

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Blanka Ferencová

**Leishmanióza u domácích a divokých zvířat**

**Leishmaniasis in domestic and wild animals**

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Iva Kolářová, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

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

V Praze, dne 14. 05. 2014

.....

### **Poděkování**

Děkuji své školitelce za vedení mé bakalářské práce a cenné rady, kterými přispěla k jejímu sepsání. Dále bych ráda poděkovala své rodině, příteli a kamarádům za obrovskou podporu nejen při psaní této práce, ale i v průběhu celého bakalářského studia.

## ABSTRAKT

Leishmanióza je infekční onemocnění postihující široké spektrum obratlovců včetně člověka. *Leishmania donovani* je původcem její nejméně závažnější formy, viscerální leishmaniózy. Dosud u tohoto parazita nebyl prokázán zvířecí rezervoár a člověk je považován za jediný zdroj nákazy. Zoonotický přenos je však potvrzen u druhu *Leishmania infantum*, jež spolu s *L. donovani* a *L. archibaldi* tvoří *L. donovani* komplex. Řada druhů domácích i divokých zvířat žijících v okolí lidských obydlí je proto testována na přítomnost leishmaniové DNA či anti-leishmaniových protilátek, v naději na odhalení rezervoárového hostitele v životním cyklu *L. donovani*. Sensitivita a specificita použitých metod zásadně ovlivňuje výsledky prováděných studií. Nezanedbatelný vliv na výskyt onemocnění má i samotná přítomnost jednotlivých druhů zvířat, jež tvoří oblíbený zdroj potravy pro přenašeče. Pochopení ekologických interakcí přenosu parazita mezi přenašečem, člověkem a domácími či divokými zvířaty by mohlo vést k účinnějším opatřením snižujícím prevalenci leishmaniózy v endemických oblastech.

**Klíčová slova:** *Leishmania donovani*, viscerální leishmanióza, rezervoár, domácí zvířata, divoká zvířata

## ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious disease affecting a wide range of vertebrates, including humans. *Leishmania donovani* is the causative agent of its most severe form - visceral leishmaniasis. So far animal reservoir has not been proven in the life cycle of this parasite and a man is regarded as the only source of infection. However, zoonotic transmission is demonstrated in the species *Leishmania infantum*, which together with *L. donovani* and *L. archibaldi* belongs into *L. donovani* complex. A lot of domestic and wild animals living near human dwellings are therefore tested for the presence of *Leishmania* DNA or anti-*Leishmania* antibodies, hoping to uncover reservoir host in the life cycle of *L. donovani*. Sensitivity and specificity of the methods significantly affects the results of undertaken studies. The animals play a significant role in the epidemiology of the disease also as a significant blood source for the vectors. Understanding the ecological interactions between parasite, vector, man, domestic and wild animals could lead to more effective transmission control, thus reducing incidence of leishmaniasis in endemic foci.

**Key words:** *Leishmania donovani*, visceral leishmaniasis, reservoir, domestic animals, wild animals

## SEZNAM ZKRATEK

<b>BMAP</b>	Bovine myeloid antimicrobial peptide (Hovězí myeloidní antimikrobiální peptid)
<b>DAT</b>	Direct agglutination test (Přímý aglutinační test)
<b>DDT</b>	Dichlordifenyltrichlorethan
<b>DNA</b>	Deoxyribonukleová kyselina
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>IFAT</b>	Immunofluorescence antibody test (Imunofluorescenční protilátkový test)
<b>ITS1</b>	Internal transcribed spacer 1
<b>L.</b>	<i>Leishmania</i>
<b>MLEE</b>	Multilocus enzyme electrophoresis (Multilokusová enzymatická elektroforéza)
<b>P.</b>	<i>Phlebotomus</i>
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction (Polymerázová řetězová reakce)
<b>PKDL</b>	Post-kala-azar dermal leishmaniasis (Post-kala-azar kožní leishmanióza)
<b>RAPD</b>	Random amplified polymorphic DNA (Náhodně amplifikovaná polymorfnní DNA)
<b>RFLP</b>	Restriction fragment length polymorphism (Polymorfismus délky restričních fragmentů)
<b>RH</b>	Reservoir host (Rezervoárový hostitel)
<b>WHO</b>	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

## Obsah

1.	ÚVOD.....	1
2.	REZERVOÁROVÝ HOSTITEL.....	2
3.	VLIV VÝSKYTU ZVÍŘAT V BLÍZKOSTI LIDSKÝCH OBYDLÍ NA PŘENOS <i>L. DONOVANI</i> MEZI LIDMI....	4
	Preference sání.....	4
	Líhnutí a vývoj přenašeče .....	5
4.	METODY DETEKCE <i>LEISHMANIA DONOVANI</i> .....	6
	A) Detekce protilátek .....	6
	DAT (Direct agglutination test) .....	7
	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) .....	7
	IFAT (Indirect fluorescent antibody test).....	8
	B) Detekce parazita .....	8
	PCR (Polymerase chain reaction) .....	8
	Další metody .....	10
5.	DOMÁCÍ ZVÍŘATA.....	11
	Psi.....	13
	Kozy.....	14
	Ovce .....	14
	Osli .....	14
	Drůbež.....	14
	Velbloudi .....	15
6.	DIVOKÁ ZVÍŘATA.....	18
	Psovité šelmy.....	18
	Hlodavci.....	19
	Vačnatci .....	20
	Promykovití .....	20
7.	ROZDÍLNÁ OPATŘENÍ V PŘENOSU ANTROPONOTICKÉ A ZOONOTICKÉ LEISHMANIÓZY .....	23
8.	ZÁVĚR .....	25
9.	POUŽITÁ LITERATURA .....	26

## 1. ÚVOD

Leishmanióza je infekční onemocnění, které způsobuje přibližně 21 různých druhů rodu *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Medicínsky a veterinárně významným přenašečem jsou infikované samice dvoukřídlého hmyzu rodu *Phlebotomus* ve Starém světě a rodu *Lutzomyia* v Novém světě. Onemocnění se vyskytuje ve více než 88 zemích, z nichž 72 patří k rozvojovým státům tropů a subtropů. Naprostá většina případů pochází z Brazílie, Indie, Nepálu, Súdánu a Bangladéše. Přibližně 350 mil lidí žije v oblastech s vysokým rizikem nákazy. Každý rok je hlášeno zhruba 1,3 mil nových případů (Alvar et al., 2012).

Lidské leishmaniózy se podle klinických příznaků tradičně dělí na tři typy: kutánní, muko-kutánní a viscerální. Typickým projevem kutánní formy jsou samovolně se hojící kožní léze. Pro mukokutánní leishmaniózu je kromě poškození kůže příznačná destrukce slizniční tkáně, nejčastěji v oblasti nosohltanu. Nejzávažnějším typem je forma viscerální (nazývána také kala-azar). Infikovaný člověk je sužován horečkami, hepato-splenomegalií, ztrátou váhy, anémií a celkovým oslabením organismu. Téměř 95 % takovýchto pacientů bez poskytnutí léčby umírá. V některých případech dochází i po úplném uzdravení k relapsu. Tento stav je označován jako post-kala-azar kožní leishmanióza (PKDL) (WHO 2010).

Jednotlivé typy leishmanióz se liší specifickým druhem patogena (*Leishmania*) zodpovědného za průběh onemocnění. Původcem viscerální leishmaniózy, již se budu dále ve své práci zabývat, jsou druhy z komplexu *Leishmania donovani*. Tvoří je druhy *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), *L. donovani* a *L. archibaldi*. *Leishmania infantum* postihuje především děti a imunosuprimované jedince. Vyskytuje se v Novém i Starém světě. Medicínsky významným rezervoárem nákazy jsou domestikovaní psi. *Leishmania archibaldi* je rozšířena zejména na africkém kontinentu. O jejím rezervoáru není mnoho známo. Existují však případy infikovaných lidí, psů i hlodavců. *Leishmania donovani* je přítomna pouze ve Starém světě a infikuje všechny věkové skupiny. Dosud je její přenos považován za antroponotický (Chappuis et al., 2007).

Cíle této práce jsou:

- 1) Zpracovat dostupnou literaturu zaměřenou na možný zvířecí rezervoár *Leishmania donovani* a porovnat jej se současnými poznatky o rezervoáru *Leishmania infantum*.
- 2) Zhodnotit vlivy výskytu zvířat v blízkosti lidských obydlí na možnou infekci člověka.
- 3) Diskutovat rozdílnost ochranných opatření u leishmaniózy se zoonotickým a antroponotickým přenosem

## 2. REZERVOÁROVÝ HOSTITEL

V současnosti neexistuje jedna obecně uznávaná definice pojmu rezervoárový hostitel (dále jen RH). Navzdory tomu jsou uváděna jistá kritéria, která by měl RH splňovat (Chaves et al., 2007).

