

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Lada Charvátová

Vliv teploty prostředí na biologii flebotomů a přenos leishmanií

Effect of temperature on sand fly biology and *Leishmania* transmission

Bakalářská práce

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

Praha, 2024

Poděkování ráda věnuji své školitelce doc. RNDr. Jovaně Sádlové, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady a trpělivost při kontrole mého textu. Nejvíc bych ale chtěla ocenit její milá slova, po kterých bylo psaní této bakalářské práce téměř radostí.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama z uvedené literatury a na základě konzultací se svojí školitelkou.

V Praze dne 17. 4. 2024

Lada Charvátová

Abstrakt a klíčová slova

Současné zvyšování teploty atmosféry působí celou řadu globálních změn a ovlivňuje mnoho druhů organismů a jejich vzájemné interakce. Flebotomové jsou drobní zástupci dvoukřídlého hmyzu z čeledi Psychodidae, podčeledi Phlebotominae, kteří přenášejí leishmanie, parazitické bičíkovce (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) působící významné lidské onemocnění leishmaniózu. Na základě literární rešerše lze konstatovat, že teplota prostředí zásadním způsobem ovlivňuje biologii flebotomů. Vysoké teploty zrychlují jejich metabolismus a zkracují délku vývoje nedospělých stádií, ovlivňují velikost a hmotnost těla (s rychlým růstem při vyšších teplotách jsou flebotomové menší), dále zkracují délku trávení krve, defekaci samiček i kladení vajíček. Nízké teploty naopak způsobují prodloužení délky vývoje, menší emergenci dospělců, zpomalené trávení a snížení počtu nakladených vajíček. Vysoké i nízké teploty mohou u larev a kulek vyvolat diapauzu. Optimální teplota, při které jsou všechny fyziologické funkce flebotomů vyvážené, je obecně 24-28 °C. Teplota také ovlivňuje hostitelskou kompetenci flebotomů, leishmanie mají zřejmě toleranci vysokých teplot nižší než flebotomové a některé druhy leishmanií mohou mít za vyšších teplot kvůli urychlené defekaci samiček problém infekci úspěšně dokončit, a tudíž nemohou být přeneseni na obratlovčího hostitele.

Klíčová slova: teplota prostředí, Phlebotominae, *Leishmania*, rychlost růstu, velikost těla, hmotnost těla, trávení krve, délka života, plodnost, diapauza

Abstract and keywords

The current rise in air temperature causes a range of global changes, affecting many species of organisms and their interactions. Phlebotomine sand flies are small members of Dipteran insects of the family Psychodidae, subfamily Phlebotominae, transmitting *Leishmania*, parasitic flagellates (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) that cause the important human disease leishmaniasis. Based on the literature review, the external temperature significantly affects the biology of sand flies. High temperature accelerates their metabolism and shortens the growth rate of immature stages, also influencing body size and body weight (faster development in higher temperatures makes them smaller). The time needed for blood digestion is also reduced, and female defecation and oviposition are accelerated. On the other hand, cold temperatures prolong growth, and cause lower emergence of adult sand flies, slower digestion of blood, or number of laid eggs. Very high or very low temperatures can cause diapause in the larval stage or eggs. In general, the optimal temperature to cover all of their physiological needs is 24-28 °C. Temperature impacts the development of *Leishmania* in sand flies as well, it is likely that *Leishmania* has a lower optimal temperature as opposed to sand flies, and therefore some *Leishmania* species might not be able to complete their development in warmer temperatures prior to the defecation of female sand flies, and thus cannot be transmitted to a vertebrate host.

Keywords: temperature, Phlebotominae, *Leishmania*, growth rate, body size, body weight, blood digestion, lifespan, fecundity, diapause

Seznam zkratek

C. = *Culicoides*

CL = Cutaneous Leishmaniosis

DCL = Diffuse Cutaneous Leishmaniasis

L. = *Leishmania*

Lu. = *Lutzomyia*

MCL = Mucocutaneous Leishmaniasis

ML = Mucosal Leishmaniasis

P. = *Phlebotomus*

PKDL = Post-kala-azar Dermal Leishmaniasis

PM = peritrofická matrix

S. = *Sergentomyia*

VL = Visceral Leishmaniosis

WHO = World Health Organization

Obsah

1	Úvod	1
2	Flebotomové	2
2.1	Taxonomie a rozšíření.....	2
2.2	Biologie.....	2
3	Leishmania	4
3.1	Úvod.....	4
3.2	Leishmaniózy a jejich epidemiologie	4
3.3	Biologie.....	6
3.4	Znaky definující přenašeče	7
4	Vliv teploty na biologii flebotomů	8
4.1	Rychlost růstu a vývoje nedospělých stádií	8
4.2	Diapauza nedospělých stádií	13
4.3	Délka života dospělců	14
4.4	Velikost těla	16
4.5	Trávení krve a hmotnost těla.....	17
4.6	Plodnost.....	18
5	Vliv teploty na vývoj leishmanií ve flebotomech	22
6	Šíření leishmanióz	23
7	Závěr	25
8	Seznam použité literatury	27

1 Úvod

Flebotomové, tzv. "sand flies" jsou drobní zástupci dvoukřídlého hmyzu z čeledi Psychodidae, podčeledi Phlebotominae. Nalezneme je v teplých oblastech jižní Evropy, Asie, Afriky, Austrálie, Střední a Jižní Ameriky, osidlují širokou škálu biotopů od vlhkých tropických pralesů po suché pouště a polopouště. Jsou významní především kvůli přenosu parazitických bičíkovců rodu *Leishmania* působících infekční onemocnění leishmaniózu. Leishmanióza je onemocnění patřící mezi „neglected emerging and re-emerging diseases“. Tato onemocnění se v některých oblastech recentně šíří anebo se znovu objevují v oblastech, kde byla předtím na ústupu. Majoritně postihují obyvatele nejchudších zemí a historicky se jim tudíž věnovalo méně pozornosti, ačkoliv například leishmanióza ohrožuje až 1 miliardu lidí a ročně se jí nakazí přes 1 milion lidí. Projevy leishmaniózy jsou velmi různorodé, od lehčích kožních forem po život ohrožující viscerální formu.

Teplota patří mezi jedny z nejdůležitějších abiotických faktorů, které značně ovlivňují biologii mnoha druhů organismů, a tudíž není překvapivé, že na fyziologii flebotomů má také vliv. Je jisté, že průměrné změny ročních teplot a vlhkostí budou mít přímý dopad na flebotomy i na jejich savčí rezervoárové hostitele. Již nyní pozorujeme, že klimatické změny způsobují posun jejich geografických areálů rozšíření a taktéž ovlivňují velikosti populací, generační dobu nebo jejich přežívání. Všechny tyto změny se následně projeví i na epidemiologii leishmaniózy, jejich distribuci a například i sezóně přenosu. Z toho vyplývá, že následkem toho se leishmanie mohou šířit do nových oblastí včetně mírného klimatického pásma. Ve střední Evropě už nyní dochází k autochtonním případům nákazy, nejběžněji u zvířat, hlavně psů nebo koní.

Proto je výzkum zaměřený na vliv teploty na fyziologii flebotomů a následný dopad na vývoj leishmanií ve svých přenašečích tak zajímavý: nejen, že to umožňuje lépe pochopit jejich fyziologii i biologii a dané poznatky poté uplatnit např. v jejich regulaci a práci s nimi, ale také jelikož máme flebotomy spolu s leishmaniemi za dveřmi a je zde možnost, že je brzy běžně najdeme i na našem území.

2 Flebotomové

2.1 Taxonomie a rozšíření

Do nedávna jediným známým přenašečem leishmanióz byli flebotomové, tzv. „sand flies“ (Killick-Kendrick, 1999). Nově se ukazuje, že kompetentním přenašečem leishmanií podrodu *Mundinia* jsou i tiplíci (Diptera: Ceratopogonidae) (Bečvář et al., 2021). Flebotomové jsou drobní zástupci dvoukřídlého hmyzu (řád Diptera), podřádu Nematocera. Dále jsou řazeni do čeledi Psychodidae a podčeledi Phlebotominae (Killick-Kendrick, 1999). Taxonomie flebotomů si prošla dlouhou evolucí a stále není všeobecně přijímána. Dle aktuálního přístupu nalezneme ve Starém světě rody *Phlebotomus*, *Sergentomyia* a *Chinius*, v Novém světě zase rody *Lutzomyia*, *Brumptomyia* a *Warileya*. Jediné dva antropofágní rody, u kterých je potvrzeno sání krve i na lidských hostitelích, jsou rod *Phlebotomus* ze Starého světa a rod *Lutzomyia* ze světa Nového. Oba jsou dále rozděleny do několika dalších druhů a podrodů (shrnutí v Dvořák et al., 2018). V menší míře byly pozorovány i případy sání na lidech u rodu *Sergentomyia* nacházejícím se ve Starém světě, ale jejich zapojení do přenosu leishmanií na savčí hostitele nebylo dosud potvrzeno (Maia & Depaquit, 2016; WHO, 2010).

V Novém světě je uznávána taxonomie podle Galati, kde byly podrody *Lutzomyia* překlasifikovány na rody (Galati, 2003) a s velkou pravděpodobností podobný osud v blízké době čeká i podrody rodu *Phlebotomus*. Starosvětový rod *Sergentomyia* je taxonomicky i fylogeneticky stále špatně prozkoumaný, ačkoliv má rozsáhlé rozšíření (Dvořák et al., 2018).

Označení „sand flies“ může být zavádějící, protože mylně vyvolává asociaci s písečnými habitaty. Název ve skutečnosti získali podle své pískové barvy. V některých částech světa za „sand flies“ bývají neprávem označovány i tiplíci z rodu *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) nebo muchničky (Diptera: Simuliidae). Proto je důležité tyto vektory odlišovat jako „phlebotomine sand flies“, (Killick-Kendrick, 1999) česky jako flebotomy. Momentálně je známo přes 1000 druhů flebotomů a u 100 z nich je potvrzené přenášení leishmanií (Cecílio et al., 2022).

Na flebotomy můžeme narazit v teplých oblastech jižní Evropy, Asie, Afriky, Austrálie, Střední a Jižní Ameriky (shrnutí v Killick-Kendrick, 1999). Nejjižnější rozšíření sahá až k 40° jižní šířky, avšak chybí na Novém Zélandu a tichomořských ostrovech (Lane, 1993). Nejseverněji rozšíření dosahuje nad 50° severní šířky v Kanadě (Young & Perkins, 1984) a v německé spolkové zemi Hesensko u města Guissen (Melaun et al., 2014). Velmi podobné rozšíření dosahující těsně pod 50° severní šířky nalezneme ve Francii a Mongolsku (Lewis, 1982). Nejběžněji vyskytující se druh flebotoma v centrální Evropě je *P. mascittii* (Melaun et al., 2014). Obývají nadmořskou výšku od 3300 m nad mořem (Afghanistan) (Artemiev, 1980) až pod úroveň hladiny moře (Mrtvé moře) (Lane, 1993).

2.2 Biologie

Flebotomové během života procházejí kompletní metamorfózou. Mají čtyři životní stádia: vajíčko, larvu, kuklu a dospělce. Nedospělá stádia na rozdíl od komárů nevyžadují ke svému vývoji

stojatou vodu, jsou suchozemská. Stále ale potřebují dostatečně vysokou vlhkost a teplotu, proto je často nalezneme v okolí zvířecích (např. hlodavčích) nor, kam samičky kladou vajíčka. Zvířecí exkrementy a vlhká zemina poskytují nově vylíhnutým larvám dostatečný úkryt, vlhkost, teplotu a zdroj obživy.

Vajíčka flebotomů dosahují velmi malých velikostí (0,3-0,5 mm do délky). Zprvu jsou velmi světlá, ale již během pár hodin po naklazení se vybarvují do tmavě hnědé nebo černé barvy. Líhnutí vajíček je závislé na teplotě. Pod mikroskopem má vnější povrch vajíček granulovitou texturu a je pokrytý drobnými vlásky. Tyto struktury umožňují vajíčkům snadné přichytávání k různorodým podkladům (Chanotis, 1967; shrnuto v Claborn, 2010; shrnuto v Maroli et al., 2013).

Stádium larvy zahrnuje čtyři instary. Larva je apodní, na hlavové části nalezneme drobná tykadla. Pro správné určení jsou podstatné štěty v kaudální části těla. Mezi taxonomické znaky se to ale řadí pouze zřídka, protože larvy jsou pozorovány především v laboratorních podmínkách, a ne ve volné přírodě (Felicangeli, 2004). První instar má štěty dva, druhé stádium má už po prvním svlékání štěty čtyři. První instar dosahuje velikosti okolo 0,5 mm, čtvrté stádium může měřit přes 3 mm (shrnutu v Claborn, 2010; shrnuto v Maroli et al., 2013).

Kukla flebotomů může připomínat kuklu motýlů přítomností svlečky (exuvii) čtvrtého larválního instaru, která kuklu na jedné straně přichytává k pevnému podkladu (shrnutu v Claborn, 2010; shrnuto v Maroli et al., 2013).

Dospělci jsou od pohledu křehcí a jemní, dosahují sotva 3,5 mm v délce (Molyneux & Ashford, 1983), což odpovídá přibližně jedné třetině běžného komára. Celé tělo i křídla mají pokryté jemnými chloupky. Jedním z charakteristických znaků flebotomů je pozice jejich křídel v klidovém stavu, připomínají tvar písmene „V“. Jejich barva se může pohybovat od velmi světlé až k téměř černé. Oči jsou tmavé, nitkovitá tykadla mají 16 segmentů. Ústní ústrojí je krátké a orientované směrem dolů. Nohy mají dlouhé a jemné (shrnutu v Claborn, 2010; shrnuto v Maroli et al., 2013).

Obě pohlaví se živí cukernými roztoky rostlin nebo mšic (Hemiptera: Aphidoidea). Krev sají pouze samičky, je potřebná pro vývoj vajíček (shrnutu v Maroli et al., 2013). Jejich sliny obsahují antikoagulanty, vazodilatanty a látky ovlivňující imunitní a zánětlivou odpověď v těle hostitele (Andrade et al., 2007). Jen velmi malé množství druhů flebotomů je schopné tvořit vajíčka bez předchozího nasátí (shrnutu v Harwood & James, 1979). Sáním mohou přenášet různá onemocnění, nejčastěji se jedná o leishmaniózu, která má několik forem. Méně často mohou ještě přenášet fleboviry a bartonellózu (shrnutu v Lane, 1993). Jejich aktivita je spíše soumráčná, noční a ranní, mohou ale sát v případě vyrušení i během dne (shrnutu v Maroli et al., 2013).

