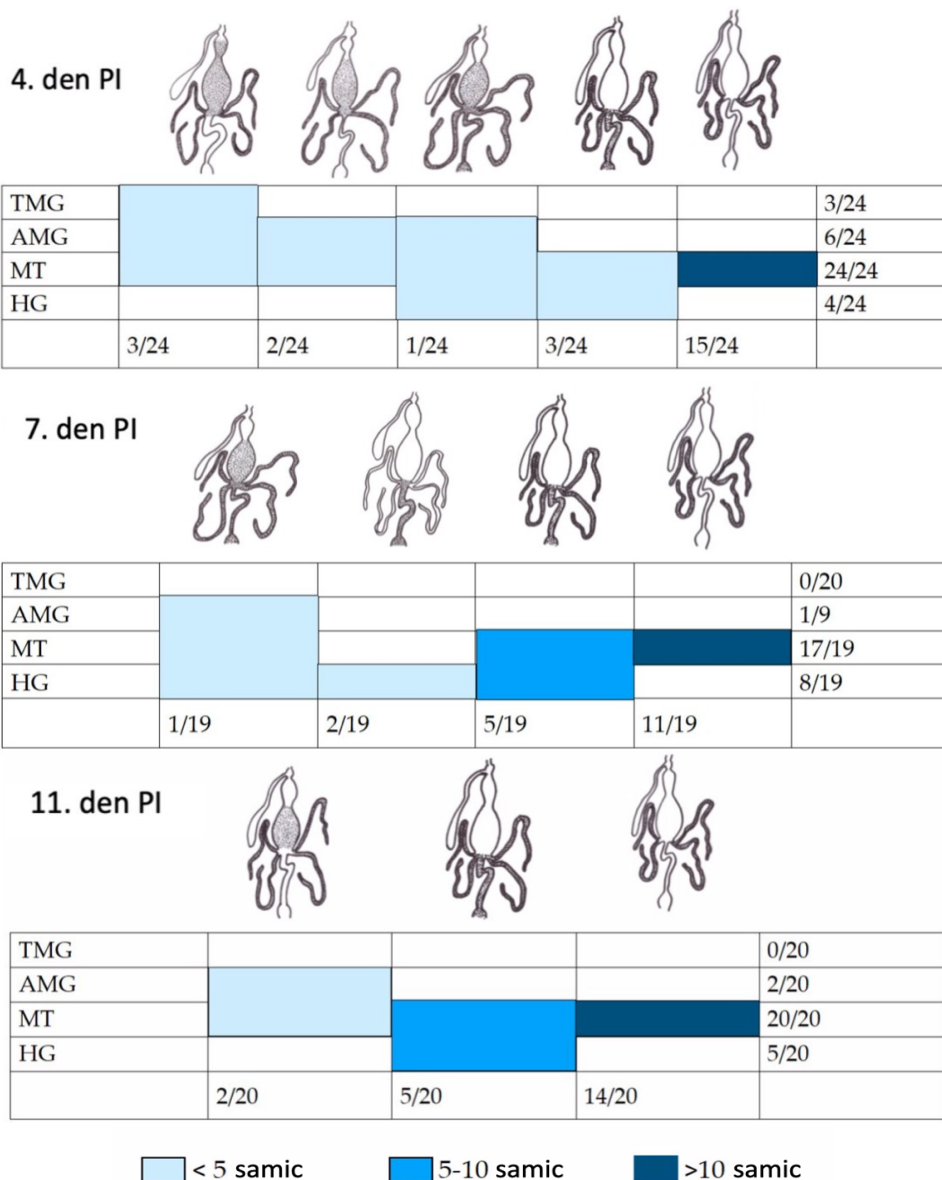
Pitvy byly provedeny vždy 1., 4., 7. a 11. den po infekčním sání. Díky tomu, že samice *Lu. longipalpis* přežívají déle než samice *Lu. migonei*, bylo možno zahrnout i 11. den po infekci. Celkem bylo prohlédnuto 117 samic infikovaných *P. deanei*, 171 samic infikovaných *P. hertigi* a 117 samic infikovaných *L. infantum*.

První den po infekčním sání tvořily všechny tři druhy parazitů středně silné infekce v nasáté krvi obklopené peritrofickou matrix. V krvi se promastigoti hojně množili. Čtvrtý den po infekci kleslo procento samic infikovaných *P. hertigi* pod 10 %, zatímco podíl infikovaných samic a intenzita infekcí *P. deanei* byla blízká hodnotám kontrolního druhu *L. infantum* (Obr. 7). Zajímavá byla lokalizace *P. deanei*, která byla vždy přítomna v MT, přičemž u 62 % samic to byla jediná infikovaná část střeva. Sedmý den po infekci byly všechny samice infikované *P. hertigi* negativní, zatímco samic infikovaných *P. deanei* bylo pozitivních více než 60 %. *Porcisia deanei* se opět nacházela především v MT (Obr. 10). Jedenáctý den po infekci byly opět všechny samice infikované *P. hertigi* negativní, zatímco samic infikovaných *P. deanei* bylo pozitivních 51 %. Malpigické trubice byly opět hlavním místem výskytu *P. deanei* a byly zde pozorovány často silné infekce (Obr. 10).

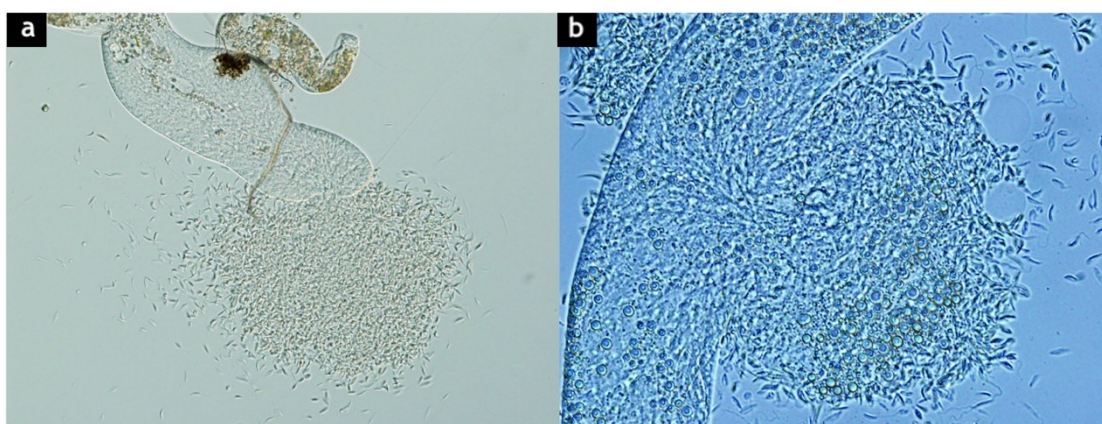


Obr. 10 – Intenzita infekcí ve čtyřech časových intervalech, porovnání *L. infantum*, *P. deanei* a *P. hertigi* v *Lu. longipalpis*.

PI = po infekci. Čísla nad sloupci uvádí počet vypitvaných samic. Plné spojovací čáry značí rozdíl mezi všemi třemi testovanými druhy; přerušované čáry zase rozdíl mezi dvěma navzájem propojenými druhy. n. s. (nesignifikantní) = $P > 0,05$, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$.



Obr. 11 – Znázornění lokalizací u *P. deanei* 4., 7. a 11. den po infekčním sání.



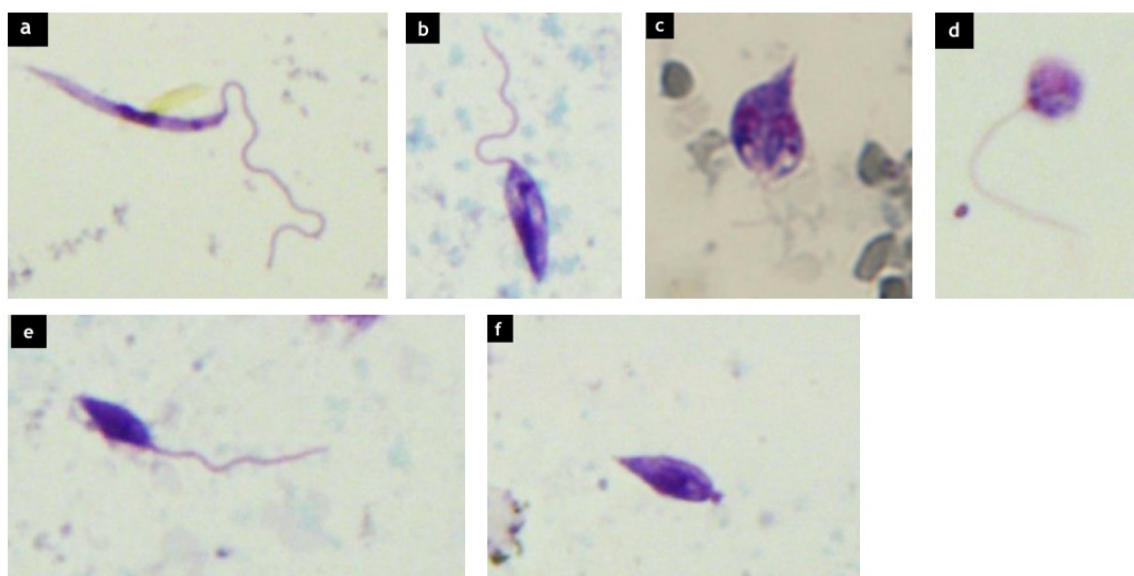
Obr. 12 – *P. deanei* v malpighických trubicích *Lu. longipalpis*.

a) 7. den po infekčním sání, zvětšení 200×

b) 10. den infekčním sání, zvětšení 400× (světelný mikroskop, DIC)