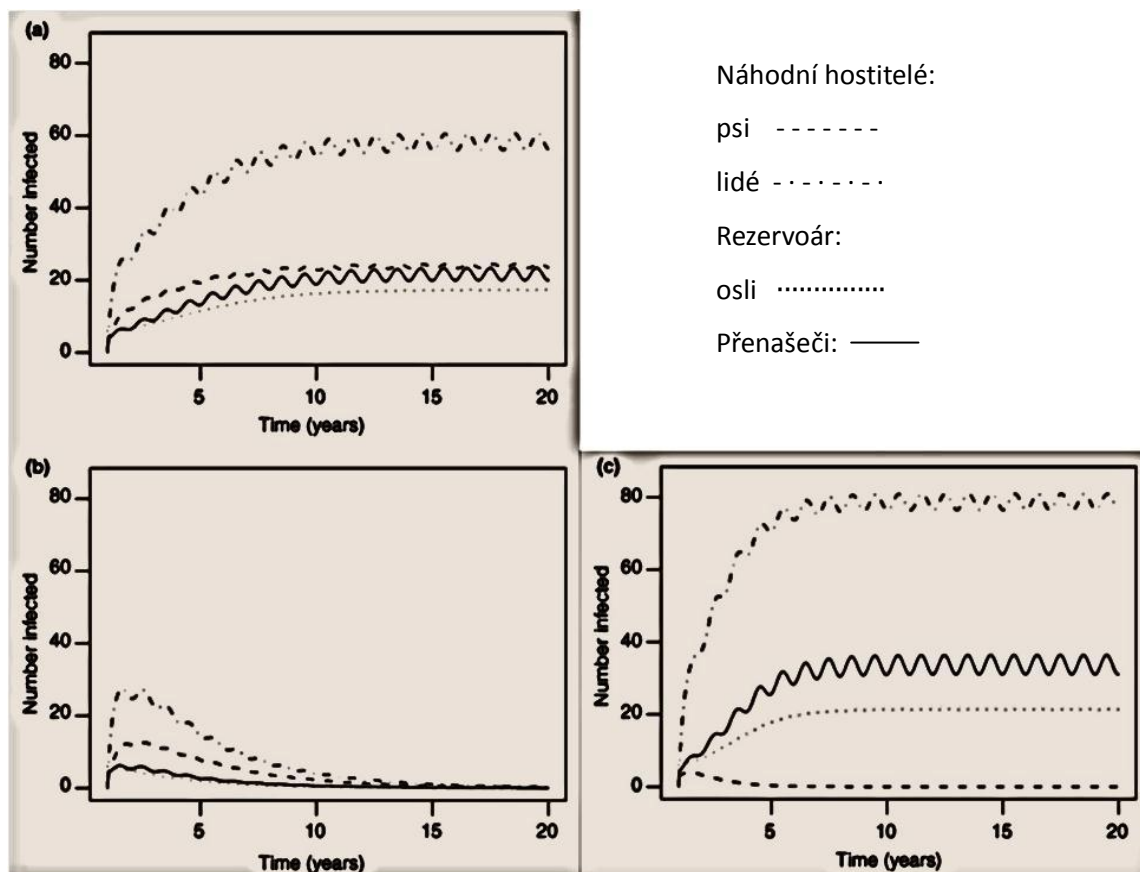
- *je dostatečně početný a relativně dlouhověký, aby mohl poskytnout významný zdroj potravy (krve) pro přenašeče (WHO 2010)*
- *poměr jedinců, infikovaných během svého života je značný a překračuje mez 20 % (Silva et al., 2005)*
- *paraziti jsou přítomni v kůži nebo v krvi v dostatečném množství, aby mohlo docházet k jejich snadnému přenosu na přenašeče (Silva et al., 2005)*
- *nezbytný je intenzivní kontakt mezi hostitelem a přenašečem (WHO 2010)*
- *infekce hostitele je dostatečně dlouhá a nepatogenní, aby dovolila parazitům přežít sezónu, během níž k přenosu nedochází (WHO 2010)*
- *izolát parazita v hostiteli se shoduje s druhem infikujícím člověka (Silva et al., 2005)*

Shaw, 1988 rozlišuje rezervoár primární a sekundární. Primárním rezervoárem jsou druhy umožňující dlouhodobé přežití parazita v ekosystému. Sekundární rezervoár tvoří hostitelé, jež jsou zdrojem infekce pro přenašeče, ale sami nejsou schopni trvale udržet jeho biologický cyklus. Ashford, 1996 kromě rozdělení rezervoáru na primární a sekundární dále zavádí pojmy náhodný a tzv. „liaison host“ (nejedná se však již o rezervoár). Náhodní hostitelé jsou infikovaní jedinci, kteří v přírodě zdroj nákazy netvoří, ale mohou se účastnit příležitostného přenosu parazitů. „Liaison host“ je definovaný jako hostitel, který umožní přenos infekce na lidi tím, že se vyskytuje v jejich blízkosti. Haydon et al., 2002 naopak považuje za rezervoár všechny hostitele schopné přenosu parazita, nezávisle na jejich významu v jeho dlouhodobém udržení v ohnisku. Podle něj by vyloučením sekundárních a náhodných hostitelů z definice RH vznikl problém při případné eradikaci infekce. V případě eliminace populace pouze primárního RH z ohniska nákazy by zřejmě nikdy nemohlo dojít k úplné eradikaci, díky zachování sekundárních a náhodných hostitelů. Naopak podle Ashford, 1996 pro úplné vymýcení infekce v ohnisku postačí eliminace primárního RH.

Jednou z možností, jak prokázat RH je posouzení situace z hlediska ekologické nebo populační dynamiky. K tomu nám slouží matematické modely, pomocí nichž lze znázornit, že rezervoárem mohou být pouze druhy, u nichž existuje dynamická zpětná vazba vůči ostatním náhodným hostitelům, zprostředkovaná přenosem patogenu. Náhodný hostitel již není zdrojem nákazy a distribuci parazita v RH neovlivňuje (Chaves et al., 2007). Použití tohoto modelu na prevalenci kutánní leishmaniózy v Americe znázorňuje **obr. č. 1** (Chaves et al., 2007). Model zahrnuje dva náhodné

hostitele (lidi, psi), jednoho RH (osli) a přenašeče (*Lutzomyia sp.*). Veškerá data a výchozí parametry pochází z Las Rosas, Venezuela (obr. 1a; Aguilar et al., 1984). Z grafických zobrazení vyplývá, že simulované snížení počtu RH vede také ke snížení výskytu infekce (obr. 1b). Zatímco eliminace náhodného hostitele, v tomto případě psů, naopak zvyšuje přenos parazitů mezi ostatními náhodnými hostiteli (lidmi) (obr. 1c; Chaves et al., 2007). V tomto případě se tedy ukazuje, že rozdělení RH a náhodných hostitelů je podstatné a eliminace náhodných hostitelů by mohla být pro lidi nebezpečná.

Pochopení systému rezervoáru a náhodných hostitelů je nedílnou součástí snahy o potlačení parazita. Pro přesnou identifikaci předpokládaného druhu RH je podstatné dlouhodobě vyšetřovat velká množství jedinců a co nejlépe pochopit jejich bionomii (WHO 2010). Matematické modely pak mohou dopomoci k simulacím nejrůznějších změn v ekosystému a výsledným efektům lidského zásahu.



**Obr. č. 1:** Model kutánní leishmaniózy v Americe a možné důsledky zooprofylaxe (Chaves et al., 2007)

- (a) založeno na datech a výchozích parametrech z endemické oblasti Las Rosas, Venezuela
- (b) založeno na modifikovaných datech - snížením počtu RH (osli)
- (c) založeno na modifikovaných datech - snížením počtu náhodného hostitele (psi)



### 3. VLIV VÝSKYTU ZVÍŘAT V BLÍZKOSTI LIDSKÝCH OBYDLÍ NA PŘENOS *L. DONOVANI* MEZI LIDMI

#### Preference sání

Jedním z kritérií rezervoárového hostitele (RH) je jeho zásadní význam jako zdroj krve pro přenašeče. Z tohoto hlediska je důležité vědět, zda přenašeči preferují potencionálního RH, mají-li možnost výběru mezi několika různými zdroji (Macedo-Silva et al., 2014). V asijské části areálu výskytu viscerální leishmaniózy (Indie, Nepál, Bangladěš) je považován za medicínsky významného přenašeče *L. donovani* *Phlebotomus argentipes* (Dinesh et al., 2001; Palit et al., 2005). Na africkém kontinentu jsou jimi *P. orientalis*, *P. martini* a *P. celiae* (Quate, 1964; Killick-Kendrick, 1990; Gebre-Michael and Lane, 1996; Gebre-Michael et al., 2007). Lidé jsou dosud považováni za jediný rezervoár *L. donovani*. Pokud má mezi nimi docházet k přenosu leishmaniózy, je podstatné, aby byli mezi různými hostiteli dostatečně preferováni. Zdá se, že zejména pro některé z výše uvedených přenašečů je víc než samotný druh hostitele, podstatnější jeho přístupnost, dostatečný počet jedinců a velikost biomasy (Quinnell et al., 1992).

Jedním z takových je *P. argentipes*. Preferenci dobytka oproti člověku ukazují výsledky studie, v níž sdíleli lidé i dobytek stejná obydlí. Na lidech sálo 14 % (14 ze 101), zatímco na dobytku 67 % (68 ze 101) přenašečů. Zbývajícími zdroji krve byly kozy a ptáci (Palit et al., 2005). Podobný výsledek byl získán nastražením dobytčích a lidských pastí, kdy lákadlem byly krávy a lidé vyskytující se ve stejné místnosti. Z dobytčích pastí bylo získáno 88,2 % (2385 z 2704) přenašečů, z toho 2212 tvořili samci (Dinesh et al., 2001). Antropofilní chování se projevuje zejména v lidských obydlích. Naopak zoofilní preference je evidentní v chlévech a místech dobytka určených (Addy et al., 1983; Ghosh et al., 1990; Palit et al., 2005). Člověk se ukázal jako hlavní zdroj krve v porovnání s různými druhy domácích zvířat ve studii Garlapati et al., 2012. Pomocí PCR byla identifikována krev ve 119 nasátých samicích převážně jako lidská (40 %) a hovězí (20 %). Důležitým poznatkem o druhu *P. argentipes* je jeho schopnost sát na dvou různých zdrojích potravy, což představuje vyšší pravděpodobnost přenosu nákazy na člověka (Palit et al., 2005; Garlapati et al., 2012).

