

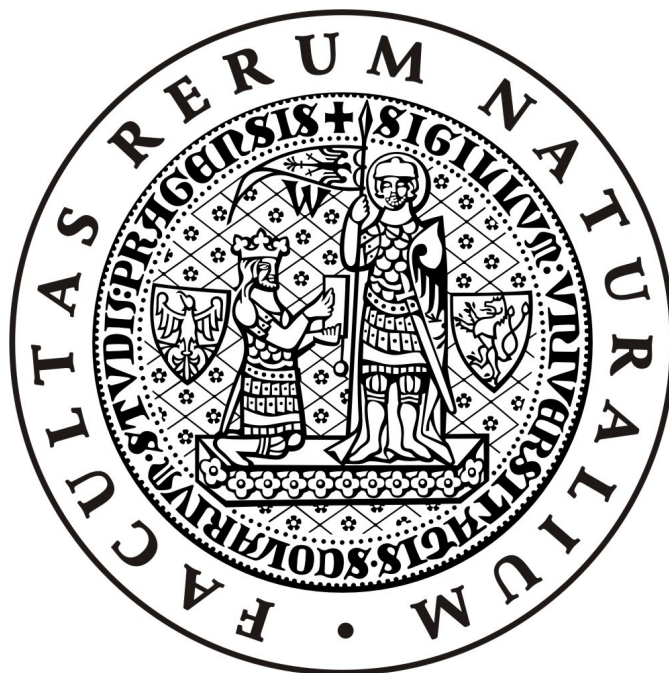
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra parazitologie**

Studijní program Biologie

Studijní obor Biologie



Julie Nováková

**Způsoby vývoje leishmanií ve flebotomech**  
Types of *Leishmania* development in phlebotomine species

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Doc. RNDr. Jan Votýpka, Ph.D.

Praha 2013



### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem v ní uvedla veškerou použitou literaturu. Tato práce ani žádná její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 7. 4. 2013

.....

### **Poděkování**

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli, panu docentu Votýpkovi, za cenné rady při zpracování této bakalářské práce, parazitologické laboratoři za možnost připojení se k ní a všem svým vyučujícím na PŘF UK za předávání znalostí a inspiraci.



## Abstrakt

Tato práce si klade za cíl zmapovat způsoby vývoje leishmanií (rod *Leishmania*) ve flebotomech (Phlebotominae). Tři hlavní skupiny leishmanií (podrody *Leishmania*, *Viannia* a *Sauroleishmania*) se ve svých vektorech vyvíjejí mírně odlišnými způsoby, z nichž nejméně známý je vývoj sauroleishmanií. Vývoj podrodu *Leishmania* ve flebotomovi je lokalizován výhradně do mesenteronu a stomodea, zatímco druhy podrodu *Viannia* se vyskytují i v proctodeu (byť nezbytnost této fáze pro dokončení vývoje a nákazu obratlovčího hostitele je zpochybňována) a podrod *Sauroleishmania* se dle většiny dostupných informací vyvíjí výhradně v proctodeu. Poměrně málo prozkoumaným rodem, co do jeho vývoje v přenašeči, je rovněž rod *Endotrypanum*, který dle fylogenetických dat tvoří vnitřní skupinu leishmanií. Ve své bakalářské práci shrnuji dosavadní poznatky týkající se typů vývoje leishmanií ve flebotomech a možných příčin vedoucích k tomuto vývoji.

**Klíčová slova:** *Leishmania*, *Sauroleishmania*, *Viannia*, *Endotrypanum*, flebotomus, vývoj leishmanií, fylogeneze leishmanií

## Abstract

The aim of this thesis is to depict the means of *Leishmania* development in sand flies (Phlebotominae). Three main *Leishmania* evolutionary branches (subgenera *Leishmania*, *Viannia* and *Sauroleishmania*) have a slightly different development in the vector, the *Sauroleishmania* development being the least known. The vector-bound development of the subgenus *Leishmania* is localized in the midgut and foregut of the sand fly solely, whereas species of the *Viannia* subgenus occur in the hindgut (although the necessity of this phase for a successful development and infection of the vertebrate host is a matter of doubt) and the subgenus *Sauroleishmania* development is according to literature confined to the hindgut. Quite little is known about the genus *Endotrypanum*, according to phylogenetic data set inside the *Leishmania* group. In my bachelor thesis, I review up-to-date literature on the topic of different types of *Leishmania* development inside the sand flies and their probable reasons.

**Keywords:** *Leishmania*, *Sauroleishmania*, *Viannia*, *Endotrypanum*, sand fly, *Leishmania* development, *Leishmania* phylogeny

## OBSAH

Úvod .....	1
1. Vztah leishmania-flebotomus .....	2
2. Trávicí soustava flebotomů .....	4
3. Fylogenetické postavení a původ leishmanií .....	5
4. Morfologické typy buněk leishmanií .....	8
5. Vývoj leishmanií ve flebotomech .....	11
5.1 Podrod <i>Leishmania</i> .....	13
5.2 Podrod <i>Viannia</i> .....	17
5.3 Podrod <i>Sauroleishmania</i> .....	18
5.4 Rod <i>Endotrypanum</i> .....	20
5.5 Paraleishmanie .....	21
5.6 Výskyt leishmanií ve slinných žlázách flebotomů .....	22
5.7 Jaké faktory mohou ovlivnit vývoj leishmanií ve flebotomech? .....	24
Závěr .....	26
Seznam referencí .....	27

## Úvod

Leishmanie jsou veterinárně i medicínsky velmi významnou skupinou trypanosomatid a v některých regionech představují vážný zdravotní problém. Způsobují různě těžká kožní, slizniční i viscerální onemocnění divokých a hospodářských zvířat i lidí. Přenášeny jsou flebotomy, krvesajícími dvoukřídlými z čeledi Psychodidae, podčeledi Phlebotominae.

Abychom dokázali epidemie v postižených oblastech potlačit, potřebujeme co nejlépe znát vztah leishmanií a flebotomů včetně podrobností o vývoji leishmanií v těchto vektorech. Způsoby vývoje ve flebotomech se mezi různými podrody leishmanií liší a některé z nich zatím nejsou prakticky vůbec prozkoumány; jedná se zejména o z hlediska lidského zdraví a hospodářské činnosti méně významné sauroleishmanie, které napadají plazy. Čím více toho však budeme vědět i o nich, tím lépe porozumíme celé skupině leishmanií a snad budeme schopni omezit její patogenní působení.

Tradičně se leishmanie dle vývoje ve vektorech dělí na Suprapylaria, Peripylaria a Hypopylaria v závislosti na poloze a migraci uvnitř střeva flebotoma. Toto dělení do značné míry koresponduje i s taxonomickou pozicí leishmanií – zmíněné tři skupiny formují podrody *Leishmania*, *Viannia* a *Sauroleishmania*; ve fylogenezi leishmanií se nicméně vyskytují i výjimky, které budou diskutovány v kapitole věnované přímo vývoji. Budu se věnovat také rodu *Endotrypanum*, který je dle poznatků molekulární biologie příbuznější některým druhům leishmanií (Noyes *et al.* 1996, 1997, Croan & Ellis 1996, Croan *et al.* 1997, Cupolillo *et al.* 1998, Asato *et al.* 2009), než jsou tyto všem ostatním leishmaniím. Proto budeme tuto pozici uvažovat jako umístění uvnitř fylogenetického stromu leishmanií (další možností by bylo vyčlenění příslušných druhů leishmanií a zástupců rodu *Endotrypanum* do samostatné skupiny) a budeme je dále označovat jako paraleishmanie, zatímco o podrodech *Leishmania*, *Viannia* a *Sauroleishmania* budeme hovořit jako o euleishmaniích (Cupolillo *et al.* 2000).

Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o vývoji leishmanií ve flebotomech a jeho evolučním pozadí, možné důsledky i související fenomény. Nejprve se proto stručně zaměřím na vztah leishmanií a flebotomů a jeho evoluční historii, následně krátce na anatomii trávicí soustavy flebotomů, na fylogenezi leishmanií a typy jejich buněk a poté na hlavní část této práce, způsoby jejich vývoje ve flebotomech.

## 1. Vztah leishmania-flebotomus

Pro posouzení vývoje leishmanií v přenašečích je důležité znát jejich evoluční vztah s flebotomy; díky tomu můžeme lépe porozumět například mezidruhovým variacím v molekulách důležitých pro vývoj ve vektoru (mj. lipofosfoglykany, proteofosfoglykany), různým typům vývoje leishmanií či existenci permisivních a specifických vektorů.

První fosilní doklady již relativně moderních zástupců podčeledi Phlebotominae pocházejí z období rané křídy (Hennig 1972 via Lukashevich & Mostovski 2003, Azar & Nel 2003). Je pravděpodobné, že již v té době mohli být vektory předchůdců současných leishmanií. Shaw (1997) předpokládá, že pokud většina současných zástupců flebotomů preferuje sání na savcích a současně většina leishmanií je adaptovaná na savce, tak i tehdejší flebotomové byli asociováni především se savčími hostiteli (byť tehdy jejich množství ještě bylo poměrně malé). Z recentnější doby, před 15 až 45 miliony let, a z oblasti Dominikánské republiky pochází fosilie *Lutzomyia adiketis* zachované v jantaru s amastigoty, promastigoty a paramastigoty leishmanie nazvané *Paleoleishmania neotropicum*, naznačujícími dvouhostitelský cyklus (Poinar 2008). Evoluce leishmanií byla pravděpodobně vázána na evoluční divergenci flebotomů (Shaw 1997), ovšem k jejich fylogenezi nejsou dostupná spolehlivá data, a tak nelze zatím říci mnoho o případné kospeciaci v tomto hostitelsko-parazitickém vztahu (Noyes 1998).

Takto dlouhodobá koevoluce však vedla k vytvoření mnoha vektorově-specifických mechanismů u leishmanií, jakými jsou například tvorba lipofosfoglykanů (LPG) nebo hemidesmosomů sloužících k přichycení ke kutikulární výstelce některých úseků střeva přenašečů či u některých zástupců exkrece chitinas schopných rozrušovat chitinovou výstelku stomodeální valvy flebotoma, a tím narušit její funkci. Produktem těsné koevoluce je patrně i existence permisivních a specifických vektorů; permisivní podporují vývoj více druhů leishmanií, zatímco ve specifických je schopen se úspěšně vyvíjet pouze jediný druh (byť jde o zjednodušení – některé druhy flebotomů mohou podporovat několik druhů leishmanií, obvykle téhož komplexu, ale zdaleka ne všechny). Specifické vztahy jsou běžné u leishmanií ve Starém světě, jako příklad lze jmenovat flebotoma *Ph. papatasi*\* a „jeho“

---

\* Z důvodu nepřehlednosti zkracování rodového jména jak leishmanií, tak lutzomyií jako *L.* byla zvolena zkratka *L.* pro leishmanie a *Lu.* pro lutzomyie. Podobný případ nastává u sauroleishmanií (*S.*) a sergentomyií (*Se.*). Vzhledem k použití dvojpísmenné zkratky pro názvy dvou rodů flebotomů jsem přistoupila k jeho použití i pro rod *Phlebotomus* (*Ph.*), ač tam problém možné záměnnosti nenastává.



leishmanii *L. major*. Podle dosavadních výzkumů je specifita vektora způsobena LPG receptory (v tomto případě PpGalec), pro něž je třeba mít správný typ LPG; u permisivních vektorů se naopak uplatňují mechanismy nezávislé na LPG (jiné typy lektinových vazeb, jak shrnují Volf a Myšková (2007)).