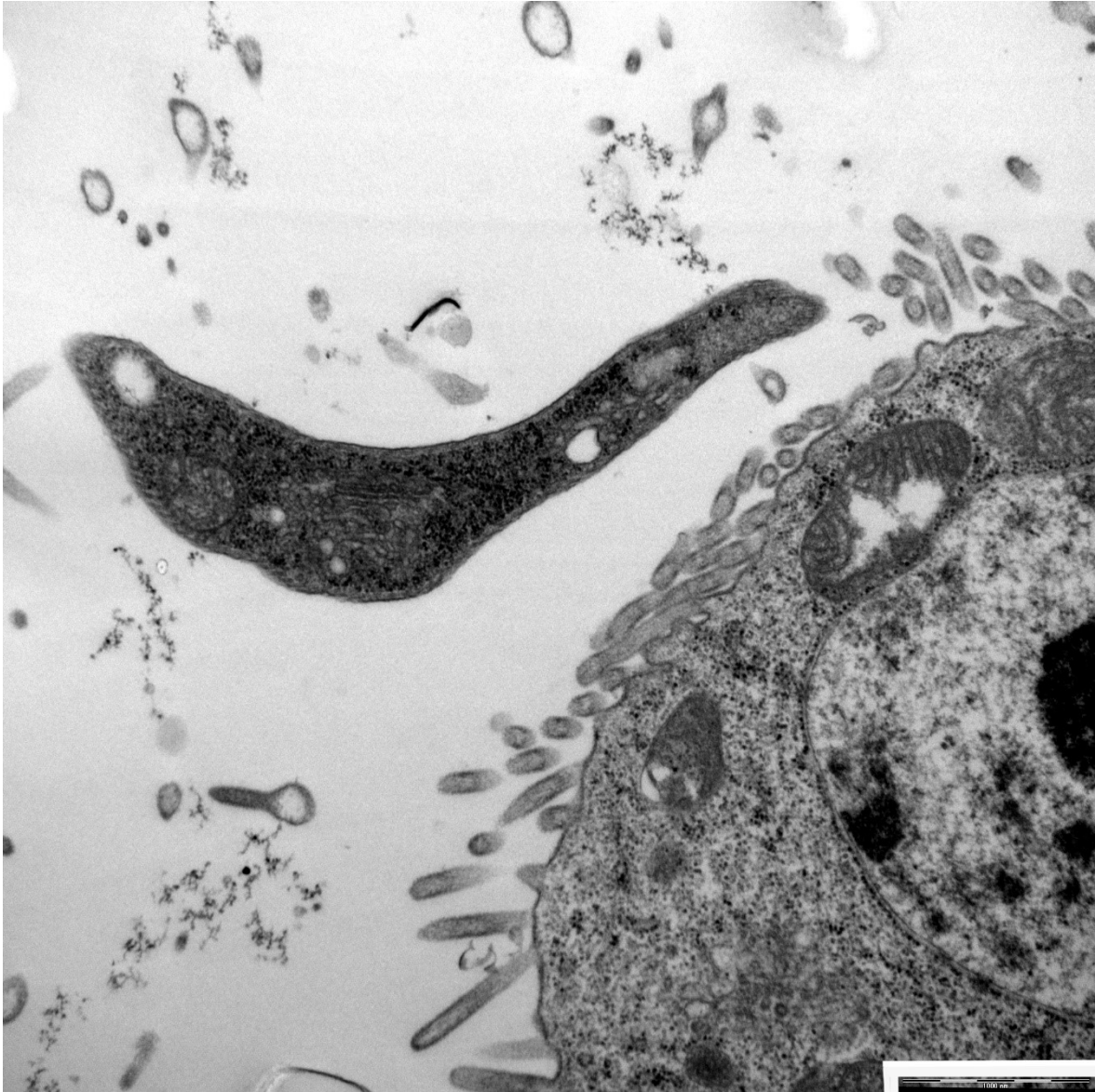
Zastoupení jednotlivých morfologických forem rodu *Porcisia* a kontrolního druhu *L. infantum* v *Lu. longipalpis* bylo hodnoceno vždy 1., 4., 7. a 11. den po infekčním sání z roztlakových preparátů obarvených roztokem Giemsa.

Na základě kritérií popsaných v kapitole 3.7 byly rozlišovány čtyři morfologické formy – procyklické formy, dlouhé nektomonády, krátkí promastigoti (leptomonády) a metacykličtí promastigoti. Haptomonády byly také nalezeny, ale jen ojediněle, neboť tyto formy zůstávají většinou přichyceny k povrchu střeva. Z důvodu, že by byl jejich počet na preparátech podceněn, nebyly zahrnuty do kvantitativní analýzy. Bohužel přisedlé formy nebyly zachyceny na snímcích z elektronového mikroskopu, zaznamenaná *P. deanei* je zobrazena na Obr. 14. Zástupci jednotlivých forem na snímcích ze světelného mikroskopu jsou zobrazeni na Obr. 13.



Obr. 13 – Morfologické formy *P. deanei* v *Lu. longipalpis* (zvětšení 1000×)

- a) nektomonáda
- b) krátký promastigot (leptomonáda)
- c) procyklický promastigot
- d) kulatý metacyklický promastigot
- e) štíhlý metacyklický promastigot
- f) haptomonáda



Obr. 14 – *P. deanei* v malpigické trubici *Lu. longipalpis* zachycená transmisním elektronovým mikroskopem (TEM JEOL1400).

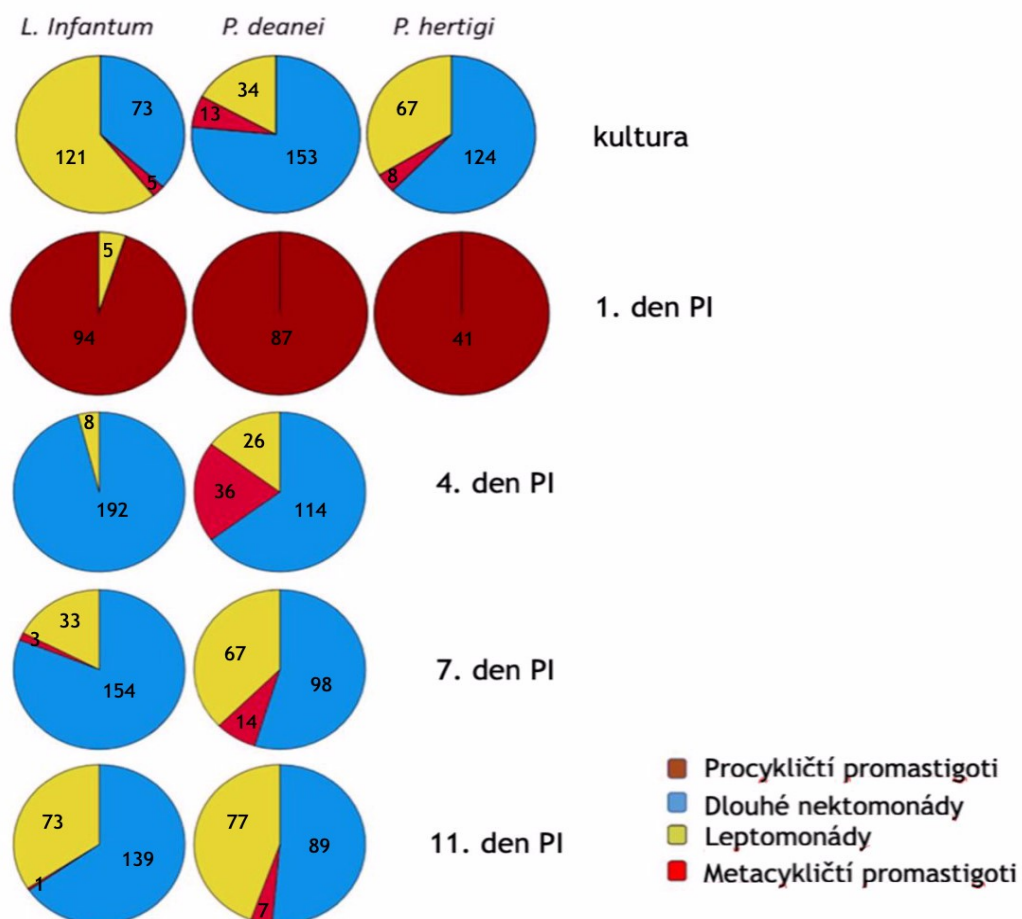
Na měřítku vyznačen úsek odpovídající 1 μm délky.

V kultuře *L. infantum* převažovaly leptomonády (61 %), narozdíl od rodu *Porcisia*, kde byly nejvíce zastoupeny dlouhé nektomonády (*P. deanei* – 76,5 %, *P. hertigi* – 62 %). O něco méně byli u porcisií zastoupeny leptomonády a v malé míře u všech tří druhů se nacházely v kultuře metacykly.

První den po infekčním sání, kdy byly leishmanie přítomny v endoperitrofickém prostoru, byli u porcisií zastoupeni v krvi pouze procykličtí promastigoti, u *L. infantum* jsme již v malé míře nacházeli i leptomonády. Procyklická stádia rodu *Porcisia* byla charakteristická malými rozměry a velmi krátkým nebo zcela nerozlišitelným bičkem, jak již bylo zmíněno, vzhledem tedy připomínala amastigoty.

Další dny po infekci bylo možno hodnotit jen morfologii *P. deanei* a kontrolní *L. infantum*, *P. hertigi* v přenašečích nepřežívala defekaci. Čtvrtý den byly nejvíce zastoupenou formou u obou druhů dlouhé nektomonády. U *P. deanei* tvořily 64 %, dále byli v populaci zastoupeni metacykličtí promastigoti (20 %) a kratší promastigoti (15 %). Metacyklické formy měly buď kulatý nebo štíhlý

oválný tvar těla (viz také obrázek 10). U *L. infantum* vysoce převažovaly nektomonády (96 %) a zbytek populace tvořili krátkí promastigoti. Sedmý a jedenáctý den po infekci klesalo u všech druhů zastoupení nektomonád, zatímco stoupal podíl leptomonád a metacyklických promastigotů. Zastoupení jednotlivých forem je graficky znázorněno na Obr. 15 a rozměry jednotlivých forem u jednotlivých druhů shrnuje Tab. 9.



Obr. 15 – Zastoupení jednotlivých forem *L. infantum*, *P. deanei* a *P. hertigi* v *Lu. longipalpis* v pěti časových intervalech.

Čísla uvnitř výsečí kruhu uvádí počet forem promastigotů.

Tab. 9 – Rozměry jednotlivých forem *L. infantum*, *P. deanei*, *P. hertigi*.