V porovnání s komáry létají neslyšně a zároveň pomalu. Rychlost letu nepřesahuje 1 m/s (Killick-Kendrick et al., 1984). Jsou špatnými letci a mají problémy s doletem při větru silnějším než 1 m/s, což znatelně ovlivňuje jejich disperzi: obvykle se pohybují ve vzdálenosti maximálně 300 m od místa vylíhnutí. Nalezneme je v blízkosti vlhkých, organicky bohatých půd, v Novém světě byli pozorováni u kořenů stromů a v jeskyních (shrnutu v Claborn, 2010; shrnuto v Felicangeli, 2004; shrnuto v Maroli et al., 2013).

3 Leishmania

3.1 Úvod

Leishmanióza je významné lidské onemocnění způsobené protozoálním bičíkovcem z rodu *Leishmania* patřící do skupiny Trypanosomatidae a třídy Kinetoplastida (De Almeida et al., 2003). Rod *Leishmania* můžeme rozdělit na čtyři podrody: *Leishmania*, *Sauroleishmania* a *Mundinia* ve Starém i Novém světě a podrod *Viannia* v Novém světě (shrnutí v Kniha et al., 2023). První zmínky o tomto onemocnění nalezneme již ve 4500 let starých přepisech, to dále podporují i podobně staré molekulární nálezy ze starověkých archeologických nalezišť (shrnutí v Akhoundi et al., 2016).

Patří mezi “neglected tropical diseases”, česky by se daly označit za opomíjená tropická onemocnění. Jedná se o skupinu různorodých onemocnění, která se vyskytují v tropickém a subtropickém pásu (WHO, 2010). Leishmanióza je endemicky rozšířená i v pásu mírném, v Evropě se endemicky vyskytuje ve Středomoří (Alvar et al., 2012; Rocha et al., 2022). Jedna z možností objevení leishmaniózy i ve střední Evropě je dovoz ze zahraničí, ročně se jedná o přibližně 700 potvrzených případů (Kniha et al., 2023). Postupně se začínají objevovat i autochtonní případy nákazy, např. v Německu (Bogdan et al., 2001), Rakousku (Kollaritsch et al., 1989), Švýcarsku (Lobsiger et al., 2010) nebo Maďarsku (Tánczos et al., 2012).

„Neglected tropical diseases“ ovlivňují přes miliardu lidí, převážně ty žijící v chudobě (WHO, 2010). Leishmanióza samotná ohrožuje přes 1 miliardu lidí a každý rok je potvrzeno až 1 milion nových případů kožní a až 90 tisíc případů viscerální nákazy (WHO, 2023). S těmito čísly má devátou největší zátěž (disease burden) mezi infekčními onemocněními. Mezi tropickými onemocněními se řadí mezi druhé nejčastější onemocnění způsobující smrt a zároveň čtvrté nejběžnější onemocnění (shrnutí v Bern et al., 2008).

Jeden z pravděpodobných důvodů, proč leishmaniózám není věnována taková pozornost, ačkoliv je jejich závažnost nepopiratelná, je jejich epidemiologická i medicínská komplexita. Tu způsobuje a) široká genetická rozmanitost rodu *Leishmania*, b) složité interakce mezi obratlovčím hostitelem a bezobratlým vektorem, c) regionální rozdíly v klinických projevech onemocnění a d) různorodý lidský faktor a rizika s ním spjatá (Gradoni, 2018).

3.2 Leishmaniózy a jejich epidemiologie

Aktuálně známe přes 50 druhů leishmanií a z nich alespoň 21 druhů může způsobovat onemocnění u lidí a 30 onemocnění u savců (shrnutí v Akhoundi et al., 2016; shrnutí v Kniha et al., 2023). Bičíkovci rodu *Leishmania* jsou na obratlovce přenášeni při nasátí infekční samičky flebotoma. Hostiteli mimo lidi bývají zvířata z řádu Carnivora, Cingulata, Chiroptera, Didelphimorphia, Lagomorpha, Pilosa, Primata a Rodentia (shrnutí v Azami-conesa et al., 2021). U psů se může vyvinout psí leishmanióza, která je bez залечení smrtelná, avšak nákaza je často asymptomatická. Zalечení i asymptomatictí psi mohou stále sloužit jako rezervoároví hostitelé. Většina transmisních cyklů je

zoonotických, za antroponózní druhy jsou považovány pouze *L. donovani* a *L. tropica* a i u těchto druhů jen v určité části areálu výskytu (Kniha et al., 2023).

Mezi nejběžnější formy řadíme formu kožní (CL), viscerální (VL) a mukokutánní (MCL). Jejich podskupinami jsou formy mukózní (ML), kutánní difúzní (DCL) nebo dermální post-kala-azar forma (PKDL). Nejběžnější forma s 90 % případů je forma kožní. Většina případů je hlášena v Afghánistánu, Íránu, Saudské Arábii, Sýrii, Alžírsku, Tunisku, Brazílii a Peru. Více než 90 % případů méně časté, ale zároveň více patogenní viscerální formy, je hlášena v Bangladéši, Indii, Nepálu, Etiopii, Keni, Súdánu a severní Brazílii (shrnuto v Alvar et al., 2012). Asymptomatické infekce jsou díky moderní diagnostice rozpoznávány stále častěji. Jsou zdrojem infekce, a tudíž je jejich brzké odhalení a zaléčení nutné k úspěšnému potlačení nemoci v dané oblasti (Pederiva et al., 2023). Věk napadených osob se liší dle druhu parazita, např. u *L. infantum* jsou nejvíce ovlivněné děti od 0-5 let a u *L. donovani* osoby ve věku 13-23 let (medián) (Gradoni, 2018). Naopak u kožní leishmaniózy je běžnější klinická forma onemocnění a věk nemocných je ovlivněný intenzitou infekce (Lysenko & Beljaev, 1987).

Kožní forma leishmaniózy (CL) postihuje ty části těla, kde má flebotom volný přístup ke kůži. S touto formou je asociována *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana*, *L. braziliensis* nebo *L. infantum*, ale ani tento výčet není definitivní (Ashford, 2000; Gaspari et al., 2020). Projevuje se jako léze kůže, ta může být osamocená nebo jich je po těle více. Nejdřív se objeví začervenalá papula, která se postupně přemění v jasně ohraničený vřed. Hojí se 6–12 měsíců a zůstává po něm jizva. Může se zde objevit i sekundární infekce (shrnuto v Claborn, 2010; shrnuto v Grevelink & Lerner, 1996). U difúzní formy kutánní leishmaniózy (DCL) se kožní léze z primárního ložiska šíří do dalších oblastí, reinfekce i chronická infekce je běžná. DCL forma je typická pro infekci *L. mexicana amazonensis* (shrnuto v Claborn, 2010).

Viscerální leishmanióza (také jinak kala-azar, VL) je život ohrožující forma leishmaniózy postihující tkáň bohaté na makrofágy (Gradoni, 2018). Hlavními původci jsou *L. donovani* a *L. infantum*, ale druhů přenášejících onemocnění je více. Postižené osoby trpí horečkami, malátností, ztrácejí na váze kvůli anémii, hepatomegálii a splenomegálii. Onemocnění často provázejí sekundární infekce vedoucí k tuberkulóze, zápalu plic a průjmům. Neléčené onemocnění končí smrtí (shrnuto v Claborn, 2010).

Mukokutánní leishmanióza (MCL) je především asociována s infekcí *L. braziliensis braziliensis*, ale původců je více, např. *L. infantum* (Gaspari et al., 2020). Postihuje oblast nosní přepážky a její blízké okolí – rty, dásně, mandle, hltan a měkké patro. Poškození těchto struktur bývá občas tak vážné, že může dojít ke smrti z podvýživy či akutnímu zánětu plic (shrnuto v Grevelink & Lerner, 1996; shrnuto v Lawyer & Perkins, 2004).

Méně běžné formy se hůře rozpoznávají, mohou být charakterizovány primárními kožními lézemi nebo některými dalšími znaky třech hlavních forem. Kvůli komplexitě onemocnění stále neexistuje obecný postup určující, jak s leishmaniózou nakládat. V mnoha oblastech klinická vyšetření a následné terapie chybí nebo nejsou kompletní, a ne všechny postupy jsou univerzální natolik, aby se daly použít

ve všech zemích. Na komplikovanosti se taktéž podílí složité interakce s rezervoárovými hostiteli a vektory v různých prostředích (Gradoni, 2018) a rezistence vůči léčivům (WHO, 2010).

Všechno výše zmíněné velmi ztěžuje regulaci leishmanióz. Je zde také reálné riziko šíření nemoci do neendemických oblastí a jejich znovuobjevování v oblastech, kde se už předtím vyskytovaly (Gradoni, 2018; Kamhawi, 2017).

Vysoká morbidita i mortalita v mnoha endemických oblastech je v dnešní době nepřijatelná, zvláště protože již existují dostupné a efektivní prostředky podporující léčbu (WHO, 2010). Je známo mnoho faktorů, které kontrolu leishmanióz znesnadňují (např. objevy nových druhů leishmanií, nedostatečná znalost jejich hostitelů a životních cyklů, změny geografického rozšíření, klimatické změny, migrace lidských populací, stárnutí, komorbidita). Leishmanióza se týká především chudých oblastí, a proto by součástí boje s tímto onemocněním mělo být i zvyšování životní úrovně citlivých regionů. Ukazuje se totiž, že v oblastech s vysokou úrovní blahobytu (např. jižní Evropa) morbidita i mortalita u osob nakažených viscerální leishmaniózou významně poklesla (Gradoni, 2018). Zapojení vlády do boje s leishmaniózou je klíčové pro její dlouhodobou regulaci (Kamhawi, 2017).

3.3 Biologie

U rodu *Leishmania* morfologicky odlišujeme dvě formy parazita: amastigota a promastigota (Bates & Rogers, 2004). Intracelulárního amastigota nalezneme v obratlovčím hostiteli, kde napadá fagocytující buňky (Handman & Bullen, 2002). Ty jsou nasáty samičkou přenašeče a dochází tak k její infekci, střídá se v ní několik morfologicky i funkčně odlišných forem promastigotů (shrnuje v Dostálová & Volf, 2012). Do savčího hostitele se při nasátí dostává stádium haptomonády, pozdní stádium metacyklického promastigota nebo v menším množství brzká stádia metacyklického promastigota a leptomonády, přičemž první dvě zmíněná stádia jsou infekční (Catta-Preta et al., 2024) a ta se v savčím hostiteli brzy mění na amastigota (Bates & Rogers, 2004).

Někteří přenašeči umožňují kompletní vývoj svého specifického druhu parazita a označujeme je za specifické vektory (*P. papatasi*, *P. sergenti*), v dalších je možný vývoj většího počtu druhů parazitů a označujeme je za permissivní vektory (*P. arabicus*, *Lu. longipalpis*) (Myšková et al., 2007; Volf & Pecková, 2007). Pro přežití ve svém přenašeči parazité různých vývojových stádií potřebují: a) přežít působení proteolytických enzymů ve středním střevě hmyzu b) dostat se přes peritrofickou matrix c) zabránit vyloučení ze střeva s exkrecí nestrávených zbytků krve a přichytit se k epitelu mezenteronu (*Leishmania*) nebo proctodea (rod *Viannia* z Nového světa a někteří zástupci rodu *Sauroleishmania* Starého světa) d) zamezit kompetici s mikrobiomem střeva e) získat potřebné živiny pro morfogenezi, kolonizování stomodeální valvy a vytvoření infekčních stádií, aby mohli být při opětovném nasátí vektora přeneseni do obratlovčího hostitele (Ready & Rogers, 2013).

Pokles teploty a zvýšení pH při přechodu z obratlovčího hostitele do bezobratlého spouští vývoj parazita v přenašeči z amastigota na pohyblivého promastigota. Tato první vývojová fáze je nazývána

procyklický promastigot (Dostálová & Volf, 2012). Po pár dnech se diferencuje do mnohem pohyblivějšího stádia nektomonády (Rogers et al., 2002) v peritrofické matrix, kde čeká na její přirozený rozpad (Sádlová & Volf, 2009) a následně se dostává do exoperitrofického prostoru mesenteronu. Pro přichycení na stěnu střeva rod *Leishmania* používá glykokonjugát lipofosfoglykanu (LPG) na svém povrchu, který se váže na galektin epitelu vektora (tak to funguje např. u *Leishmania major* ve specifickém přenašeči *P. papatasi* (Pimenta et al., 1992)), nebo může využívat jiný mechanismus nezávislý na LPG, záleží na druhu. Tento druhý typ přichycení najdeme u permisivních vektorů (Myšková et al., 2007; Volf & Pecková, 2007). V přední části mezenteronu se nektomonády přeměňují na leptomonády a ty se dále přeměňují buď v metacyklické promastigoty nebo přichycené či volně pohyblivé haptomonády sekretující promastigotní sekreční gel (PSG). Ten ucpává přední část střeva, což způsobuje potíže při sání samičky a následnou regurgitaci, při které se *Leishmania* dostává do hostitele. Metacyklické promastigoty i pohyblivé haptomonády jsou pro obratlovčí hostitele infekční (Catta-Preta et al., 2024).

Dominantně napadají parazité komplexu *L. donovani* a *L. infantum* vnitřní orgány, což vede k viscerální formě leishmaniózy. Ostatní druhy rodu *Leishmania* jsou dermatropičtí a napadají tělní tegumenty. U viscerální leishmaniózy je citlivost k infekci velmi různorodá – ne u každého nakaženého propukne onemocnění v plné míře, asymptomatická nákaza je v endemických oblastech dokonce častější (Lysenko & Beljaev, 1987).

3.4 Znaký definující přenašeče

Leishmaniózu může v porovnání s jinými onemocněními způsobovat větší množství druhů parazitů (Killick-Kendrick, 1990). Pro správné určování různých druhů vektorů přenášejících leishmaniózu byl proto vytvořen seznam kritérií, které by každý přenašeč měl splňovat. Původně používaných pět kritérií (1-5) podle Killick-Kendricka (Killick-Kendrick, 1990) se dočkalo rozšíření o dvě nová (6-7), která matematickým modelem dokazují epidemiologickou významnost vektora a vliv regulace jejich populací na přenos onemocnění. Zatím žádný ze známých přenašečů kritéria 6 a 7 nesplňuje, protože prakticky se tato dvě kritéria příliš nevyužívají.

Kritérium 1: Z jednoznačně určené volně žijící samice flebotoma jsou izolováni promastigoti ve více než jednom případě.

Kritérium 2: U přirozeně nakažených samic flebotoma jsou ve středním střevě a v oblasti u stomodeální valvy nalezeny infekční formy rodu *Leishmania* a vektor umožňuje kompletní vývoj parazita.

Kritérium 3: Daný druh flebotoma saje na lidech a dalších rezervoárových hostitelích.

Kritérium 4: Mezi flebotomem, člověkem a rezervoárovým hostitelem se nachází silná ekologická provázanost včetně sezonality, vyskytují se ve stejné oblasti.

Kritérium 5: Po nasátí na infekčním přirozeném hostiteli nebo jeho ekvivalentu v laboratorních podmínkách je pozorován přenos onemocnění.

Kritérium 6: S pomocí retrospektivních dat lze sestavit matematický model demonstrující nezbytnost vektora pro přenos onemocnění.