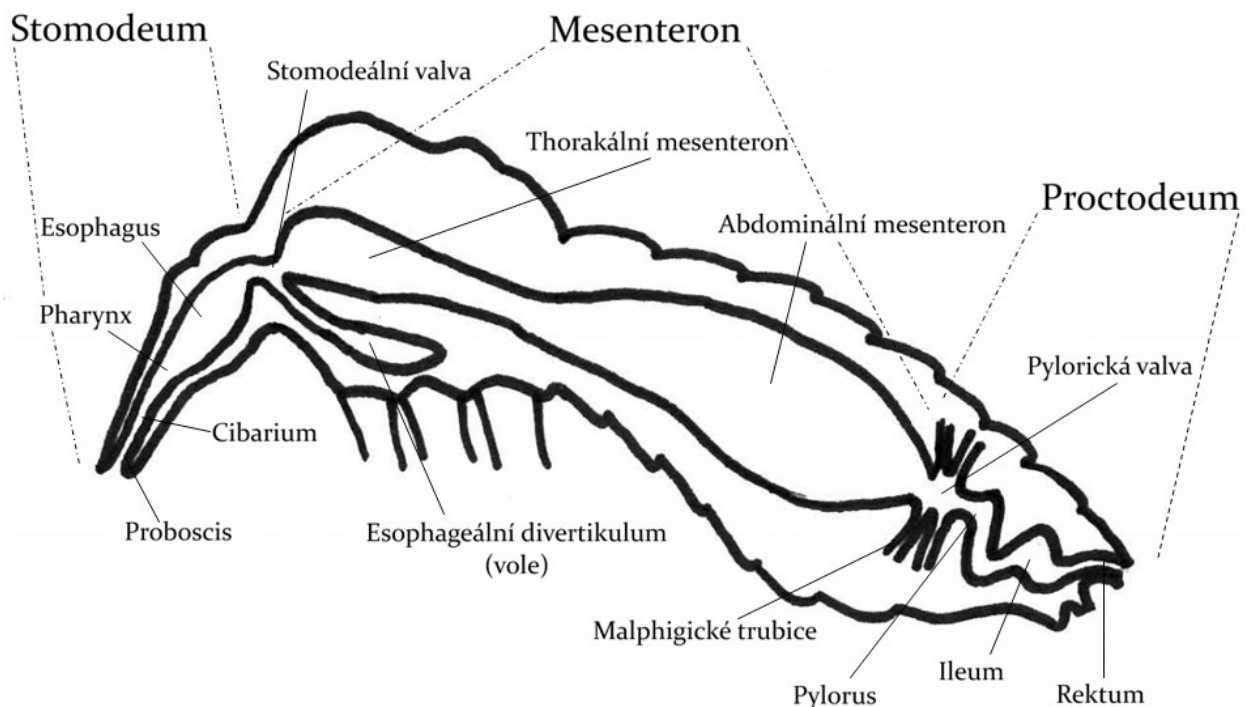
Toto vše nasvědčuje velmi těsnému evolučnímu vztahu leishmanií s flebotomy. V literatuře se sice opakovaně objevují úvahy a nepřímé důkazy (např. PCR pozitivní na DNA leishmanií) o možnosti zapojení dalších členovců, jmenovitě blech a klíšťat, do přenosu leishmanií (Coutinho *et al.* 2005, Coutinho & Linardi 2007, Dantas-Torres *et al.* 2010, Dantas-Torres 2011), většinou se však jedná o poměrně málo podložené studie (přítomnost DNA zjištěná pomocí PCR, nikoli stadia pod mikroskopem) či náhodné nálezy.

Nedávno se ovšem ukázalo, že flebotomové skutečně nemusejí sloužit jako jediné vektoři leishmanií, v nichž se leishmanie dokážou vyvíjet a nikoli jen náhodně mechanicky přenášet. Dougall *et al.* (2011) se snažili nalézt vektora nepojmenované australské leishmanie objevené v roce 2004 v klokanovi rudém (*Macropus rufus*) týmem Rose *et al.* (2004). V Austrálii se vyskytují pouze flebotomové rodu *Phlebotomus* a *Sergentomyia*, kteří zde nepřenášejí žádné leishmanie infekční pro člověka (Lane 1993). Autoři odchytili samice čtyř druhů sergentomyií (*Se. queenslandi*, *Se. hoogstraali*, *Se. vanella* a *Se. standfasti*), ale nenalezli žádné pozitivní na leishmanie (nicméně počty byly kromě druhu *Se. queenslandi* příliš nízké na případné vyloučení z role potenciálního vektora). Proto se obrátili k alternativním vektorům a došli k překvapivému závěru: Nejenže bezmála 15 % odchycených tiplíků podrodu *Forcipomyia* (Ceratopogonidae) bylo pozitivních na DNA leishmanií, ale někteří jedinci byli dokonce silně nakaženi. Analýza DNA prokázala, že jde o tentýž druh leishmanie jako ve studii Rose *et al.* (2004). Jde o historicky první případ, kdy bylo prokázáno, že se leishmanie mohou vyvíjet (nejen být vzácně mechanicky přeneseny) v jiném přenašeči než flebotomovi. Fylogenetická analýza na základě srovnání se sekvencemi od 22 různých druhů trypanosomatid (jednalo se o 20 příslušníků rodu *Leishmania* ze všech tří podrodů, *Endotrypanum monterogeii* a jako vnější skupinu druh *Trypanosoma brucei*) ukázala, že leishmanie izolovaná z nakaženého klokana a odchycených tiplíků je nejpříbuznější druhu *L. enriettii*. Co se týče jejího vývoje v tiplíkovi, autoři pozorovali procyklické promastigoty, nektomonády, leptomonády a metacyklické promastigoty, dokonce v jednom případě našli analog zátky vznikající u flebotomů ze sekretorického proteofosfoglykanu obsahující leptomonády.

Bylo by žádoucí zjistit co nejvíce o vývoji leishmanií v tiplících, neboť jejich schopnost přežít a funkčního vývoje v jiných vektorech než flebotomech jednak může představovat epidemiologické riziko a problém při snaze o eradikaci nebezpečných leishmanióz, jednak nám může leccos říci o konzervovanosti vývoje leishmanií v přenašeči. Zatím jediný pokus s experimentální infekcí tiplíků (rod *Culicoides*) leishmaniemi provedli Šeblová *et al.* (2012); po první dva dny se udržely infekce silné, třetí den výrazně klesly a pak již nebyly pozorovatelné, ač se podařilo izolovat DNA leishmanií i sedmého dne. Ačkoli se dlouho zdálo, že vztah leishmanií a flebotomů je velmi těsný a leishmanie se nemohou vyvíjet v žádných jiných členovcích, zjištění Annette Dougallové a kolegů (2011) vyvrátilo tuto představu a pozměnilo náš pohled na míru koevoluce leishmanií s flebotomy.

## 2. Trávicí soustava flebotomů

Trávicí trakt je místem vývoje leishmanií ve flebotomech a morfologicky se dělí do tří částí: na stomodeum, mesenteron a proctodeum.



Obr. 1: Zjednodušené schéma trávicí soustavy flebotoma, upraveno dle Tesh & Guzman (1996).

Stomodeum je možné dále členit na proboscis, cibarium, pharynx, esophagus a esophageální divertikulum neboli vole, kam je zpravidla po nasátí směřován cukerný roztok, nikoli ovšem krev (Lane 1993).

Od mesenteronu je stomodeum odděleno stomodeální valvou (SV), někdy též nazývanou cardia (občas je tento název používán ale i pro úsek thorakálního mesenteronu těsně za SV). Mesenteron se skládá z thorakální a abdominální části. Proctodeum od něj dělí pylorická valva (PV). Je dále tvořeno pylorem, ileem, rektálními ampulemi a rektem. Stomodeum a proctodeum obsahují chitinovou výstelku, kterou mesenteron postrádá, a výstelka jeho dutiny je tvořena epitelem s výběžky – mikrovilli (Gemetchu 1974, Tesh & Guzman 1996). Běžnou potravou flebotomů jsou cukerné roztoky, pouze samice sají krev, a to kvůli nutričnímu příjmu nezbytnému pro naklazení vajíček, která bývají kladena zpravidla o dva až pět dní později (Tesh & Guzman 1996).

Po nasátí krve se již v řádu několika málo hodin tvoří v mesenteronu peritrofická matrix (PM), která odděluje ekto- a endoperitrofický prostor, v nichž je jiné pH a odlišná koncentrace trávicích enzymů. PM slouží jak k efektivnějšímu trávení potravy, tak i k ochraně citlivého epitelu nekrytého stálou chitinovou výstelkou před případnými patogeny v potravě (Secundino *et al.* 2005).

### 3. Fylogenetické postavení a původ leishmanií

Leishmanie jsou řazeny nově do podčeledi Leishmaniinae (Jirků *et al.* 2012, Maslov *et al.* 2013), tradičně do čeledi Trypanosomatidae (Kinetoplastida), kam patří devět rodů parazitických protist. Z nich pět je jednohostitelských a parazituje pouze ve členovcích; vícehostitelský rod *Phytomonas* využívá kvetoucí rostliny k přenosu na hmyzí hostitele – ploštice (Heteroptera); tři dvouhostitelské rody trypanosomatid jsou *Trypanosoma*, *Leishmania* a *Endotrypanum* (Noyes 1998).

Na základě srovnání genů pro SSU rRNA u zástupců Trypanosomatidae lze usuzovat, že dvouhostitelský cyklus v této čeledi vznikl *nejméně* třikrát nezávisle na sobě – u rodů *Trypanosoma* a *Phytomonas* a evoluční větve vedoucí k rodům *Leishmania* a *Endotrypanum* (Fernandes *et al.* 1993, Noyes 1998), dle Fernandes *et al.* (1993) možná dokonce čtyřikrát – zvláště u *T. cruzi* a *T. brucei*.

Podle Fernandes *et al.* (1993) se u předka blízce příbuzných rodů *Leishmania* a *Endotrypanum* vyvinul dvouhostitelský životní cyklus v pozdní křídě; nejspíše kolem divergence savčích řádů, tedy před přibližně 85 miliony let. Z období křídý pocházejí i první fosilní záznamy přenašečů obou těchto parazitů – krvesajících dvoukřídlých z podčeledi Phebotominae (Hennig 1972 *via* Lukashevich & Mostovski 2003, Azar & Nel 2003).

Přechod ke dvouhostitelskému parazitismu se u leishmanií podle Croan *et al.* (1997), Noyes *et al.* (1997), Noyes (1998) a Yurchenko *et al.* (2006) odehrál v neotropické oblasti (současná Jižní Amerika), kde se vyskytují lenochodi, jediní známí savčí hostitelé *Endotrypanum* a hostitelé nejméně pěti druhů leishmanií: *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. shawi*, *L. colombiensis* a *L. equatorensis* (Cupolillo *et al.* 1998), nicméně u nich by mohlo jít o druhotný přechod k parazitismu na těchto savcích. Noyes (1998) předpokládá, že lenochodi mohli být prvními obratlovčími hostiteli zástupců větve *Leishmania/Endotrypanum* a usuzuje, že u původně jednohostitelských parazitů se mohla objevit preadaptace k životu v krvi obratlovců díky kontaktu s krví uvnitř střeva flebotoma; tutéž domněnku sdílí i Yurchenko *et al.* (2006). Vzhledem k nízké tělesné teplotě vůči ostatním savcům a částečné poikilotermii lenochodů (Kredel 1928, Britton & Atkinson 1938, Hanley *et al.* 2008) by přechod z bezobratlého hostitele do teplokrevného obratlovce nemusel být pro tohoto předka natolik obtížný.

Deane & Jansen (1988) přednesli hypotézu, že by původními savčími hostiteli mohli být vačnatci, neboť množství jedno- i dvouhostitelských trypanosomatid přežívá v jejich análních pachových žlázách, jak bylo prokázáno experimentálně (u rodů *Crithidia*, *Leptomonas* a *Herpetomonas* přežití a úspěšné množení po mnoho měsíců až do zabití experimentálních zvířat (Jansen *et al.* 1988), u zástupců rodu *Trypanosoma* viz shrnutí v Deane & Jansen (1988)). Jako další body pro tuto preadaptační hypotézu připomínají, že uvnitř pachových žláz jsou paraziti chráněni před imunitním systémem hostitele, a že se tam paraziti mohli dostat po průchodu trávicím traktem po pozření hmyzího hostitele. V bezpečí pachových žláz by se posléze mohly vyvinout i mechanismy přežití v částech těla, kde by byli paraziti vystaveni účinkům imunity. Zde ovšem není jasná příčina a cesta přechodu k parazitismu v krvi, kromě toho by byl mnohem komplikovanější přenos zpět na vektora a posléze na další hostitele.