Druh	Den PI	Forma	Počet forem	Délka těla		Šířka těla		Délka bičíku	
				Průměr (odchylka)	min–max	Průměr (odchylka)	min–max	Průměr (odchylka)	min–max
<i>L. infantum</i>	0	EN	73	16,2 (± 1,7)	14–21,1	2,1 (± 0,3)	1,2–2,9	16,0 (± 4,8)	6,9–30
		MC	5	8,4 (± 0,3)	8–9,1	2,1 (± 0,3)	1,7–2,4	19,3 (± 2,8)	16,2–23,5
		LE	121	10,0 (± 2,6)	4,7–13,9	2,1 (± 0,5)	1,1–4,6	13,5 (± 4,7)	4,4–26,8
	1	PP	94	8,5 (± 2,1)	4,4–15,2	3,0 (± 1,1)	1,2–5,9	1,8 (± 2,9)	0–11,2
		LE	5	11,0 (± 2,1)	8,3–12,6	4,0 (± 0,)	3,5–4,7	13,0 (± 2,9)	8,4–16,1
	4	EN	192	20,8 (± 3,2)	14,1–32,8	1,4 (± 0,3)	0,8–3,2	18,5 (± 3,9)	3,4–31,5
		LE	8	12,0 (± 1,0)	10,2–13,2	2,1 (± 0,8)	1,2–3,8	19,0 (± 3,2)	14,2–23,4
	7	EN	154	18,9 (± 2,8)	14–26	2,1 (± 0,6)	1,2–4,4	18,3 (± 5,7)	1,7–32,4
		MC	3	10,7 (± 0,8)	10–11,5	3,5 (± 1,5)	2,3–5,2	26,9 (± 4,3)	22,8–31,3
		LE	33	12,2 (± 1,5)	6,9–13,9	2,3 (± 1,0)	1,1–5,1	13,3 (± 6,1)	1,9–22,8
	11	EN	139	17,6 (± 2,4)	14–25,9	2,4 (± 0,6)	1,1–4	17,2 (± 4,8)	1,3–29,4
		MC	1	8,3	8,3–8,3	2,4	2,4–2,4	20,7	20,7–20,7
LE		73	10,5 (± 2,6)	5,2–13,9	2,5 (± 0,8)	1,3–6,9	12,4 (± 5,3)	2,4–24,7	
<i>P. deanei</i>	0	EN	153	11,1 (± 2,1)	8–17,6	2,1 (± 0,4)	1,2–3,2	15,2 (± 3,7)	6,1–27,3
		MC	13	10,2 (± 1,7)	8,1–13,1	2,0 (± 0,5)	1,5–3,3	22,1 (± 3,5)	17,2–27,1
		LE	34	6,8 (± 0,7)	5,4–7,9	2,0 (± 0,3)	1,3–2,7	13,4 (± 4,4)	3,5–24,5
	1	PP	87	7,7 (± 1,5)	4,7–12,8	3,0 (± 0,9)	1,6–7,4	0,3 (± 0,8)	0–3,8
	4	EN	114	12,4 (± 2,2)	8,1–17,6	2,0 (± 0,6)	1,1–4,9	17,1 (± 4,6)	2–30,2
		MC	36	10,5 (± 1,8)	8,1–14,5	2,1 (± 0,5)	1,1–3,2	25,5 (± 4,4)	16,9–34,6
		LE	26	6,1 (± 1,3)	2,7–7,7	3,3 (± 1,2)	1,8–5,1	18,9 (± 8,1)	3–35,7
	7	EN	98	9,9 (± 1,4)	8–14	8,8 (± 0,8)	1,3–5,5	13,0 (± 4,5)	0,6–21,3
		MC	14	9,3 (± 1,1)	8–11,4	3,0 (± 1,0)	1,7–5,1	21,3 (± 3,0)	17,2–25,9
		LE	67	6,1 (± 1,0)	4,4–7,9	3,2 (± 1,1)	1,5–8,2	11,6 (± 5,2)	1,1–25
	11	EN	89	10,7 (± 2,2)	8,1–19,4	2,0 (± 0,6)	1–3,8	12,4 (± 4,3)	2–21,1
		MC	7	9,3 (± 1,3)	8,2–11,8	2,2 (± 0,5)	1,2–2,8	20,5 (± 1,8)	18,1–23,7
LE		77	6,3 (± 1,0)	4–7,8	2,4 (± 0,7)	1,3–4,2	10,5 (± 3,6)	0,8–20,4	
<i>P. hertigi</i>	0	EN	124	9,5 (± 1,0)	8–12,2	2,1 (± 0,4)	1,4–3,5	14,2 (± 2,5)	8,5–23
		MC	8	8,7 (± 0,4)	8,2–9,1	2,2 (± 0,5)	1,7–2,8	19,0 (± 2,1)	16,9–22,7
		LE	67	6,7 (± 1,1)	4,2–7,9	2,0 (± 0,3)	1,3–2,8	13,3 (± 3,6)	7,3–24,9
	1	PP	41	6,1 (± 1,4)	3,6–9,2	3,0 (± 0,6)	1,9–4,4	0,1 (± 0,2)	0–1,4

PP = procykličtí promastigoti, EN = dlouhé nektomonády, MC = metacykličtí promastigoti, LE = leptomonády (krátkí promastigoti).

4.3 Přítomnost *P. deanei* v moči *Lu. longipalpis*

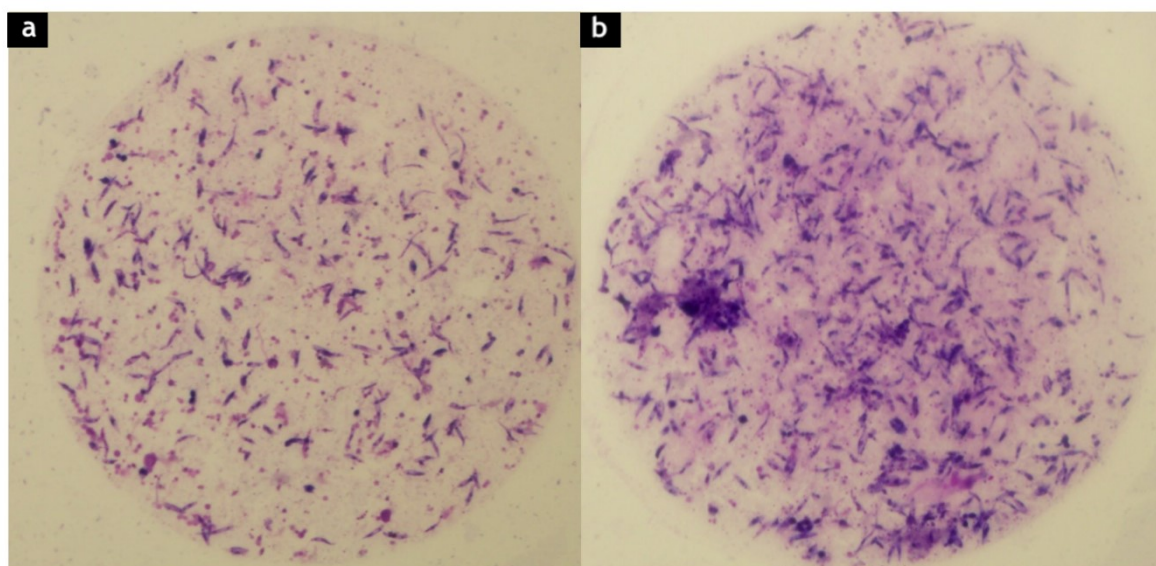
Zajímavá lokalizace porcisíí v MT přenašečů nás vedla k další sérii pokusů zaměřených na zodpovězení důležité otázky, zda se jedná o aberantní lokalizaci danou tím, že *Lu. longipalpis* nemusí být přirozeným přenašečem *P. deanei*, nebo zda by MT mohly být přirozenou lokalizací porcisíí, odkud se mohou dostávat při prediurezi do kapek vylučované moči a takto infikovat obratlovčího hostitele. Prediureze je proces, kdy samice flebotoma zahušťuje nasátou krevní potravu vylučováním přebytečné vody, která proudí z hemolymfy malpighickými trubicemi do zadního střeva a je vylučována již během sání na hostiteli.

Samice *Lu. longipalpis* byly experimentálně nakaženy *P. deanei*. Byla použita infekční dávka 2×10^6 promastigotů / ml. Infikované samice byly potom 10–14 dní PI fixovány k podložce a nuceny sát kapalinu ze skleněné kapiláry, která jim byla nasazena na proboscis. Kapky moči, které vypouštěly během sání (prediureze), byly zachytávány na krycí sklíčka. Prediureze byla zachycena

u pěti nakažených samic, přičemž u tří z nich byly ve všech vyloučených kapkách přítomné porcisie, převážně ve velkých počtech (40–350 promastigotů na kapku). Mezi promastigoty v kapkách tvořily metacyklické formy 20–29 %. Výsledky pokusu shrnuje Tab. 10.

Tab. 10 – Počet porcisií a jejich metacyklických forem v moči *Lu. longipalpis* vylučované během prediureze.

Číslo samice	Číslo kapky	Počet porcisií v kapce	Počet (%) metacyklických promastigotů v kapce
1	1	150	40 (27)
2	1	60	15 (25)
	2	40	10 (25)
	3	250	50 (20)
	4	160	40 (25)
	5	35	10 (29)
	6	55	20 (36)
	7	40	10 (25)
	8	270	70 (26)
	9	350	100 (29)
3	1	200	40 (20)
	2	95	20 (21)



Obr. 16 – Přítomnost *P. deanei* v prediuretické moči *Lu. longipalpis*.

a) kapka č. 8 vypuštěná samicí č. 2

b) kapka č. 9 vypuštěná samicí č. 2

4.4 Přenos *Porcisia deanei* na BALB/c myši

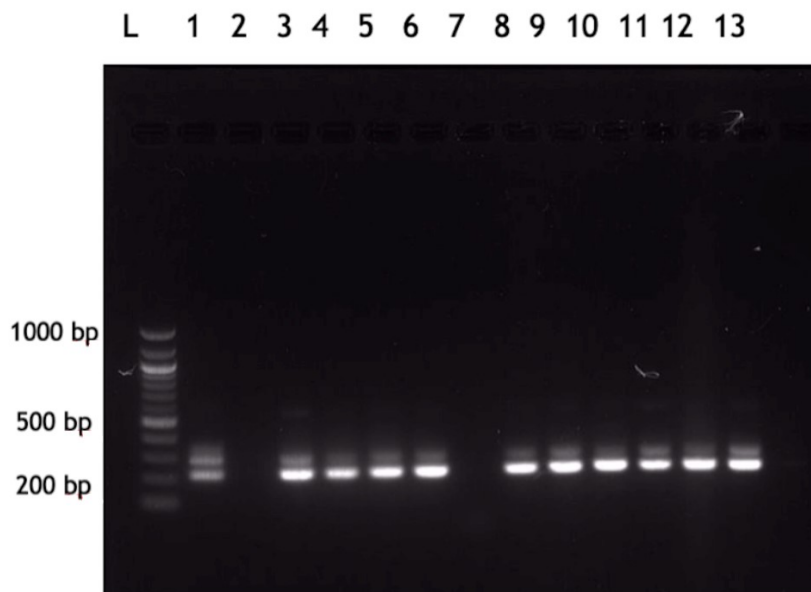
Cílem přenosových experimentů s BALB/c myši bylo dokázat, že *P. deanei* se s prediurezií *Lu. longipalpis* může přenést na savčího hostitele.