Při výzkumu hostitelské preference přenašečů leishmaniózy v Keni sál *P. martini* převážně na přežvýkavcích, zejména krávách, ovcích a kozách žijících v blízkosti lidských obydlí. V menší míře pak tvořili zdroj potravy lidé (Mutinga et al., 1990; Ngumbi et al., 1992). V průběhu studie provedené na zvířatech držných v klecích prostupných pro hmyz bylo odchyceno 2985 jedinců. Nejvíce jich nalákala kuřata (38 %), kozy (19,7 %) a krysy (14,4 %). Méně preferovanými druhy byli ještěři (3,2 %) a promyky (1,5 %) (Mutinga, 1986).

Celkem v 91,6 % z 250 čerstvě nasátých *P. orientalis* v Keni byla ELISA metodou nalezena dobytčí krev. Pouze 2,2 % náležely lidské krvi a 2,6 % vzorků obsahovalo směs lidské a dobytčí krve (Gebre-

Michael et al., 2010). V případě, že byly různé druhy zvířat samostatně uzavřeny s volně chycenými přenašeči, sál větší počet na kryse obecné (61 %) a myši nilské (26 %) než na gekonu a ještěrce (0-3 %) (Quate, 1964). Pokud byli pes domácí, promyka ichneumon a ženetka tečkovaná umístěni do vlastních klecí a přenašeči volně vlétali za zdrojem potravy, sála většina přenašečů (73 %) na psu domácím (Hassan et al., 2009).

*Lutzomyia longipalpis* a *P. perniciosus* patří mezi významné přenašeče *Leishmania infantum*. Ani u těchto druhů nedošlo při možnosti výběru z různých zdrojů potravy k jednoznačné preferenci lidí nebo psů, jež tvoří zvířecí rezervoár *L. infantum* (Agrela et al., 2002; Lainson and Rangel, 2005; Macedo-Silva et al., 2014). Naopak se zdá, že *Lutzomyia longipalpis* oportunisticky saje na množství různých zvířat. V řadě studií byli jejím významným zdrojem potravy ptáci, především drůbež chovaná v blízkosti lidských obydlí (de Oliveira et al., 2008; Macedo-Silva et al., 2014). Podobná preference se ukázala i u druhu *P. perniciosus* v Itálii. V 35 testovaných jedincích (z celkového počtu 58 chycených přenašečů) byla nalezena kuřecí krev. Dalšími zdroji potravy byli ovce (24,2 %), psi (8,6%), lidé (5,2 %) a králík (1,7 %)(Rossi et al., 2008).

Zdá se, že preference sání není zcela věrohodným ukazatelem pro stanovení RH. Rezervoárový hostitel tvoří pravidelný, ale spíše jen průměrný zdroj potravy. Preference větší biomasy související s vylučováním potu, exkrementů a CO<sub>2</sub> (Kelly et al., 1996), může vysvětlit vyšší počet přenašečů nasátých na dobytku. V případě jiných domácích nebo divokých zvířat, jež jsou přenašečům stejně dostupná, se však výběr z hlediska biomasy nepotvrdil. (Mutinga et al., 1990; Macedo-Silva et al., 2014). Dalšími kritérii rozhodujícími o preferenci sání může být také konkrétní lokalita, roční období nebo aktuální možnost výběru hostitele.

### **Líhnutí a vývoj přenašeče**

Místa výskytu spojená s vývojem přenašečů, jako je kladení vajíček, dospívání larev a hledání partnerů jsou dosud ne zcela probádanou oblastí života flebotomů ve volné přírodě (Felicangeli, 2004). Zdá se, že distribuce a hojnost přenašečů částečně záleží na složení půdy, kterou potřebují ke svému rozmnožování (Singh et al., 2008). Ta musí být vlhká a bohatá na organické a dusíkaté látky (Napier and Smith, 1926). Feromony uvolněné z vajíček hrají velkou roli v identifikaci vhodného místa pro kladení. Nejvyšší preferenci pak mají místa se zbytky již nakladených vajíček, svlečkami larev a rozkládajícími se zvířecími produkty (Kumar et al., 2013).

Jelikož rod *Phlebotomus* nepatří mezi dlouhověký hmyz ani dobré letce, musí si zajistit dostupnost potravy, a zároveň i vhodné místo pro kladení vajíček a vývoj larev nedaleko sebe. Vývojová stádia *P. argentipes* byla v nemalém množství nalezena v lidských obydlích (Shortt et al., 1930; Dhiman et al., 1983; Ghosh and Bhattacharya, 1991) a příbytcích pro dobytek (Pandya and Niyogi, 1980; Dhiman et al., 1983; Mutinga et al., 1989). Díky neustálé přítomnosti zvířecích exkrementů se půda stává více

alkalickou a tudíž vhodnou pro vznik líhnišť přenašečů a přitom dokáže být plnohodnotnou potravou pro rostoucí larvy (Bucheton et al., 2002; Singh et al., 2008).

Líhništi afrických druhů *P. martini* a *P. celiae* jsou především zvířecí nory, termitiště a dutiny stromů. *Phlebotomus martini* se však během období dešťů dokáže adaptovat i na lidská obydlí a drůbeží kurníky (Mutinga et al., 1989).

*Phlebotomus orientalis* odpočívá v termitištích a dutinách stromů. Zdá se tedy, že by mohl podobně jako předchozí dva druhy využívat tato místa i pro kladení vajíček. Nicméně vajíčka ani vyvíjející se larvy nebyly nalezeny v termitištích, hlodavčích norách, půdních trhlinách ani v lidských či dobytčích příbytcích (Quate, 1964; Elnaïem et al., 1997).

Naopak larvy *Lutzomyia longipalpis* byly nalezeny v okolí lidských i zvířecích obydlí, zejména prasečích chlívků (Ferro et al., 1997). V jiné studii byla největší hustota (11,5 larev/m<sup>2</sup>) zjištěna v blízkosti kurníků v místech, kde se potrava pro kuřata i jejich výkaly zcela rozložily a promíchaly s půdou. Tato směs se pak stala vhodnou potravou pro rostoucí larvy (Casanova et al., 2013). V přírodě byla vývojová stadia nalezena v trhlinách kamenů a těsné blízkosti kmenů stromů (Ferro et al., 1997; Casanova et al., 2013).

Znalost míst vhodných pro vývoj flebotomů je důležitá zejména pro možnost omezení jejich výskytu v blízkosti člověka. Nicméně může být taktéž vodítkem k RH, jehož přítomnost nabízející zdroj potravy a zároveň vhodných podmínek pro vývoj nedospělých stádií je pro přenašeče velmi výhodná.

#### **4. METODY DETEKCE LEISHMANIA DONOVANI**

O věrohodnosti studií zabývajících se výskytem parazita mezi zvířaty rozhodují, kromě množství jedinců a počtu jednotlivých testování, zejména metody, jež byly k jeho identifikaci použity. Senzitivita a specifická jsou limitující omezení každého testu. Pro testování leishmaniózy u lidí i zvířat se v současné době používá především dvou různých principů: (A) detekce protilátek a (B) detekce parazita. V některých případech dochází k nesouladu sérologických vyšetření s výsledky přímé detekce parazita, což je zřejmě způsobeno přetrváním protilátek v organismu, zatímco paraziti se již v organismu nemusí vyskytovat a parazitická DNA je již degradována. U jedinců s imunodeficiencí nebo neschopností produkovat detekovatelné množství protilátek je naopak přímá detekce jedinou možností testování (Camargo et al., 2010).

##### **A) Detekce protilátek**

U sérologických technik je třeba vzít v úvahu, že výsledek ovlivňují i tyto faktory:

- po úspěšné léčbě či spontánním odeznění nemoci hladina anti-leishmáníových protilátek klesá, nicméně protilátky zůstávají několik let detekovatelné (Bern et al., 2005; Silva et al., 2006). Sérologicky rozpoznat případy v relapsu je pro tyto metody velký problém.

- Protilátky proti *L. donovani* jsou přítomny u významného počtu zdravých jedinců žijících v endemických oblastech bez evidence nákazy (Schenkel et al., 2006; Sundar et al., 2006). Tito lidé či zvířata tedy zřejmě do kontaktu s parazitem přišli, ale klinické příznaky se u nich nikdy neprojeví (Zijlstra and El-Hassan, 2001).

Mezi běžně používané metody pro detekci protilátek patří DAT, ELISA a IFAT.

### **DAT (Direct agglutination test)**

Jedná se o semikvantitativní test, jež využívá mikrotitrační destičku, ve které se mísí ředící řada testovaného krevního séra s celými promastigoty *L. donovani* nebo jejich homogenátem (el Harith et al., 1988; Chappuis et al., 2007). Pokud sérum obsahuje specifické protilátky, dochází k aglutinaci, která je viditelná pouhým okem zhruba po 18 hodinách (Chappuis et al., 2007). Sensitivita se pohybuje okolo 80-97 %, specificita 85,9-87 % (Zijlstra et al., 1998; Chappuis et al., 2006; Sundar et al., 2006). Vzhledem k jednoduchosti je DAT vhodný do terénních podmínek. Positivní výsledky ukazují případy s akutní i subklinickou infekcí. Ke zkřížené reakci nedochází s malárií, schistosomózou ani tuberkulózou. Použití DATu je vhodné zejména v oblastech, kde je prevalence infekce vysoká, a je třeba vyšetřit velká množství jedinců (Zijlstra and El-Hassan, 2001).