Poté, co společný předek současných druhů tandemu *Leishmania/Endotrypanum* přešel k dvouhostitelskému cyklu, došlo přibližně před 65 až 53 miliony let k divergenci

linie vedoucí k *Endotrypanum* a některým druhům leishmanií – *L. herreri*, *L. hertigi*, *L. daenei*, *L. equatorensis*, *L. colombiensis* a *L. enriettii* (Noyes *et al.* 1996, Croan & Ellis 1996, Croan *et al.* 1997, Noyes *et al.* 1997, Cupolillo *et al.* 1998, Asato *et al.* 2009), někdy též označovaných paraleishmanie (Cupolillo *et al.* 2000). Uvnitř této větve mohlo dojít k rozdělení na *Endotrypanum* a druhy tradičně řazené k leishmaniím zřejmě po příchodu hystrikomorfních hlodavců (předků např. kapybar a morčat), jediných známých savčích hostitelů druhů komplexu *L. hertigi*, do Nového světa před asi 40 miliony let. Z linie vedoucí k leishmaniím *sensu stricto* (tzv. euleishmaniím) se nejspíše jako první v raném miocénu odštěpil podrod *Viannia*, jehož výskyt je omezen na Nový svět, a v pozdním miocénu patrně došlo k rozdělení podrodů *Leishmania* a *Sauroleishmania*, jak nasvědčují analýzy genů pro SSU rRNA (Noyes *et al.* 1997, Noyes *et al.* 2002) a také RNA polymerasu II a enzym GAPDH (Yurchenko *et al.* 2006).

Hypotézy podrodů *Leishmania* a *Sauroleishmania* jako vrcholových skupin, dřívějšího odvětvení *Viannia* (patrně v neotropické oblasti) a existence skupiny paraleishmanií potvrzují i nové fylogenetické studie, byť každá pouze částečně.

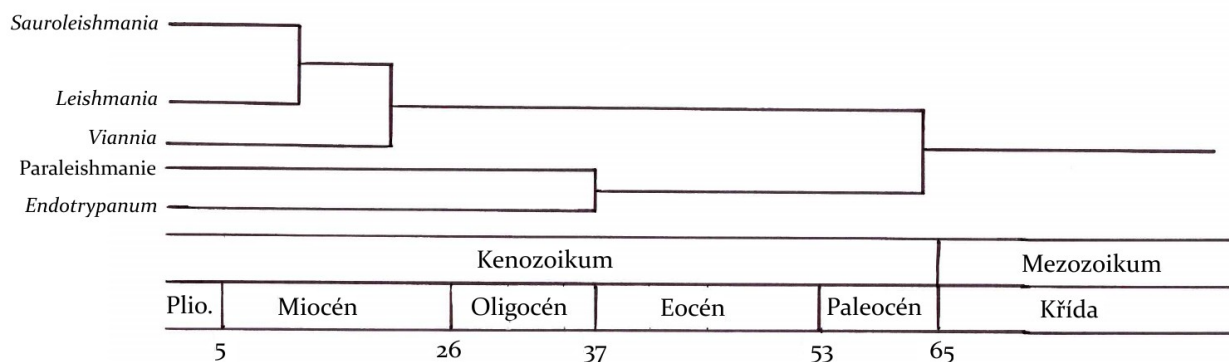
Asato *et al.* (2009) řadí *L. equatorensis*, *L. daenei*, *L. hertigi* a *L. enriettii* blíže k *Endotrypanum* než k ostatním leishmaniím, avšak odvětvuje *Viannia* a *Sauroleishmania* společně. To komplikuje geografické rozdělení leishmanií; podrod *Viannia* se vyskytuje pouze v Novém světě, *Sauroleishmania* naopak ve Starém světě. Autoři bohužel použili pouze *L. (S.) tarentolae* jako jediného zástupce sauroleishmanií.

Další studie založená na genu pro HSP70 (Fraga *et al.* 2010) bohužel nezahrnuje ani *Endotrypanum*, ani druhy patřící mezi paraleishmanie. Rody *Leishmania* a *Sauroleishmania* v ní jsou vrcholové taxony, *Viannia* se odvětvovala jako první, viz obr. 3 na následující straně. Ze sauroleishmanií bohužel také použili jediný druh, opět *L. (S.) tarentolae*.

Naopak palearktický původ leishmanií je podporován jednak původem flebotomů (Lewis 1982 *via* Kerr 2000), jednak též palearktickým původem myšovitých hlodavců, důležitých hostitelů leishmanií. Vysoký počet druhů leishmanií v neotropické oblasti by dle Kerr (2000) mohl být způsoben vlhkými tropickými podmínkami s vysokou abundancí vektorů i obratlovčích hostitelů (navíc s rychlou radiací myšovitých), což by oproti suchým a druhově chudším stepím a savanám mohlo vyvolat velkou radiaci taxonu.

Momen & Cupollilo (2000) navrhují další alternativní hypotézu, a to původ podrodů *Leishmania* a *Sauroleishmania* v Africe a *Viannia* a paraleishmanií v Jižní Americe.

Současný nejpravděpodobnější obraz fylogeneze leishmanií tedy zahrnuje přechod ke dvouhostitelskému cyklu v průběhu křídy a následné rozvětvení na větve paraleishmanií (spolu s *Endotrypanum*) a euleishmanií (podrody *Viannia*, *Leishmania* a *Sauroleishmania*) geografický původ je však dosud poměrně nejasný. U podrodů euleishmanií odraží vývoj v přenašeči jejich taxonomické zařazení, viz kapitola 5, nicméně paraleishmanie tuto představu svým častěji suprapylárním vývojem do jisté míry porušují.



Obr. 2: Schéma evoluce jednotlivých rodů a podrodů leishmanií včetně časové osy (v milionech let), upraveno dle Noyes (1998).

Časová posloupnost v současné době nejpravděpodobnějšího modelu evoluce leishmanií je znázorněna na obrázku 2. Většina prací zaměřených na fylogenezi skupiny tento model podporuje.

Bohužel fylogenetická studie zahrnující i větší množství sauroleishmanií, různých kmenů *Endotrypanum* a paraleishmanií a dostatečný počet zástupců podrodů *Viannia* a *Leishmania* zatím chybí.

#### 4. Morfologické typy buněk leishmanií

Během životního cyklu vytvářejí leishmanie několik rozdílných typů buněk v závislosti na přítomnosti ve vektorovi či obratlovčím hostiteli a konkrétní fázi vývoje. Pro obratlovce infekční metacykličtí promastigoti pronikají do buněk hostitele a transformují se na amastigoty, kteří se dále dělí a napadají další hostitelské buňky. Jsou-li tyto buňky při sání nasáty flebotomem, v jeho trávicím ústrojí tvoří leishmanie nejprve procyklické promastigoty, následně i stadia haptomonád, nektomonád a leptomonád, potřebná

k dokončení vývoje v přenašeči, a poté infekční metacyklické promastigoty (shrnuje Kamhawi 2006). Někdy byla zaznamenána též paramastigotní stadia (Gossage *et al.* 2003). O jednotlivých typech buněk leishmanií, jejich morfologii, výskytu a funkci, je stručně pojednáno níže. Později v kapitole věnované způsobům vývoje leishmanií již nebudou tyto typy buněk do detailů popisovány. Není-li uvedeno jinak, popisy stadií jsou citovány z prací Gossage *et al.* (2003), Kamhawi (2006) a Bates (2007).

### **Amastigoti**

Toto kulaté či mírně oválné bezbičíkaté stadium se vyskytuje intracelulárně v buňkách obratlovců – savců a plazů (fagocytujících leukocytech, u sauroleishmanií ovšem i v erythrocytech, v nichž obligátně parazituje také *Endotrypanum*). Spolu s nasátou krví se dostávají do střeva flebotoma, kde jsou obklopeni PM a vlivem snížené teploty a zvýšeného pH se transformují v procyklické promastigoty.

### **Procykličtí promastigoti**

Jedná se o malé, mírně pohyblivé formy s krátkým předním bičíkem (odtud označení promastigot), které se ve flebotomovi vyskytují v době formování a existence peritrofické matrix. Slouží především k dělení; do rozpadu PM se počty parazitů výrazně zvyšují. V řádu dní dochází k jejich transformaci na nektomonádní promastigoty neboli nektomonády.

### **Nektomonády**

Morfologicky jde o podlouhlé štíhlé buňky promastigotního typu, schopné rychlého pohybu (Molyneux *et al.* 1975), které (v případě podrodů *Leishmania* a *Viannia*, nikoli však *Sauroleishmania*) podstupují anteriorní migraci a neprocházejí dělením. Únik z PM je umožněn jak jejím přirozeným rozpadem, tak v případě některých leishmanií zřejmě i působením jejich chitinas.

### **Leptomonády**

Tato krátká a široká promastigotní forma vzniká z nektomonád a je schopná se hojně dělit. Je také producentem sekretorického PPG (proteofosfoglykanu) leishmanií, který vytváří zátku v oblasti stomodeální valvy, a může být prekurzorem metacyklických promastigotů (Rogers *et al.* 2002).

### **Haptomonády**

Jde o přichycená stadia s krátkým bičíkem, vznikající pravděpodobně z nektomonád či leptomonád. Tvarem jsou buňky obvykle krátké a hruškovité, jádro je sférického tvaru a přichycení parazitů k výstelce stomodeální valvy probíhá za pomoci hemidesmosomů (Molyneux *et al.* 1975). Produkují chitinasy rozrušující kutikulu SV, což může napomáhat přenosu na obratlovčího hostitele (Rogers *et al.* 2008).

### **Paramastigoti**

Ač byli pozorováni ve více pracích (např. Walters *et al.* 1989b, Rangel *et al.* 1992, Rogers *et al.* 2002), mnoho o nich není známo: Není zcela jisté, z jakého stadia se paramastigoti u leishmanií vyvíjejí, v jaké fázi se tak děje a jaká je jejich funkce. Gossage *et al.* (2003) se o nich zmiňují jako o formě nalezené obvykle ve stomodeu v pozdních fázích infekce, jak přichycené, tak volně pohyblivé. Mohlo by se jednat o stadium potenciálně infekční pro obratlovčího hostitele, formu odvozenou od haptomonád nebo degenerované buňky.

### **Opistomastigoti**








Molyneux *et al.* (1975) ve své práci o *L. (L.) mexicana amazonensis* popisují stadia nalezená ve pharyngu jako opistomastigoty, tedy stadia se zadním bičíkem. Tvar buněk byl nepravidelný a většinou byly přichyceny k výstelce pharyngu pomocí hemidesmosomů. Nejedná se ovšem o obecně používané typologické označení; paraziti v předních částech trávicího traktu jsou obvykle popisováni pomocí další zde popsané terminologie.

### **Metacykličtí promastigoti**

Jedná se o infekční stadium schopné nakazit obratlovčího hostitele. Mají relativně malou velikost, dlouhý bičík a jsou schopni velmi rychlého pohybu, důležitého právě při nákaze obratlovce během sání flebotoma. O jejich vývoji *in vivo* je bohužel známo poměrně málo, nicméně *in vitro* je diferenciaci na metacykly navozena anaerobními podmínkami, nízkým pH a snížením hladiny tetrahydrobiopterinu (kofaktoru NO-synthasy). Metacykličtí promastigoti jsou nedělicím se stadiem, jsou schopni pouze diferenciaci na amastigoty, kteří se posléze dělí v buňkách obratlovce.