Samicím *Lu. longipalpis* bylo deset dní po infekčním sání umožněno sát na uších BALB/c myši uspaných roztokem ketaminu a xylazinu. Celkem byly provedeny tři přenosové experimenty. Jako kontrola nám sloužil pokus, v němž byly dvě BALB/c myši vystaveny sání *Lu. longipalpis*

infikovanými *L. infantum*, usmrceny byly hned po sání a byly jim odebrány ušní boltce, které byly následně testovány na přítomnost DNA parazita pomocí nested PCR. U všech čtyř vzorků (obě uši dvou myší) byla potvrzena přítomnost DNA parazita. V dalších dvou pokusech sály na myších samice *Lu. longipalpis* infikované *P. deanei*. V prvním byly dvě myši usmrceny bezprostředně po sání a ve dvou ze tří případů byla DNA *P. deanei* ve tkáni detekována. V posledním experimentu sály *Lu. longipalpis* infikované *P. deanei* na BALB/c myších, které byly usmrceny až čtyři dny po sání. Myším byly odebrány jak uši, tak tentokrát i lymfatické uzliny. DNA parazita ve tkáni byla potvrzena v obou uších a obou lymfatických uzlinách. Počty flebotomů použitých v pokusech shrnuje Tab. 11 a výsledky PCR detekce Obr. 17. Dlouhodobé sledování myší na přítomnost porcisií po experimentálním přenosu bohužel nebylo technicky možné, porcisie jsou silně hostitelsky specifické pro urzony a v modelových laboratorních zvířatech se infekce neudrží (Herrer, 1971).

Tab. 11 – Výsledky mikroskopické prohlídky *Lu. longipalpis* sajících na uších BALB/c myší a PCR detekce u DNA *P. deanei* a *L. infantum* z tkáni myší.

Druh parazita	Tkáň BALB/c myši	Počet nasátých samic	Počet nasátých nakažených samic	Interval po sání, kdy byly BALB/c myši usmrceny	Přenos potvrzený PCR
<i>L. infantum</i>	ucho	15	8	ihned	ano
	ucho	14	5	ihned	ano
	ucho	16	7	ihned	ano
	ucho	9	3	ihned	ano
<i>P. deanei</i>	ucho	17	9	ihned	ne
	ucho	13	8	ihned	ano
	ucho	12	7	ihned	ano
	ucho	8	3	4 dny	ano
	ucho	2	2	4 dny	ano
	lymf. uzlina	8	3	4 dny	ano
	lymf. uzlina	2	2	4 dny	ano



Obr. 17 – PCR detekce DNA *P. deanei* a *L. infantum* (226 bp dlouhý úsek genu pro 18S ribosomální podjednotku).

1) pozitivní kontrola s *L. major*

2) negativní kontrola

3–6) DNA izolovaná z uší BALB/c myši vystavených *L. infantum* (myši zabitě ihned po sání)

7–9) DNA izolovaná z uší BALB/c myši vystavených *P. deanei* (myši zabitě ihned po sání)

10–11) DNA izolovaná z uší BALB/c myši vystavených *P. deanei* (myši zabitě 4 dny po sání)

12–13) lymfatické uzliny odebrané z BALB/c myši vystavených *P. deanei* (zabitě 4 dny po sání)

4.5 Porovnání morfologických forem podrodu *Mundinia* v *Culicoides sonorensis* a *Phlebotomus argentipes*

Sledovali jsme zastoupení jednotlivých morfologických forem u dvou druhů podrodu *Mundinia* – *Leishmania martiniquensis* kmene Cu2 a *Leishmania orientalis* v tiplících *C. sonorensis* a flebotomech *Ph. argentipes*. Zastoupení forem bylo hodnoceno vždy 1., 4., 6. a 10. den po infekčním sání z roztlakových preparátů obarvených roztokem Giemsa, pokud byli v daných dnech promastigoti zachyceni, a statisticky hodnoceno chí-kvadrátovým testem. Zastoupení forem je graficky znázorněno na Obr. 18 a 19 a počty a rozměry jednotlivých forem u jednotlivých druhů shrnuje Tab. 12.

Leishmania martiniquensis i *L. orientalis* v obou typech přenašečů tvořily stejnou škálu morfologických forem – procyklické promastigoty, dlouhé nektomonády, krátké promastigoty (leptomonády) a metacyklické promastigoty.

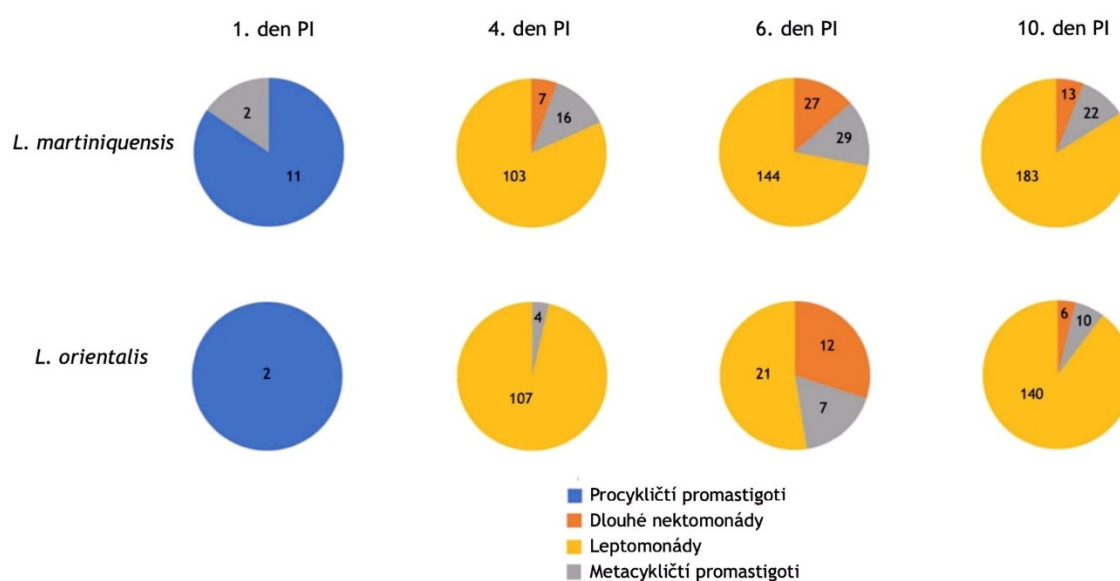
První den po infekčním sání se v krvi obalené peritrofickou matrix nacházeli u obou přenašečů převážně procyklické promastigoty. U tiplíků i flebotomů se v malé míře už vyskytovali i metacyklické promastigoty, u flebotomů své zastoupení v krvi měly i leptomonády. Statisticky se zastoupení forem *L. martiniquensis* v těchto dvou vektorech výrazně nelišilo ($P = 0,503$, d.f. = 2, $\chi^2 = 1,376$), u *L. orientalis* byl počet hodnocených promastigotů pro statistiku příliš malý.

Čtvrtý den po infekci bylo zastoupení forem *L. martiniquensis* v tiplících i flebotomech velice podobné ($P = 0,887$, d.f. = 2, $\chi^2 = 0,240$). V obou přenašečích dominovaly jednoznačně leptomonády, v menší míře se tvořily nektomonády a metacykly. Také zastoupení forem u *L. orientalis* se v přenašečích statisticky nelišilo ($P = 0,106$, d.f. = 2, $\chi^2 = 4,491$). Jednoznačně u obou vektorů převažovaly leptomonády, u *Ph. argentipes* byly v malé míře zachyceny nektomonády a u *C. sonorensis* jeden metacyklický promastigot.

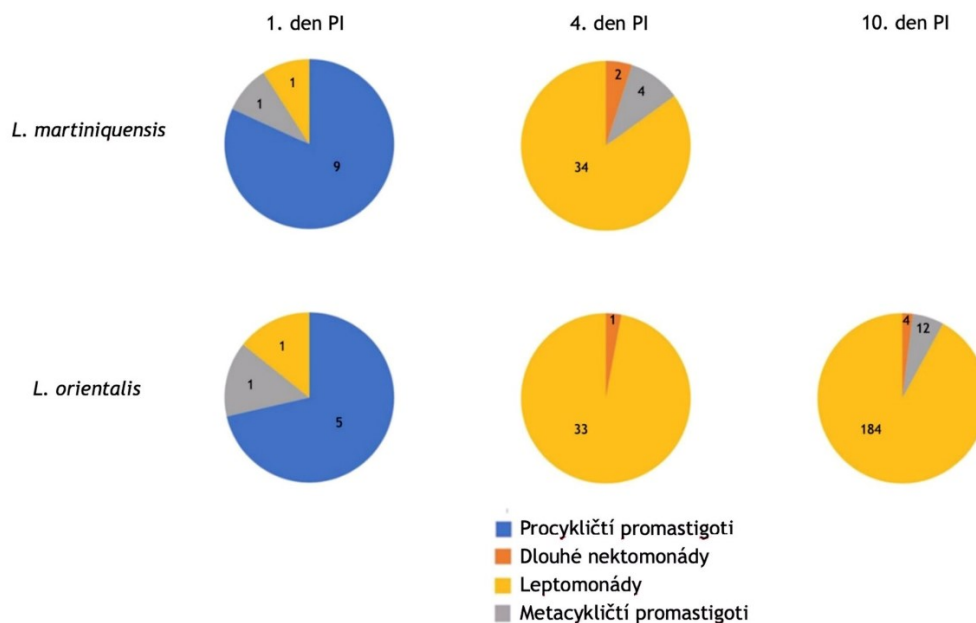
Šestý den po infekci jsme z roztlakových preparátů měli k dispozici parazity pouze u tiplíků. U obou druhů mundinií převládaly opět leptomonády (ve větší míře u *L. martiniquensis*), a oproti dnu 4 stouplo zastoupení nektomonád a metacyklů.