Kritérium 7: Lze sestavit matematický model demonstrující fakt, že množství nákaz signifikantně klesá, pokud signifikantně klesne četost sání daného vektora (shrnutí v Ready, 2013).

Pro prokázané přenašeče z Nového i Starého světa platí vždy kritéria 1-4. U předpokládaných, ale dosud neprokázaných vektorů platí jenom část (mezi běžné problémy patří např. to, že byl parazit ve volně žijící samici nalezen pouze jedenkrát, ekologická asociace přenašeče a onemocnění je těžko doložitelné nebo experimentální přenos občas dokazuje pouze to, že je flebotom schopný přenosu pouze v případě silné nákazy (Kimblin et al., 2008; Ready, 2013)). V některých případech je velmi těžké naplnit výše stanovená kritéria a přenašeči jsou dále určováni na základě historických a epidemiologických dat (Claborn, 2010).

4 Vliv teploty na biologii flebotomů

4.1 Rychlost růstu a vývoje nedospělých stádií

Vliv teploty na vývoj larev a kukel byl zkoumán u druhů *P. papatasi*, *P. perniciosus* a *Lu. longipalpis* (Guzmán & Tesh, 2000). Dospělce chovali v normálních podmínkách, tj. nově vylíhli dospělci byli vypouštěni do sítí, kde byli drženi přibližně 7 dní, byli krmeni 30% sacharózou, stálá teplota byla udržována na 25 °C a fotoperioda se střídala po dvanácti hodinách (12:12 světlo:tma). Nasáté samice byly umístěny do oddělených nádob držných v 28, 25, 23, 18 a 15 °C a poté byl sledován vývoj od naklazení vajec po vylíhnutí dospělců následující generace.

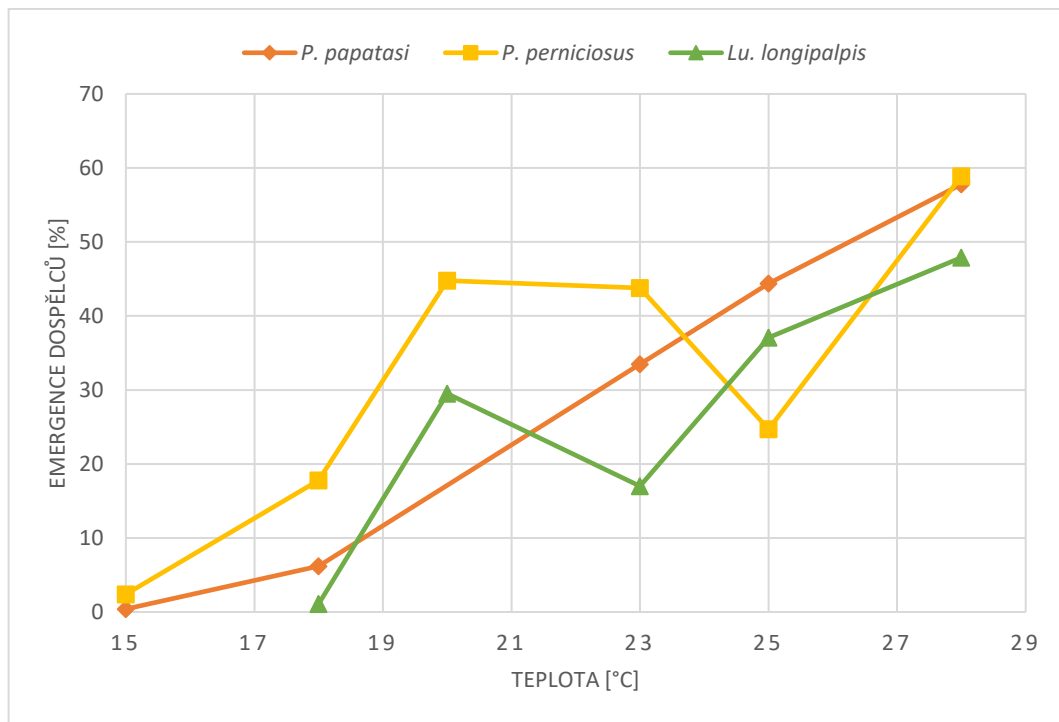
U *P. papatasi* se potvrdil asynchronní vývoj, hlavně během nižších teplot. Z pozorování byla taktéž zřejmá nepřímá závislost rychlosti vývoje a růstu na teplotě prostředí. U skupiny chované při teplotě 28 °C celkový vývoj trval 34-76 dní (od uzavření do krabičky až po vylétnutí dospělce) a u skupiny chované v 15 °C 150-189 dní. Pozorování při 25 °C a 23 °C byla velmi podobná. Procentuálně se množství vyletujících dospělců (emergence = celkový počet vylétnutých dospělců/množství vajíček · 100) snižovalo se snižující se teplotou (viz **Graf 1**). Při nižších teplotách měly larvy a kukly větší úmrtnost, při 15 °C dokončilo vývoj pouze 6 flebotomů z 1424 vajíček (0,4% emergence). Když se larvy vylíhly při 25 °C a následně byly umístěny do nižších teplot, taktéž docházelo k znatelné úmrtnosti. Z 1806 vajíček při 15 °C se vyvinulo pouze 7 dospělců (0,7% emergence) po 258-360 dnech, při 10 °C se žádná larva nedožila dospělosti.

U *P. perniciosus* při teplotě 28 °C trval celkový vývoj 32-45 dní a při 15 °C 192-412 dní. Při 25 °C vývoj trval necelých 60 dní a u 23 °C zase 70 dní maximálně. Při nižších teplotách docházelo k významnému množství úmrtí larev i kukel. Při 18 °C byla 17,8% emergence dospělců a při 15 °C činila emergence 2,4 %. Pokud byla vajíčka prvně umístěna do 25 °C až do vylíhnutí a následně do

15 °C, emergence se zvedla na 7,3 % (z 602 vajíček se vylíhlo 44 dospělců). U 10 °C by vývoj velmi pomalý a všechny larvy zemřely nejpozději ve třetím stádiu vývoje.

U *Lu. longipalpis* byl opět nejrychlejší vývoj při 28 °C, který trval 37-53 dní. Při 18 °C trval 193-216 dní. Tento druh byl nejméně tolerantní k nižším teplotám a už při 18 °C docházelo k úmrtí skoro všech larev a kukel, emergence činila jen 1,1 %. Při 15 °C se žádný jedinec nedožil dospělosti, ani když se vajíčka nechala prvně líhnout při 25 °C (Guzmán & Tesh, 2000).

Graf 1: Emergence různých druhů flebotomů za různých teplot (sestaveno z dat Guzmán & Tesh, 2000)

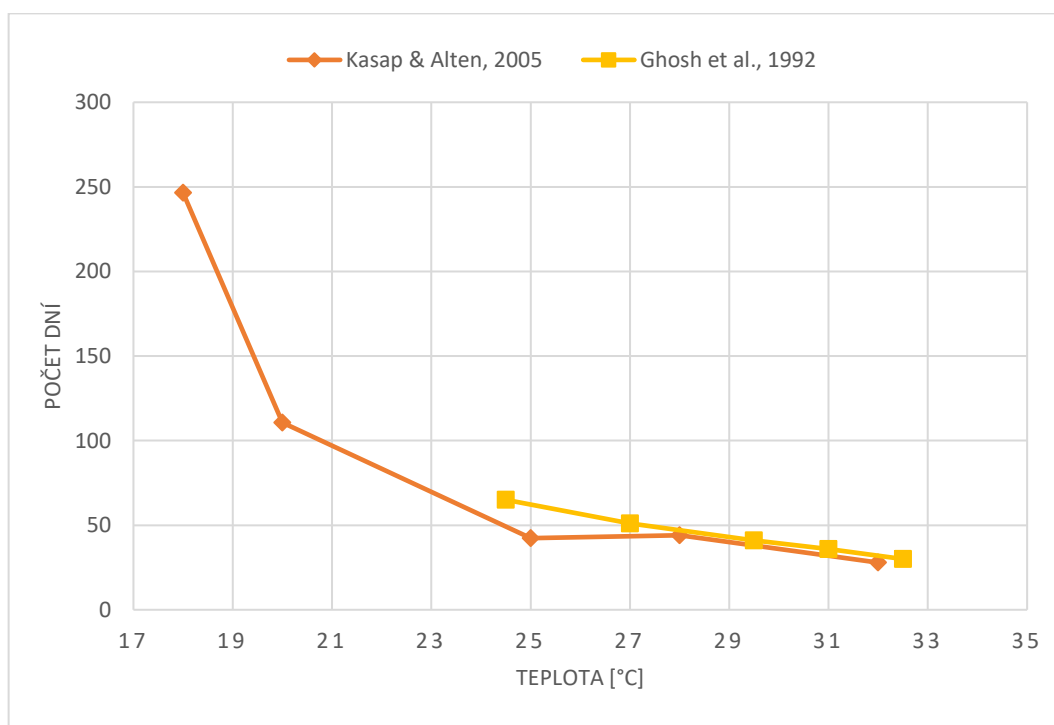


Obdobná data potvrzuje i výzkum Ghoshe a kol. (Ghosh et al., 1992), kteří testovali i vyšší teploty. Při průměrné teplotě 24-26 °C trval vývoj *P. papatasi* průměrně 65 dní, při 27 ± 0,5 °C trval v průměru 51 dní, při 29-30 °C průměrně 41 dní, při 31 ± 0,5 °C 36 dní a při 32-33 °C 30 dní (grafické zpracování viz **Graf 2**), ale při této teplotě byl také největší úhyn larev (23 %) a kukel (12 %). Zvýšení teploty z 20 °C na 31 °C umožnilo larvám rychlejší vývoj a zkrátil se jim životní cyklus. Podobný efekt byl pozorován i u *P. argentipes*. Ten má průměrnou dobu vývoje pohybující se okolo 35 dnů při teplotě 28-31 °C. Jednotlivým larválním stádiím *P. papatasi* se dařilo o něco lépe ve vyšší teplotě (nejmenší ztráty byly při 29-30 °C) oproti *P. argentipes*, který měl nejmenší ztráty při 28-29 °C. *Phlebotomus papatasi* je oproti *P. argentipes* zároveň o něco odolnější vůči širší škále teplot (Ghosh et al., 1992; Ghosh & Bhattacharya, 1989). Obdobně má například *P. sergenti* při zvýšené teplotě 32 °C zkrácenou průměrnou dobu vývoje čítající 26 dní (Jančářová et al., 2016).

K podobným výsledkům došli i Kasap a Alten (Kasap & Alten, 2005) při pozorování *P. papatasi* za stálých teplot (15, 18, 20, 25, 28 a 32 °C), konstantní 60-65% vlhkosti a fotoperiodě

14:10 (světlo:tma). U 15 °C byla teplota tak nepříznivá, že žádný flebotom nedosáhl dospělosti. Při 32 °C trval celkový vývoj průměrně 27,89 dní, při 28 °C trval 44,08 dní, u 25 °C 42,43 dní, u 20 °C 110,64 dní, a u 18 °C trval průměrně až 246,43 dní (grafické zpracování viz **Graf 2**). U všech teplot byly rozdíly v délce vývoje signifikantní, až na 25 a 28 °C, kdy byla doba vývoje velmi podobná. Průměrná doba vývoje lineárně korelovala s rostoucí teplotou. Nejmenší hraniční teplota, kterou jednotlivá stádia *P. papatasi* potřebují k vývoji, odpovídá 11,6 °C pro vajíčka, 19,81 °C pro larvy a 17,63 °C pro kukly. Minimální teplota pro celkový vývoj se pohybuje přibližně okolo 20 °C. Další autoři se nevěnovali přímo sledování vlivu teploty na vývoj flebotomů, ale existuje spousta pozorování za běžných laboratorních podmínek (viz **Tabulka 1**).

Graf 2: Průměrná délka vývoje nedospělých stádií *P. papatasi* (od naklazení vajíček po emergenci dospělců) za různých teplot (sestaveno z dat Ghosh et al., 1992; Kasap & Alten, 2005)



V extrémních teplotách larvy *P. papatasi* umírají po jedné hodině ve 42 °C anebo po půl hodině v -10 °C. Při 0 °C přežijí až 4,5 dne a při -2 °C 2-3 dny (Theodor, 1934). V laboratoři žádná larva *P. papatasi* nepřežije chov v 15 °C a při 18 °C jich zahyne přibližně 85 %, se zvyšující se teplotou mortalita larev klesá. Mortalita kukel stoupá s rostoucí teplotou, kdy při 32 °C jich zahyne necelých 30 % (Kasap & Alten, 2005). Podobně larvy *P. perniciosus* vystavené nízkým teplotám mezi 2-10 °C umíraly velmi brzy (Ready & Croset, 1980). Diapauzující larvy jsou ale schopné přežít nízké teploty (3-5 °C) i potopení do vody po dobu 10-12 dní (Chaniotis, 1967).