Tab. 1: Schematická znázornění a popisy jednotlivých morfologických stadií leishmanií dle Rogers *et al.* (2002), upraveno, dále Molyneux *et al.* (1975), Lawyer *et al.* (1987) a Walters *et al.* (1989b).\*

Morfologická kategorie	Popis stadia	Ilustrační obrázek
Amastigot	Oválný tvar, bez bičíku, délka do 5 mikrometrů	
Procyklický promastigot	Délka 6,5 až 11,5 mikrometru, bičík kratší než tělo buňky, šířka variabilní	
Nektomonádní promastigot	Délka přes 12 mikrometrů, délka bičíku i šířka těla variabilní	
Leptomonádní promastigot	Délka 6,5 až 11,5 mikrometru, bičík delší než tělo, šířka variabilní	
Haptomonádní promastigot	Diskovitý tvar přední části, délka 7 až 12 mikrometrů, tvar buňky i délka bičíku variabilní	
Metacyklický promastigot	Délka do 8 mikrometrů, šířka do 1 mikrometru, bičík delší než tělo buňky	
Paramastigot	Kinetoplast přiléhající k jádru, bičík externě od kinetoplastu, délka cca 4 až 6 mikrometrů	

## 5. Vývoj leishmanií ve flebotomech

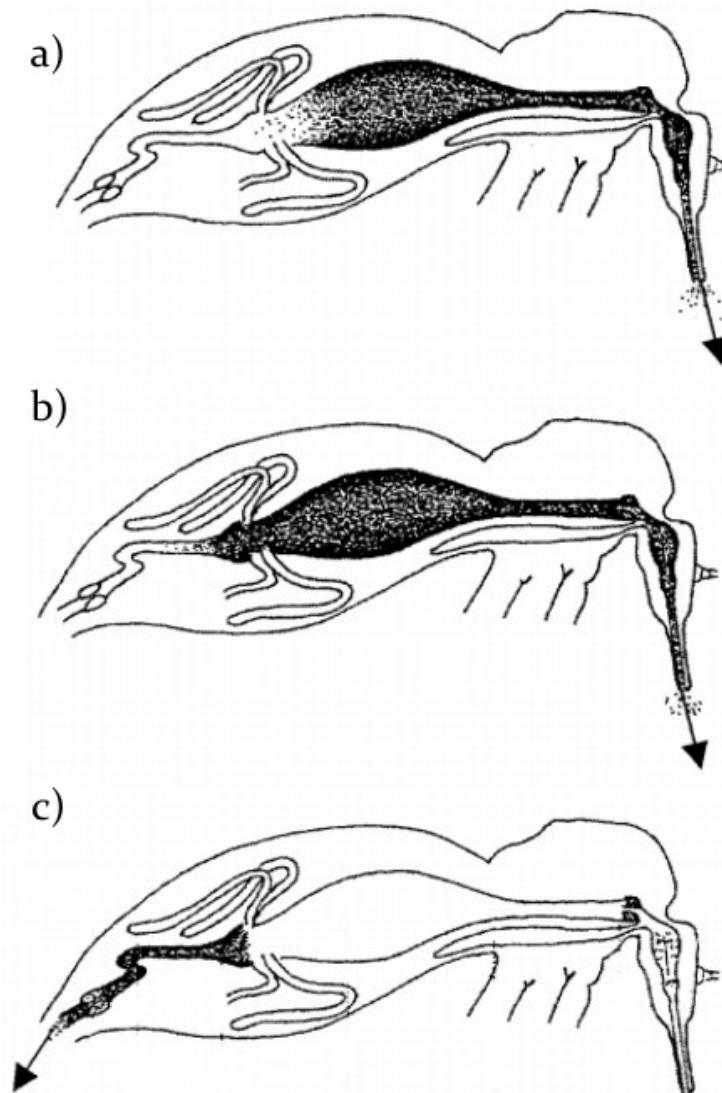
Vývoj leishmanií ve vektoru do značné míry kopíruje jejich taxonomické zařazení a fylogenezi, představené v kapitole 3. Podrod *Leishmania* má suprapylární vývoj, podrod *Viannia* peripylární a podrod *Sauroleishmania* dle většiny zdrojů hypopylární. *Paraleishmania* a *Endotrypanum* však z tohoto řazení částečně vybočují.

V následujících podkapitolách se budu dopodrobna věnovat způsobům vývoje jednotlivých skupin leishmanií a rodu *Endotrypanum*, možnosti vývoje leishmanií ve slinných žlázách flebotomů a vnějším faktorům ovlivňujícím průběh vývoje. Typ vývoje a přenosu u jednotlivých skupin je stručně představen v tabulce 2 a graficky znázorněn na obrázku 3.

\* Údaj o velikosti amastigotů pochází z práce Lawyer *et al.* (1987), o velikosti haptomonád z Molyneux *et al.* (1975) a o velikosti paramastigotů z Walters *et al.* (1989b). Veškeré ostatní informace a obrázky pocházejí z Rogers *et al.* (2002).

Tab. 2: Přehled jednotlivých skupin leishmanií, jejich zástupců, vektorů, lokalizace vývoje ve flebotomovi a způsobu přenosu na obratlovčího hostitele. Informace o způsobu přenosu jsou převzaty z práce Jovany Sádlové (1999).

Podrod (rod)	Vybraní zástupci	Vektoři	Místo vývoje	Přenos
<i>Leishmania</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i>	<i>Phlebotomus</i> ve Starém světě, <i>Lutzomyia</i> v Novém světě	výhradně mesenteron, průniky i do stomodea	inokulativní
<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. naiffi</i>	rod <i>Lutzomyia</i>	mesenteron i proctodeum, průniky do stomodea	inokulativní (uvažována však i role prediureze)
<i>Sauroleishmania</i>	<i>L. tarentolae</i> <i>L. gymnodactyli</i> <i>L. ceramodactyli</i> <i>L. adleri</i> <i>L. hoogstraali</i>	rody <i>Sergentomyia</i> a <i>Phlebotomus</i>	po rozpadu PM zřejmě výhradně proctodeum, u některých druhů možná i anteriorní část mesenteronu	prediureze či defekace, nebo pozření flebotoma plazem
<i>Endotrypanum</i>	<i>E. schaudinni</i> <i>E. monterogeii</i>	rod <i>Lutzomyia</i>	proctodeum, nepřichycená stadia i mesenteron, nejistota u přítomnosti v malphigických trubicích a SV	zřejmě kontaminativní, inokulativní však není vyloučen



Obr. 3: Znázornění kolonizace trávicího traktu u různých způsobů vývoje leishmanií: a) suprapylární, b) peripylární, c) hypopylární. Dle Lawyer & Perkins (2000), upraveno.

### 5.1 Podrod *Leishmania*

Vývoj zástupců tohoto podrodu je prozkoumán zdaleka nejlépe. Probíhá suprapylárně, což znamená, že po rozpadu PM dochází jednak k přichycení na epitel stěny mesenteronu a jednak k následné migraci do anteriorní části mesenteronu k SV; žádná část vývoje se neodehrává v oblasti proctodea. Podrobné studie vývoje u podrodu *Leishmania* probíhaly od 60. let minulého století, ačkoli úplně první výzkumy tohoto typu pocházejí již z 20. let, jak v úvodu své práce shrnují Johnson a Hertig (1970).

Po nasátí infikované krve se uvnitř mesenteronu flebotoma a obklopení PM začínají amastigoti transformovat na procyklické promastigoty. Zpravidla po přibližně dvou dnech již nezůstávají žádné amastigoti a mimo procyklických promastigotů se vyskytují už také nektomonády a leptomonády, avšak ještě ve velmi malém množství. Přibližně od třetího až pátého dne (dle druhu leishmanie a přenašeče) nektomonády již dominují, a to zejména v anteriorní části abdominálního mesenteronu, a procyklické promastigoti se naopak téměř nevyskytují. Tehdy také dochází k rozpadu PM a posléze se objevují první paraziti v okolí SV (Johnson & Hertig 1970, Lawyer *et al.* 1987, Rogers *et al.* 2002, Sádlová *et al.* 2003, Chajbullinová *et al.* 2012).

Anteriorní migrace je řízena jak chemotaxí, tak osmotaxí. Barros *et al.* (2006) zjistili na modelu *L. (L.) amazonensis*, že leishmanie chemotakticky reagují již na nízké koncentrace (0,001 mM) sacharosu, laktosu, manitolu a glycinu, zatímco osmotakticky na vysoké koncentrace (1 M) chloridu sodného a guanosinu. Jedná se o stimuly zejména ze slinných žláz, které mohou být dobře využity ke stanovení anteriorního směru.

Důležitý moment vývoje podrodu *Leishmania* ve flebotomech je přichycení procyklických a nektomonádních promastigotů k epitelu mesenteronu po rozpadu PM a před defekací, kterou by jinak byli vypuzeni ven spolu s nestrávenými zbytky krve. Co umožňuje přežít tuto kritickou fázi, objasnili Sacks *et al.* (1995) ve své práci zaměřené na změny ve struktuře povrchového lipofosfoglykanu (LPG) leishmanií na modelu *L. (L.) donovani*. U procyklických promastigotů a nektomonád se na terminálním konci LPG nacházejí oligosacharidy vázající se na lektiny epitelálních buněk mesenteronu flebotoma – tímto způsobem se leishmanie uchytí, zpravidla bičíkem mezi mikrovilli epitelu. U metacyklů již tyto cukerné zbytky chybí a metacyklické promastigoti nejsou podobného přichycení schopni. Myšková *et al.* (2007) později upřesnili, že přímo na oligosacharidech na LPG závisí přichycení u specifických vektorů (schopných podporovat vývoj pouze jednoho druhu leishmanií), zatímco u vektorů permisivních existují mechanismy podobného rázu (vazba cukerných zbytků na lektiny), ale nezávislé na zbytcích vázaných na LPG. Vazba na epitel mesenteronu je velmi pravděpodobně charakteristická pouze pro tento podrod leishmanií; Hlaváčová (2009) ve své DP experimentálně ověřila, že testování paraziti *L. (V.) braziliensis* se na epitel mesenteronu *Lu. longipalpis* vůbec nevázáli.

Od čtvrtého dne po sání u modelu *L. (L.) mexicana* začínají převládat leptomonády (a to především v thorakálním mesenteronu a za SV), také se začínají objevovat

haptomonády a metacykly. Od té doby zůstává poměr haptomonád přibližně stejný (pouze několik málo procent), zatímco podíl metacyklických promastigotů zvolna vzrůstá (až na přibližně polovinu všech buněk okolo desátého dne). Kontinuálně narůstá množství parazitů v thorakálním mesenteronu a v blízkosti SV, kde od šestého dne dominují metacykličtí promastigoti. Jen výjimečně jsou v různou dobu i v různých regionech trávicí soustavy pozorováni paramastigoti (Walters *et al.* 1989a, Rogers *et al.* 2002). V malých počtech mohou být také nalezeni paraziti ve stomodeu (Johnson & Hertig 1970, Walters *et al.* 1989a, Rogers *et al.* 2002, Sádlová *et al.* 2003) či ve voleti (Lawyer *et al.* 1987).

Od čtvrtého dne dál se také začíná u SV formovat zátka ze sekretorického proteofosfoglykanu neboli promastigotního sekretorického gelu (PSG). Ač byla pozorována již dříve (Lawyer *et al.* 1987), Rogers *et al.* (2002) jako první detailně zdokumentovali její vznik a původ; stadii, která ji produktovala, byly leptomonády. Zátka z PSG tvoří bariéru mechanicky narušující funkci stomodeální valvy, která je normálně mimo sání uzavřena a odděluje stomodeum od mesenteronu. U infikovaných samic flebotomů nabývá thorakální mesenteron přibližně třikrát na objemu a tlak zátky na trávicí trakt je poměrně vysoký. Zátka může dosahovat skrze SV až do esophagu. Je podlouhlého tvaru a uvnitř obsahuje převážně leptomonády, pak také metacykly (Rogers *et al.* 2002).

Od osmého dne po sání již bývá uvnitř PSG zátky soustředěna valná většina parazitů. Uprostřed výrazněji dominují leptomonády, směrem k okrajům PSG zátky pozvolna přibývá metacyklických promastigotů. Dle Rogers *et al.* (2002) tento fakt indikuje, že leptomonády jsou prekurzorem metacyklů. Metacyklogeneze by také mohla být stimulována samotným PSG, v jehož prostředí je nízké pH, a to je jeden z hlavních faktorů přispívajících k tomuto procesu (Kamhawi 2006). Nejvíce metacyklických promastigotů ve studii Rogerse *et al.* (2002) bylo na anteriorním konci PSG zátky, což by měla být nejlepší lokalizace pro následný přenos. Většina nakažených samic *Lu. longipalpis* v této studii měla obtíže se sáním, patrně právě kvůli blokaci alimentárního traktu PSG zátkou, a výrazně větší podíl jich pouze zkoušelo sát nebo se nasálo částečně, na rozdíl od neinfikovaných samic, které se nejčastěji nasály úplně. Čím těžší byla infekce leishmaniemi, tím obtížnější se jevílo sání. To odpovídá i hypotéze zmíněné Rogersem *et al.* (2002) a blíže studované u leishmanií i trypanosom v práci Volfa *et al.* (2004), že častější sání z důvodu neschopnosti se úplně nasát napoprvé zvyšuje šanci přenosu leishmanií na obratlovčí hostitele. Autoři také stručně shrnují poznatky o tom, jak se haptomonády přichycují za pomoci hemidesmosomů

k výstelce SV a narušují ji chitinasami, čímž ještě více poškozují její funkci, než by vyvolala samotná přítomnost PSG zátky. Pravděpodobnost úspěšného přenosu tak dále vzrůstá.