### **ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)**

Standardní ELISA využívá solubilní nebo korpuskulární antigen tvořený promastigoty *L. donovani*. Pro zvýšení senzitivity a specificity je používáno specifitějších antigenů, jako jsou povrchový glykoprotein gp63, histonové proteiny rH2A, rH2B nebo rekombinantní protein rK39 (Zijlstra et al., 1998; Maalej et al., 2003). Antigen se aplikuje na mikrotitrační destičku a inkubuje se s testovaným sérem. Následně přidaná sekundární protilátka (konjugát) s kovalentně navázaným enzymem (nejčastěji peroxidáza nebo alkalická fosfatáza) se specificky váže na vyvázané protilátky z testovaného séra. Po přidání substrátu dochází k barevné reakci. Výsledky se získávají měřením optické density vzorků a dále se srovnávají s hodnotami pozitivních a negativních kontrol. Měření optické density vyžaduje laboratoř s vhodnými přístroji. Vzorky krve však mohou být sbírány na filtrační papír a testovány po delší době (Zijlstra and El-Hassan, 2001). Sensitivita a specificita testu se pohybuje okolo 68-100 % a 85-99 % (Maalej et al., 2003; Camargo et al., 2010) Modifikací ELISA metody vhodné do terénu je rK39 imunochromatický test. Jako antigen používá 39 aminokyselinovou repetici, která je částí kinesin-related proteinu *L. chagasi*, a je konzervována pro celý *L. donovani* komplex (Burns et al., 1993). Tento test je časově nenáročný (15-20 min) a vykazuje vysokou senzitivitu (93-100%) i specificitu (97%) (Zijlstra et al., 1998; Braz et al., 2002; Maalej et al., 2003; Chappuis et al., 2007). Nedokáže však rozlišit mezi akutní a post infekcí (Zijlstra et al., 1998). Sensitivita a specificita výše zmíněných antigenů je vždy >85 % a >80 % (Maalej et al., 2003). Při ELISA

testech nedochází ke zkřížené reakci s tuberkulózou, avšak s původcem Chagasovy choroby *Trypanosoma cruzi* došlo v některých případech k silné reakci (Braz et al., 2002; Rosário et al., 2005). Zároveň je třeba vzít v potaz, jaký druh zvířete je testován, a podle toho vybrat nejvhodnější sekundární protilátku (konjugát). V případech, kdy je afinita všech známých konjugátů slabá, je možné produkovat antisérum v jiném živočichu. Pokud je třeba vyšetřit zvíře, u kterého neexistuje druhově specifická sekundární protilátka a nelze získat ani antisérum, lze použít např. mikrobiální proteiny A a G, které se s různou afinitou váží k savčím imunoglobulinům (Santiago et al., 2007).

### **IFAT (Indirect fluorescent antibody test)**

Imunofluorescence je technika, díky níž můžeme vizualizovat specifický protein (antigen) v buňkách nebo tkáních. IFAT využívá tzv. nepřímé imunofluorescence, při které se na antigen váže specifická primární protilátka. Tu mají jedinci, kteří již byli parazitem nakaženi. Na primární protilátku se váže sekundární protilátka konjugovaná s fluorescenční značkou (Barbierato et al., 2012). Výsledky se vyhodnocují fluorescenčním mikroskopem, což komplikuje využití této metody v terénu (Chargui et al., 2007). Senzitivita a specifita testu se pohybuje kolem 83-97,8 % a 92,5-100 % (Troncarelli et al., 2009; Camargo et al., 2010). Falešně pozitivní výsledky se vyskytují zejména díky zkřížené reakci s *Trypanosoma cruzi* (Celeste et al., 2004; Troncarelli et al., 2009).

### **B) Detekce parazita**

Zlatým standardem pro tvrzení viscerální leishmaniózy však zůstává přímá detekce parazita. Jednou z možností, je mikroskopická demonstrace amastigotů v lymfatických uzlinách, kostní dřeni nebo slezině. Tato metoda je oproti ostatním relativně invazivní (Deborggraeve et al., 2008). Sensitivita záleží zejména na schopnostech laboratorního pracovníka a kvalitě použitých činidel (Chappuis et al., 2007).

Mnohem přesnější je kultivace parazita *in vitro* z tkání a orgánů, což je většinou časově náročné (Deborggraeve et al., 2008).

V následujícím textu je pak podrobněji rozebrána detekce DNA parazita pomocí různých PCR technik.

### **PCR (Polymerase chain reaction)**

Amplifikace parazitické DNA pomocí PCR se stala jednou z nejpoužívanějších metod detekce prvoků *Leishmania* (Deborggraeve et al., 2008). Díky své vysoké senzitivě (82-100%) a specifitě (97%) lze pomocí PCR testovat i krevní vzorky, jejichž odběr je v porovnání s jinými tkáněmi jednoduchý, a není problematické je získat z velkého množství jedinců (Piarroux et al., 1994; Lachaud et al., 2002; Sreenivas et al., 2002). Metody PCR založené na kinetoplastové DNA (K13A-K13B a RV1-

RV2) dokáží detekovat až  $10^{-3}$  parazitů v 1 ml krve (Lachaud et al., 2002). Specificita však záleží zejména na výběru vhodného primeru a tkáně, ze které je studovaný vzorek získán (Deborggraeve et al., 2008). Účinnost testování zvyšuje i skutečnost, že převážná většina detekované DNA je obsažena v živých parazitech. Při injekci mrtvého parazita není možno DNA zaznamenat již po 48 hodinách (Jarra and Snounou, 1998). Díky této rychlé degradaci, ihned po zahájení léčby či nastartování nespecifické imunity jedince (Prina et al., 2007), je PCR schopna, na rozdíl od sérologických technik, odhalit akutní nebo nedávno proběhlou nákazu (Bhattarai et al., 2009). Tento jev potvrzují výsledky experimentální infekce psů. Pomocí PCR se přítomnost parazita v krvi potvrdila po 4 měsících po infekci, přičemž během dalších 9 měsíců u části psů počet parazitů osciloval a u jiných došlo k jejich úplnému vymizení. *Leishmania* specifické protilátky se podařilo detekovat teprve po 6 měsících. Od prvotní detekce po celé testované období hladina protilátek stoupala (Rodríguez-Cortés et al., 2007). Metoda PCR není vhodná pro terénní účely. Při výjezdech je možný pouze sběr vzorků, jejich vyhodnocení je nutno provést v laboratoři. Velkou výhodou je vysoká senzitivita a skutečnost, že prakticky nehrozí zkřížená reakce s jinými parazity. Na rozdíl od sérologických technik nám však neřekne nic o infekci, která v testovaném jedinci proběhla před delší dobou.

K detekci parazitické DNA lze použít různé typy PCR. Jednou z modifikací je oblast genomu, který se rozhodneme amplifikovat. Pro PCR jsou vhodné vysoce repetitivní sekvence. Standardně se používají geny malé ribosomální podjednotky RNA (rRNA), mini-exonu odvozeného od RNA, kinetoplastových minikroužků a repetitivní jaderné DNA sekvence (van Eys et al., 1992; Reale et al., 1999; Maurya et al., 2005; Deborggraeve et al., 2008). Kromě klasické PCR existují odvozené verze, které zvyšují specificitu amplifikace DNA nebo lze pomocí nich přesněji rozeznat jednotlivé druhy leishmanií.

*Kvantitativní real-time PCR* – metoda, která oproti klasické PCR využívá fluorescenční značení. Díky tomu můžeme zaznamenat zvyšující se množství amplifikované DNA během každého cyklu. Intenzita fluorescence je úměrná množství PCR produktu a pomocí standardní křivky sestavené při použití známých množství cílové DNA je možné přesně kvantifikovat množství cílové DNA v biologickém vzorku (Bartůňková et al., 2011). Pro detekci a vyhodnocení amplifikovaného produktu tedy nemusíme využívat gelové elektroforézy, western blotu ani DNA sekvenace. Velkou výhodou je rychlost, se kterou dostaneme výsledky. Tato metoda je schopna rozlišit *L. donovani* komplex, *L. braziliensis* komplex a ostatní jednotlivé druhy leishmanií. Ne však druhy v rámci *L. donovani* komplexu (Schönian et al., 2003; Espy et al., 2006).

*Nested PCR* - využívá se zejména ke zvýšení specifity amplifikace DNA. Skládá se ze dvou po sobě jdoucích reakcí pokaždé s jinými primery. V první PCR se amplifikuje větší oblast dané části genomu. Ve druhé pak použijeme tento produkt k amplifikaci vnitřního (finálního) produktu. Ve výsledku dostaneme větší množství finálního produktu, než kdyby byl vnitřní úsek amplifikován již v první

reakci. Specificita této metody je v porovnání s klasickou PCR vyšší (Sreenivas et al., 2002).

*ITS1-PCR* - metoda založená na amplifikaci ITS1 (internal transcribed spacer 1) oblasti. Jedná se o část ribosomální RNA (rRNA), která je i mezi blízkými příbuznými druhy variabilní. Ve spojení s RFLP (Restriction fragment length polymorphism, podrobněji o této metodě níže v textu) se využívá k přímé identifikaci druhu parazita z pacientovy krve nebo tkáně (Schönian et al., 2003; Toz et al., 2009). Následnou sekvenací ITS1 lze odlišit jednotlivé druhy v rámci *L. donovani* komplexu (Gelanew et al., 2010; Toz et al., 2013).