Tabulka 1: Srovnání délky vývoje nedospělých stádií (od naklazení vajíček po emergenci dospělců) jednotlivých druhů flebotomů za příznivých teplot a vlhkostí

Druh flebotoma	Teplota [°C]	Vlhkost [%]	Délka vývoje [dny] Min – Max (Průměr)	Autor	Poznámka
<i>Lu. stewarti</i>	25	75-100	31-43	(Chaniotis, 1967)	
<i>Lu. flaviscutellata</i>	20,5-26	Neuvedeno	25-68 (40,5)	(Ward, 1977)	
<i>Lu. longipalpis</i>	25	95	25-52 (40)	(Killick Kendrick et al., 1977)	Stále kontrolované podmínky, průměr čtyř generací.
		Neuvedeno	25-52 (51)	(Killick Kendrick et al., 1977)	Méně stálé podmínky, průměr čtyř generací.
	25-26	60-70	37-47 (41,9)	(Volf & Volfová, 2011)	
<i>Lu. vexatrix occidentis</i>	25	75-100	42-61	(Chaniotis, 1967)	
<i>Lu. californica</i>	25	75-100	48-52	(Chaniotis, 1967)	
<i>Lu. anthophora</i>	25	90	(49,5 ± 2)	(Endris et al., 1984)	
<i>Lu. shannoni</i>	28	87-99	36-74 (54,6)	(Ferro et al., 1998)	
<i>P. tobbi</i>	25-26	60-70	37-42 (39,1)	(Volf & Volfová, 2011)	Délka vývoje se lišila dle původu kolonií.
			38-48 (42,3)		
<i>P. sergenti</i>	25-26	60-70	38-45 (40,3)	(Volf & Volfová, 2011)	Délka vývoje se lišila dle původu kolonií.
			44-52 (47,8)		
<i>P. argentipes</i>	25-26	60-70	35-45 (41,3)	(Volf & Volfová, 2011)	
<i>P. papatasi</i>	25	65-75	(42,43)	(Kasap & Alten, 2005)	
	25-26	60-70	39-44 (41,9) 52-64 (56,1)	(Volf & Volfová, 2011)	Délka vývoje se lišila dle původu kolonií.
<i>P. perniciosus</i>	25-26	60-70	41-47 (43,1)	(Volf & Volfová, 2011)	Délka vývoje se lišila dle původu kolonií.
			44-52 (48,1)		
<i>P. longipes</i>	25	100	(45)	(Gemetchu, 1976)	
<i>P. arabicus</i>	25-26	60-70	42-48 (45,5)	(Volf & Volfová, 2011)	
<i>P. halapensis</i>	25-26	60-70	46-52 (48,4)	(Volf & Volfová, 2011)	
<i>P. duboscqi</i>	25-26	60-70	52-61 (54,5)	(Volf & Volfová, 2011)	Délka vývoje se lišila dle původu kolonií.
			53-69 (58,4)		

Larvy ani kukly nemají žádný mechanismus zabráňující ztrátám vody a ztrácí ji celým povrchem těla. Bez kontaktu s vlhkým substrátem oběma stádiím hrozí smrt vysušením (Chanotis, 1967; Theodor, 1936) i v relativně vysokých (80 %) vlhkostech, ta obvykle nastává poté, co ztratí přibližně 55-60 % vody z těla. Theodor (Theodor, 1936) zkoumal při různých teplotách ztráty vody u larev a kulek *P. papatasi* a jejich vliv na délku života. Larvy jsou velmi citlivé na vysychání. Při nízkých vlhkostech umíraly do 6 hodin, ve vyšších vlhkostech byly ztráty vody pozvolnější; pro 30 °C a 23 °C byly ztráty vody téměř identické. V pozorovaných teplotách 17, 23 a 30 °C aktivně se pohybující larvy zemřely při 0% vlhkosti po 2-4 hodinách, u 20-60% vlhkosti po 4-6 hodinách a po 6-24 hodinách u 80-100% vlhkosti. Hibernující larvy na tom byly s délkou života velmi podobně a rozdílná teplota na obě skupiny neměla z hlediska vysoušení příliš vliv, ztráty vody byly úměrné k relativní vlhkosti: pokud byly larvy v kontaktu s vlhkým substrátem, tak přežily až 36 dní. Kukly se při 30 °C vyvíjely 8-9 dní a při 17 °C až 50 dní a ztráceli vodu podobně jako larvy. U nízkých teplot trval vývoj příliš dlouho a tak se kvůli vysychání žádní dospělci nestihli nevylíhnout.

Jak je patrné z předchozího textu, doba vývoje od vajíčka po vznik dospělé flebotomy může být svou délkou dost variabilní, u většiny druhů trvá přibližně 40-50 dní. Nejkratší délku vývoje uvádějí (Chanotis, 1967) u *Lu. stewarti* (31-43 dní), naopak poměrně dlouhý vývoj byl popsán u *P. duboscqi* (52-69 dní) (Volf & Volfová, 2011) a *L. shannoni* (36-74 dní) (Ferro et al., 1998). Variabilitu v délce vývoje vajíček, larev a kulek ovlivňují kromě teploty určité i vnitřní faktory; Volf a Volfová (Volf & Volfová, 2011) popisují, že i u druhů *P. papatasi* a *P. duboscqi*, chovaných za stejných podmínek, lze pozorovat odlišnou délku vývoje dle toho, z jaké geografické oblasti daný druh pocházel. Kasap a Alten (Kasap & Alten, 2005) dokonce uvádějí odlišnou délku vývoje u potomků dvou sester.

Na nižší teploty jsou lépe adaptovány druhy žijící v mírném podnebném pásu, například *P. papatasi* nebo *P. perniciosus* (Guzmán & Tesh, 2000). Naopak druhy běžně obývající oblasti bez velkého kolísání teplot (např. *Lu. longipalpis*) snáší nižší teploty velmi špatně, takže často umírají ještě před dokončením vývoje, který je v chladnějším prostředí zpomalený (Guzmán & Tesh, 2000). Příliš vysoké teploty mohou překračovat teplotní optimum jedinců, způsobující jejich úhyn, například u *P. papatasi*, kdy je za vysokých teplot (32 °C) menší emergence dospělců (Kasap & Alten, 2005), v kontrastu s tím ale např. počty *Lu. anthophora* při teplotě 32 °C nebyly zdatelně negativně ovlivněny (Endris et al., 1984). Velmi vysoké (42 °C) nebo nízké teploty (pod 15 °C) jsou pro všechna nedospělá stádia již po krátké době fatální (Kasap & Alten, 2005; Theodor, 1936).

Teplota prostředí má tedy významný vliv na rychlost růstu všech vývojových stádií. Se zvyšující se teplotou se zkracuje délka celkového vývoje, což může být výhodné pro produkci velkého počtu jedinců. V přírodě se může délka vývoje oproti laboratorním podmínkám lišit, důležité jsou hlavně změny vzdušné vlhkosti a vlhkosti substrátu. Hraniční teplotou pro celkový vývoj je přibližně 20 °C. To bylo popsáno pro běžně chovaný druh *P. papatasi*, je ale třeba brát v úvahu mezidruhovou variabilitu i variabilitu v rámci populací stejného druhu.

4.2 Diapauza nedospělých stádií

Flebotomové žijící v mírném podnebném pásu během zimních měsíců podstupují diapauzu v podobě vajíčka nebo třetího či čtvrtého larválního stádia, která prodlužuje délku jejich života a přečkávají díky ní nepříznivé podmínky. Toto chování můžeme pozorovat například u *P. papatasi*, *P. perniciosus* (Guzmán & Tesh, 2000), *P. ariasi* (Killick-Kendrick & Killick-Kendrick, 1987), *Lu. stewarti*, *Lu. californica* nebo *Lu. vexatrix occidentis* z oblasti Kalifornie (Chaniotis, 1967). Larvy *Lu. diabolica* podstupují diapauzu i během horkých letních dnů (P. Lawyer & Young, 1991).

Vliv teploty na chování při přezimování bylo pozorováno u *P. perniciosus* a *P. ariasi* (Ready & Croset, 1980). Při 20 °C byly larvy aktivní během celé zimy, při 15 °C se larvy zprvu pohybovaly pouze po vyrušení, ale přišlo i období, kdy se úroveň aktivity zvýšila. To samé se dělo i při 10 °C. Při nižších teplotách (2-7 °C) nebyl u larev zaznamenán žádný pohyb. Diapauzu u *P. perniciosus* je možné přerušit přemístěním larev do 25 °C (Tesh et al., 1992).

Podobně u *Lu. vexatrix occidentis* a *Lu. californica* (Chaniotis, 1967) část larev ve čtvrtém vývojovém stádiu podstoupila diapauzu. Za diapauzující jedince byli považováni ti, kteří se nestihli zakuklit do 11-13 dní při 22 °C, 9-10 dní při 25 °C a 7-8 dní při 28 °C a zůstali ve čtvrtém larválním stádiu ještě alespoň týden. Čím vyšší teplota, při které byly larvy chovány, tím méně často se diapauza objevovala. Intenzita i délka diapauzy závisela na teplotě, ale byla zde velká individuální variabilita. Doba, kdy larvy setrvaly v diapauze se lišila, mohla trvat několik týdnů až 6 měsíců. Po vystavení vyšším teplotám (28 °C) se brzy zakuklily. Výjimečně se pár jedinců ani po vystavení vysokým teplotám nezakuklilo – to naznačuje, že každá larva má svoji optimální teplotu pro zakuklení jinde.

Diapauza čtvrtých larválních stádií se objevila i u laboratorní kolonie *P. ariasi* (Killick-Kendrick & Killick-Kendrick, 1987), kdy nastávala navzdory příznivým laboratorním podmínkám: proto byly během zimních měsíců diapauzující larvy umístěny do 10 °C a na jaře byla teplota zvýšena na 24 °C, načež se larvy velmi brzo zakuklily a následně začali vyletovat dospělci.

Obdobně při pozorování *Lu. diabolica* (Lawyer & Young, 1991) mimo laboratoř se objevila diapauza po zkrácení dnů v zimě a nástupu chladnějších teplot (10-20 °C), trvající u jednotlivých snůšek 90-270 dní. Vývoj larev, které se vylíhly na podzim, se ve třetím nebo čtvrtém stádiu zastavil až do teplejšího období na jaře, kdy zvyšující se teplota znamenala konec diapauzy.

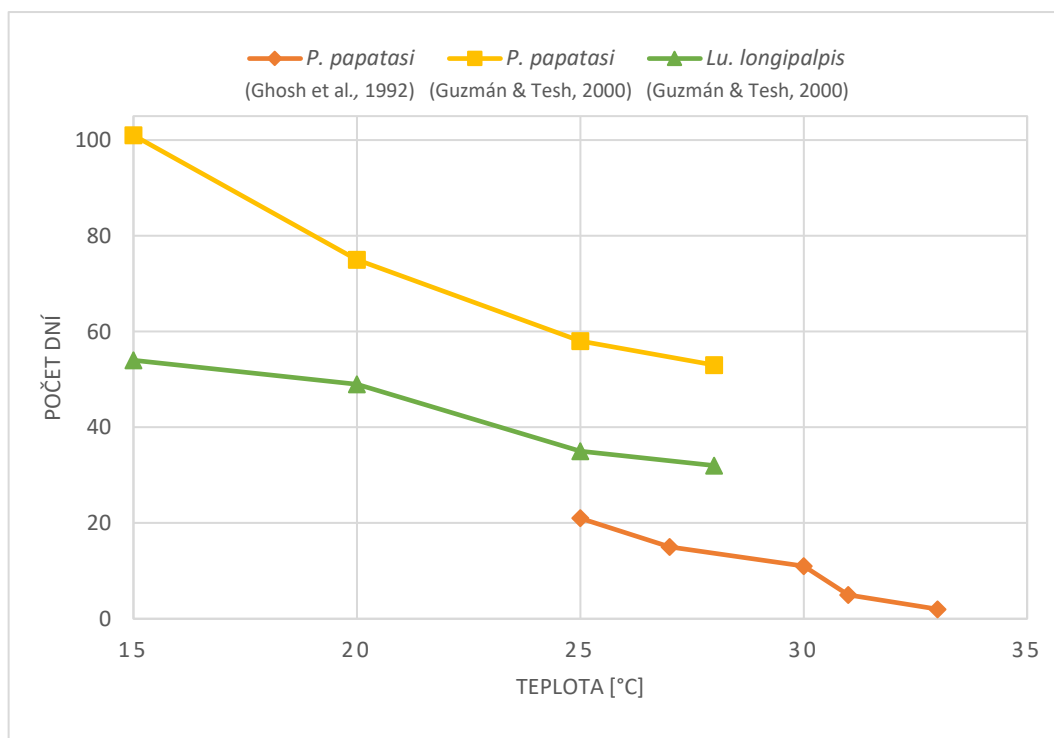
Intenzita i délka diapauzy tedy závisí na teplotě a má kumulativní charakter (Chaniotis, 1967; Ready & Croset, 1980). Nízká teplota je jeden z hlavních faktorů vyvolávajících diapauzu, nicméně i při laboratorních podmínkách ji část larev v druhé a třetí generaci podstupuje, reagující pravděpodobně na vnitřní signály, které jsou vlastní pro vajíčka, larvy i dospělé samice (Chaniotis, 1967). Vajíčka flebotomů jsou citlivější vůči vyšším teplotám a jejich larvy zase vůči nižším teplotám, proto diapauzu v podobě vajíčka nalezneme často v teplejším podnebí (např. *Lu. diabolica*) a diapauzu larev zase v chladných oblastech (např. *P. ariasi*) (Kasap & Alten, 2005; Killick-Kendrick & Killick-Kendrick, 1987; Lawyer & Young, 1991). Období diapauzy se přeruší, jakmile se jedinec dostane do vyšších

teplot: například 24 °C pro *P. ariasi* (Killick-Kendrick & Killick-Kendrick, 1987), 25 °C pro *P. perniciosus* (Tesh et al., 1992), nebo 28 °C pro *Lu. vexatrix occidentis* a *Lu. californica* (Chaniotis, 1967).

4.3 Délka života dospělců

Za stálých laboratorních podmínek se samičky flebotomů dožívají průměrně v rozmezí 9-40 dnů (viz **Tabulka 2**). Je ale třeba podotknout, že metodika i podmínky chovu ovlivňují pozorované hodnoty a tak pro mezidruhová srovnání by bylo ideální vycházet z prací, kdy mají flebotomové stejné životní podmínky, včetně přístupu k potravě a kladení vajíček. Vliv teploty na délku života dospělců testovali Guzmán a Tesh (Guzmán & Tesh, 2000). S klesající teplotou se průměrná délka života prodlužovala. Pro nedospělá stádia bylo 15 °C smrtelných, ale dospělci zvládali tuto teplotu bez problémů, jejich délku života při této teplotě přesahovala 50 (*Lu. longipalpis*) až 100 dní (*P. papatasi*), viz **Graf 3**. Druh *P. papatasi* měl delší délku života než *Lu. longipalpis* u všech testovaných teplot (Guzmán & Tesh, 2000). Když byli dospělí jedinci *P. papatasi* umístěni do 10 °C, zemřeli všichni do 19 dní. Při testování v 6 °C byla délka jejich života znatelně kratší, okolo 6-8 dnů, v 0 °C vydrželi až 2,5 dne (Theodor, 1934). Co se týče limitů vysoké teploty, *P. papatasi* umírá po jedné hodině v teplotě 40,5-41 °C (samičky) a 42 °C (samečci) a po dvou hodinách v -5,5 °C. U dlouhodobého vystavení vysokým teplotám nenasáté samičky vydrží vyšší teploty déle než nasáté (Theodor, 1936).

Graf 3: Maximální doba přežívání dospělců *P. papatasi* a *Lu. longipalpis* za různých teplot (sestaveno z dat Ghosh et al., 1992; Guzmán & Tesh, 2000)



Tabulka 2: Délka přežití dospělců jednotlivých druhů flebotomů za příznivých podmínek v laboratoři

Druh flebotoma	Teplota [°C]	Vlhkost [%]	Průměrná délka přežití [den]	Autor	Poznámky
<i>Lu. shannoni</i>	28	80-97	8,6	(Ferro et al., 1998)	Cukrem byly krmené jen nasáté samičky.
<i>Lu. vexatrix occidentis</i>	25	100	9,2 ± 2,63	(Chaniotis, 1967)	Samečci bez cukru, s cukrem přežili maximálně 32 dní.
		100	11,8 ± 3,76	(Chaniotis, 1967)	Samičky bez cukru, s cukrem přežily maximálně 34 dní.
<i>Lu. anthophora</i>	26	90	10,1 ± 3,1	(Endris et al., 1984)	Samečci
		90	10,4 ± 2,9	(Endris et al., 1984)	Samičky
<i>Lu. longipalpis</i>	25	Neuvedeno	23,7	(Guzmán & Tesh, 2000)	Samečci
		Neuvedeno	25,3	(Guzmán & Tesh, 2000)	Samičky
<i>Lu. flaviscutellata</i>	20,5-26	95-98	27	(Ward, 1977)	Samičky, které se až 4x nasály.
		95-98	8,8	(Ward, 1977)	Samičky, které se nasály pouze 1x.
		95-98	5,9	(Ward, 1977)	Samečci
<i>P. papatasi</i>	25	Neuvedeno	32,2	(Guzmán & Tesh, 2000)	Samečci
		Neuvedeno	39,6	(Guzmán & Tesh, 2000)	Samičky
<i>P. longipes</i>	25	50-80	35,5	(Gemetchu, 1976)	

Délka života dospělců *P. papatasi* byla i v další studii poměrně vysoká za nízkých teplot (při 15 °C se jednalo o 35 dní pro samice a 33 dní pro samce), za extrémně vysokých teplot se *P. papatasi* průměrně dožívali méně (při 32 °C 11 dní pro samice a 13 dní pro samce) (Kasap & Alten, 2006).