Suprapylární vývoj lze tedy shrnout následovně: Po nasátí flebotomem se amastigoti transformují na procyklické promastigoty a dochází k dělení. Z procyklů se dále diferencují nektomonády a poté i leptomonády. Procykliční a nektomonádní promastigoti se po rozpadu peritrofické matrix (PM) přichycují na epitel mesenteronu, což zabraňuje jejich vydefekování. Nektomonády a leptomonády následně podstupují anteriorní migraci ke stomodeální valvě (SV), kde leptomonády vytvářejí gelovitou zátku z PSG. Další stadia, haptomonády, valvu mechanicky narušují. To společně se vznikem PSG zátky, s níž jsou poté do obratlovčího hostitele inokulováni infekční metacykliční promastigoti, zvyšuje šance přenosu.

I ve vývoji dobře prozkoumaných druhů tohoto podrodu se ovšem mohou vyskytnout překvapivé skutečnosti. Různí autoři (Johnson & Hertig 1970, Lawyer *et al.* 1987) pozorovali živé buňky leishmanií i v proctodeu flebotomů, byť pouze u cca 3 až 17 % nakažených jedinců. Je otázka, zda se jedná čistě o občasné náhodné průniky při silnějších nálezích, nebo zda tato lokalizace může mít pro vývoj leishmanií i nějaký význam. Podobně se uvažuje o infekcích malphigických trubic, které zaznamenali např. Johnson a Hertig (1970) u druhu *L. (L.) mexicana* či Nieves a Pimenta (2000) u *L. (L.) amazonensis*.

Añez *et al.* (2003) našli ve stomodeální valvě a thorakálním mesenteronu samic *Ph. papatasi* po druhém, neinfekčním sání krve formy leishmanií *L. (L.) major* nejvíce připomínající amastigoty. Význam tohoto nálezů dosud není jasný. Novým zjištěním je také to, že nejen rody *Phlebotomus* a *Lutzomyia* mohou hostit leishmanie podrodu *Leishmania*; Parvizi & Amirkhani (2008) a Berdjane-Brouk *et al.* (2012) totiž našli DNA *L. (L.) major* ve flebotomech *Sergentomyia sintoni*, respektive *Se. darlingi*. Je však otázka, zda se *L. (L.) major* v sergentomyiích skutečně správně vyvíjí, nebo se do nich pouze náhodně dostává a další přenos se buď neodehrává, nebo přinejmenším není efektivní. Kompetenci druhu *Se. schwetzi* jako vektora *L. (L.) donovani* zpochybnila Sádlová (v recenzním řízení), neboť u této kombinace nebyly pozorovány žádné úspěšné nákazy.

## 5.2 Podrod *Viannia*

Na rozdíl od podrodu *Leishmania* zahrnuje vývoj zástupců *Viannia* ve vektoru i fázi v proctodeu a nazýváme jej peripylární. Jedna z prvních prací zabývajících se detaily vývoje v přenašeči pochází od Johnsona a Hertiga (1970), kteří ve svém srovnání popsali vývoj *L. (V.) braziliensis* ve flebotomech *Lu. sanguinaria* a *Lu. gomezi*. V úvodu své práce shrnují tehdejší poznatky o roli proctodea ve vývoji: Výskyt leishmanií v zadní části trávicího traktu flebotoma byl zaznamenán již v polovině 20. let, nicméně až do 50. let se badatelé soustředili spíše na stomodeum a mesenteron, zatímco přítomnost či nepřítomnost parazitů v proctodeu nebyla vůbec uváděna.

Po nasátí nakažené krve dochází i u viannií k přeměně amastigotů na procyklické promastigoty. Po rozpadu PM dochází k posteriorní migraci do proctodea, kde se většina parazitů přichycuje, a to nejčastěji v oblastech pyloru a ilea, ale v případě silnějších infekcí po celé délce proctodea (Johnson & Hertig 1970, Walters *et al.* 1989b, Rangel *et al.* 1992, Nieves & Pimenta 2000, Barbosa *et al.* 2006). Podíl haptomonád v proctodeu zůstává zpravidla vysoký od chvíle úniku z PM po celou dobu infekce. Haptomonády v pyloru a ileu mohou být zakulacené až oválné, často v rozetách (Johnson & Hertig 1970, Walters *et al.* 1989b), nebo též větvenovité (Johnson & Hertig 1970). V téže oblasti se mohou relativně běžně vyskytovat i paramastigoti (Walters *et al.* 1989b, Rangel *et al.* 1992, Nieves & Pimenta 2000).

Ač Johnson a Hertig (1970) pozorovali uchycení nektomonád v mesenteronu, žádná jiná studie takové zmínky neobsahuje a Hlaváčová (2009), která se ve své diplomové práci speciálně na tuto vlastnost leishmanií zaměřila, u *L. (V.) braziliensis* žádné přichycení v oblasti mesenteronu nezaznamenala. Defekaci se tedy paraziti téměř jistě brání pouze uchycením ke kutikulární výstelce proctodea.

Od pátého až šestého dne dochází k anteriorní migraci parazitů, což může vést i k úplnému zbavení proctodea infekce, většinou tam však určité množství haptomonád zůstává (Walters *et al.* 1989b).

V okolí SV se viannie opět přichycují pomocí hemidesmosomů a objevují se první metacyklické promastigoti, stejně jako u podrodu *Leishmania* volní, schopní rychlého pohybu a nedělící se. Walters *et al.* (1989b) popisují výskyt filamentosního gelu u SV; lze usuzovat, že pozorovali PSG zátku.

Mohou se vyskytnout i průniky do stomodea. Johnson a Hertig (1970) zaznamenali ojedinělé výskyty parazitů v esophagu a pharyngu, Walters *et al.* (1989b) pozorovali nákazy esophagu u necelé poloviny samic, pharyngu přibližně u čtvrtiny. Nalezená stadia byli promastigoti a překvapivě také paramastigoti. Rangel *et al.* (1992) u několika samic našli parazity i v proboscis.

V malphigických trubicích na rozdíl od podrodu *Leishmania* nebyli zástupci podrodu *Viannia* dosud nikdy pozorováni.

Příslušníci tohoto podrodu jsou zcela jistě přenášeni inokulativně, uvažuje se však i o roli prediureze – vyloučení tekutiny samicí flebotoma při a po sání krve (Sádlová *et al.* 1998) – tedy kontaminativním přenosu. Není vyloučena ani role prediureze při přenosu zástupců podrodu *Leishmania*, jak ukázala přítomnost různých stadií *L. (L.) major* v prediuretické tekutině *Ph. papatasi* a *Ph. duboscqi* (Sádlová & Volf 1999).

### 5.3 Podrod *Sauroleishmania*

O vývoji parazitů podrodu *Sauroleishmania* je bohužel známo poměrně málo. Valná část prací pochází z 20. a 30. let minulého století, jiné jsou zase dostupné pouze v jiných jazycích než angličtině (jmenovitě v arabštině, ruštině, francouzštině a portugalštině). Následné shrnutí pochází z prací psaných anglicky, případně citovaných v pracích publikovaných v angličtině, nebo s dostupným podrobným anglickým abstraktem.

Flebotomové spolu s nakaženou krví nasají promastigoty, krevní formy plazích leishmanií. V mesenteronu dochází k množení. *Sauroleishmania* po rozpadu PM migrují do proctodea, kde se přichycují na chitinosní výstelku. Jako první tam tři dny po sání Adler a Theodor (1929) pozorovali dlouhé štíhlé formy uchycené v oblasti těsně za pylorickou valvou. Později se jiné formy (středně velké i krátké bičíkaté buňky) vyskytovaly přichycené i v celém proctodeu, dokonce i v rektu a rektálních ampulích; po celou dobu v proctodeu přetrvávaly též volné formy leishmanií (včetně bezbičíkatých buněk). Infekce byly zpravidla velmi silné.

Adler a Theodor (1929) však u *L. (S.) ceramodactyli* zaznamenali bezmála u všech nakažených samic *Ph. papatasi* také infekce mesenteronu krátkými i dlouhými bičíkatými buňkami a při silných nákazách též infekce cardie, tedy oblasti těsně za SV, podobnými formami. Třetí až pátý den se leishmanie nacházely v cardii u 29,5 % nakažených samic, šestý až třináctý den už pouze u 10,6 %. I tak jde však o číslo překvapivé u parazita, u něž



bychom předpokládali hypopylární vývoj. U části infikovaných samic byly leishmanie ke stěně cardie (tedy oblasti bez kutikulární výstelky, na rozdíl od proctodea) dokonce přichyceny. Vzhledem k typickému obsazení posteriorní části trávicího traktu ale autoři usuzovali, že přenos na plazího hostitele probíhá kontaminativně, a to pozřením infikovaného flebotoma. V téže práci autoři našli tři až pět dní po sání i příslušníky *L. (S.) tarentolae* ve velkých počtech za SV; naopak v proctodeu *Ph. papatasi* infekce tímto parazitem zcela chyběly. U téhož druhu sauroleishmanie Adler a Theodor (1935) opět pozorovali nákazu mesenteronu a cardie těsně za SV, a to ve flebotomovi *Se. minuta parrotti*, zatímco Parrot (1935 via Adler 1964) u stejného druhu přenašeče zaznamenal výskyt *L. (S.) tarentolae* v proctodeu. Pochybnosti ohledně typu vývoje jsou i u *L. (S.) adleri* (Adler 1964).

Lainson *et al.* (1977) infikovali *Lu. longipalpis* plazí leishmanií *L. (S.) hoogstrali* a našli infekci v proctodeu, nicméně poměrně slabou. Z osmnácti samic lutzomyií sátých na krvi s promastigoty přes membránu se nakazila jediná, nejedná se proto o reprezentativní vzorek. Autoři neúspěšnost infekce *L. (S.) hoogstrali* vysvětlovali jednak tím, že se jedná o leishmanii ze Starého světa a flebotoma z Nového světa, dvojici, která by se za přirozených podmínek nikdy nesesetkala, a také tím, že po dlouhodobé kultivaci mohla tato linie *L. (S.) hoogstrali* ztratit schopnost infikovat přenašeče.

Shatova *et al.* (1991) zkoumali vývoj *L. (S.) gymnodactyli* v experimentálně nakažených flebotomech *Sergentomyia arpaklensis* a zjistili, že PM se ani po konci trávení nerozpadla natolik, aby leishmaniím (uvnitř PM se normálně transformujícím na promastigoty a množícím se) umožnila únik; paraziti byli vydefekováni spolu se zbytky potravy, což by nasvědčovalo nevhodnosti přenašeče.

Rashti *et al.* (1994) po dobu šesti měsíců prováděli odchyt flebotomů druhu *Sergentomyia sintoni* v oblasti na hranici Íránu a Turkmenistánu a zkoumali jejich infekce leishmaniemi. Provedli pitvy celkem 403 samic a našli promastigoty výhradně v mesenteronu 60 z nich. Podle analýzy izoenzymů se jednalo o druh *L. (S.) gymnodactyli*.

Rassi *et al.* (1997) na severozápadě Íránu vypitvali celkově 2 659 samic sedmi druhů flebotomů. U 1,09 % samic *Ph. perfiliewi*, 0,34 % *Ph. kandelakii*, 13,64 % *Se. sintoni* a 9,76 % *Se. dentata* byly nalezeny infekce promastigoty, pravděpodobně plazích leishmanií; autoři nicméně neuvádějí žádné další informace (ani lokalizaci parazitů).