## Další metody

K identifikaci jednotlivých druhů tvořících *L. donovani* komplex můžeme použít také molekulární markery. Např. kódující a nekódující sekvence jaderného nebo mitochondriálního původu, metody RAPD, RFLP nebo mikrosatelity (Lukeš et al., 2007). Díky těmto metodám vzniklo 18 000 charakteristických znaků pro každý z 25 kmenů *L. donovani* komplexu (Lukeš et al., 2007). Přesné rozpoznání jednotlivých kmenů může být důležitým poznatkem v rámci epidemiologických zásahů. Slouží však také k pochopení taxonomie a tvorbě fylogenetických stromů leishmanií. (Lukeš et al., 2007).

*RAPD (Random amplified polymorphic DNA)* - jedná se o modifikovaný typ PCR. RAPD markery jsou různě dlouhé DNA fragmenty vzniklé amplifikací náhodných segmentů genomické DNA. Užívá se jen jediný primer o náhodné aminokyselinové sekvenci. Amplifikované produkty poskytují zastoupení kódujících i nekódujících oblastí v celém genomu, zahrnující velký počet lokusů, a tudíž umožňují současné zkoumání mnoha genetických markerů (Lynch and Milligan, 1994). DNA fragmenty se podle své délky rozdělí na gelové elektroforéze. Při použití vhodného primeru vznikne profil charakteristický pro jednotlivé geneticky nepříbuzné jedince.

*RFLP (Restriction fragment length polymorphism)* - technika, která využívá rozdílů v homologních DNA sekvencích. Vzorek DNA je restričními enzymy rozdělen na restriční fragmenty. Ty se podle své délky rozdělí na gelové elektroforéze. Poté jsou pomocí Southern blotu přemístěny na membránu. Hybridizace membrány na značené DNA sondy pak určuje délku fragmentů, které jsou k sondě komplementární. RFLP nastane, pokud se délka detekovaného fragmentu mezi jednotlivými vzorky liší. Každý kus fragmentu je považován za alelu a může být dále použit v genetické analýze (King et al., 2006).

*MLEE (Multilocus enzyme electrophoresis)* - metoda, díky níž bylo popsáno mnoho druhů leishmanií (Pratlong et al., 2001). Je založena na elektroforetické mobilitě několika základních metabolických enzymů. Alely genů těchto enzymů v každém lokusu definují elektroforetickou mobilitu svých produktů. Příbuznost těchto produktů lze vizualizovat pomocí dendrogramu generovaného z matrice párových rozdílů mezi elektroforetickými typy. Problémem je fakt, že enzymy mohou mít

různé aminokyselinové sekvence a přitom nemusí ovlivnit elektroforetickou mobilitu natolik, aby vznikly různé bandy. Tzv. "tiché mutace" mohou změnit DNA sekvenci genu, aniž by se změnila posloupnost aminokyselin. Dále může u enzymu dojít k posttranslačním modifikacím či vazbě kofaktoru, čímž dojde také ke změně fenotypu enzymu (Stanley and Wilson, 2003).

*Izoenzymatická elektroforetická analýza* – metoda, která slouží k rozlišení zymodemů parazita. Rioux et al., 1990 podle této metody vypracoval návrh nové klasifikace rodu *Leishmania*. Na základě izoenzymatické analýzy se leishmanie dělí na zymodemy nazývané MONy. Jednotlivé zymodemy jsou dále řazeny do druhů nebo komplexů druhů (Pešťová, 2010). Izoenzymatická analýza se dělá na základě těchto enzymů: malát dehydrogenáza, isocitrát dehydrogenáza, 6 -fosfoglukonát dehydrogenáza, glukózo-6 - fosfát dehydrogenáza, glutamát dehydrogenáza, NADH diaforáza, purinová nukleosidová fosforyláza, glutamát-oxalacetát transamináza, fosfoglukomutáza, fumarát hydratáza, manóza fosfát isomeráza, glukóza fosfát isomeráza (Pratlong et al., 2004; Campino et al., 2006).

## 5. DOMÁCÍ ZVÍŘATA

Viscerální leishmanióza se tradičně řadí mezi tzv. „neglected diseases“. Jedná se o choroby, kterým se obecně věnuje menší míra pozornosti i finančních prostředků na jejich výzkum, léčbu, eradikaci... Efektivních a cenově dostupných léků je nedostatek a postižení lidé jsou příliš chudí na to, aby si je mohli opatřit (Yamey, 2002). Řada z nich žije v rozvojových zemích a živí se zemědělstvím a chovem domácích zvířat, jako jsou hovězí dobytek, kozy, ovce, či osli (Alvar et al., 2006). V častém kontaktu s lidmi jsou také domácí psi. Pakliže některý z druhů není přímo rezervoárem infekce, jeho výskyt může být jedním z faktorů snižující či zvyšující riziko, že nákaza mezi lidmi vznikne a bude se rozšiřovat (Barnett et al., 2005; Bern et al., 2005; Bashaye et al., 2009). Proto se budu dále podrobněji zabírat vybranými druhy domácích zvířat a jejich úlohou v přenosu infekce. Přehled testovaných domácích zvířat znázorňuje **Tabulka č. 1** na konci této kapitoly.

### Hovězí dobytek

Hovězí dobytek patří mezi hojná užitková zvířata. Přesto se jen málo prací zabírá možností, že tvoří rezervoár *L. donovani*. Sérologicky pozitivní jedinci byli nalezeni v Súdánu (47,6 %), Bangladéši (9,4 %) a Nepálu (22,7 % býků, 10 % krav). Metodou PCR byla studována zvířata v Bangladéši a Nepálu, přičemž pouze nepálský dobytek vykazoval pozitivitu (5 % krávy, 4 % býci) (Mukhtar et al., 2000; Bhattarai et al., 2010; Khanal et al., 2010; Alam et al., 2011).

Nepopíratelný význam má tento druh jako atraktant pro přenašeče (Bern et al., 2000, 2005; Bucheton et al., 2002; Ryan et al., 2006). Jak bylo již dříve zmíněno, kromě efektu množství biomasy



podpořené zvýšenou produkcí potu, specifického pachu a CO<sub>2</sub>, vytváří skot výborné podmínky pro kladení vajíček a vývoj larev přenašečů v místech svého odpočinku (Bucheton et al., 2002). Nepřímo se podílí také na výskytu líhnišť v okrajích venkovních ohrad. Ty jsou ideálním místem pro hlodavce, kteří si zde vytvářejí nory, do kterých přenašeči kladou vajíčka (Ryan et al., 2006). Existuje řada studií potvrzujících, že vlastnictví a přítomnost skotu má ochranný efekt. Vzhledem ke své přitažlivosti pro přenašeče, přiláká veškerou pozornost na sebe a sníží tak pravděpodobnost sání na člověku a případný přenos nákazy (Bern et al., 2000; Desjeux, 2001; Bern et al., 2005). Možným vysvětlením ochranného efektu je však také skutečnost, že lidé vlastníci dobytek, nepatří mezi nejchudší. Jejich vyšší socioekonomický status je spojen s lepšími nutričními podmínkami, díky čemuž nemusí dojít k přechodu ze subklinické do klinické fáze infekce (Bern et al., 2000). Částečnou ochrannou funkci dokládají také repelenty proti hmyzu aplikované na zvířata. Důsledkem je zvýšená atraktivita lidí jako zdroje potravy (Kolaczinski et al., 2008).

Na preferenci dobytka z hlediska sání a tvorby vhodných podmínek pro vývoj nedospělých stádií lze pohlédnout také z opačné strany. Pokud výskyt skotu zvyšuje množství přenašečů, zvyšuje také reálnou šanci sání na člověku. Studie zkoumající faktory, odpovědné za epidemie leishmaniózy, či stálý výskyt infekce v endemických oblastech, považují vlastnictví a především bezprostřední přítomnost dobytka za zvýšené riziko onemocnění (Bucheton et al., 2002; Barnett et al., 2005; Kolaczinski et al., 2008; Bashaye et al., 2009; Saha et al., 2009). Vliv dobytka ukazuje také zvýšená hladina *Leishmania*-reaktivních protilátek u lidí sdílejících se skotem místa určená ke spánku (Bucheton et al., 2002). Vzájemná incidence byla pozorována zejména v obdobích sucha (Bashaye et al., 2009), čemuž odpovídá i neobvykle velké množství přenašečů chycených na dobytčích pastech s vrcholy před začátkem a po skončení období dešťů (Dinesh et al., 2001).

V rámci několika málo studií zabývajících se detekcí prvků *L. donovani* v krvi skotu, je děláni závěru o jeho možnosti jako rezervoáru infekce téměř nemožné. V jistém procentu dobytek produkuje protilátky a vykazuje PCR pozitivitu, což nasvědčuje předešlé infekci. Absence DNA u sérologicky pozitivních jedinců může svědčit o neúspěchu parazita přežít a rozmnožit se. Možným vysvětlením je existence tzv. BMAP 27 peptidu (Bovine myeloid antimicrobial peptide). V *in vitro* podmínkách byly sledovány jeho inhibiční účinky na růst trypanosom a leishmanií (konkrétně se jednalo o experiment s druhem *L. donovani*) (Haines et al., 2009). Vzhledem k evidentní preferenci skotu jako zdroje potravy, se dá předpokládat vysoká frekvence jednotlivých sání. Pokud díky BMAP 27 proteinu nedochází k dlouhodobému přežití leishmanií v krvi dobytka, nemůže být považován za rezervoárového hostitele *L. donovani*.