Trend zkracování délky života s narůstající teplotou překračující teplotní optimum potvrdil i Ghosh a kol. u *P. papatasi* (Ghosh et al., 1992). Při průměrné teplotě 24-26 °C se dospělci dožívali 15-27 dní (21 dní průměr), při 27 ± 0,5 °C 12-18 dní (15), při 29-30 °C 8-14 dní (11), při 31 ± 0,5 °C 3-8 dní (5) a při 32-33 °C se dospělci dožili pouhých 1-4 dní (2).

Rozdíl v absolutních hodnotách udávaný různými autory u stejného druhu flebotoma (*P. papatasi*) v předchozím textu by mohl být dán mimo jiné různou vlhkostí prostředí, ve které se

prováděly pokusy. Bohužel Guzmán a Tesh (Guzmán & Tesh, 2000) ani Ghosh a kol. (Ghosh et al., 1992) vlhkost při svém pozorování nezmiňovali. Právě možný vliv vlhkosti na délku života *P. papatasi* pozoroval Theodor (Theodor, 1936) při 10, 15, 23 i 30 °C. Při pozorování nenasátých samic během všech teplot (kromě 30 °C) průměrná délka života proporcčně klesala s úbytkem vlhkosti, při 30 °C byla délka života mnohem kratší. Vysoké vlhkosti byly pro flebotomy stěžejní z hlediska dlouhodobého přežívání, za nízkých vlhkostí všichni flebotomové umřeli velmi brzy bez ohledu na teplotu. Ovšem při vysoké teplotě (30 °C) se i při vysoké vlhkosti (80-95 %) pouze 40 % nasátých samic dožilo 6 dnů. Pro porovnání při 23 °C a vysokých vlhkostech se 40 % nasátých samic dožilo 8-9 dnů a při 15 °C se jednalo o 12-15 dní. Při 15 °C se nasáté samičky dožívaly maximálně 16 dní, při 23 °C maximálně 10 dní a při 30 °C se nejdéle dožily nenasáté samičky 9 dní. V tomto experimentu se průměrná délka života u nasátých a nenasátých samic při vysokých vlhkostech příliš nelišila.

Obecně lze tedy říct, že mezi délkou života dospělých flebotomů a vnější teplotou lze pozorovat nepřímou úměrnost: v nízkých teplotách je život dospělců delší oproti teplotám vysokým, kde se po překročení určitého teplotního optima ještě výrazněji zkracuje (Ghosh et al., 1992; Guzmán & Tesh, 2000), nicméně každý druh má teplotní optimum trochu jinde. V 15 °C jsou chladnomilnější druhy schopny přežít až 100 dní (*P. papatasi*), teplomilnější *Lu. longipalpis* přežila jen maximálně 54 dní (Guzmán & Tesh, 2000). Velmi nízké teploty (-5,5 °C a níž) i velmi vysoké teploty (41-42 °C) jsou pro dospělé flebotomy po pár hodinách smrtelné (Theodor, 1936). Při nízkých vlhkostech ztrácí flebotomové velmi rychle svoji tělesnou vodu, což způsobuje jejich rychlý úhyn. Délka života se prodlužuje s rostoucí vlhkostí za všech pozorovaných teplot (Theodor, 1936).

4.4 Velikost těla

Pro stanovení velikosti dospělých flebotomů je často měřena velikost jejich křídel a délka žilek na křídlech. Dále je pro větší přesnost možnost změřit např. femur, tarsus a basitarsus (Belen et al., 2004). Například *P. papatasi* běžně měří 2,5-2,8 mm (Theodor, 1936) a samice mají signifikantně větší křídla než samečci (Prudhomme et al., 2016).

Při pozorování velikosti křídel u *P. ariasi* (Prudhomme et al., 2016) v jihovýchodní Francii autoři shledali, že na velikost křídel má vliv sezóna, ve které byli dospělí flebotomové pozorováni. Velikost křídel (délka žilek) se u obou pohlaví signifikantně změnila mezi červnem, červencem a zářím. Samičky byly v teplejším červenci o něco menší než v červnu. Vliv na velikost měla u obou pohlaví v jednotlivých měsících i nadmořská výška.

Obdobně byly pozorovány čtyři populace *P. papatasi* na jihozápadě Turecka (Belen et al., 2004), kdy nadmořská výška měla na velikost jedinců v jednotlivých populacích taktéž vliv. Průměrně největší byli zástupci populace žijící v 644 m n. m. a z oblasti 368 m n. m. pocházeli nejmenší jedinci.

Taktéž jednotlivé populace *P. papatasi* z různých oblastí pohoří Atlas a kontrolní skupiny z Turecka po porovnání vykazovaly rozdílné velikosti změřených křídel. Flebotomové z turecké kolonie

měli křídla největší a mezi marockými populacemi byli flebotomové větší, pokud žili více na severu oproti těm žijícím na jižnější části hor (Prudhomme et al., 2012).

Jančářová a kol. ve svém pokusu (Jančářová et al., 2016) pozorovali mimo jiné vliv teploty na vývoj larev u *P. sergenti* a zjišťovali, zdali má teplota vliv na následnou velikost dospělců. Nedospělá stádia byla držena při 27 a 32 °C. Po dokončení vývoje byli dospělci rozpitváni a jejich křídla a žilky na křídlech byly změřeny pro přesné určení velikosti flebotoma. Teplota, při které byly larvy drženy velikost dospělců ovlivnila – žilky u samic chovaných při 27 °C byly signifikantně delší než u samic chovaných při 32 °C.

Výše uvedená pozorování ukazují, že pokud mají larvy flebotomů během svého vývoje dostatek potravy a prostoru k růstu, velikost dospělců je podmíněna teplotou, kdy spíše větší jedince nalezneme v oblastech s nižší teplotou a spíše menší jedince v oblastech s vyšší teplotou, neb vyšší teplota urychluje vývoj (viz kapitola 4.1 Rychlost růstu a vývoje nedospělých stádií). To potvrzuje jak pozorování populací *P. papatasi* žijících v oblasti pohoří Atlas (Prudhomme et al., 2012) tak *P. sergenti* chované v laboratoři (Jančářová et al., 2016). Mezi další související faktory ovlivňující velikost těla flebotomů tedy patří i nadmořská výška a klima (Prudhomme et al., 2012). Ve vyšších nadmořských výškách, kde je obecně chladněji, se nachází relativně robustnější populace (Belen et al., 2004; Prudhomme et al., 2012).

4.5 Trávení krve a hmotnost těla

Trávení krve u krevsajícího hmyzu je proces, který zahrnuje: a) odstranění přebytečné vody z nasáté krve b) hemolýzu nasáté krve c) hydrolyzu makromolekul z nasáté krve (trávení) d) absorpci drobných molekul produkovaných během trávení do epiteliálních buněk mezenteronu a následně i hemocoelu. Voda je rychle odstraňována díky osmotickému gradientu, který vzniká mezi epiteliálními buňkami mezenteronu a hemolymfou, procesem prediureze (ještě během sání) a následně diureze, což nasáté samici usnadňuje proces trávení a ztráta přebytečné vody ulehčuje i let (shrnuto v Romoser, 1996).

U nasátých samic *P. papatasi* sledoval Theodor (Theodor, 1936) kolísání hmotnosti při 23 a 30 °C. Těsně po vylíhnutí samička váží 0,5-0,6 mg a během prvních pár hodin váhu rychle ztrácí spolu s exkretovanou vodou; postupem času jsou ztráty váhy víc pozvolné a závisí na okolní teplotě a vlhkosti. Průměrná váha samičky třetí den bez předchozího nasátí činila 0,35-0,4 mg. Při obou teplotách se množství nasáté krve po prvním sání pohybovalo okolo 0,4-0,5 mg nehledě na váhu flebotomů. Jiní autoři popisují jiné absolutní hodnoty nasáté krve: v jednom pozorování dospělci *P. papatasi* při sání na bílých laboratorních myších nasáli maximálně 0,26-0,30 mg krve a podobně dospělci *P. argentipes* zase 0,22-0,27 mg krve (Ghosh et al., 1992) a v dalším pokusu *P. papatasi* nasáli 0,90 mg krve, *P. argentipes* 0,73 mg, *P. orientalis* 0,53 mg, a *S. schwetzi* 0,91 mg krve. Flebotomové nasáli větší objem krve na laboratorních myších oproti umělému krmítku z kuřecí kůže s králičí krví (Pružinová et al., 2015). Vliv

na množství nasátých flebotomů měl také druh hlodavce: flebotomové nejochotněji sáli na bílých laboratorních myškách a nejméně jim vyhovovaly albínské krysy (Ghosh et al., 1992). Rozdíly v uváděném množství nasáté krve jsou ale dány i rozdílnou metodikou měření. Jak bylo zmíněno, při sání krve dochází u samic flebotomů rychle ke ztrátě vody díky prediurezi, proto je spolehlivější stanovit objem nasáté krve skrze množství vyloučeného hemoglobinu (Pružinová et al., 2015) než pouhým vážením.

Theodor také popisuje, že se samičky *P. papatasi* podruhé nasály obvykle po 3 (při 23 °C) nebo 2-3 dnech (při 30 °C) a množství nasáté krve bylo vždy menší, nehledě na teplotu a velikost těla flebotoma. To může být způsobeno tím, že samičky v té době ještě nebyly úplně vyhladovělé. Při třetím až pátém nasátí se při 23 °C jednalo o 0,15-0,20 mg krve, výjimečně okolo 0,25 mg, při 30 °C bylo druhotné nasátí o něco méně objemné, obvykle nasáli okolo 0,15-0,2 mg krve. To pravděpodobně zapříčinila velmi vysoká teplota – pro pozorované flebotomy bylo překročeno se nejednalo o teplotní optimum a velmi brzy po druhém nasátí i umírali. Při 30 °C nasátí flebotomové ztráceli vylučováním ze zadečku větší množství vody, a tudíž i váhy (75 % hmotnosti 24 h po sání oproti 50-66 % při 23 °C). Vývoj vajíček nijak znatelně neovlivnil váhu samičky flebotomů, některé vážily stejně před prvním sáním a po pátém sání, kdy už měly plně vyvinutá vajíčka (Theodor, 1936).

V pokusu zaměřeném na vliv teploty na metabolismus *P. papatasi* (Benková & Volf, 2007) při 23 a 28 °C se autoři mimo jiné věnovali i vlivu teploty na trávení krve. Pro výpočet množství nasáté krve bylo zváženo množství defekovaného hematinu na filtračním papíru. Teplota měla na trávení krve vliv, stejně jako na všechny ostatní metabolické procesy – s nižší teplotou byly pomalejší. Při 23 °C byla defekace samic opožděna o 12-36 hodin v porovnání se samicemi drženými v 28 °C. Mezi jednotlivými teplotními skupinami v množství exkretovaného hematinu nebyl žádný signifikantní rozdíl. Vliv nízkých teplot na sníženou rychlost trávení potvrzují i další výzkumy na *P. papatasi* (Kasap & Alten, 2006; Theodor, 1936). Při 15 °C bylo trávení redukováno anebo vůbec neprobíhalo.

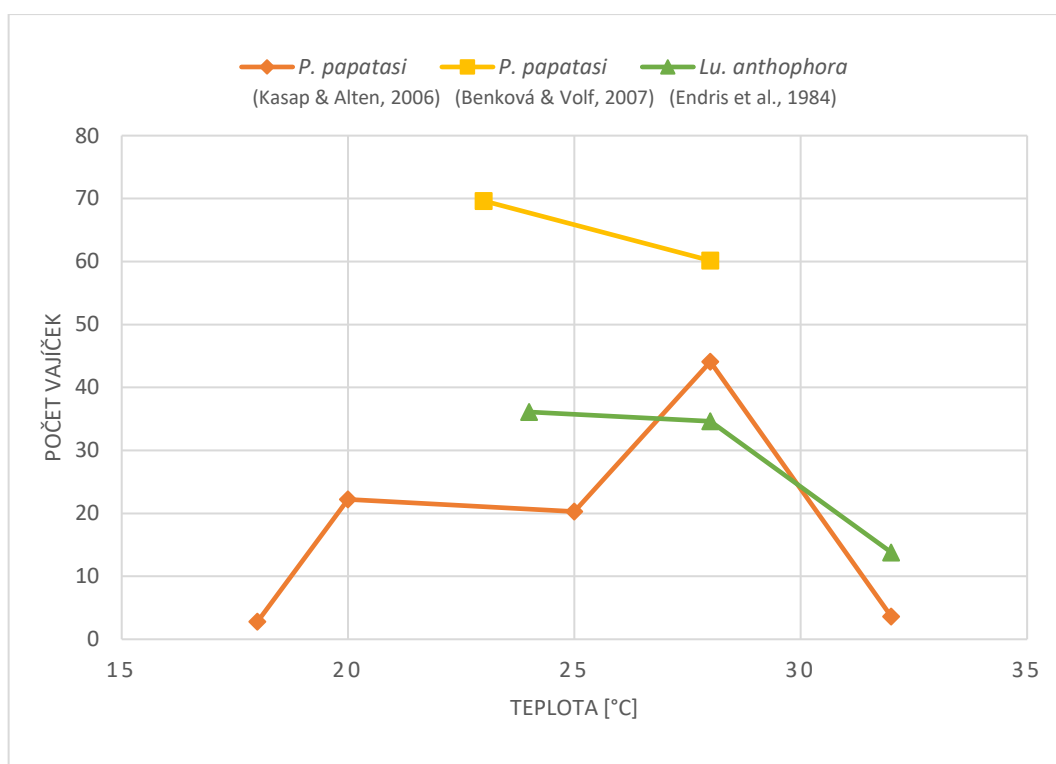
Předchozí text potvrzuje, že flebotomové, stejně jako jiný hematofágní hmyz, obvykle pozřou množství krve, které překračuje jejich vlastní váhu. Délka trávení krve se liší druh od druhu (Volf & Killick-Kendrick, 1996) a množství nasáté krve se odvíjí od několika faktorů, např. vývojové fáze, četnosti předchozích nasátí (Theodor, 1936) nebo hostitele (Ghosh et al., 1992; Sant'anna et al., 2010). Okolní teplota neovlivňuje množství nasáté krve, ale rychlost jeho trávení. S nižší teplotou se proces zpomaluje (Benková & Volf, 2007; Kasap & Alten, 2006; Theodor, 1936). Vysoké teploty (30 °C) způsobují, že flebotomové vylučují přibližně o 15 % více vody z těla než za běžných teplot (23 °C) a s tím i ubývají na váze (Theodor, 1936).