Vzhledem k nízkému počtu studií o vývoji podrodu *Sauroleishmania* ve flebotomech a k možnému výskytu v přední části trávicí soustavy u některých druhů, a to navzdory obecnému předpokladu hypopylárního vývoje u celého podrodu, by byla nanejvýš vhodná srovnávací studie vývoje různých příslušníků tohoto podrodu v různých vektorech, abychom si mohli udělat co nejpřesnější obraz o vývoji sauroleishmanií v přenašečích za použití současné platné terminologie a metod.

#### 5.4 Rod *Endotrypanum*

Tento rod je unikátní infikováním erytrocytů (a nikoli fagocytózy schopných leukocytů) savčích hostitelů. V erythrocytech se vyskytují epimastigoti v případě *E. schaudinni* a trypomastigoti u *E. monterogeii* (Shaw 1969). Podle dosavadních zjištění napadá *Endotrypanum* z obratlovců pouze chudozubé, nejčastěji dvouprsté lenochody rodu *Choleopus* (Shaw 1969, Franco & Grimaldi 1999).

Poté, co flebotomus nasaje infikovanou krev, se v mesenteronu z nakažených erytrocytů uvolní epimastigoti (resp. trypomastigoti), uvnitř PM se postupně dělí a transformují na nektomonádní promastigoty a po rozpadu PM migrují do zadního oddílu trávicího traktu, kde dochází k dalšímu dělení a kde se z větší části přichycují na stěnu různých regionů proctodea (zejména pyloru), mnohdy pohromadě v rozetách či palisádách (Shaw 1969, Christensen & Herrer 1976, Shaw 1981, Franco *et al.* 1997, Barbosa *et al.* 2006). Typické pro *Endotrypanum* jsou zřejmě nákazy malphigických trubic, pozorované v řadě studií (Shaw 1969, Christensen & Herrer 1976, Shaw 1981, Arias *et al.* 1985, Franco *et al.* 1997). Zde se však popis dalšího vývoje v jednotlivých studiích začíná markantně lišit. Dle některých prací je infekce omezena na abdominální mesenteron a proctodeum (Shaw 1969, Arias *et al.* 1985, Barbosa *et al.* 2006), zatímco jiné zaznamenaly výskyt parazitů i v thorakálním mesenteronu, a to Christensen & Herrer (1976) v případě jediné samice *Lu. sanguinaria*, Shaw (1981) již u řady samic *Lu. furcata*, ne však *Lu. longipalpis* a *Lu. flaviscutellata*, Franco *et al.* (1997) u *Lu. shannoni*, *Lu. Longipalpis* i *Ph. papatasi*, v němž se *Endotrypanum* též dokázalo vyvíjet. Podle výsledků Franco *et al.* (1997) dochází k migraci k SV od sedmého dne po sání a posléze tam dochází k diferenciaci na infekční stadia (autoři uvádějí metacyklické promastigoty s otazníkem).

Způsob přenosu byl navrhován jak kontaminativní (Shaw 1969), tak inokulativní (Christensen & Herrer 1976, Shaw 1981). V současné době není jasné, jaký typ vývoje je pro

*Endotrypanum* běžný, zda se liší mezi jednotlivými druhy a liniemi (což je na základě takto rozporuplných dat pravděpodobné), zda na něj má vliv taxonomická příslušnost přenašeče (čemuž nasvědčují rozdíly mezi třemi druhy lutzomyií u Shaw (1981)) a jaký je obvyklý způsob přenosu na lenochody.

Otázkou také zůstává, zda se opravdu u všech uvedených studií skutečně jednalo o rod *Endotrypanum*. Cupolillo *et al.* (2000) vznesli pochybnost, zda jsou linie kultivované v laboratořích jako *Endotrypanum* skutečně těmi parazity, kteří způsobují infekce erytrocytů v lenochodech, a zda se spíše nejedná o paraleishmanie vyvolávající jiné nákazy, přičemž trypo- a epimastigotní formy nalezené dříve v erythrocytech by mohly být stadii dosud laboratorně nekultivovaného trypanosomatidního parazita (infekce lenochodů různými příslušníky rodu *Trypanosoma* jsou také běžné). Autoři navrhují ponechat název *Endotrypanum* pro parazita tvořícího intraerytrocytální trypo- a epimastigoty a současné zástupce *Endotrypanum* překlasifikovat jako leishmanie, budou-li odpovídat definici (tvořit amastigotní stadia v makrofázích obratlovce).

## 5.5 Paraleishmanie

Četné molekulárně-fylogenetické studie (Noyes *et al.* 1996, 1997, Croan & Ellis 1996, Croan *et al.* 1997, Cupolillo *et al.* 1998) prokázaly bližší příbuznost druhů *L. herreri*, *L. hertigi*, *L. daenei*, *L. equatorensis* a *L. colombiensis* rodu *Endotrypanum*, než ostatním leishmaniím; Asato *et al.* (2009) ve své analýze takto zařadili i *L. enriettii*. Cupollilo *et al.* (2000) pro tuto skupinu navrhli označení paraleishmanie, avšak zkoumání jejich vývoje je zkomplikováno skutečností, že poměrně donedávna byly tyto druhy považovány za zástupce různých skupin euleishmanií.

Lainson *et al.* (1977) zjistili ve své studii čtrnácti druhů leishmanií, že se žádná stadia *L. hertigi* ani *L. daenei* nevyskytovala v proctodeu infikovaných samic *Lu. longipalpis*, zatímco v mesenteronu byl slabý výskyt zachycen. Bohužel však nezdokumentovali vývoj zkoumaných druhů kompletně, zaměřovali se pouze na výskyt či absenci parazitů v mesenteronu a proctodeu. Je tedy relativně pravděpodobné, že *L. hertigi* a *L. daenei* podstupují suprapylární vývoj, jeho podrobnosti však neznáme.

Zeledón *et al.* v roce 1979 popsali *L. herreri*, kterou kromě lenochodů izolovali také z flebotomů *Lu. trapidoi*, *Lu. ylephiletor* a *Lu. shannoni*; jejímu vývoji se však nevěnovali a psali pouze o výskytu bičíkatých stadií ve flebotomech, lokalizace nebyla zmíněna.

Grimaldi *et al.* (1992) při svém popisu *L. equatorensis* spoléhali pouze na nálezy z obratlovců (lenochoda a veverky); přenašeče se jim zjistit nepodařilo. Furuya *et al.* (1998) později zjistili, že jejím přirozeným vektorem je patrně *Lu. hartmanni*, nicméně přímo vývojem v přenašeči se nezabývali. V případě *L. enriettii* není přirozený přenašeč znám dosud (Lainson & Shaw 2005).

Kreutzer *et al.* (1991) popsali druh *L. colombiensis* včetně jeho vývoje v přenašeči; provedli experimentální infekce flebotomů *Lu. trapidoi*, *Lu. gomezi* a *Ph. papatasi*. Jako přirozený vektor byla ovšem identifikována *Lu. hartmanni*. U *Lu. trapidoi* měly všechny zkoumané samice tři dny po sání velké množství dělicích se promastigotů v mesenteronu, 7 z 19 samic také v proctodeu, převážně v blízkosti rektálních ampulí, jedna samice již také u SV a ve stomodeu. Pátý den vykazovalo infekci pouze 5 z 10 samic, přičemž pouze jedna stále ještě i v mesenteronu (ostatní výhradně parazity přichycené v pyloru a blízko rektálních ampulí). Šestý den byla infekce nalezena ve 3 z 6 samic, pouze s promastigoty přichycenými v proctodeu. U *Lu. gomezi* přežilo pouze 9 samic; jedna byla zkoumána tři dny po sání, s prokázanou infekcí, další pět dní, bez nálezu leishmanií, a zbylých 7 sedmý den, přičemž 6 bylo pozitivních s parazity přichycenými ke stěně pyloru. U *Ph. papatasi* byla třetí den pozitivní většina samic s parazity lokalizovanými v mesenteronu. Desátý den už jen 1 z 9 zbývajících samic vykazovala slabou infekci krátkými promastigoty uchycenými ke stěně pyloru těsně za ústím malpigických trubic. Obecně se tedy *L. colombiensis* vyskytovala zejména v pyloru, nicméně přítomnost parazitů i u SV nasvědčuje peripylárnímu vývoji.

Zdá se tedy, že paraleishmanie podstupují jak suprapylární (*L. hertigi* a *L. daenei*), tak peripylární vývoj (*L. colombiensis*). Příčiny této diverzity zatím neznáme.

## 5.6 Výskyt leishmanií ve slinných žlázách flebotomů

Otázka vývoje leishmanií ve vektoru je stále poměrně kontroverzním tématem a není dosud jasné, zda možnost nákazy slinných žláz flebotoma hraje nějakou roli v přenosu leishmanií, nebo jde pouze o slepou uličku při silné infekci trávicího traktu či artefakt způsobený např. neopatrností při pitvě. První záznam o pozorování leishmanií ve slinných žlázách přenašeče pochází z roku 1978 (Arias & Freitas 1978 *via* Freitas *et al.* 2002). Následně až Naiff *et al.* (1991) zmiňují nález leishmanií *L. (V.) naiffi* ve slinných žlázách flebotoma *Lutzomyia squamiventris*. Nepíšou ovšem, o jaká stadia se jednalo, ani jaký byl počet parazitů, a kladou důraz na to, že tuto informaci uvedli pouze pro úplnost.

Killick-Kendrick *et al.* (1996) našli metacyklické promastigoty *L. (L.) tropica* ve slinných žlázách *Ph. duboscqi* (nejedná se však o přirozeného vektora *L. (L.) tropica*). Paraziti byli pozorováni ve slinách u celkem 31 samic v období 9 až 21 dní od infekce. U 22 samic byla zřejmě infikována pouze jedna slinná žláza. Pouze tři samice měly prokazatelně infekci v obou žlázách. Autoři bohužel nikde neuvádějí přesný, dokonce ani přibližný počet studovaných flebotomů; v závěru výsledků pouze zmiňují, že žádní paraziti nebyli pozorováni ve slinách u mnoha set samic, a tak byla celková prevalence ve slinných žlázách poměrně nízká. Většina prozkoumaných žláz obsahovala pouze do 5 parazitů, pět jich obsahovalo 6 až 10, dvě 11 až 15 a šest žláz mělo v sobě více než 20 metacyklů. Celkem dvacet čtyři ze všech samic s infikovanými žlázami mělo zároveň i silné infekce SV a thorakálního mesenteronu, osmnáct z nich také vykazovalo přítomnost abnormálně velkého počtu metacyklických promastigotů. Autoři shrnují dva možné způsoby, jak se leishmanie mohou dostat do slinných žláz flebotoma: penetrací stěny thorakálního mesenteronu, přiléhající ke žlázám, nebo skrz slinný kanál – to by však musela být infekce přítomna i v proboscis. Za pravděpodobnější proto autoři považují první možnost. Uvádějí hypotézu, že ač přítomnost ve slinných žlázách podle všeho není obligátní součástí vývoje leishmanií ve vektorech, může být parazitům velmi prospěšná z hlediska jejich inokulace do hostitele přímo ve slinách, které hrají důležitou roli v uchycení infekce v obratlovčím hostiteli. Slinné žlázy jsou bohužel při pitvách zkoumány jen zřídka, a tak nelze říci, nakolik je tento fenomén častý, zda není infekce slinných žláz pouze náhodná a zda může ve vývoji v přenašeči hrát nějakou zásadnější roli.

Freitas *et al.* (2002) ovšem poskytli další podporu hypotézy, že infekce ve slinných žlázách může být běžnou součástí životního cyklu leishmanií. Ve své studii diverzity druhů přenašečů v brazilském regionu Amapá našli promastigoty (bohužel typ buněk ani druh parazita dále nespecifikují, pouze uvádějí, že šlo patrně o rod *Leishmania*) ve slinných žlázách a také stomodeu 13 z 21 samic se silnými parazitárními infekcemi v mesenteronu. Celkem bylo z 60 pitvaných nakažených lutzomyií nalezeno 18 samic s infikovanými slinnými žlázami. Autoři navrhují pitvy většího množství odchycených nakažených samic pro zjištění, zda se skutečně jedná o normální část vývoje leishmanií ve flebotomech.