Desátý den po infekci jsme pro srovnání neměli k dispozici *L. martiniquensis* ve flebotomech. Zastoupení forem *L. orientalis* bylo v obou přenašečích opět velice podobné ($P = 0,567$, d.f. = 2, $\chi^2 = 1,136$). Jednoznačně převládaly leptomonády, dále se tvořily metacykly a ve velmi malé míře se objevovaly nektomonády. Kmen Cu2 v tiplících tvořil rovněž převážně leptomonády, v menší míře metacykly a v malé míře se vyskytovaly nektomonády.

Rozdíl ve velikosti délky těla v *C. sonorensis* a *Ph. argentipes* byl statisticky hodnocen na celkovém materiálu t-testem (Tab. 12). Mezi formami parazitů nebyly signifikantní velikostní rozdíly. Pouze nektomonády *L. martiniquensis* byly signifikantně větší v *Ph. argentipes*, ovšem hodnocených parazitů ve flebotomech bylo příliš málo na to, aby se tento výstup dal brát za relevantní.



Obr. 18 – Zastoupení jednotlivých morfologických forem v tiplících *C. sonorensis*.
Čísla uvnitř výsečí kruhu uvádí počet forem promastigotů.



Obr. 19 – Zastoupení jednotlivých morfologických forem ve flebotomech *Ph. argentipes*. Čísla uvnitř výsečí kruhu uvádí počet forem promastigotů.

Tab. 12 – Počty a rozměry jednotlivých forem *L. martiniquensis* a *L. orientalis* (v obou přenašečích).

DRUH			FORMY			
			PP	EN	MC	LE
<i>L. martiniquensis</i>	Délka těla	Průměr (odchylka)	7,0 (± 1,7)	15,6 (± 1,7)	8,3(± 1,7)	10,1 (± 2,0)
		min–max	4,4–10,2	14–24,3	4,3–12,2	4,9–13,9
	Šířka těla	Průměr (odchylka)	2,7 (± 0,7)	2,1 (± 0,6)	2,7 (± 0,7)	2,5 (± 1,1)
		min–max	1,7–4,1	1,2–4,1	1,3–4,5	0,8–7,9
	Délka bičíku	Průměr (odchylka)	2,6 (± 1,7)	20,3 (± 3,2)	19,8 (± 4,2)	11,8 (± 6,0)
		min–max	0–6,9	11,1–25,6	11,3–33,7	1,3–25,1
	Počet (<i>C.son.</i> , <i>P. arg.</i>)		20 (11, 9)	49 (47, 2)	74 (69, 5)	464 (429, 35)
	t-test	Hodnota P	0,924	0	0,858	0,519
Hodnota t		1,335	-7,463	0,26	0,583	
<i>L. orientalis</i>	Délka těla	Průměr (odchylka)	5,8 (± 1,1)	14,9 (± 0,6)	7,2 (± 2,2)	8,8 (± 1,8)
		min–max	4,7–7,7	14–16,4	3,5–13,9	3,7–13,9
	Šířka těla	Průměr (odchylka)	2,8 (± 1,1)	1,9 (± 0,4)	2,3 (± 0,8)	2,5 (± 0,8)
		min–max	1,9–4,5	1,3–2,8	1,2–4,3	0,8–7,4
	Délka bičíku	Průměr (odchylka)	3,3 (± 2,0)	20,1 (± 5,1)	17,1 (± 4,4)	7,5 (± 5,0)
		min–max	0–5,4	8,6–29,4	8,4–28	0,8–23,1
	Počet (<i>C.son.</i> , <i>P. arg.</i>)		7 (2, 5)	23 (18, 5)	34 (21, 13)	486 (268, 218)
	t-test	Hodnota P	0,185	0,387	0,599	0,605
Hodnota t		-0,498	-0,905	1,268	-0,683	

PP = procykliční promastigoti, EN = dlouhé nektomonády, MC = metacykliční promastigoti, LE = leptomonády (krátkí promastigoti). P = hladina pravděpodobnosti, t = testovaná statistika t pro velikost délky těla.

5 Diskuze

5.1 Rod *Porcisia*

Biologie rodu *Porcisia* je na rozdíl od lékařsky významného rodu *Leishmania* velice málo prozkoumána. Dva dosud popsání zástupci rodu, *Porcisia hertigi* a *Porcisia deanei*, parazitují u amerických stromových dikobrazů – urzonů rodu *Coendou*. Nákazy dikobrazů probíhají asymptomaticky, i když amastigoti bývají v těle hojně rozšířeni – jak v kůži, tak mohou i visceralizovat (Espinosa et al. 2016). Protože ale nejsou patogenní pro člověka, nebylo jim věnováno tolik pozornosti, jako patogenním zástupcům rodu *Leishmania*.

Morfologie rodu *Porcisia* byla doposud důkladně popsána jen v několika málo studiích, které popisovaly buď amastigoty z dikobrazího hostitele nebo promastigoty z *in vitro* kultur. Herrer (1971) získával *P. hertigi* z dikobrazů v Panamě a z otisků tkání popsal amastigoty o rozměrech $3,5 - 4,8 \times 1,2 - 2,5 \mu\text{m}$. Lainson a Shaw (1977) rovněž izolovali porcisie z dikobrazů a z otisků tkání popsali amastigoty *P. deanei* o rozměrech: $6,1 \times 3,1 - 3,7 \mu\text{m}$, tedy výrazně větší, než *P. hertigi*. Ve zmíněných studiích promastigoti v kultuře vykazovali velké rozpětí velikostí s rozměry: $6,0 - 18,0 \times 1,5 - 2,5 \mu\text{m}$ s bičíkem o délce $7-24 \mu\text{m}$ u *P. deanei* (Lainson a Shaw 1977) a $7,5 - 20,5 \times 1,3 - 4,1 \mu\text{m}$ s bičíkem o rozměrech $9,1 - 35,5 \mu\text{m}$ u *P. hertigi* (Herrer, 1971). V mé práci byli promastigoti *P. deanei* v kultuře ($5,4 - 17,6 \times 1,2 - 3,3 \mu\text{m}$) větší, než *P. hertigi* ($4,2 - 12,2 \times 1,3 - 2,8 \mu\text{m}$), ale rozdíl nebyl výrazný.

V této diplomové práci jsme se navíc mohli zabývat morfologií buněk získaných ze střev přenašeče, kterou doposud ještě nikdo nezkoumal. Promastigoti porcisií byli výrazně menší než kontrolní *Leishmania infantum*, ale tvořili v přenašeči stejná stádia – procyklické formy, nektomonády, leptomonády a metacyklické formy. Kvůli celkově menší velikosti buněk nebylo pro rozlišení nektomonád od krátkých promastigotů možné použít rozhraní $14 \mu\text{m}$, které se běžně používá u rodu *Leishmania* (Sádllová et al. 2010), ale stanovili jsme hranici $8 \mu\text{m}$. Promastigotní stádia měla na rozdíl od *L. infantum* jen nepatrný bičík, který často nebyl na preparátech pozorovatelný. Po defekaci převládaly u *P. deanei* nejprve dlouhé nektomonády a postupně se pak zvyšoval podíl leptomonád, stejně jako u *L. infantum*. Již od čtvrtého dne po infekci se v *Lu. longipalpis* objevovaly i metacyklické formy. Metacyklické formy jsme zachytili po defekaci nakažených samic i v *C. sonorensis* a *Lu. migonei*, byť v těchto druzích přenašečů přežívala *P. deanei* jen v malém procentu samic.

Přirození přenašeči rodu *Porcisia* doposud nebyli popsáni. Jediný údaj z přírody pochází z roku 2018, kdy Thies et al. (2018) zkoumali přirozenou nákazu flebotomů leishmaniemi v městské oblasti Sinop státu Mato Grosso v Brazílii a objevili DNA *P. hertigi* v druhu *Lutzomyia antunesi*. Avšak samotný nález DNA pomocí PCR detekce neznamena, že se v přenašeči parazit množí a je schopen dokončit vývoj.

Laboratorní infekce byly dosud popsány pouze ve třech studiích ze sedmdesátých let minulého století. Lainson et al. (1977) a Croft a Molyneux (1979) zkoumali vývoj *P. hertigi* a *P. deanei* v *Lutzomyia longipalpis*. V obou pracích byly zaznamenány jen slabé infekce střev u malého procenta samic lokalizované v mesenteronu, zadním střevě a malpigických trubicích. Velmi slabý vývoj *P. hertigi* byl také popsán u panamského druhu *Lutzomyia gomezi* (Anon, 1967 ex Lainson a Shaw 1977). V našich experimentech jsme sledovali vývoj *P. hertigi* a *P. deanei* ve dvou druzích

flebotomů, *Lu. longipalpis* a *Lu. migonei*, kteří sdílí s rodem *Porcisia* areál rozšíření v Jižní Americe (Shimabukuro et al. 2017) a podporují vývoj *L. infantum* a *L. braziliensis* (Alexandre et al. 2020; Guimarães et al. 2016). Zatímco *P. hertigi* nepřežívala defekaci v žádném druhu, *P. deanei* tvořila v *Lu. longipalpis* silné infekce i desátý den po infekci.

Do studie jsme kromě flebotomů zařadili i tiplíky druhu *Culicoides sonorensis*, protože nedávno byla potvrzena jejich kompetence přenášet leishmanie podrodu *Mundinia*. V našich pokusech porcisie v tiplících sice defekaci přežili, kolonizovali MT a tvořili metacycklická stádia, avšak jen v malém procentu samic. Vzhledem k tomu, že *C. sonorensis* je severoamerický druh, není rozhodně vyloučeno, že by se rod *Porcisia* mohl úspěšně vyvíjet v některém z lokálních jiho- a středoamerických druhů.

Ve všech druzích přenašečů jsme promastigoty *P. deanei* opakovaně při pitvách pozorovali v malpigických trubicích (MT). Výskyt v této části střeva byl velice překvapivý.