4.6 Plodnost

Při pozorování vlivu teploty na metabolismus (Benková & Volf, 2007) byly samice *P. papatasi* drženy při teplotě 23 a 28 °C, 60-70% vlhkosti a s ohledem na teplotu bylo dokumentován i čas kladení

vajíček a jejich líhnutí. Rozdíly v počtu nakladených vajec mezi oběma teplotními skupinami nebyly signifikantní ($69,63 \pm 23,55$ vajíček při 23 °C a $60,15 \pm 27,82$ vajíček při 28 °C), vliv na množství vajíček mělo množství nasáté krve. Skupina držaná při 28 °C ale nakladla vajíčka dřív a během relativně krátké doby (3-12 dní po nasátí), kdežto ve skupině držené při 23 °C bylo kladení vajíček opožděno o přibližně 3,5 dne a kladení vajíček nastávalo 6-18 dní po nasátí. Vývoj vajíček byl také pomalejší, při 23 °C činila průměrná doba vývoje 250 hodin (10,5 dne), naopak při 28 °C se jednalo o 166 hodin (7 dní). Kladení i líhnutí vajíček bylo tedy opožděné a oba procesy trvaly déle. Vliv teploty na počet nakladených vajíček pozorovaný různými autory lze dobře vidět na **Graf 4**.

Graf 4: Počet vajíček nakladených samičkami *P. papatasi* a *Lu. anthophora* za různých teplot (sestaveno z dat Benková & Volf, 2007; Endris et al., 1984; Kasap & Alten, 2006)



Vliv teploty na kladení vajíček byl pozorován i u samiček *Lu. longipalpis* (Martins et al., 2023). Nasáté samice byly drženy při 20, 24 a 30 °C. Další skupiny samic, které byly pro porovnání drženy v oblasti s teplotním gradientem, sahajícím od 18 °C až k 30 °C (± 1 °C), 3. den po nasátí, kdy se teprve vyvíjely oocyty, preferovaly chladnou oblast teplotního spektra a pohybovaly se méně oproti skupině samic 6. den po nasátí krve, které se naopak pohybovaly v nejteplejší oblasti a byly o poznání aktivnější. Také samice chované při konstantní teplotě 24 °C kladly většinou až 6. den po sání. Zpomalená aktivita i preference chladnějších teplot tedy zřejmě zajišťuje ideálnější podmínky pro maturaci vajíček.

Kasap a Alten pozorovali za stálých teplot (15, 18, 20, 25, 28 a 32 °C) reprodukční a populační parametry *P. papatasi* (Kasap & Alten, 2006). V pokusu střídali fotoperiodu po 14 a 10 hodinách (14:10

světlo:tma) a všechny flebotomy drželi ve stálé 60% vlhkosti. Reprodukční období (doba, během které samičky kladly vajíčka) trvalo u jednotlivých skupin 1-10 dní. Na obou koncích spektra teplot byl počet nakladených vajíček nižší a doba kladení vajíček se zkracovala s narůstající teplotou. Vajíček bylo nejvíce u skupiny chované při 28 °C ($44,08 \pm 7,79$), oproti například 25 °C, kdy jich samičky průměrně nakladly $20,28 \pm 3,73$ nebo 20 °C, kdy jich nakladly $22,24 \pm 3,32$. Net reproduktive rate R_0 popisuje průměrné množství narozených samic na jednu samici v každé generaci. R_0 bylo nejvyšší u skupiny chované při teplotě 28 °C a nejnižší u 18 °C a 32 °C (u 15 °C se žádný flebotom nedožil dospělosti). Skupina chovaná při 28 °C signifikantně lišila od ostatních skupin a lze tedy říct, že 28 °C je pro *P. papatasi* u pozorovaných parametrů optimální teplotou pro život.

K podobným výsledkům došel i Endris (Endris et al., 1984) u pokusů s *Lu. anthophora* při 24, 28 a 32 °C. Množství nakladených vajíček se mezi 24 °C (první 3 generace) a 28 °C (zbylých 9 generací) nelišilo. Průměrný počet vajíček na samici se u vyšších teplot pohyboval okolo $35 \pm 17,3$. U skupin chovaných při 32 °C bylo nakladených vajíček zřetelně méně, průměrně $13,8 \pm 9,8$ vajíček na samičku.

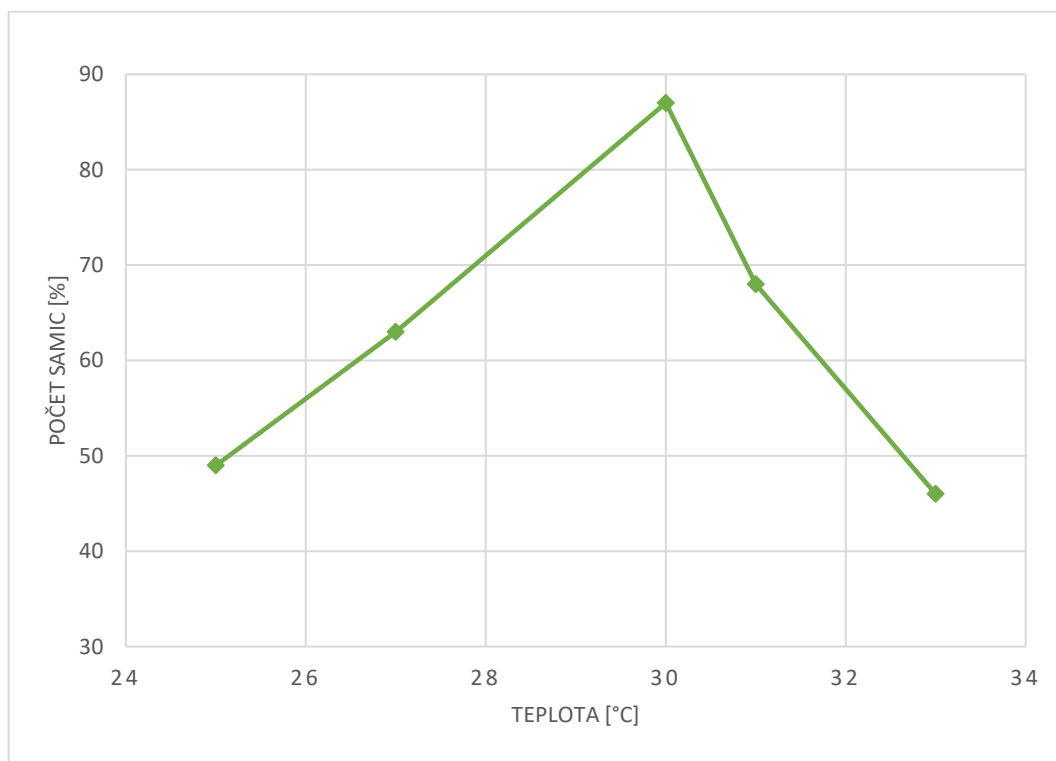
Tabulka 3: Množství nakladených vajíček jednotlivých druhů flebotomů při nejprůzračnější teplotě pro kladení vajíček

Druh flebotoma	Teplota [°C]	Vlhkost [%]	Průměrný počet vajíček	Autor	Poznámky
<i>Lu. californica</i>	25	75-100	11 ± 8	(Chaniotis, 1967)	
			33 ± 18	(Chaniotis, 1967)	
<i>Lu. shannoni</i>	28	87-99	22,7	(Ferro et al., 1998)	K tomu průměrně 24,3 vajíček zadržela.
<i>Lu. flaviscutellata</i>	20,5-26	Neuvedeno	37,6	(Ward, 1977)	
<i>Lu. vexatrix occidentis</i>	25	75-100	38 ± 27	(Chaniotis, 1967)	
			43 ± 27	(Chaniotis, 1967)	
<i>Lu. longipalpis</i>	25	95	50	(Killick Kendrick et al., 1977)	
<i>P. neglectus</i>	27	Neuvedeno	23,2	(Chaniotis et al., 2000)	Samičky dané množství vajíček nakladly po druhém nasátí.
<i>P. papatasi</i>	29-30	Neuvedeno	$39 \pm 8,07$	(Ghosh et al., 1992)	
	28	80	$40,39 \pm 16,19$	(Eldridge & Scanlon, 1963)	
<i>P. argentipes</i>	29-30	Neuvedeno	$47 \pm 10,85$	(Ghosh et al., 1992)	
<i>P. longipes</i>	25	100	52	(Gemetchu, 1976)	

V laboratorních podmínkách se za příznivých teplotních podmínek pro kladení vajíček (přibližně mezi 25 °C a 30 °C) počet vajíček u jednotlivých druhů liší (viz **Tabulka 3**). Nejméně jich bylo pozorováno při 25 °C u *Lu. californica* (průměrně 11 ± 8) (Chaniotis, 1967) a při 28 °C *Lu. shannoni* (22,7) (Ferro et al., 1998), nejvíce vajíček nakladly samice *Lu. longipalpis* (50) (Killick Kendrick et al., 1977) při 25 °C nebo *P. longipes* (52) (Gemetchu, 1976) taktéž při 25 °C. Ovšem stejně jako při sledování délky života dospělců není vyloučeno, že rozdílný počet nakladených vajec v různých studiích může být ovlivněn různou metodikou chovu.

Je tedy jisté, že vnější teplota má vliv na plodnost flebotomů: se snižující teplotou se kladení i líhnutí vajíček zpomaluje. Množství vajíček ale přímo neovlivňuje (pokud se nejedná o extrémní teploty): při nižších teplotách (23 °C) samice *P. papatasi* nakladly vajíček podobně jako samice nacházející se v optimálnějších teplotách (28 °C) (Benková & Volf, 2007). Mezi teplotami 24 a 28 °C se množství vajíček nelišilo ani u *Lu. anthophora* (Endris et al., 1984). Podobně Kasap a Alten (Kasap & Alten, 2006) taktéž považují 28 °C za optimální teplotu pro kladení i vývoj vajíček u *P. papatasi*, ale při méně příznivých podmínkách (18 nebo 32 °C) samice kladou signifikantně méně vajíček. Teplota zároveň ovlivňuje počet samic, které vajíčka nakladou (viz **Graf 5**) (Ghosh et al., 1992). Na počet nakladených vajíček má také vliv množství nasáté krve, kdy s větším množstvím nasáté krve jsou flebotomové schopni vytvořit více vajíček (Benková & Volf, 2007).

Graf 5: Podíl samic *P. papatasi*, které nakladly vajíčka za různých teplot (sestaveno z dat Ghosh et al., 1992)



5 Vliv teploty na vývoj leishmanií ve flebotomech

Vliv teploty na vývoj *L. braziliensis* a *L. peruviana* v jejich permissivním vektoru *Lu. longipalpis* a na vývoj *L. infantum* v jejich přirozených přenašečích *Lu. longipalpis* a *P. perniciosus* při teplotě 20 a 26 °C ve svém pokusu pozorovali Hlaváčová a kol. (Hlaváčová et al., 2013). Po 2-3 a 8-9 dnech po nasátí infekční krví byly samičky sledovány pod světelným mikroskopem anebo byla izolována jejich DNA za pomoci PCR.

Při pozorování *L. braziliensis* a *L. peruviana* v *Lu. longipalpis* 2-3 den po nasátí byl podíl infikovaných samic (infection rate) podobný pro všechny čtyři skupiny. Při 26 °C se ale oba druhy leishmanií množily rychleji než při 20 °C, což vedlo k silnější infekci. Později, 8-9 den po nasátí, se infekce *L. braziliensis* vyvinula dobře v obou skupinách. Naopak infekce způsobená *L. peruviana* se po 8-9 dnu rozvinula pouze u samic držených ve 20 °C. U *L. infantum* byla zkoumán podíl infikovaných samic při teplotě 20 a 26 °C v jejich přirozených přenašečích. První dva dny po nasátí bylo při 20 °C množství parazitů v obou přenašečích nízké, ale po 8-9 dnech se ve všech skupinách nákaza plně rozvinula do silné infekce.

Teplota tedy měla na vývoj leishmanií významný vliv. Infekce *L. peruviana* byla *Lu. longipalpis* vydefekována, zvýšená teplota totiž urychluje defekaci a 80 % samic se při 26 °C vyprázdnilo již 3. den, zatímco při 20 °C se 80 % samic vyprázdnilo až kolem 6-7 dne. U *L. infantum* sice nižší teplota také zpomalovala růst parazita, ale po 8-9 dnech se infekce rozvinula v obou přenašečích při 20 i 26 °C.

Podobnému tématu se věnoval i Rioux (Rioux et al., 1985). Ve své studii sledoval vliv teploty na životní cyklus *L. infantum*. Nasáté infikované samice byly drženy při 10, 15, 20 a 25 °C ($\pm 1,5$ °C). Po 6-10 dnech po nasátí byla střeva samic blíže prozkoumána. Se zvyšující se teplotou se zvýšilo množství nakažených samic a urychlilo se množení promastigotů v mezenteronu. Od 15 °C výše zde byla vyšší migrace promastigotů do přední části střeva a zvýšená teplota od 20 °C výš podporovala přichycení parazitů ke stěně stomodeální valvy. Z použitého exponenciálního modelu zde vyplývalo, že optimální teplotou pro *L. infantum* je 25 °C, což je teplota, která zase příliš nevyhovuje přenašeči *P. ariasi*, který se naopak nejčastěji vyskytuje ve vlhkých oblastech s průměrnou teplotou 20 °C. Toto zjištění vysvětlovalo tehdejší nesoulad v distribuci viscerálních leishmanióz v Cévennes. Leishmanióza se totiž od 600 m n. m. nevyskytovala, ačkoliv se její vektor běžně nacházel v nadmořských výškách nad 1000 m n. m. V západní části Středomoří je *L. infantum* pravděpodobně nejlépe adaptovaná na přenašeče *P. perniciosus*, jehož teplotní optimum (25 °C) je velmi podobné.

Taktéž se zjišťovalo, jestli jsou přenosu rodu *Leishmania* schopní i tiplíci *Culicoides sonorensis* a *C. nubeculosus* (Séblková et al., 2012, 2015). U *C. sonorensis* první den po nákaze *L. enrietti* a *L. macropodum* při 20 a 26 °C se infekce projevila u 90 % tiplíků. Při 20 °C byla vyšší procenta infikovaných samic než při 26 °C a leishmanie přežívaly déle, ačkoliv po defekaci byla zralá infekce přítomna jen u velmi malého procenta samic držených za obou teplot. Tiplíci *C. sonorensis* ani

C. nubeculosus taktéž nejsou schopni podporovat vývoj významných druhů patogenních pro člověka (*L. major*, *L. infantum* a *L. donovani*), po defekaci se infekce ztrácely i při 20 °C.