## 5.7 Jaké faktory mohou ovlivnit vývoj leishmanií ve flebotomech?

Průběh vývoje v přenašeči ovšem nezávisí pouze na příslušnosti parazita k podrodu či komplexu, pro nějž je určitý typ vývoje typický; může být ovlivněn i řadou dalších podmínek (druhem vektora, teplotou, sáním cukerných roztoků).

Jedním z důležitých faktorů je druh přenašeče. Při experimentálních infekcích jihoamerických flebotomů *Lu. longipalpis* a *Lu. renei* běžně suprapylárními parazity původem ze střední a Severní Ameriky či Eurasie – *L. (L.) major*, *L. (L.) donovani* a *L. (L.) mexicana* – invadovaly leishmanie proctodeum zhruba stejně jako běžně peripylárně se vyvíjející druhy (Schlein 1986). Autor navrhl vysvětlení, že lokalizace v proctodeu parazity chrání před účinky trávicích enzymů v mesenteronu „jím neznámého“ flebotoma. Zmiňoval též možný vliv cukerných roztoků sátých po sání infikované krve, který je třeba prozkoumat.

Na průběh vývoje může mít značný vliv i teplota; vyšší teplota zpravidla urychluje trávení krve u flebotomů, a tak mají leishmanie na svůj vývoj méně času. Hlaváčová (2011) ve své diplomové práci studovala mj. vliv teploty na vývoj leishmanií *L. (V.) braziliensis* a *L. (V.) peruviana*. U podhorského druhu *L. (V.) peruviana* docházelo ke ztrátě většiny infekcí po defekaci při teplotě 26 stupňů Celsia; při 20 stupních probíhal vývoj normálně. U spíše pralesního druhu *L. (V.) braziliensis* se lépe vyvíjely leishmanie za 26 stupňů, ale při 20 stupních Celsia byly infekce sníženy jen velmi mírně.

Añez *et al.* (1989) testovali jak vliv teploty, tak vliv sátého cukerného roztoku při svém studiu vývoje *L. (L.) amazonensis* v *Lu. youngi* při teplotách 22, 25 a 28 stupňů Celsia a 30% roztoky sacharosy, fruktosy a maltosy (předešlé pokusy s touto dvojicí běžně probíhaly s teplotou 25 stupňů Celsia a 50% roztokem sacharosy). Došli k překvapivému pozorování: Za všech podmínek mimo 25/28 stupňů Celsia a sacharosy se paraziti tohoto běžně suprapylárně se vyvíjejícího druhu vyskytovali pět dní po infekčním sání, kdy proběhly pitvy celkem 407 samic, také v pyloru. U samic sajících roztoky fruktosy a maltosy byly rovněž (mimo teploty 28 stupňů) detekovány infekce malphigických trubic a posteriorního mesenteronu, přičemž posteriorní mesenteron obsahoval leishmanie také u skupiny se sacharosou za 22 stupňů Celsia. Přítomnost parazitů v určité části trávicího traktu byla zaznamenána pouze tehdy, nacházeli-li se tam ve větších počtech přichycení promastigoti, nelze tedy namítat, že tyto výsledky mohly způsobit jednotlivé leishmanie, neúspěšné při anteriorní migraci.

Značí zřejmý přechod k peripylárnímu vývoji u běžně suprapylárních parazitů, že fáze v proctodeu je evolučně původní a při zhoršení podmínek dochází k jejímu návratu? Tomu, že nešlo pouze o parazity neschopné se v daných podmínkách vyvíjet, čekající na defekaci, by nasvědčovalo právě jejich přichycení ke stěně střeva. Je-li však vývoj zahrnující proctodeum (peri- či hypopylární) původní, čemuž nasvědčuje jeho přítomnost u rodu *Endotrypanum*, muselo dojít k jeho ztrátě nejméně dvakrát – u suprapylárně se vyvíjejících *paraleishmanií* a u linie *euleishmanií* po odštěpení podrodu *Viannia*. Příslušníci podrodu *Sauroleishmania* by pak hypopylární vývoj získali druhotně – vzhledem k extrémně nízkému počtu a značnému stáří prací zabývajících se touto skupinou by ale nemuselo být příliš překvapivé, kdyby se ukázalo, že se hypopylární způsob nemusí vyskytovat u všech *sauroleishmanií* nebo za všech podmínek. Významný vliv změny vnějších podmínek na průběh vývoje nám také ukazuje, že zařadit leishmanii k určitému typu na základě malého množství studií nemusí být úplně správný krok.

## Závěr

O průběhu vývoje leishmanií ve vektorech je v současné době již známo poměrně dost, zejména u podrodů *Leishmania* a *Viannia*. Ostatní skupiny zůstávají spíše na okraji zájmu. Je dobře podloženo, že podrod *Leishmania* podstupuje suprapylární vývoj (byť může být změněn některými vnějšími faktory) a podrod *Viannia* má vývoj peripylární. Podrod *Sauroleishmania* se dle většiny studií vyvíjí buď výhradně, nebo převážně hypopylárně, i když nálezy sauroleishmanií v okolí stomodeální valvy vnášejí do tohoto předpokladu značnou nejistotu. *Endotrypanum* se vyvíjí buďto peri-, nebo hypopylárně; potvrzeno dosud není ani jedno. Paraleishmanie, tedy leishmanie fylogeneticky příbuznější *Endotrypanum* než ostatním leishmaniím, mají minimálně dva typy vývoje – supra- a peripylární; u některých z nich však průběh vývoje v přenašeči stále neznáme.

Také mnohé další otázky zůstávají nezodpovězené. Může v přenosu leishmanií hrát roli přítomnost promastigotů ve slinných žlázách? Odpovídá současný pohled na fylogenezi leishmanií evoluci vývoje v přenašeči, a pokud ano, jaký typ vývoje byl původní po vzniku dvouhostitelského cyklu? Jaké je postavení paraleishmanií? Do jaké míry ovlivňují způsob vývoje ve flebotomovi vnější podmínky?

Ve své diplomové práci bych se ráda věnovala experimentálnímu studiu vývoje méně prozkoumaných druhů leishmanií (zejména zástupců podrodu *Sauroleishmania*, paraleishmanií a rodu *Endotrypanum*) v přenašečích, což umožní hlubší pohled na evoluci leishmanií, jejich koevoluci s flebotomy a rozdílné způsoby vývoje a přenosu u této skupiny. Ráda bych se při tom pokusila zodpovědět alespoň některé z výše položených otázek.



## Seznam referenci

- ADLER, S. & THEODOR, O. Observations on *Leishmania ceramodactyli*. N. SP. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 22, 343-356 (1929).
- ADLER, S. & THEODOR, O. Investigations on Mediterranean Kala Azar. X.--A Note on *Trypanosoma platydactyli* and *Leishmania tarentolae*. *Royal Society of London Proceedings Series B*, 116, 543-544 (1935).
- ADLER, S. *Leishmania*. *Advances in Parasitology* 2, 35-96 (1964).
- AÑEZ, N., NIEVES, E., CAZORLA, D. 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, 634-635 (1989).
- AÑEZ, N., TANG, Y., ROJAS, A., CRISANTE, G., KILLICK-KENDRICK, M., KILLICK-KENDRICK, R. Detection of amastigote-like forms in the valve of *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania major*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 495-498 (2003).
- ARIAS, J. R. & DE FREITAS, R. A. Sobre os vetares de leishmaniose cutanea na Amazonia central do Brasil. 2: incidencia de flagelados em flebotomos selváticos. *Acta Amazônica* 8, 387-396 (1978)
- via DE FREITAS, R. A., NAIFF, R. D., BARRETT, T. V. Species diversity and flagellate infections in the sand fly fauna near Porto Grande, state of Amapá, Brazil (Diptera: Psychodidae. Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 53-59 (2002).
- ARIAS, J. R., MILES, M. A., NAIFF, R. D., POVOA, M. M., DE FREITAS, R. A., BIANCARDI, C. B., CASTELLON, E. G. Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): Isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34, 1098-1108 (1985).
- ASATO, Y., OSHIRO, M., MYINT, C. K., YAMAMOTO, Y. I., KATO, H., MARCO, J. D., MIMORI, T., GOMEZ, E. A. L., HASHIGUCHI, Y., UEZATO, H. Phylogenic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome *b* gene sequencing. *Experimental Parasitology* 121, 352-361 (2009).
- AZAR, D. & NEL, A. Fossil psychodoid flies and their relation to parasitic diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 35-37 (2003).
- BARBOSA, A. F., OLIVEIRA, S. M., BERTHO, Á. L., FRANCO, A. M., RANGEL, E. F. Single and concomitant experimental infections by *Endotrypanum* spp. and *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the Neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101, 851-856 (2006).
- BARROS, V. C., OLIVEIRA, J. S., MELO, M. N. & GONTIJO, N. F. *Leishmania amazonensis*: chemotactic and osmotactic responses in promastigotes and their probable role in development in the phlebotomine gut. *Experimental Parasitology* 112, 152-7 (2006).

- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology* 37, 1097-1106 (2007).
- BERDJANE-BROUK, Z., KONÉ, A. K., DJIMDÉ, A. A., CHARREL, R. N., RAVEL, C., DELAUNAY, P., DEL GUIDICE, P., IZRI, A. First Detection of *Leishmania major* DNA in *Sergentomyia (Spelaemyia) darlingi* from Cutaneous Leishmaniasis Foci in Mali. *PLoS One* 7, e28266 (2012).
- BRITTON, S. W. & ATKINSON, W. E. Poikilothermism in the sloth. *Journal of Mammalogy* 19, 94-99 (1938).
- CHAJBULLINOVÁ, A., VOTÝPKA, J., SÁDLOVÁ, J., KVAPILOVÁ, K., ŠEBLOVÁ, V., KREISINGER, J., JIRKŮ, M., VOLF, P. The development of *Leishmania turanica* in sand flies and competition with *L. major*. *Parasites & Vectors* 5, 219 (2012).
- CHRISTENSEN, H. A., & HERRER, A. Neotropical sand flies (Diptera: Psychodidae), invertebrate hosts of *Endotrypanum schaudinni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Journal of Medical Entomology* 13, 299-303 (1976).
- COUTINHO, M. T. Z., BUENO, L. L., STERZIK A., FUJIWARA, R. T., BOTELHO, J. R., DE MARIA, M., GENARO, O., LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 128, 149-155 (2005).
- COUTINHO, M. T. Z. & LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Veterinary Parasitology* 147, 320-325 (2007).
- CROAN, D. & ELLIS, J. Phylogenetic relationships between *Leishmania*, *Viannia* and *Sauroleishmania* inferred from comparison of a variable domain within the RNA polymerase II largest subunit gene. *Molecular and Biochemical Parasitology* 79, 97-102 (1996).
- CROAN, D. G., MORRISON, D. A., ELLIS, J. T. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology* 89, 149-159 (1997).
- CUPOLILLO, E., PEREIRA, L. O., FERNANDES, O., CATANHO, M. P., PEREIRA, J. C., MEDINA-ACOSTA, E., GRIMALDI JR, G. Genetic data showing evolutionary links between *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93, 677-683 (1998).
- CUPOLILLO, E., MEDINA-ACOSTA, E., NOYES, H., MOMEN, H., GRIMALDI JR, G. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today* 16, 142-143 (2000).
- DANTAS-TORRES, F., LORUSSO, V., TESTINI, G., DE PAIVA-CAVALCANTI, M., FIGUEREDO, L. A., STANNECK, D., MENCKE, N., BRANDÃO-FILHO, S. P., ALVES, L. C., OTRANTO, D. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitology Research* 106, 857-860 (2010).
- DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends in Parasitology* 27, 155-159 (2011).