Občasný výskyt malého množství promastigotů rodu *Leishmania* v MT flebotomů, jako například v *L. flaviscutellata* odchycených ve státě Pará v Brazílii, bývá interpretován jako důsledek jejich vytlačení do MT peristaltickým pohybem středního střeva (Lainson a Shaw 1968). Pokud byli zástupci podrodů *Leishmania* a *Viannia* pozorováni v MT při experimentálních infekcích, bylo to zpravidla u nepřirozených druhů přenašečů (Walters et al. 1989; Nieves a Pimenta 2000; Rangel et al. 1985) a při atypických experimentálních podmínkách (nahrazení sacharózy maltózou či fruktózou, Anez et al. 1989). Nedávno tento výskyt uvedli ve své studii také i Tichá et al. (2021) zaměřené na vývoj různých izolátů *L. (S.) tarentolae* u tří druhů flebotomů rodu *Phlebotomus*. Výskyt v MT byl zaznamenán u všech testovaných přenašečů, přičemž paraziti vykazovali peripylariální nebo hypopylariální vývoj.

Výskyt v MT je vzácný i u ostatních trypanosomatid. Lokalizaci monoxenních druhů v hmyzím hostiteli shrnul Lukeš et al. v práci z roku 2018 a uvádějí, že se paraziti v MT nacházeli jen v 1,9 % hmyzích hostitelů. Infekce byly lokalizovány převážně v oblasti středního (50,7 %) a zadního střeva (22,4 %). U rodu *Endotrypanum* jsou infekce MT popisovány častěji než u rodu *Leishmania*, ale hlavní masa promastigotů je vždy také lokalizována v mesenteronu a/nebo stomodeu. Franco et al. (1997) zkoumali vývoj brazilských kmenů rodu *Endotrypanum* u 3 druhů flebotomů (*Lu. longipalpis*, *Lu. shannoni* a *Ph. papatasi*) a zaznamenali přítomnost bičíkovců v MT zkoumaných přenašečů, avšak infekce odpovídaly klasickému peripylariálnímu vývoji s majoritní infekcí mesenteronu (Franco et al. 1997).

Lokalizace parazitů v trávicím traktu přenašeče má zásadní význam pro přenos na obratlovčího hostitele. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2, způsob vývoje leishmanií v přenašeči byl v 80. letech 20. století podkladem pro jejich rozdělení do jednotlivých podrodů (Lainson a Shaw 1987). Pro podrod *Leishmania* je typický suprapylariální vývoj vyznačující se lokalizací leishmanií pouze v mesenteronu a stomodeu. Podrod *Viannia* a také některé druhy podrodu *Sauroleishmania* se vyznačují peripylariálním vývojem zahrnujícím kromě mesenteronu a stomodea i zadní středvo (proctodeum). Pro zbylé druhy podrodu *Sauroleishmania* je typický hypopylariální vývoj, u něhož je vývoj parazitů omezen na zadní střevo přenašeče. U suprapylariálního a peripylariálního vývoje dochází ke kolonizaci stomodeální valvy a přenosu parazitů ústním ústrojím při sání na hostiteli (shrnutí v Bates, 2007; Lainson a Shaw 1987).

Výskyt v zadním střevě je spojený s kontaminativním přenosem, a to buď pozřením přenašeče (předpokládá se u podrodu *Sauroleishmania*), jeho rozmáčknutím při sání (asi málo pravděpodobná, ale teoreticky uváděná možnost přenosu leishmanií) či vyloučením s exkrementy (shrnuto v Killick-Kendrick, 1979). Tento poslední typ přenosu je znám například u *T. cruzi* (Tyler a Engman 2001) či monoxenních rodů *Herpetomonas* a *Crithidia* (Maslov et al. 2013).

Jelikož porcisie nekolonizovaly v našich pokusech zadní střevo, ale MT, přicházela v úvahu další teoretická možnost kontaminativního přenosu, a to pomocí prediureze. Tento fyziologický proces umožňuje samičce koncentrovat proteiny z přijaté krve. Tekutina je filtrována do MT aktivním transportem z hemolymfy a přebytečnou tekutinu vylučuje samice do vnějšího prostředí ještě během sání na hostiteli (Sádlová a Volf 1999). Sádlová a Volf (1999) popsali vylučování leishmanií při prediurezi *Ph. papatasi* a *Ph. duboscqi* nakažených *L. major*. Ta byla pozorována u 100 % samic *Ph. papatasi* (leishmanie byly v moči přítomné u 37,5 % samic) a 85 % samic *Ph. duboscqi* (leishmanie u 16,1 % samic). Abychom prokázali přítomnost parazita v prediuretické tekutině, zachytávala jsem na krycí skličko kapičky moči vyloučené samicemi *Lu. longipalpis*, nakaženými *P. deanei*. Zachytila jsem prediurezi pěti nakažených samic, z toho tři samice vypouštěly kapky, ve kterých byly přítomni promastigoti. Porcisie se nacházely ve všech kapkách produkovaných těmito samicemi v počtu od 40 do 350 parazitů na kapku, z toho metacyklické formy představovaly 20–29 %. Abychom potvrdili, že *P. deanei* může být skutečně přenesena na hostitele prediurezí, provedli jsme poté přenosové experimenty. Infikované *Lu. longipalpis* jsme nechali sát na uších uspaných BALB/c myši, uši po sání odebrali a testovali pomocí PCR. Detekovali jsme amplifikované úseky DNA parazita ve všech kontrolních vzorcích, kdy sáli flebotomové infikovaní *L. infantum*, tak ve dvou ze tří případů, kdy sáli přenašeči infikovaní *P. deanei*. V dalším pokusu jsme detekovali DNA parazita nejen z uší, ale i spádových uzlin získaných z myši zabitých čtyři dny po sání flebotomů. Tyto pokusy prokázaly, že lze *Lu. longipalpis* považovat za kompetentního přenašeče *P. deanei*. Do přenosu ovšem mohou být zapojeny i další druhy flebotomů či tiplíků, které se v endemických lokalitách vyskytují.

5.2 Podrod *Mundinia*

Jak již bylo zmíněno v literárním přehledu, podrod *Mundinia* se v současnosti skládá z pěti druhů: *L. martiniquensis*, *L. orientalis*, *L. enrietti*, *L. macropodum* a dosud vědecky nepojmenovaného druhu z Ghany. U *L. martiniquensis*, *L. orientalis* a druhu z Ghany byly hlášeny lidské infekce. *L. macropodum* způsobuje onemocnění u klokanů a *L. enrietti* u morčat. Rovněž podrod *Mundinia*, stejně tak jako rod *Porcisia*, byl ustanoven až při taxonomické revizi v roce 2016 (Espinosa et al. 2016). Nedávno pak Bečvář et al. (2021) prokázali, že všechny druhy podrodu *Mundinia* se unikátně úspěšněji vyvíjejí v tiplících *C. sonorensis* než ve flebotomech, a potvrdili experimentální přenos tiplíky na hostitele.

Náplní druhé části mé diplomové práce bylo zjistit, zda se liší morfologický vývoj mundinií ve flebotomech a tiplících. Toto téma zatím nebylo studováno, protože vzhledem k nízké úspěšnosti experimentálních infekcí v laboratorně chovaných druzích flebotomů je obtížné získat dostatek materiálu. Například v práci Chanmol et al. (2019) autoři popsali pouze morfologický vývoj *L. orientalis* v tiplíkovi *C. sonorensis*, protože infekce flebotoma *Lu. longipalpis* se zcela ztrácely s defekací samic.

V této studii *L. martiniquensis* a *L. orientalis* tvořily stejné morfologické formy – procyklické promastigoty, dlouhé nektomonády, krátké promastigoty (leptomonády) a metacyklické promastigoty, které jsou známy z vývoje jiných druhů podrodů leishmanií v přenašečích (shrnuto v Dostálová a Volf 2012) a které tvořila *L. orientalis* i v *C. sonorensis* (Chanmol et al. 2019). Na roztlakových preparátech byly pozorovány velice ojediněle i haptomonády, které však nebyly zahrnuty do kvantitativní analýzy vzhledem k tomu, že zůstávají převážně přichyceny k povrchu střeva a na preparátech je jejich podíl podhodnocený. Rovněž stejně tak, jak bylo pozorováno u rodu *Porcisia*, i zde u podrodu *Mundinia* metacykličtí promastigoti tvořily dvě formy – kulatou a štíhlou oválnou. Nebyli pozorováni paramastigoti, popisovaní spíše vzácněji u podrodů *Leishmania*, *Viannia* i *Sauroleishmania* (Walters, 1993; Nieves a Piment 2000; Tichá et al. 2021). Průkazně se nelišila velikost jednotlivých typů promastigotů v obou přenašečích ani jejich relativní zastoupení v různých fázích infekce. První den po infekčním sání se v krvi nacházeli u obou přenašečů převážně procykličtí promastigoti, později dominovaly jednoznačně leptomonády, v menší míře se vyskytovaly nektomonády a metacykly.

Leishmania martiniquensis i *L. orientalis* vykazovali v obou přenašečích typický suprapylariální vývoj, typický i pro podrod *Leishmania* (Lainson a Shaw 1987). Tento výsledek není tak samozřejmý, například Tichá et al. (2021) popsali odlišný vývoj *L. (S.) tarentolae* u tří druhů flebotomů – *Ph. papatasi*, *Ph. sergenti* a *Ph. perniciosus*. Zástupci podrodu *Sauroleishmania* se běžně řadí mezi parazity s hypopylariálním typem vývoje, avšak výsledky této práce ukázaly, že tyto parazité mohou vykazovat i peripylariální vývoj. Peripylariální vývoj převládal u *Ph. papatasi* a *Ph. perniciosus*, zatímco parazité v *Ph. sergenti* vykazovali vývoj hypopylariální (Tichá et al. 2021).

6 Závěr

1) Vývoj *P. hertigi* a *P. deanei* v přenašečích.

Vývoj *P. hertigi* a *P. deanei* byl studován u tří druhů přenašečů: *Lu. migonei*, *Lu. longipalpis* a *C. sonorensis*. Celkem bylo vypitváno a prohlédnuto pod světelným mikroskopem 115 infikovaných tiplíků, 385 infikovaných *Lu. migonei* a 405 infikovaných *Lu. longipalpis*. *P. hertigi* nebyla schopna tvořit pozdní infekce ani v jednom zkoumaném druhu zatímco ***P. deanei* tvořila zralé infekce u 51–61 % samic *Lu. longipalpis*** a v menší míře přežívala i v samicích *Lu. migonei* (7,3 %) a *C. sonorensis* (7,7 %).