Ve výše zmíněné studii Martinse a kol. byla také sledována preference teplot infikovaných a neinfikovaných samic *Lu. longipalpis* (Martins et al., 2023). Na termální senzitivitu *Lu. longipalpis* nemělo vliv pohlaví hmyzu ani přítomnost *Le. mexicana*. Významně naopak působil fakt, zdali byla samice nasátá (ať už infekční nebo neinfekční krví). Jelikož se podobné chování zvýšené aktivity a preference teplejších oblastí vyskytlo u samic nasátých na infekční i neinfekční krvi, nákaza *Le. mexicana* neměla na chování vliv. Autoři vyvozují, že aktivnější chování *Lu. longipalpis* 6. den po nákaze (období, kdy již parazité kolonizují stomodeální valvu) je spojené s vyšším rizikem nákazy. Autoři taktéž pozorovali vliv teploty na infekci leishmanií při třech různých teplotách – 6. den po nasátí se podíl infikovaných samic u skupiny chované při 20 a 24 °C téměř nelišil, ale infekce nepřežila ve skupině chované při 30 °C.

V přírodě jsou flebotomové spíše noční živočichové a vyhýbají se přehřátí změnou chování (např. přemístěním do stínu), to ale u sání nemusí být vždy umožněno. Reakcí na termální stres může být u flebotomů tvorba heat shock proteinů. Samičky flebotomů byly v této studii vystaveny extrémním teplotám 4, 37 a 40 °C a byla pozorována následná tvorba reakčních teplotních proteinů (heat shock proteiny). U samic nakažených *Le. mexicana* klesalo množství nasyntetizovaných HSP90(83) proteinů pomaleji oproti samicím nasátých na neinfekční krvi. U HSP70 proteinu ale žádná signifikantní změna nalezena nebyla. Jiné obranné mechanismy vůči teplotnímu stresu pozorovány nebyly.

Shrneme-li uvedené práce, je patrné, že teplota má na rychlost vývoje leishmanií ve flebotomech vliv, s klesající teplotou je vývoj parazitů signifikantně pomalejší. To lze pozorovat například u *L. infantum*, *L. braziliens* a *L. peruviana*, kdy při 26 °C byl vývoj rychlejší v porovnání s 20 °C. U všech leishmanií kromě *L. peruviana* se infekce uchytila za obou teplot. Druh *L. peruviana* ale řadíme mezi druhy leishmanií adaptované na nízké teploty v horách, při vyšší teplotě se nedokáže dostatečně rychle uchytit ve střevě a ubránit se vypuzení při defekaci (Hlaváčová et al., 2013). *L. infantum* potřebuje pro svůj vývoj minimálně 20 °C, ideálně 25 °C. Se vzrůstající teplotou narůstal počet infikovaných samic (Rioux et al., 1985). U *C. sonorensis* se nákaza *L. enrietti* a *L. macropodum* neuchytila ani při jedné z pozorovaných teplot (Sébllová et al., 2012, 2015). Nebyl pozorován specifický vliv teploty na chování samic nakažených leishmaniemi, či na jejich reakci na termální stres. Pro přesnější poznatky by byl vhodný další výzkum zaměřený na vliv teploty na vývoj leishmanií ve svých přenašečích, data jsem mohla čerpat celkem pouze ze 4-5 prací.

6 Šíření leishmaniózy

Epidemiologie leishmaniózy, podobně jako ostatních nemocí přenášených vektory, reflektuje citlivě změny klimatu (shrnuto v Caminade et al., 2019). Lze očekávat, že změna průměrných ročních teplot a vlhkostí bude mít přímý dopad na ekologii flebotomů (poikilothermních bezobratlých) a do

určité míry i na savčí rezervoáry nemoci (homoiothermní obratlovce), protože se jim pozmění velikost populací a generační doba (Gradoni, 2018). Ze srovnání klimatických předpovědí se současným rozšířením leishmaniózy vyplývá, že klimatické změny budou mít na epidemiologii nemoci velký vliv (Koch et al., 2017; Trájer et al., 2013). Globální oteplování patrně ovlivní rozšiřování areálů flebotomů (např. *P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. papatasi*, *P. perniciosus*, *P. similis* nebo *P. tobbi*) a následně i leishmanií do severnějších oblastí, včetně střední Evropy. U *P. ariasi* a *P. mascittii*, což jsou druhy poměrně dobře adaptované na chladnější prostředí, byl zase v modelu predikován přesun spíše do vyšších nadmořských výšek a na jih Britských ostrovů a Skandinávie. Nejpodstatnějším faktorem ovlivňujícím šíření flebotomů jsou nízké teploty během zimy a sezonalita, kdy pro flebotomy je příznivější oceánské klima oproti kontinentálnímu. Flebotomům taktéž vyhovují delší a teplejší léta a ke svému přežití potřebují průměrnou měsíční teplotu pohybující se minimálně nad 15 °C po alespoň několik měsíců v kuse (Koch et al., 2017; Trájer et al., 2013). Pokud víme, teplotní požadavky pro leishmanie mohou být ještě vyšší, např. komplex *L. infantum* přežívá pouze v oblastech, kde průměrná teplota dosahuje 5-10 °C v nejchladnějších měsících a 20-30 °C v měsících nejteplejších (Kuhn, 1999; Rioux et al., 1985).

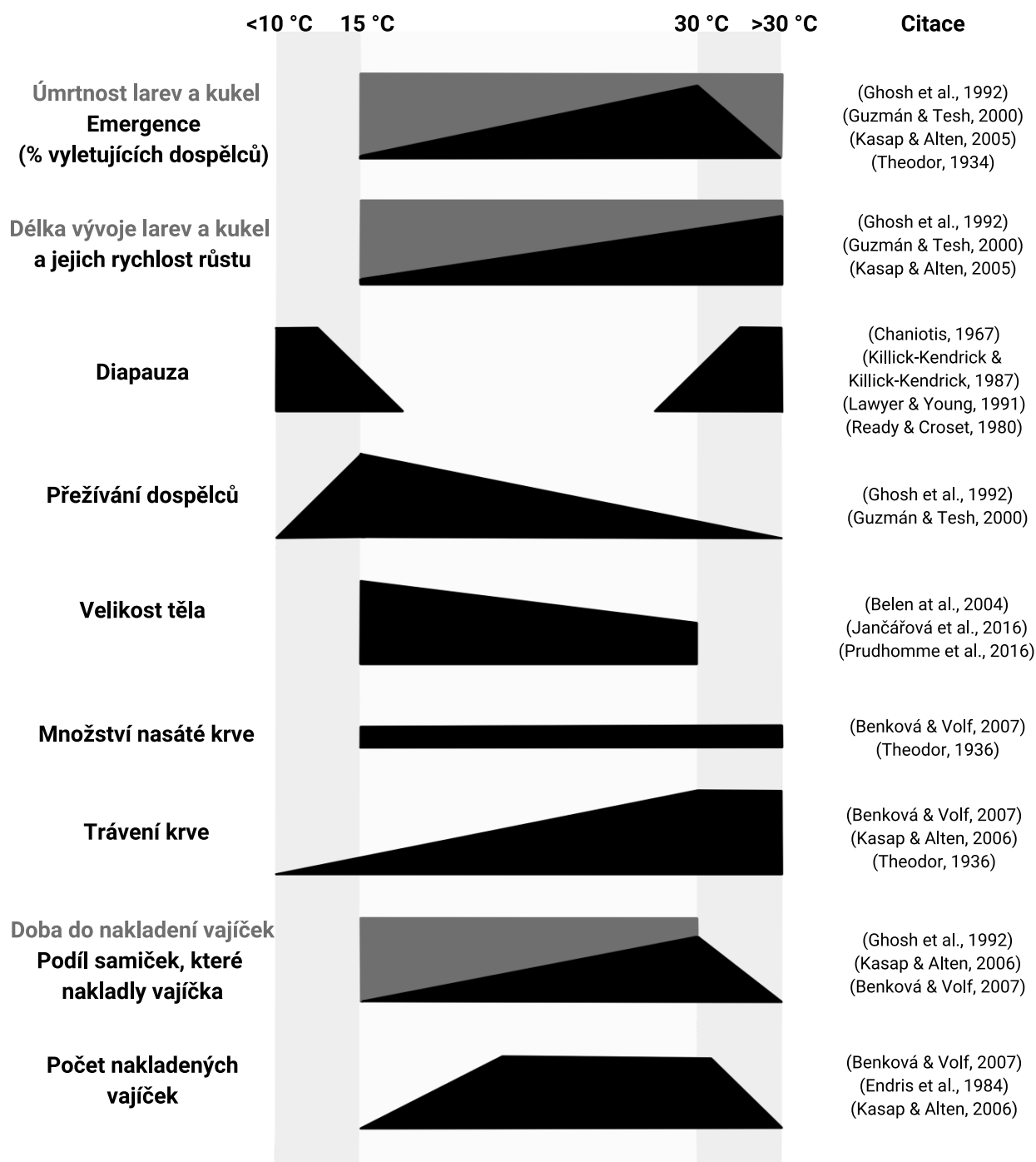
Změny klimatu a tudíž teplot taktéž nevyhnutelně ovlivní i vývoj leishmanií v přenašečích, kdy některé druhy leishmanií potřebují delší časový úsek před defekací (což je proces ovlivněný vnější teplotou) ke kolonizaci střeva flebotomů, která je nezbytná pro přenos na dalšího hostitele (např. *L. peruviana* adaptovaná na horské podnebí (Hlaváčová et al., 2013)). Alespoň u některých kombinací druhů leishmanie a flebotoma existuje horní teplotní limit pro vývoj leishmanií, za kterých ještě přenašeč přežívá, ale infekce se neuchytí (např. 30 °C pro *L. infantum* v *Lu. longipalpis* je již příliš vysoká teplota (Martins et al., 2023)). Při velmi nízkých teplotách, kdy ještě přenašeč spolu s parazitem přežívá, leishmanie nemůže kolonizovat přední část střeva, tudíž je přenos velmi nepravděpodobný (Rioux et al., 1985).

Již v této době během teplejších let přibývá výskyt autochtonních případů leishmaniózy ve střední Evropě (Kollaritsch et al., 1989; Lobsiger et al., 2010; Tanczos et al., 2012). Může ještě trvat léta či desetiletí, než se u nás, kvůli kombinovaným teplotním omezením (restraints) leishmanií i flebotomů, onemocnění etabluje (Fischer et al., 2010), tedy alespoň v tom případě, že bude proces globálního oteplování pokračovat. Nicméně například podrod *Mundinia* mohou přenášet i tiplíci (Bečvář et al., 2021) a ti jsou na chladnější teploty přizpůsobeni lépe než flebotomové.

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout poznatky popisující vliv vnější teploty na fyziologii flebotomů a následný vývoj leishmanií ve flebotomech. Z literární rešerše je patrné, že teplota prostředí patří mezi abiotické faktory signifikantně ovlivňující většinu fází jejich životního cyklu: délku vývoje larev a kukel, reprodukci, diapauzu, délku života dospělců ale i jejich velikost a hmotnost (viz **Obrázek 1**). Taktéž má nezanedbatelný vliv i na hostitelskou kompetenci flebotomů.

Obrázek 1: Grafické znázornění vlivu teploty na fyziologii flebotomů



Obecně se dá říct, že vysoké teploty zrychlují metabolismus a všechny pochody s ním spojené: konkrétně zkracují délku vývoje nedospělých stádií, a rychlejší růst pak způsobuje menší velikost dospělců, nehledě na to, že ve vyšších teplotách flebotomové ztrácí větší množství tělesné hmotnosti kvůli výparu vody. Vysoká teplota dále zrychluje trávení krve, defekaci nasátých samiček i rychlost kladení vajíček. Co se týče délky života, vysoké teploty (obvykle nad 30 °C) mohou překračovat teplotní optimum flebotomů a výrazně jim zkracovat život; nedospělá stadia mohou vysoké teploty přečkat v podobě vajíčka nebo třetího a čtvrtého larválního stadia.

Nízké teploty naopak všechny tělesné pochody zpomalují: délka vývoje se může až ztrojnásobit a emergence dospělců dosahuje menších hodnot, trávení krve je v rámci desítek hodin opožděné, proces líhnutí i kladení vajíček se taktéž zpomaluje a za velmi nízkých teplot je nakladených vajíček méně. Dospělci různých druhů flebotomů se v nízkých teplotách průměrně dožívají o desítky dní více, ale tyto teploty nejsou dostatečné na trávení krve a vývoj vajíček. Nedospělá stadia mohou chladná období taktéž přečkávat v podobě vajíčka nebo třetího a čtvrtého larválního stadia díky schopnosti diapauzy. Dlouhodobé nízké teploty (pod 15 °C) jsou pro všechna stadia nepříznivé. Flebotomové žijící v chladnějších oblastech mají obvykle robustnější konstituci a vyšší toleranci nízkých teplot.

Minimální teplota pro celkový vývoj se pohybuje okolo 20 °C pro *P. papatasi*, za optimální teplotu pro vývoj i plodnost je pro mnoho druhů obecně považováno 24-28 °C. Jak ale vyplývá z pozorování, tato nejpriznivější teplota pro délku vývoje a kladení vajíček není zcela výhodná pro přežívání dospělců, protože při vyšších teplotách je jejich mortalita o něco vyšší. Přesto jsou vyšší teploty pro druh biologicky výhodnější, protože pro přežití druhu je podstatná právě plodnost a dlouhý život dospělců za nízkých teplot značí spíše jejich ustrnutí v méně příznivých podmínkách. Flebotomové všech vývojových fází ke svému životu také vyžadují vysokou relativní vzdušnou vlhkost.

Několik publikovaných pozorování naznačuje, že leishmanie mají toleranci vysokých teplot nižší než flebotomové, teplota ovlivňuje délku a kvalitu jejich vývoje v přenašeči a různé druhy leishmanií se mohou teplotními nároky lišit. Vliv vnější teploty na vývoj leishmanií ve flebotomech je ale obecně téma, kterému se zatím příliš nevěnovala pozornost, do budoucna by proto v těchto oblastech bylo vhodné výzkum rozšířit – já sama bych na toto téma ráda zaměřila ve své diplomové práci.

8 Seznam použité literatury

Sekundární citace nebyly použity.

Souhrnné články (review) jsou označeny *, webové stránky **.