- DEANE, M. P. & JANSEN, A. M. From a mono to a digenetic life-cycle: how was the jump for flagellates of the family trypanosomatidae? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 83, 273-275 (1988).
- DOUGALL, A. M., ALEXANDER, B., HOLT, D. C., HARRIS, T., SULTAN, A. H., BATES, P. A., ROSE, K., WALTON, S. F. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *International Journal for Parasitology* 41, 571-579 (2011).
- FERNANDES, A. P., NELSON, K., BEVERLEY, S. M. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 11608-11612 (1993).
- FRAGA, J., MONTALVO, A. M., DE DONCKER, S., DUJARDIN, J. C., VAN DER AUWERA, G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution* 10, 238-245 (2010).
- FRANCO, A., RAMOS, M., TESH, R. B., GUZMAN, H., DEANE, M. P., GRIMALDI, G. Development of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in experimentally infected phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 34, 189-192 (1997).
- FRANCO, A. M. R. & GRIMALDI JR, G. Characterization of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a unique parasite infecting the neotropical tree sloths (Edentata). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94, 261-268 (1999).
- FREITAS, R. A., NAIFF, R. D., BARRETT, T. V. Species diversity and flagellate infections in the sand fly fauna near Porto Grande, state of Amapá, Brazil (Diptera: Psychodidae. Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 53-59 (2002).
- FURUYA, M., SHIRAISHI, M., AKIMARU, Y., MIMORI, T., GOMEZ L, E. A., & HASHIGUCHI, Y. Natural infection of *Lutzomyia hartmanni* with *Leishmania (Viannia) equatorensis* in Ecuador. *Parasitology International* 47, 121-126 (1998).
- GEMETCHU, T. The morphology and fine structure of the midgut and peritrophic membrane of the adult female, *Phlebotomus longipes* Parrot and Martin (Diptera: Psychodidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 68, 111-124 (1974).
- GOSSAGE, S. M., ROGERS, M. E., BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology* 33, 1027-1034 (2003).
- GRIMALDI JR, G., KREUTZER, R. D., HASHIGUCHI, Y., GOMEZ, E. A., MIMORY, T., TESH, R. B. Description of *Leishmania equatorensis* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 87, 221-228 (1992).
- HANLEY, C. S., SIUDAK-CAMPFIELD, J., PAUL-MURPHY, J., VAUGHAN, C., RAMIREZ, O., KEULER, N. S., SLADKY, K. K. Immobilization of free-ranging hoffmann's two-toed and brown-throated three-

- toed sloths using ketamine and medetomidine: a comparison of physiologic parameters. *Journal of Wildlife Diseases* 44, 938-945 (2008).
- HENNIG, W. Insektenfossilien aus der unteren Kreide. IV. Psychodidae (Phlebotominae) mit einer kritischen Uebersicht über das phylogenetische System der Familie und die bisher beschriebenen Fossilien (Diptera). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde* 241, 169 (1972) via LUKASHEVICH, E. D., & MOSTOVSKI, M. B. Hematophagous insects in the fossil record. *Paleontological Journal C/C of Paleontologicheskii Zhurnal* 37, 153-161 (2003).
- HLAVÁČOVÁ, J. Vývoj leishmanií podrodu *Viannia* v přenašeči. *Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta* (2011).
- JANSEN, A. M., CARREIRA, J. C., DEANE, M. P. Infection of a mammal by monogenetic insect trypanosomatids (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 83, 271-272 (1988).
- JIRKŮ, M., YURCHENKO, V. Y., LUKEŠ, J., MASLOV, D. A. New species of insect trypanosomatids from Costa Rica and the proposal for a new subfamily within the Trypanosomatidae. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59, 537-547 (2012).
- JOHNSON, P. T. & HERTIG, M. Behavior of *Leishmania* in Panamanian phlebotomine sandflies fed on infected animals. *Experimental Parasitology* 27, 281-300 (1970).
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology* 22, 439-445 (2006).
- KERR, S. F. Palaearctic origin of *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95, 75-80 (2000).
- KILLICK-KENDRICK, R., KILLICK-KENDRICK, M., TANG, Y., BASTIEN, P. Metacyclic promastigotes of *Leishmania* in the salivary glands of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite* 3, 55-60 (1996).
- KREDEL, F. E. Note on the temperature of the sloth. *Journal of Mammalogy*, 9, 48-51 (1928).
- KREUTZER, R. D., CORREDOR, A., GRIMALDI JR, G., GROGL, M., ROWTON, E. D., YOUNG, D. G., MORALES, A., MCMAHON-PRATT, D., GUZMAN, H., TESH, R. B. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44, 662-676 (1991).
- LAINSON, R., WARD, R. D., SHAW, J., LAINSON, R., WARD, R. D., SHAW, J. J. *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 (1977).
- LAINSON, R. & SHAW, J. J. New world leishmaniasis. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*, 313-349 (2005).

- LANE, R. P. Sandflies (phlebotominae). *Medical Insects and Arachnids, Chapman & Hall, London*, 78-119 (1993).
- LAWYER, P. G., YOUNG, D. G., BUTLER, J. F., AKIN, D. E. Development of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 24, 347-355 (1987).
- LAWYER, P. G. & PERKINS, P. V. Leishmaniasis and trypanosomiasis. *Medical Entomology-A test on Public Health and Veterinary Problems caused by Arthropods* 231-298 (2000).
- LEWIS, D. J. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera, Psychodidae). *British Museum (Natural History)*, (1982) via KERR, S. F. Palearctic origin of *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95, 75-80 (2000).
- MASLOV, D. A., VOTÝPKA, J., YURCHENKO, V., LUKEŠ, J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends in Parasitology* 29, 43-52 (2013).
- MOLYNEUX, D. H., KILLICK-KENDRICK, R., ASHFORD, R. W. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. III. The ultrastructure of *Leishmania mexicana amazonensis* in the midgut and pharynx of *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 341-357 (1975).
- MOMEN, H. & CUPOLILLO, E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95, 583-588 (2000).
- MYŠKOVÁ J., SVOBODOVÁ M., BEVERLEY S. M., VOLF P. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes & Infections* 9, 317-24 (2007).
- NAIFF, R. D., FREITAS, R. A., NAIFF, M. F., ARIAS, J. R., BARRET, T. V., MOMEN, H., GRIMALDI JR, G. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86, 317-321 (1991).
- NIEVES, E. & PIMENTA, P. F. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 37, 134-140 (2000).
- NOYES, H. A., CAMPS, A. P., CHANCE, M. L. *Leishmania herreri* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) is more closely related to *Endotrypanum* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) than to *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 80, 119-123 (1996).
- NOYES, H. A., ARANA, B. A., CHANCE, M. L., MAINGON, R. The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania*: Their classification and evidence for a neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 44, 511-517 (1997).
- NOYES, H. Implications of a Neotropical origin of the genus *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93, 657-662 (1998).

- NOYES, H., PRATLONG, F., CHANCE, M., ELLIS, J., LANOTTE, G., DEDET, J. P. 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, 17-24 (2002).
- PARROT, L. Nouvelles recherches sur l'évolution de *Leishmania tarentolae* chez *Phlebotomus minutus* Rondani. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* (1935) via ADLER, S. *Leishmania. Advances in Parasitology* 2, 35-96 (1964).
- PARVIZI, P. & AMIRKHANI, A. Mitochondrial DNA characterization of *Sergentomyia sintoni* populations and finding mammalian *Leishmania* infections in this sandfly by using ITS-rDNA gene. *Iranian Journal of Veterinary* 9, 10-18 (2008).
- POINAR JR, G. *Lutzomyia adiketis* sp. n. (Diptera: Phlebotomidae), a vector of *Paleoleishmania neotropicum* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Dominican amber. *Parasites & Vectors* 1, 1-8 (2008).
- RANGEL, E. F., BARBOSA, A. F., ANDRADE, C. A., SOUSA, N. A., WERMELINGER, E. D. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 in *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) under experimental conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 87, 235-238 (1992).
- RASHTI, M. S. & MOHEBALI, M. Natural promastigote infection of *Sergentomyia sintoni*, its seasonal variation and reservoir host in Turkemen Sahapa Iran. *Iranian Journal of Public Health* 23, 1-4 (1994).
- RASSI, Y., JAVADIAN, E., NADIM, A., TAHVILDAR-BIDRUNI, G. Natural promastigote infection of sandflies and its first occurrence in *Sergentomyia dentata* in Ardabil province, North West of Iran. *Iranian Journal of Public Health* 26, 1-2 (1997).
- ROGERS, M. E., CHANCE, M. L., BATES, P. A. 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, 495-507 (2002).
- ROGERS, M. E., HAJMOVÁ, M., JOSHI, M. B., SÁDLOVÁ, J., DWYER, D. M., VOLF, P., & BATES, P. A. *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cellular microbiology* 10, 1363-1372 (2008).
- ROSE, K., CURTIS, J., BALDWIN, T., MATHIS, A., KUMAR, B., SAKTHIANANDESWAREN, A., SPURCK, T., LOW CHOY, J., HANDMAN, E. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. *International Journal for Parasitology* 34, 655-664 (2004).
- SACKS, D. L., PIMENTA, P. F., MCCONVILLE, M. J., SCHNEIDER, P., TURCO, S. J. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *The Journal of Experimental Medicine* 181, 685-697 (1995).

- SÁDLOVÁ, J., REISHIG, J., VOLF, P. Prediuresis in female *Phlebotomus* sandflies (Diptera: Psychodidae). *European Journal of Entomology* 95, 643-647 (1998).
- SÁDLOVÁ, J. The life history of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae* 63, 331-366 (1999).
- SÁDLOVÁ, J. & VOLF, P. Occurrence of *Leishmania major* in sandfly urine. *Parasitology* 118, 455-460 (1999).
- SÁDLOVÁ, J., HAJMOVÁ, M., VOLF, P. *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* vector competence for *Leishmania major* and *Le. tropica*. *Medical and Veterinary Entomology* 17, 244-250 (2003).
- ŠEBLOVÁ, V., SÁDLOVÁ, J., CARPENTER, S., VOLF, P. Development of *Leishmania* parasites in *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae) and implications for screening vector competence. *Journal of Medical Entomology* 49, 967-970 (2012).
- SECUNDINO, N. F. C., EGER-MANGRICH, I., BRAGA, E. M., SANTORO, M. M., PIMENTA, P. F. P. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *Journal of Medical Entomology* 42, 928-938 (2005).
- \* SHATOVA, S. M., SAF'IANOVA, V. M., OVEZMUKHAMMEDOV, A. [An experimental study of the interrelations of *Leishmania (Sauroleishmania) gymnodactyli* and the sandfly *Sergentomyia arpaklensis* (Diptera: Phlebotominae)]. *Parazitologiya* 25, 110 (1991).
- SHAW, J. J. The haemoflagellates of sloths. *London School of Hygiene and Tropical Medicine* (1969).
- SHAW, J. J. The behaviour of *Endotrypanum schaudinni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in three species of laboratory-bred Neotropical sandflies (Diptera: Psychodidae) and its influence on the classification of the genus *Leishmania* [*Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia furcata*]. *Special publication Society of Protozoologists*, 232-241 (1981).
- SHAW, J. J. Ecological and evolutionary pressures on leishmanial parasites. *Brazilian Journal of Genetics* 20 (1997).
- SCHLEIN, Y. Sandfly diet and *Leishmania*. *Parasitology Today* 2, 175-177 (1986).
- TESH, R. B. & GUZMAN, H. Sand flies and the agents they transmit. *The Biology of Disease Vectors*, University Press of Colorado, USA, 117-127 (1996).
- VOLF, P., HAJMOVÁ, M., SÁDLOVÁ, J., VOTÝPKA, J. Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International Journal for Parasitology* 34, 1221-1227 (2004).
- VOLF, P. & MYŠKOVÁ, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends in Parasitology* 23, 91 (2007).
- WALTERS, L. L., MODI, G. B., CHAPLIN, G. L., TESH, R. B. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 41, 295-317 (1989a).

- WALTERS, L. L., CHAPLIN, G. L., MODI, G. B., TESH, R. B. Ultrastructural biology of *Leishmania (Viannia) panamensis* (= *Leishmania braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40, 19-41 (1989b).
- YURCHENKO, V. Y., LUKEŠ, J., JIRKU, M., ZELEDÓN, R., MASLOV, D. A. *Leptomonas costaricensis* sp. n. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae), a member of the novel phylogenetic group of insect trypanosomatids closely related to the genus *Leishmania*. *Parasitology* 133, 537-546 (2006).
- ZELEDÓN, R., PONCE, C., MURILLO, J. *Leishmania herreri* sp. n. from sloths and sandflies of Costa Rica. *The Journal of Parasitology* 65, 275-279 (1979).

\* u této práci pouze abstrakt (celá práce je dostupná pouze v ruském jazyce)