Porcisie tvořily v přenašečích klasické morfologické formy, jako rod *Leishmania* – procyklické promastigoty, dlouhé nektomonády, leptomonády, metacyklické promastigoty a haptomonády. Promastigoti vykazovali menší tělesné rozměry, než kontrolní *L. infantum*. Procyklické formy měli velice krátký bičík nebo připomínaly amastigoty a metacykličtí promastigoti byli přítomní ve dvou formách – oválné a kulaté.

Ve všech třech druzích přenašečů byla *P. deanei* **lokalizována dominantně v malpigických trubicích**. Tato neobvyklá lokalizace umožňuje porcisii **unikátní způsob přenosu – potvrdili jsme jejich vylučování močí při prediurezi *Lu. longipalpis* na hostiteli**. Paraziti se vyskytovali ve vylučovaných kapkách ve velkých počtech – od 40 do 350 promastigotů na kapku, z toho metacyklické formy představovaly 20–29 %.

Přenosové experimenty pak potvrdily přítomnost DNA porcisii i u myši usmrcených 4 dny po sání, a to jak v místě sání, tak ve spádových lymfatických uzlinách. Tyto pokusy tedy prokázaly, že ***Lu. longipalpis* je kompetentním přenašečem *P. deanei*. Kontaminativní přenos močí při prediurezi, umožněný neobvyklou lokalizací parazita v malpigických trubicích, je v rámci dvouhostitelských trypanosomatid unikátní.**

2) Srovnání morfologie mundinií ve flebotomech a tiplících

Porovnali jsme morfologické formy dvou druhů podrodu *Mundinia* – *L. martiniquensis* a *L. orientalis* v tiplících *C. sonorensis* a flebotomech *Ph. argentipes*. Oba druhy tvořily v obou přenašečích stejná stádia – procyklické promastigoty, dlouhé nektomonády, krátké promastigoty (leptomonády) a metacyklické promastigoty. Opět byly v malé míře nalezeny i haptomonády, které nebyly zahrnuty do kvantitativní analýzy. **V relativním zastoupení forem obou druhů ve flebotomech a tiplících ani v jejich rozměrech v různých přenašečích nebyly pozorovány signifikantní rozdíly**. Z dříve publikované studie ovšem víme, že v tiplících je vývoj mundinií úspěšnější – dokončí vývoj ve vyšším procentu samic a jsou i schopny přenosu na hostitele.

7 Použitá literatura

Abdeladhim, M., Kamhawi, S., & Valenzuela, J. G. (2014). What's behind a sand fly bite? the profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 691–703. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.028>

Albanaz, A. T., Gerasimov, E. S., Shaw, J. J., Sádlová, J., Lukeš, J., Volf, P., . . . Yurchenko, V. (2021). Genome Analysis of *Endotrypanum* and *Porcisia* spp., Closest Phylogenetic Relatives of *Leishmania*, Highlights the Role of Amastins in Shaping Pathogenicity. *Genes*, 12(3), 444. doi:10.3390/genes12030444

Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin J., & Boer. den. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>

Alexandre, J., Sadlova, J., Lestinova, T., Vojtkova, B., Jancarova, M., Podesvova, L., ... & Volf, P. (2020). Experimental infections and co-infections with *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* in two sand fly species, *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*. *Scientific Reports*, 10(1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60600-7>

Añez, N., Nieves, E., & Cazorla, D. (1989). The validity of the developmental pattern in the Sandfly Gut for classification of *Leishmania*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(5), 634–635. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(89\)90378-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(89)90378-7)

Asato, Y., Oshiro, M., Myint, C. K., Yamamoto, Y., Kato, H., Marco, J. D., . . . Uezato, H. (2009). Phylogenetic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing. *Experimental Parasitology*, 121(4), 352-361. doi:10.1016/j.exppara.2008.12.013

Atayde, V. D., Aslan, H., Townsend, S., Hassani, K., Kamhawi, S., & Olivier, M. (2015). Exosome secretion by the parasitic protozoan *Leishmania* within the sand fly midgut. *Cell Reports*, 13(5), 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.058>

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 Dixerous Parasitism in the Leishmaniinae. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(1). doi:10.1371/journal.pntd.0005215

Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International journal for parasitology*, 37(10), 1097-1106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>

Becvar, T., Vojtkova, B., Siriyasatien, P., Votypka, J., Modry, D., Jahn, P., Bates, P., Carpenter, S., Volf, P., & Sadlova, J. (2021). Experimental transmission of *Leishmania (Mundinia)*

parasites by biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *PLOS Pathogens*, 17(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009654>

Becvar, T., Siriyasatien, P., Bates, P., Volf, P., & Sádlová, J. (2020). Development of *Leishmania (Mundinia)* in guinea pigs. *Parasites & Vectors*, 13(1). doi:10.1186/s13071-020-04039-9

Boisseau-Garsaud, A., Cales-Quist, D., Desbois, N., Jouannelle, J., Jouannelle, A., Pralong, F., & Dedet, J. (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. doi:10.1016/s0035-9203(00)90435-8

Brushi F., Gradoni L. (2018) The leishmaniasis old neglected tropical diseases.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0>

Butenko, A., Kostygov, A. Y., Sádlová, J., Kleschenko, Y., Bečvář, T., Podešvová, L., . . . Yurchenko, V. (2019). Comparative genomics of *Leishmania (Mundinia)*. *BMC Genomics*, 20(1). doi:10.1186/s12864-019-6126-y

Chanmol, W., Jariyapan, N., Somboon, P., Bates, M. D., & Bates, P. A. (2019). Development of *Leishmania orientalis* in the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and the biting midge *Culicoides soronensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Acta Tropica*, 199, 105157. doi:10.1016/j.actatropica.2019.105157

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), 605-607.

Chusri, S., Thammapalo, S., Silpapojakul, K., & Siriyasatien, P. (2014). Animal reservoirs and potential vectors of *Leishmania siamensis* in southern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 45(1), 13.

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

Croft, S. L., & Molyneux, D. H. (1979). Studies on the ultrastructure, virus-like particles and infectivity of *Leishmania hertigi*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 73(3), 213–226. <https://doi.org/10.1080/00034983.1979.11687251>

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. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.04.008>

- Coutinho, M. T., Bueno, L. L., Sterzik, A., Fujiwara, R. T., Botelho, J. R., Maria, M. D., . . . Linardi, P. M.** (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, *128*(1-2), 149-155. doi:10.1016/j.vetpar.2004.11.011
- Dantas-Torres, F., Lorusso, V., Testini, G., Paiva-Cavalcanti, M. D., Figueredo, L. A., Stanneck, D., . . . Otranto, D.** (2010). Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitology Research*, *106*(4), 857-860. doi:10.1007/s00436-010-1722-4
- Dantas-Torres, F., Martins, T. F., de Paiva-Cavalcanti, M., Figueredo, L. A., Lima, B. S., & Brandão-Filho, S. P.** (2010). Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. *Experimental Parasitology*, *125*(2), 184-185.
- Deane, L. M., da Silva, J. E., & Figueiredo** (1974). Leishmaniae in the viscera of porcupines from the state of Piauí, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *16*, 68-69.
- Dedet, J., Roche, B., Pratlong, F., Cales-Quist, D., Jouannelle, J., Benichou, J., & 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. doi:10.1016/0035-9203(95)90427-1
- Desbois, N., Pratlong, F., Quist, D., & Dedet, J. P.** (2014). *Leishmania (Leishmania) martiniquensis* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), description of the parasite responsible for cutaneous leishmaniasis in Martinique Island (French west indies). *Parasite*, *21*, 12. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014011>
- Dostálová, A., & Volf, P.** (2012). *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & vectors*, *5*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>
- 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. doi:10.1016/j.ijpara.2010.12.008
- Dougall, A., Shilton, C., Choy, J. L., Alexander, B., & Walton, S.** (2009). New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in Northern Australian macropods. *Epidemiology and Infection*, *137*(10), 1516-1520. doi:10.1017/s0950268809002313

Espinosa, O. A., Serrano, M. G., Camargo, E. P., Teixeira, M. M., & Shaw, J. J. (2016). An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*, *145*(4), 430-442. doi:10.1017/s0031182016002092

Ferreira, M. G., Fattori, K. R., Souza, F., & Lima, V. M. (2009). Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Veterinary Parasitology*, *165*(1-2), 150-154. doi:10.1016/j.vetpar.2009.06.026

Franco, A. M., Tesh, R. B., Guzman, H., Deane, M. P., & Grimaldi, G. (1997). Development of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in experimentally infected phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, *34*(2), 189-192. <https://doi.org/10.1093/jmedent/34.2.189>

Guimarães, V. C., Pruzinova, K., Sadlova, J., Volfova, V., Myskova, J., Filho, S. P., & Volf, P. (2016). *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. *Parasites & Vectors*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1444-2>

Handman, E. (1999). Cell Biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology Advances in Parasitology Volume 44*, 1-39. doi:10.1016/s0065-308x(08)60229-8

Herrer, A. (1971). *Leishmania Hertigi* sp. n., from the tropical porcupine, *Coendou Rothschildi* Thomas. *The Journal of Parasitology*, *57*(3), 626. <https://doi.org/10.2307/3277928>

Intakhan, N., Chanmol, W., Kongkaew, A., Somboon, P., Bates, M. D., Bates, P. A., & Jariyapan, N. (2020). Experimental infection of *Leishmania (Mundinia) martiniquensis* in BALB/c mice and Syrian golden hamsters. *Parasitology Research*, *119*(9), 3041-3051. doi:10.1007/s00436-020-06842-w

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). doi:10.1186/s13071-018-2908-3

Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?. *Trends in parasitology*, *22*(9), 439-445. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.06.012>

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), 1-4.

Killick-Kendrick, R. (1979). Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. *Biology of Kinetoplastida*, *2*, 396-460.