## Psi

*Leishmania donovani* a *L. infantum* jsou v současnosti považovány za hlavní původce viscerální leishmaniózy. Vzhledem k jejich velké genetické příbuznosti (Marcili et al., 2014) lze očekávat, že budou sdílet i stejného RH. Pouze u *L. infantum* jsou však psovitě šelmy, zejména domácí psi, prokázaným RH (Alvar et al., 2004). Psi jsou rozšíření téměř po celém světě a zcela logicky se tak stávají hlavními kandidáty na zvířecí rezervoár *L. donovani* (Ashford, 1996). Proto je studována jejich prevalence také v oblastech výskytu tohoto parazita.

Metodami ELISA a IFAT bylo v Etiopii prokázáno 3,8 % sérologicky pozitivních psů. Pomocí PCR byla identifikována leishmaniová DNA v 2,8 % vzorků kostní dřevě (ze 3 séropozitivních a 2 séronegativních psů) (Bashaye et al., 2009). V jiné oblasti bylo nalezeno 27,7 % nakažených zvířat, přičemž většina z nich nevykazovala žádné klinické příznaky (Kalayou et al., 2011). Pravděpodobně zde došlo k časté expozici parazitů a následnému vzniku adaptivní imunity (Mukhtar et al., 2000; Cardoso et al., 2004). Zejména u psů infikovaných *L. infantum* je zcela běžné, že vysoký počet evidentně zdravých jedinců vykazuje séropozitivní výsledky (Baneth et al., 2008). V letech 1998-2000 bylo v Súdánu označeno za séropozitivní 42,9-74,3 % testovaných jedinců (Dereure et al., 2003). Další dvě studie ukazují různou prevalenci infekce *L. donovani* mezi psy v této oblasti (6,9 %, 43 % sérologicky a 2,3 % PCR pozitivních jedinců) (Dereure et al., 2000; Hassan et al., 2009). Významný přenašeč v Súdánu *P. orientalis*, preferuje psa, jako zdroj sání, oproti různým druhům divokých zvířat (Hassan et al., 2009). Pouze 1 z 85 vyšetřovaných psů v Bangladéši byl označen jako PCR pozitivní (Alam et al., 2013). Další oblastí s výskytem infikovaných psů je Srí Lanka. Zde však dosud nedošlo k rozlišení, zda infekci způsobuje *L. donovani* nebo *L. infantum* (Rosypal et al., 2010).

V rámci identifikace jednotlivých zymodemů v Súdánu byly v kostní dřevě psů a lidí nalezeny 3 různé druhy: *L. donovani* (ve 4 psech, 33 lidech), *L. infantum* (v 10 psech, 12 lidech) a *L. archibaldi* (v 6 psech, 7 lidech). V člověku byla nejvíce zastoupeným druhem *L. donovani*. Z 33 infikovaných lidí bylo 28 postiženo viscerální, 4 post-kala-azar kutánní a 1 kutánní formou leishmaniózy. Přestože většina psích vzorků obsahovala *L. infantum* a *L. archibaldi*, je zřejmé, že psi mohou být nakaženi i *L. donovani* (Dereure et al., 2003).

V porovnání s populacemi psů infikovanými *L. infantum* v Brazílii (35-80 %) je výskyt psí leishmaniózy způsobené *L. donovani* nízký (Dietze et al., 1997; Solano-Gallego et al., 2001; Courtenay et al., 2002). Přesto je v některých oblastech Súdánu a Etiopie vlastnictví a přítomnost psů považována za zvýšené riziko nákazy (Bucheton et al., 2002; Bashaye et al., 2009; Hassan et al., 2009). Experiment zaměřený na projevy infekce a přítomnost parazitů v orgánech, lymfatických uzlinách a kůži byl proveden na psech nakažených 3 různými kmeny *L. donovani*, které pocházely z infikovaných lidí z Keni, Súdánu a Mediteránu. Pouze stav psů nakažených mediteránským kmenem přešel do chronické fáze a paraziti v nich byli přítomni 512 dnů po prvotní infekci. Psi nakažení kmenem ze

Súdánu obsahovali parazity 128 dnů. U keňského kmene došlo po 64 dnech ke spontánnímu vyléčení všech testovaných jedinců (Mansour et al., 1970). Jelikož se jedná o starší studii, je nasnadě otázka, zda mediteránským kmenem nebyl spíše druh *L. infantum*, jež se v oblasti Středomoří hojně vyskytuje, a psi tvoří rezervoár infekce. Proto jsou kromě sérologických a PCR testů velmi podstatné výsledky isoenzymatické analýzy. Pokud tvoří většina zymodemů nalezených v psích vzorcích jiný druh než *L. donovani*, jak ukázala výše zmíněná studie ze Súdánu, jen těžko lze považovat psa za jejího RH.

## Kozy

Dalším často chovaným druhem v blízkosti lidských obydlí jsou kozy. Jejich oblíbenost z hlediska sání pro přenašeče je zjevná ze studií v Keni, kde tvoří výrazně preferovaného hostitele *P. martini* (Ngumbi et al., 1992). Podobný výsledek ukázal experiment s různými domácími a divokými zvířaty, kde se kozy spolu s kuřaty, psy a krysami taktéž zařadily mezi nejoblíbenější zdroj krve tohoto druhu flebotoma (Mutinga, 1986). Pozoruhodný je počet jedinců nakažených *L. donovani*. Nejvíce PCR (16 %) a DAT (23,1 %) pozitivních koz se ukázalo být v Nepálu, kde míra infekce předčila dokonce i běžně nakažený skot (Bhattarai et al., 2010; Khanal et al., 2010). V Súdánu tvořili sérologicky pozitivní jedinci 13,6 % (Mukhtar et al., 2000). Daleko více studií je zaměřeno na vliv výskytu koz v blízkosti lidí. Jako ochranný faktor fungovaly v Indii (Barnett et al., 2005), Bangladéši (Bern et al., 2005) a částečně v Keni (Ryan et al., 2006). Naopak zvyšují riziko nákazy v Nepálu (Khanal et al., 2010), Indii (Singh et al., 2010), Keni (Ryan et al., 2006) a Etiopii (Bashaye et al., 2009).

Z těchto výsledků vyplývá, že i kdyby kozy netvořily rezervoár *L. donovani*, nějakým způsobem se zřejmě podílejí na epidemiologii. Pravděpodobně hrají velkou roli v lákání u udržení přenašečů v okolí lidských obydlí.

## Ovce

Žádná z testovaných ovcí v Súdánu neprokázala přítomnost protilátek (Mukhtar et al., 2000) ani vliv na přenos infekce (Bucheton et al., 2002). V rámci experimentální nákazy 5 ovcí promastigoty *L. donovani* bylo možno pouze z jedné do 28 dní po infekci izolovat amastigoty a detekovat protilátky (Anjili et al., 1998). Ovce tedy nejspíš nebudou vhodným kandidátem na RH.

## Oslí

Podobně jako ovce zřejmě ani oslí netvoří rezervoár *L. donovani*. Ačkoli v Súdánu byla zjištěna velká séroprevalence (68,7 %), která předpokládá jejich častou expozici parazitům (Mukhtar et al., 2000). V jiné studii se jejich chov neprojevil jako faktor zvyšující či snižující riziko nákazy (Bucheton et al., 2002). Za zvýšené riziko pro přenos viscerální leishmaniózy na lidi je však výskyt oslů považován v Etiopii (Bashaye et al., 2009).

## **Drůbež**

Přítomnost drůbeže, zejména kuřat, snižuje pravděpodobnost nákazy lidí v Nepálu (Schenkel et al., 2006), nicméně zvyšuje v Bangladéši (Bern et al., 2005). Vysoká preference sání se ukázala při přenosu *L. infantum* druhem *Lutzomyia longipalpis* v jižní Americe (Alexander et al., 2002), ale také *L. donovani* druhem *P. martini* v Keni (Mutinga et al., 1990). Přestože je drůbež pro přenašeče atraktivní zdroj potravy, není schopna, podobně jako jiní ptáci, udržet infekci (Alexander et al., 2002).

## **Velbloudi**

V žádném z testovaných sér súdánských velbloudů nebyly nalezeny protilátky proti *L. donovani*. Zato 15 % vzorků vykazovalo pozitivitu na prvoka *Trypanosoma evansi*. Zdá se tedy, že zde nedošlo k žádné zkřížené reakci mezi danými parazity, ačkoli oba spadají do čeledi Trypanosomatidae (Mukhtar et al., 2000).

Žádné z výše uvedených zvířat zatím nemůžeme dle dostupných informací považovat za rezervoár *L. donovani*. Nicméně se zdá, že z epidemiologického hlediska je řada druhů významným zdrojem potravy pro přenašeče. I to je důležitý poznatek, který je třeba vzít v potaz při případném plánování ochranných opatření proti přenosu leishmaniózy.