- ***Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., et al. (2016).** A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(6): e0004770.
- ***Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., et al. (2012).** Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*, 7(5): e35671.
- ***Andrade, B. B., De Oliveira, C. I., Brodskyn, C. I., Barral, A., et al. (2007).** Role of Sand Fly Saliva in Human and Experimental Leishmaniasis: Current Insights. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66(2–3), 122–127.
- ***Artemiev, M. M. (1980).** A revision of sandflies of the subgenus *Adlerius* (Diptera, Phlebotominae, Phlebotomus). *Zoologicheskii Zhurnal*, 59(8), 1177–1192.
- Ashford, R. W. (2000).** The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30(12–13), 1269–1281.
- ***Azami-conesa, I., Gómez-muñoz, M. T., & Martínez-díaz, R. A. (2021).** A Systematic Review (1990–2021) of Wild Animals Infected with Zoonotic *Leishmania*. *Microorganisms*, 9(5), 1101.
- Bates, P., & Rogers, M. (2004).** New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. *Current Molecular Medicine*, 4(6), 601–609.
- Bečvář, T., Vojtková, B., Siriyasatien, P., Votýpka, J., et al. (2021).** Experimental transmission of *Leishmania (Mundinia)* parasites by biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *PLoS Pathogens*, 17(6): e1009654.
- Belen, A., Alten, B., & Aytekin, A. M. (2004).** Altitudinal variation in morphometric and molecular characteristics of *Phlebotomus papatasi* populations. *Medical and Veterinary Entomology*, 18(4), 343–350.
- Benková, I., & Volf, P. (2007).** Effect of Temperature on Metabolism of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 44(1), 150–154.
- ***Bern, C., Maguire, J. H., & Alvar, J. (2008).** Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(10): e313.
- Bogdan, C., Schönian, G., Bañuls, A. L., Hide, M., et al. (2001).** Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, 32(2), 302–306.
- ***Caminade, C., McIntyre, K. M., & Jones, A. E. (2019).** Impact of recent and future climate change on vector-borne diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1436(1), 157–173.
- Catta-Preta, C., Sacks, D., & Ferreira, T. (2024).** Single-cell atlas of *Leishmania major* development in the sandfly vector reveals the heterogeneity of transmitted parasites and their role in infection. (Preprint)
- ***Cecílio, P., Cordeiro-da-Silva, A., & Oliveira, F. (2022).** Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites. *Communications Biology*, 5(305), 1–12.

- Chaniotis, B. (1967).** The Biology of California *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) Under Laboratory Conditions. *Journal of Medical Entomology*, 4(2), 221–233.
- Chaniotis, B., Spyridaki, I., Scoulika, E., & Antoniou, M. (2000).** Colonization of *Phlebotomus neglectus* (Diptera: Psychodidae), the major vector of visceral leishmaniasis in Greece. *Journal of Medical Entomology*, 37(3), 346–348.
- *Claborn, D. M. (2010).** The Biology and Control of Leishmaniasis Vectors. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(2), 127.
- *De Almeida, M. C., Vilhena, V., Barral, A., & Barral-Netto, M. (2003).** Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7), 861–870.
- *Dostálová, A., & Volf, P. (2012).** *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors*, 5(1), 1–12.
- *Dvořák, V., Shaw, J., & Volf, P. (2018).** Parasite biology: The vectors. In *The leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*. Brushi, F., Gradoni, L. (eds.). Springer International Publishing. ISBN: 9783319723860 (eBook)
- Eldridge, B., & Scanlon, J. (1963).** Notes on the Laboratory Rearing of Sand Flies (Diptera: Psychodidae). *Mosquito News*, 23(3), 215-217.
- Endris, R. G., Young, D. G., & Butler, J. F. (1984).** The laboratory biology of the sand fly *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 21(6), 656–664.
- *Feliciangeli, M. D. (2004).** Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 18(1), 71–80.
- Ferro, C., Cárdenas, E., Corredor, D., Morales, A., et al. (1998).** Life cycle and fecundity analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(2), 195–199.
- Fischer, D., Thomas, S. M., & Beierkuhnlein, C. (2010).** Temperature-derived potential for the establishment of phlebotomine sandflies and visceral leishmaniasis in Germany. *Geospatial Health*, 5(1), 59–69.
- Galati, E. A. B. (2003).** Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae. In: *Flebotomíneos do Brasil*, Rangel, E.F. & Lainson, R. (eds.). Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Ghosh, K. N., & Bhattacharya, A. (1989).** Laboratory colonization of *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 10(4), 551–555.
- Ghosh, K. N., Ghosh, D. K., De, A., & Bhattacharya, A. (1992).** Biology of *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti and *P. papatasi* (Scopoli) in the laboratory. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 67(2), 55–61.
- *Gradoni, L. (2018).** A Brief Introduction to Leishmaniasis Epidemiology. In *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*. Brushi, F., Gradoni, L. (eds.). Springer International Publishing. ISBN: 9783319723860 (eBook)
- *Grevelink, S. A., & Lerner, E. A. (1996).** Leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 34(2), 257–272.
- Guzmán, H., & Tesh, R. B. (2000).** Effects of temperature and diet on the growth and longevity of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Biomédica*, 20(3), 190–199.

- Handman, E., & Bullen, D. V. R. (2002).** Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*, 18(8), 332–334.
- ***Harwood, R. F., & James, M. T. (1979).** Entomology in human and animal health. 7th ed. Macmillan Publishers, New York.
- Hlaváčová, J., Votýpka, J., & Volf, P. (2013).** The Effect of Temperature on *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) Development in Sand Flies. *Journal of Medical Entomology*, 50(5), 955–958.
- Jančářová, M., Hlaváčová, J., Votýpka, J., & Volf, P. (2016).** An increase of larval rearing temperature does not affect the susceptibility of *Phlebotomus sergenti* to *Leishmania tropica* but effectively eliminates the gregarine *Psychodiella sergenti*. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–5.
- Kamhawi, S. (2017).** The yin and yang of leishmaniasis control. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(4), e0005529.
- Kasap, O. E., & Alten, B. (2005).** Laboratory estimation of degree-day developmental requirements of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Vector Ecology*, 30(2), 328–333.
- Kasap, O. E., & Alten, B. (2006).** Comparative demography of the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) at constant temperatures. *Journal of Vector Ecology*, 31(2), 378–385.
- Killick Kendrick, R., Leaney, A. J., & Ready, P. D. (1977).** The Establishment, Maintenance and Productivity of a Laboratory Colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 13(4–5), 429–440.
- Killick-Kendrick, R., Rioux, J. A., Bailly, M., Guy, M. W., et al. (1984).** Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 59(6), 555–572.
- Killick-Kendrick, R., & Killick-Kendrick, M. (1987).** The laboratory colonization of *Phlebotomus ariasi* (Diptera: Psychodidae). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 62(4), 354–356.
- ***Killick-Kendrick, R. (1990).** Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, 4(1), 1–24.
- ***Killick-Kendrick, R. (1999).** The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. *Clinics in Dermatology*, 17, 279–289.
- Kimblin, N., Peters, N., Debrabant, A., Secundino, N., et al. (2008).** Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), 10125–10130.
- ***Kniha, E., Aspöck, H., Auer, H., & Walochnik, J. (2023).** *Leishmania* infections and *Leishmania* species in central Europe. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift – Veterinary Medicine Austria*, 110:Doc1.
- Koch, L. K., Kochmann, J., Klimpel, S., & Cunze, S. (2017).** Modeling the climatic suitability of leishmaniasis vector species in Europe. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10.
- Kollaritsch, H., Emminger, W., Zaunshirm, A., & Aspöck, H. (1989).** Suspected autochthonous kala-azar in Austria. *The Lancet*, 1(8643), 901–902.
- Kuhn, K. (1999).** Global warming and leishmaniasis in Italy. *Bulletin of Tropical Medicine and International Health*, 7(1), 1–2.

- *Lane, R. P. (1993). Sandflies (Phlebotominae). In *Medical Insects and Arachnids*. Lane, R. P., Crosskey, R. W. (eds.). Chapman & Hall, London.
- Lawyer, P. G., & Perkins, P. V. (2004). Leishmaniasis and Trypanosomiasis. In *Medical Entomology*. Eldridge, B. F., Edman, J. D. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- *Lawyer, P., & Young, D. (1991). Diapause and quiescence in *Lutzomyia diabolica* (Diptera:Psychodidae). *Parassitologia*, 33(1), 353–360.
- *Lewis, D. J. (1982). A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History) (Entomology)*, 45, 121–209.
- Lobsiger, L., Müller, N., Schweizer, T., Frey, C. F., et al. (2010). An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Veterinary Parasitology*, 169(3–4), 408–414.
- *Lysenko, A., & Beljaev, A. (1987). Quantitative approaches to epidemiology. In *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Peters, W., Killick-Kendrick, R. (eds.). Academic Press, London.
- Maia, C., & Depaquit, J. (2016). Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? *Parasite*, 23, 55.
- *Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., et al. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), 123–147.
- Martins, K. A., Morais, C. S., Broughton, S. J., Lazzari, C. R., et al. (2023). Response to thermal and infection stresses in an American vector of visceral leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, 37(2), 238–251.
- Mathers, C. D., Ezzati, M., & Lopez, A. D. (2007). Measuring the Burden of Neglected Tropical Diseases: The Global Burden of Disease Framework. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 1(2): e114.
- Melaun, C., Krüger, A., Werblow, A., & Klimpel, S. (2014). New record of the suspected leishmaniasis vector *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)--the northernmost phlebotomine sandfly occurrence in the Palearctic region. *Parasitology Research*, 113(6), 2295–2301.
- *Molyneux, D. H., & Ashford, R. W. (1983). *The Biology of Trypanosoma and Leishmania, Parasites of Man and Domestic Animals*. Taylor & Francis, London.
- Myšková, J., Svobodová, M., Beverley, S. M., & Volf, P. (2007). A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes and Infection*, 9(3), 317–324.
- *Pederiva, M. M. C., Santos, S. M., Rivarola, L. G. S., Guerreiro, V. J., et al. (2023). Asymptomatic *Leishmania* infection in humans: A systematic review. *Journal of Infection and Public Health*, 16(2), 286–294.
- Pimenta, P. F. P., Turco, S. J., McConville, M. J., Lawyer, P. G., et al. (1992). Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, 256(5065), 1812–1815.
- Prudhomme, J., Gunay, F., Rahola, N., Ouanaimi, F., et al. (2012). Wing size and shape variation of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) populations from the south and north slopes of the Atlas Mountains in Morocco. *Journal of Vector Ecology*, 37(1), 137–147.
- Prudhomme, J., Cassan, C., Hide, M., Toty, C., et al. (2016). Ecology and morphological variations in wings of *Phlebotomus ariasi* (Diptera: Psychodidae) in the region of Roquedur (Gard, France): a geometric morphometrics approach. *Parasites & Vectors*, 9, 578.

- Pružinová, K., Sádlová, J., Séblová, V., Homola, M., et al. (2015).** Comparison of Bloodmeal Digestion and the Peritrophic Matrix in Four Sand Fly Species Differing in Susceptibility to *Leishmania donovani*. *PLoS One*, 10(6), 128203.
- Ready, P. D., & Croset, H. (1980).** Diapause and laboratory breeding of *Phlebotomus perniciosus* Newstead and *Phlebotomus ariasi* Tonnoir (Diptera: Psychodidae) from southern France. *Bulletin of Entomological Research*, 70(3), 511–523.
- *Ready, P. D. (2013).** Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annual Review of Entomology*, 58, 227–250.
- *Ready, P. D., & Rogers, M. E. (2013).** Behaviour of sandflies infected with *Leishmania*. In *Ecology of parasite-vector interactions. Ecology and control of vector-borne diseases*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.
- Rioux, J. A., Aboulker, J. P., Lanotte, G., Killick-Kendrick, R., et al. (1985).** Ecology of leishmaniasis in Southern France. 21. Influence of temperature on the development of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 in *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Experimental study. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 60, 221–229.
- *Rocha, R., Pereira, A., & Maia, C. (2022).** Non-Endemic Leishmaniasis Reported Globally in Humans between 2000 and 2021—A Comprehensive Review. *Pathogens*, 11(8), 921.
- 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.
- *Romoser, W. S. (1996).** The Vector Alimentary System. In *The Biology of Disease Vectors*, Beaty, B. J., Marquardt, W. (eds.). University Press of Colorado.
- Sádlová, J., & Volf, P. (2009).** Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania* major development. *Cell and Tissue Research*, 337(2), 313–325.
- Sant’anna, M. R., Nascimento, A., Alexander, B., Dilger, E., et al. (2010).** Chicken blood provides a suitable meal for the sand fly *Lutzomyia longipalpis* and does not inhibit *Leishmania* development in the gut. *Parasites & Vectors*, 3(1), 3.
- Séblová, V., Sádlová, J., Carpenter, S., & Volf, P. (2012).** Development of *Leishmania* parasites in *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae) and implications for screening vector competence. *Journal of Medical Entomology*, 49(5), 967–970.
- Séblová, V., Sádlová, J., Vojtková, B., Votýpka, J., et al. (2015).** The Biting Midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) Is Capable of Developing Late Stage Infections of *Leishmania enriettii*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), e0004060.
- Tánczos, B., Balogh, N., Király, L., Biksi, I., et al. (2012).** First Record of Autochthonous Canine Leishmaniasis in Hungary. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 12(7), 588–594.
- Tesh, R. B., Lubroth, J., & Guzman, H. (1992).** Simulation of Arbovirus Overwintering: Survival of Toscana Virus (Bunyaviridae: Phlebovirus) in its Natural Sand Fly Vector *Phlebotomus perniciosus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 47(5), 574–581.
- Theodor, O. (1934).** Observations on the Hibernation of *Phlebotomus Papatasii* (Dipt.). *Bulletin of Entomological Research*, 25(4), 459–472.
- Theodor, O. (1936).** On the Relation of *Phlebotomus papatasii* to the Temperature and Humidity of the Environment. *Bulletin of Entomological Research*, 27(4), 653–671.

- Trájer, A. J., Bede-Fazekas, Á., Hufnagel, L., Horváth, L., et al. (2013).** The effect of climate change on the potencial distribution of the European *Phlebotomus* species. *Applied Ecology and Environmental Research*, 11(2), 189–208.
- Volf, P., & Killick-Kendrick, R. (1996).** Post-engorgement dynamics of haemagglutination activity in the midgut of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 10(3), 247–250.
- Volf, P., & Pecková, J. (2007).** Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends in Parasitology*, 23(3), 91-92.
- Volf, P., & Volfová, V. (2011).** Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology* 36 Suppl 1, S1-S9.
- Ward, R. D. (1977).** The Colonization of *Lutzomyia flaviscutellata* (Diptera: Psychodidae), A Vector of *Leishmania mexicana amazonensis* in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 14(4), 469–476.
- WHO – World Health Organization (2010).** Control of the leishmaniasis. *Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases*, 22-26 March 2010, WHO Technical Report Series. Who, Geneva.
- **WHO – World Health Organization (2023).** Fact Sheet Leishmaniasis 2023 [cit. 01/02/2024]. Dostupné na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Young, D. G., & Perkins, P. V. (1984).** Phlebotomine sand flies of North America (Diptera: Psychodidae). *Mosquito News*, 44(2), 263–304.