- Killick-Kendrick, R.** (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in dermatology*, 17(3), 279-289. [https://doi.org/10.1016/s0738-081x\(99\)00046-2](https://doi.org/10.1016/s0738-081x(99)00046-2)
- Kwakye-Nuako, G., Mosore, M., Duplessis, C., Bates, M. D., Puplampu, N., Mensah-Attipoe, I., . . . Bates, P. A.** (2015). First isolation of a new species of *Leishmania* responsible for human cutaneous leishmaniasis in Ghana and classification in the *Leishmania enriettii* complex. *International Journal for Parasitology*, 45(11), 679-684. doi:10.1016/j.ijpara.2015.05.001
- Lainson, R.** (1997). On *Leishmania enriettii* and Other Enigmatic *Leishmania* Species of the Neotropics. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 92(3), 377-387. doi:10.1590/s0074-02761997000300014
- Lainson, R.** (2010). The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1(2), 13-32. <https://doi.org/10.5123/s2176-62232010000200002>
- Lainson, R., & Shaw, J. J.** (1968). Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis—incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian Basin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(3), 385–395. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(68\)90090-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(68)90090-4)
- Lainson, R., & Shaw, J. J.** (1977). *Leishmanias* of Neotropical Porcupines: *Leishmania hertigi deanei* nov. subsp. *Acta Amazonica*, 7, 51-57. <https://doi.org/10.1590/1809-43921977071051>
- Lainson, R. & Shaw, J. J.** (1987). Evolution, classification and geographical distribution. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, 1, 1–120. ISBN: 0-12-552101-4
- Lainson, R., Ward, R. D., & Shaw, J.** (1977): *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proceedings of the Royal society of London. Series B. Biological sciences*, 199, 309-320.
- Lawyer, P., Killick-Kendrick, M., Rowland, T., Rowton, E., & Volf, P.** (2017). Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae). *Parasite*, 24, 42. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017041>
- Leelayoova, S., Siripattanapipong, S., Manomat, J., Piyaraj, P., Tan-Ariya, P., Bualert, L., & Mungthin, M.** (2017). Leishmaniasis in Thailand: a review of causative agents and situations. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 16–0604. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0604>

Lipoldová, M., & Demant, P. (2006). Genetic susceptibility to infectious disease: Lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature Reviews Genetics*, 7(4), 294-305. doi:10.1038/nrg1832

Lobsiger, L., Müller, N., Schweizer, T., Frey, C., Wiederkehr, D., Zumkehr, B., & Gottstein, B. (2010). An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Veterinary Parasitology*, 169(3-4), 408-414. doi:10.1016/j.vetpar.2010.01.022

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. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652014000100001>

Luz, E., Giovannoni, M. & Borba, A. M. (1967). Infecção de *Lutzomyia monticola* por *Leishmania enriettii*. Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná 9-10, 121-8.

Machado MI, Milder RV, Pacheco RS, Silva M, Braga RR, 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. <https://doi.org/10.1017/s0031182000076241>

Maia, C., & Depaquit, J. (2016). Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? *Parasite*, 23, 55. doi:10.1051/parasite/2016062

Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., & Gradoni, L. (2012). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), 123-147. doi:10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x

Maslov D. A., Votýpka J., Yurchenko V., Lukeš J. (2013). Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends in Parasitology*. 29: 43-52

Müller, N. Welle, M., Lobsiger, L., Stoffel, M.H., Bogenbor, K.K., Hilbe, M., Gottstein, B., Frey, C. F., Geyer, C., & von Bomhard, W. (2009). Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. *Veterinary Parasitology*, 166(3-4), 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.001>

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. <https://doi.org/10.1093/jmedent/45.1.133>

- Nieves, E., & Pimenta, P. F.** (2000). Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 37(1), 134–140. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-37.1.134>
- Nolte, F. S., & Hill, C. E.** (2011). Polymerase chain reaction and other nucleic acid amplification technology. *McPherson RA, Pincus MR. Henrys Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 21, 1239-1249.
- 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. <https://doi.org/10.1017/s0031182001008927>
- Ogden, G., & Melby, P.** (2009). *Leishmania*. *Encyclopedia of Microbiology*, 663-673. doi:10.1016/b978-012373944-5.00195-4
- Otranto, D., & Dantas-Torres, F.** (2010). Fleas and ticks as vectors of *Leishmania* spp. to dogs: Caution is needed. *Veterinary Parasitology*, 168(1-2), 173-174. doi:10.1016/j.vetpar.2009.11.016
- Paranaíba, L. F., Pinheiro, L. J., Macedo, D. H., Menezes-Neto, A., Torrecilhas, A. C., Tafuri, W. L., & Soares, R. P.** (2017). An overview on *Leishmania (Mundinia) enriettii*: biology, immunopathology, LRV and extracellular vesicles during the host–parasite interaction. *Parasitology*, 145(10), 1265-1273. <https://doi.org/10.1017/s0031182017001810>
- Podinovskaia, M. & Descoteaux, A.** (2015). **Leishmania and the macrophage: A multifaceted interaction.** *Future Microbiology*, 10(1), 111-129.
- 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). doi:10.1371/journal.pntd.0003339
- Ramalho-Ortigao, M.** (2010). Sand Fly-Leishmania Interactions: Long Relationships are Not Necessarily Easy. *The Open Parasitology Journal*, 4(1), 195-204. doi:10.2174/1874421401004010195
- Rangel, E. F., Deane, L. M., Grimaldi Filho, G., Souza, N. A., Wermelinger, E. D., & Barbosa, A. F.** (1985). Flagellates in the Malpighian tubules of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* fed on a hamster experimentally infected with *Leishmania mexicana amazonensis*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 80(3), 371–372. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761985000300016>

- Ready, P. D.** (2013). Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 227-250. doi:10.1146/annurev-ento-120811-153557
- 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.
- 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. <https://doi.org/10.1017/s0031182002001439>
- Rosa, L. D., Soares, A., Marcili, A., Diaz, J., Wolkmer, P., Bassuino, D., . . . Rossato, C.** (2020). Cutaneous leishmaniasis in *Cavia porcellus* (guinea pig): Case report. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia*, 72(3), 744-748. doi:10.1590/1678-4162-11459
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.03.001>
- Sadlova, J., Vojtkova, B., Becvar, T., Lestinova, T., Spitzova, T., Bates, P., & Volf, P.** (2020). Host competence of the African rodents *Arvicanthis neumanni*, *A. niloticus* and *Mastomys natalensis* for *Leishmania donovani* from Ethiopia and *L. (Mundinia)* sp. from Ghana. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 11, 40-45. doi:10.1016/j.ijppaw.2019.12.002
- Sadlova, J., & Volf, P.** (1999). Occurrence of *Leishmania major* in sandfly urine. *Parasitology*, 118(5), 455-460. <https://doi.org/10.1017/s0031182099004254>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01507.x>
- Seblova, V., Sadlova, J., Vojtkova, B., Votýpka, 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). doi:10.1371/journal.pntd.0004060
- Serafim, T. D., Coutinho-Abreu, I. V., Dey, R., Kissinger, R., Valenzuela, J. G., Oliveira, F., & Kamhawi, S.** (2021). Leishmaniasis: The act of transmission. *Trends in Parasitology*, 37(11), 976–987. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.07.003>

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), 548-555. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0125-7>

Sharma, U., & Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Diseases*, 45(4), 255–272.

Shimabukuro, P. H. F., de Andrade, A. J., & Galati, E. A. B. (2017). Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. *ZooKeys*, (660), 67-106. <https://doi.org/10.3897/zookeys.660.10508>

Shlomai, J. (2004). The Structure and Replication of Kinetoplast DNA. *Current Molecular Medicine*, 4(6), 623-647. doi:10.2174/1566524043360096

Silva, D. A., Madeira, M. de, Barbosa Filho, C. J., Schubach, E. Y., Barros, J. H. and Figueiredo, F. B. (2013). *Leishmania (Leishmania) hertigi* in a porcupine (*Coendou* sp.) found in Brasilia, Federal District, Brazil. *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária*, 22(2), 297–299. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612013005000014>

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. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy069>

Solano-Gallego, L., Rossi, L., Scroccaro, A. M., Montarsi, F., Caldin, M., Furlanello, T., & Trotta, M. (2012). Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 5(1). doi:10.1186/1756-3305-5-98

Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 10(1). doi:10.1186/s13071-017-2028-5

Sukmee, T., Siripattanapipong, S., Mungthin, M., Worapong, J., Rangsin, R., Samung, Y., Kongkaew, W., Bumrungsana, K., Chanachai, K., Apiwathanasorn, C., Rujirojindakul, P., Wattanasri, S., Ungchusak, K., & Leelayoova, S. (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. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.12.003>

Thermo Fisher Scientific - US. (n.d.). Retrieved July 20, 2022, from <http://thermofisher.com/>

- Thies, S. F., Bronzoni, R. V., Michalsky, É. M., Santos, E. S., Silva, D. J., Dias, E. S., & Damazo, A. S.** (2018). Aspects on the ecology of phlebotomine sand flies and natural infection by *Leishmania hertigi* in the southeastern Amazon Basin of Brazil. *Acta Tropica*, 177, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.023>
- Ticha, L., Kykalova, B., Sadlova, J., Gramiccia, M., Gradoni, L., & Volf, P.** (2021). Development of various *Leishmania (sauroleishmania) tarentolae* strains in three Phlebotomus species. *Microorganisms*, 9(11), 2256. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112256>
- Tyler, K. M., & Engman, D. M.** (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International journal for parasitology*, 31(5-6), 472-481. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00153-9)
- Volf, P. & Volfová, V.** (2011). Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology*, 36, 1948-1959. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00106.x>
- Walters, L. L.** (1993). *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40(2), 196–206. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1993.tb04904.x>
- Walters, L. L., Modi, G. B., Tesh, R. B., & Burrage, T.** (1987). Host-parasite relationship of *Leishmania mexicana mexicana* and *Lutzomyia abonnenci* (Diptera: Psychodidae). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 36(2), 294-314. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.36.294>
- World Health Organization.** (n.d.). *Leishmaniasis*. World Health Organization. Retrieved January 26, 2022, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Zeledon, R., Ponce, C., & de Ponce, E.** (1977). Finding of *Leishmania hertigi* in the Costa Rican porcupine. *The Journal of Parasitology*, 63(5), 924. <https://doi.org/10.2307/3279912>
- Zijlstra, E. E.** (2016). The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). *Parasites & vectors*, 9(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1721-0>