**TABULKA č. 1:** Domácí zvířata testována na infekci *L. donovani*

Druh zvířete	Oblast	Séropozitivita (%)	PCR pozitivita (%)	Přítomnost amastigota v tkáni/ kultuře	Citace
Hovězí dobytek	Nepál	22,7 (5 z 22) býci (D) 10,0 (2 z 20) krávy (D)			(Khanal et al., 2010)
	Nepál		5 (1 z 20) krávy, krev 4 (1 z 24) býci, krev		(Bhattarai et al., 2010)
	Bangladéš	9,4 (13 z 138) (E)			(Alam et al., 2011)
	Súdán	47,6 (20 ze 42) (E) 21,4 (9 ze 42) (D)			(Mukhtar et al., 2000)
Kozy	Nepál		16 (23 ze 144), krev		(Bhattarai et al., 2010)
	Súdán	13,6 (8 z 59) (E) 8,5 (5 z 59) (D)			(Mukhtar et al., 2000)
	Nepál	23,1 (33 z 143) (D)			(Khanal et al., 2010)
Osli	Súdán	68,7 (66 z 96) (D)			(Mukhtar et al., 2000)
	Súdán			negat. kultury krev, lymf. uzliny	(Dereure et al., 2003)
Ovce	Súdán	25 jedinců < Cut-off (D)			(Mukhtar et al., 2000)
Velbloudi	Súdán	20 jedinců < cut-off (D)			(Mukhtar et al., 2000)

Druh zvířete	Oblast	Séropozitivita (%)	PCR pozitivita (%)	Přítomnost amastigota v tkáni/ kultuře	Citace
Psi	Etiopie	3,8 (7 z 184) (E)	0 (0 z 184) - krev	negat. kultury	(Bashaye et al., 2009)
		10,9 (20 z 184) (I)	2,8 (5 z 184) – kostní dřeň	kostní dřeň	
	Etiopie	27,7 (51 z 184) (D)			(Kalayou et al., 2011)
		14,8 (28 z 189) (KDRT)			
	Súdán	6 jedinců < cut-off (D)			(Mukhtar et al., 2000)
	Súdán	43 (22 z 51) (I)		44% (4 z 9) krev	(Dereure et al., 2000)
	Súdán	72,5 (37 z 51) (I)*		44 % (4 z 9)	(Dereure et al., 2003)
74,3 (26 z 35) (I)*			23 % ( 8 z 35)		
42,9 (15 z 35) (I)*			31% (11 z 35) (lymf. uzliny)		
Bangladéš		1,2 (1 z 85), krev		(Alam et al., 2013)	
Srí Lanka	0,9 (1 z 114) **			(Rosypal et al., 2010)	

Sérologické metody: D – DAT, E – ELISA, I – IFAT, KDRT - Kala-azar detect rapid test (rK39 dipstick test)

\* studie prováděné v různých letech (1998, 1999, 2000)

\*\* Immunochromatographic strip assays založen na rK39 antigenu, v této studii nedošlo k rozlišení druhu v rámci *L. donovani* komplexu

## 6. DIVOKÁ ZVÍŘATA

Existuje několik důvodů, proč se zabírat otázkou rezervoáru *L. donovani* ve volné přírodě. V prvním případě nás k tomuto zamyšlení vedou okolnosti vzniku infekce u lidí, jež nepřišli do kontaktu s nakaženými lidmi nebo zvířaty. Podobnou špatně vysvětlitelnou skutečností je relativně vysoká prevalence přenašečů vyskytujících se v zcela neobydlených lokalitách (Hassan et al., 2009). Pochopení sylvatického cyklu parazita by mohlo vést také k objasnění, zda přenos nákazy mezi divokými zvířaty ovlivňuje prevalenci či interaguje s cyklem parazita příležitostně probíhajícím v domácích zvířatech (Quinnell and Courtenay, 2009). Pro bližší vhled do této problematiky je třeba zhodnotit výsledky studií testujících jednotlivé druhy divokých zvířat, jež jsou považovány za možný rezervoár *L. donovani*. Jedná se především o šelmy a hlodavce. Oba tyto řády jsou prokázánymi RH jiných druhů leishmanií (Quinnell and Courtenay, 2009). Přehled testovaných divokých zvířat znázorňuje **Tabulka č. 2** na konci této kapitoly.

### Psovité šelmy

Zaměření na psovité šelmy není nijak náhodné. Jak již bylo dříve několikrát zmíněno, pes domácí tvoří rezervoár *L. infantum*, který je blízce příbuzný druhu *L. donovani*, u něhož dosud nebyla existence psa jako RH dořešena. *Leishmania infantum* byla sérologicky detekována v 2 % z celkového počtu 33 testovaných vlků (*Canis lupus*) v Portugalsku a Španělsku. V jiné studii v jihozápadní Evropě byla DNA obsažena v 9 % vzorků (Sastre et al., 2008). V Íránu se ukázalo být sérologicky pozitivních 10 % chycených jedinců (Mohebbali et al., 2005).

Relativně velká prevalence nákazy se zdá být u lišek obecných (*Vulpes vulpes*) v oblasti Středomoří. Celkem 40 % PCR pozitivních zvířat se vyskytuje v jižní Itálii. Ve Španělsku jich bylo nalezeno 2,7-74,6 % (Criado-Fornelio et al., 2000; Curi et al., 2006; Del Río et al., 2014). Jedinci podrobení nekropsii se kromě příznaků leishmaniózy jeví v dobré kondici (Criado-Fornelio et al., 2000). Vzhledem k podobné prevalenci infekce mezi psy v Mediteránu (Moreno and Alvar, 2002), se zdá být liška dobrým adeptem na volně žijícího RH *L. infantum*. V Íránu se sérologicky potvrdilo 10 % nakažených jedinců (Mohebbali et al., 2005).

Dalším druhem rozšířeným v brazilské oblasti výskytu *L. infantum* je liška maikong (*Cerdocyon thous*). Při dvou po sobě jdoucích měřeních protilátek u nakaženého jedince došlo po 105 dnech ke snížení hladiny, nicméně infekce ve zvířeti přetrvávala (Jusi et al., 2011). V porovnání se psy, bylo možno parazita detekovat delší dobu (Courtenay et al., 1994). V rámci výzkumu abundance nakažených jedinců bylo nalezeno 13 % pozitivních zvířat. Žádný z nich nejevil příznaky onemocnění (Lainson et al., 1987). Další brazilské studie prokázaly 16-33 % pozitivních jedinců (Curi et al., 2006; Luppi et al., 2008; Jusi et al., 2011).

Mezi psovitě šelmy nakažené leishmaniózou v Novém světě patří také pes hřivnatý (*Chrysocyon brachyurus*) s prevalencí 28,6-50 % (Curi et al., 2006; Luppi et al., 2008; Jusi et al., 2011), pes pralesní (*Speothos venaticus*) s jedním potvrzeným infikovaným jedincem (Jusi et al., 2011) a pes šedý (*Lycalopex vetulus*) s 33 % nakažených zvířat (Luppi et al., 2008).

Dosud bylo pojednáváno o možném rezervoáru *L. infantum*, nikoli *L. donovani*. Díky blízké příbuznosti a skutečnosti, že oba druhy způsobují viscerální leishmaniózu, by znalost volně žijícího rezervoáru *L. infantum* mohla být vodítkem k možnému RH *L. donovani* v endemických oblastech.

Studie pojednávající o psovitých šelmách jako rezervoáru *L. donovani* jsou staršího data a není tedy jistá garance, že paraziti nalezeni v tkáních a orgánech příslušných jedinců odpovídají právě tomuto druhu. V roce 1968 byl v oblasti Sahary chycen pár fenků (*Vulpes zerda*). Po třech měsících zemřel a při nekropsii byli v jeho orgánech i kůži nalezeni paraziti *L. donovani*. Autoři si však nejsou jisti, zda se nejedná o druh *L. tropica*, jejíž oblast výskytu spíše odpovídá místu nálezu zvířete (Conroy et al., 1970). Během let 1982-1983 bylo v jižním Súdánu testováno 72 šakalů (*Canis adustus aureus*). Pouze ve slezině jednoho z nich byly detekovány leishmanie. Na základě předchozího nálezu *L. donovani* ve stejné lokalitě, ze které pochází testovaný šakal, byl i parazit nalezený v šakalovi označen za druh *L. donovani* (Sixl et al., 1987).

## Hlodavci

Řada druhů hlodavců hraje roli v infekčních chorobách jako je mor, virová hemoragická horečka, venezuelská koňská encefalitida a v neposlední řadě také kutánní leishmanióza (Mackenzie, 1972). Hlodavci jsou obecně uznávaným rezervoárem *L. major* (Ashford, 2000). Lesní hlodavci pak figurují v přenosu *L. braziliensis* (Mackenzie, 1972).

Spolu s psovitými šelmami se také řadí mezi možné RH *L. donovani*. Súdánské studie z 60. let považují za rezervoár zejména myš nilskou (*Arvicanthis niloticus*) (Hoogstraal, 1969). Nicméně tehdy ještě nebylo možné dokázat, zda je původcem infekce nakažených jedinců opravdu *L. donovani*. Pokusy opakované v pozdějších letech ukázaly, že všechny kmeny izolované z hlodavčích vnitřností v rámci předešlých pokusů odpovídají *L. major* (Ashford, 2000). Myš nilská je stále dosti zkoumaným druhem, příležitostně nakaženým *L. donovani*. Ve východní Africe je považována za epidemiologicky vhodného RH. Dochází u ní k chronické infekci a vysoké toleranci (Hoogstraal, 1969). Nicméně v porovnání se psem, vačicí a ženetkou je preference sání *P. orientalis* na tomto druhu nízká (Hassan et al., 2009). V Súdánu byla sérologicky zjištěna 5,4% prevalence nákazy (Mukhtar et al., 2000). DNA parazita obsahovala 1 ze 168 myší nilských (0,6 %) (Elnaiem et al., 2001). Mikroskopická studie nepotvrdila infekci v žádném ze 75 zvířat (Sixl et al., 1987), podobně jako patologické vyšetření a krevní roztěry 37 jedinců provedené v pozdější studii (Dereure et al., 2003).

Dalšími druhy často testovanými na přítomnost protilátek či parazita jsou myš bodlinatá (*Acomys*



*cahirinus*), krysa mnohobradavková (*Mastomys natalensis*), myšice (*Apodemus spp.*), krysa obecná (*Rattus rattus*), aj. (Hoogstraal, 1969; Sixl et al., 1987; Elnaiem et al., 2001; Dereure et al., 2003). PCR pozitivní reakci prokázala pouze krysa mnohobradavková (Elnaiem et al., 2001). V Íránu byl na detekci *L. donovani* pozitivní pískomil perský (*Meriones persicus*) (Moheballi et al., 1998).

Zdali jsou hlodavci volně žijícím rezervoárem *L. infantum*, je taktéž recentně řešená otázka. Zejména u potkana (*Rattus norvegicus*) a krysy obecné, jež jsou často nakaženými druhy v Itálii (Di Bella et al., 2003) a Venezuele (Zulueta et al., 1999; Lara-Silva et al., 2014), přičemž ve Venezuele je krysa považována za možného RH *L. braziliensis* a *L. mexicana* (Oliveira et al., 2005).

### **Vačnatci**

První nepsovitou šelmou, u které byla objevena nákaza způsobená komplexem *L. donovani*, je vačice bělobřichá (*Didelphis albiventris*). V jejich orgánech ani kůži amastigoti nalezeni nebyli. U křečků, jimž byl inokulován filtrát z jejich tkání, však došlo ke vzniku infekce (Sherlock et al., 1984). Velká prevalence (91 % PCR, 71 % ELISA) byla zaznamenána u vačic v Brazílii (Santiago et al., 2007). V této studii však nebylo zkoumáno, o jaký druh rodu *Leishmania* jde a vzhledem k lokalitě je zřejmé, že se nejednalo o *L. donovani*. Přítomnost leishmaniové DNA byla prokázána u 1 ze 14 vačic opossum (*Didelphis marsupialis*) ve Venezuele (Zulueta et al., 1999).

### **Promykovití**

K testování promyky ichneumon (*Herpestes ichneumon*) na infekci *L. donovani* vedla súdánská studie preference sání *P. orientalis* v oblasti, kde nežijí lidé ani domácí zvířata (Hassan et al., 2009). Celkem 3,4 % a 3,2 % přenašečů bylo během dvou sezón infikováno promastigoty leishmanií. Proto je nasnadě, že infekce cirkuluje mezi divokými zvířaty. Promyka byla v rámci preference po psech nejoblíbenějším zdrojem potravy (Hassan et al., 2009) a u 1 z 11 zvířat byla mikroskopicky detekovány leishmanie. Pomocí PCR byli označeni za pozitivní 2 ze 14 jedinců (Elnaiem et al., 2001). Tento druh splňuje řadu kritérií pro RH: abundanci, distribuci, dlouhověkost i časté setkávání se s přenašeči (Elnaiem et al., 2001). Zdá se, že promyky i *P. orientalis*, jež je významným přenašečem leishmaniózy v Súdánu, sdílejí stejná místa k odpočinku, mezi něž patří termiště a dutiny stromů (Elnaiem et al., 1997; Palomares and Delibes, 2009).

Dalšími druhy, jež jsou považovány spíše za náhodné hostitele *L. donovani* jsou ženetka tečkovaná (*Genetta genetta*) a serval (*Leptailurus serval*). Pouze jeden jedinec z každého druhu byl označen za pozitivního (Hoogstraal, 1969). Ve studii prováděné Sixl et al., 1987 nebyla pozitivní žádná z 29 ženetek, 8 servalů ani 50 koček divokých (*Felis silvestris*).

**TABULKA č. 2:** Divoká zvířata testována na infekci *L. donovani*

Druh zvířete	Oblast	Séropozitivita (%)	PCR pozitivita (%)	Přítomnost amastigota v tkáni/ kultuře	Citace
Fenek ( <i>Vulpes vulpes</i> )*	Severní Afrika			Positv. nález v kůži a orgánech	(Conroy et al., 1970)
Šakal ( <i>Canis adustus aureus</i> )	Súdán			1,4 % (1 ze 72) slezina	(Sixl et al., 1987)
Myš nilská ( <i>Arvicanthis niloticus</i> )	Súdán	5,4 (DAT)			(Mukhtar et al., 2000)
	Súdán		0,6 (1 z 168) slezina, kůže	neg. nález ve slezině, krvi	(Elnaiem et al., 2001)
	Súdán			negat. nález v 75 jedincích slezina	(Sixl et al., 1987)
	Súdán			negat. nález, negat. kultura v 37 jedincích slezina	(Dereure et al., 2003)
Myš bodlinatá ( <i>Acomys cahirinus</i> )	Súdán			negat. nález v 71 jedincích slezina	(Sixl et al., 1987)

Druh zvířete	Oblast	Séropozitivita (%)	PCR pozitivita (%)	Přítomnost amastigota v tkáni/ přít. v kultuře	Citace
Krysa obecná ( <i>Rattus rattus</i> )	Súdán			negat. nález ve 102 jedincích slezina	(Sixl et al., 1987)
	Súdán	73 jedinců < Cut-off (DAT)			(Mukhtar et al., 2000)
Krysa mnohobradavková ( <i>Mastomys natalensis</i> )	Súdán		16,7 (1 z 6) krev		(Elnaiem et al., 2001)
	Súdán			negat. nález v 82 jedincích slezina	(Sixl et al., 1987)
Pískomil perský ( <i>Meriones persicus</i> )	Írán	0,5 (2 z 394)(DAT)		16,8 % (66 z 394) krev	(Mohebbali et al., 1998)
Promyka ichneumon ( <i>Herpestes ichneumon</i> )	Súdán		14,3 (2 z 14) slezina	9% (1 z 11) krev, slezina, játra	(Elnaiem et al., 2001)

\* Testován byl pouze jeden jedinec. Autoři studie si nejsou jisti, zda se jedná o druh *L. donovani*, místo nálezu spíše odpovídá druhu *L. tropica*

## 7. ROZDÍLNÁ OPATŘENÍ V PŘENOSU ANTROPONOTICKÉ A ZOONOTICKÉ LEISHMANIÓZY

Znalost rezervoáru *L. donovani* je podstatná pro případná protiepidemická opatření, která by mohla vést ke snížení nebo úplnému zabránění přenosu leishmaniózy na lidi. Obecně lze infekční onemocnění rozdělit na dvě skupiny podle hostitelů, ve kterých je infekce udržována, na antroponózy a zoonózy. Při antroponotickém přenosu je jediným zdrojem infekce člověk, zatímco zoonotické onemocnění postihuje především zvířata a člověk se nakazí pouze ojedinele. Jak již bylo několikrát řečeno, dva druhy leishmanií (*L. donovani*, *L. infantum*) sdílející stejný komplex *L. donovani*, se liší především způsobem přenosu. Přenos leishmaniózy, jejímž původcem je *L. infantum* je považován za zoonózu, zatímco přenos *L. donovani* je antroponotický.

Ochranná opatření vhodná pro eliminaci antroponotické leishmaniózy jsou založena na co nejpřesnější detekci případů, určení diagnózy a odpovídající léčbě pacientů s klinickou formou leishmaniózy (WHO 2010). Velkým problémem jsou případy, u kterých se rozvine post-kala-azar dermální leishmanióza (PKDL). Nejvíce jich je hlášeno v Súdánu a na Indickém subkontinentu (Ganguly et al., 2010). U takovýchto lidí přetrvávají příznaky po dlouhou dobu, ale většinou nedojde k systémové infekci. Bez vhodné léčby tvoří tito lidé vhodný rezervoár. Přesto dosud nejsou zaznamenány žádné snahy o kontrolu případů s PKDL. Také pacienti koinfikovaní leishmanií a virem HIV jsou vysoce infekční pro přenašeče a zvyšují pravděpodobnost přenosu na ostatní jedince (WHO 2010).

Jednou z možností, jak zabránit nákaze, je vyvarovat se kontaktu s přenašeči, např. použitím insekticidů (Quinnell and Courtenay, 2009). Užitečnou ochranou lidí a zvířat v domácnostech jsou insekticidem napuštěné sítě. Ty významně snižují riziko incidence leishmaniózy v Súdánu, Nepálu a Brazílii (El-naïem et al., 1999; Bern et al., 2000; Ritmeijer et al., 2007; Courtenay et al., 2007). Vyšší účinnost byla zjištěna v Indii, kde se přenašeči leishmaniózy vyskytují v těsné blízkosti lidí. V Africe je kontrola přenašečů složitější, jelikož patří mezi sylvatické druhy a nemoc propuká v nepravidelně se opakujících epidemiích, zejména v chudých populacích žijících na periferii (Ashford, 2000). Největším problémem jsou poměrně vysoké náklady na pořízení konvenčně používaných sítí a jejich další reimpregnaci (Vythilingam et al., 1999).

Další možnou variantou obrany proti přenašečům jsou postřiky rizikových míst insekticidy, např. vnitřních prostor obydlí, kde budou mít největší efekt na endofilní přenašeče. Hlavním účelem postřiku není snížit celkovou populaci přenašečů, ale zmenšit počet sání na člověku. V 50. letech minulého století byl v Brazílii, Indii a Číně tento postřik použit ve velkém. Tehdy používaným insekticidem bylo DDT (dichlordifenyltrichlorethan), které v chudých zemích díky své nízké ceně

přetrvalo dosud. V Brazílii jej nahradily syntetické pyrethroidy (Lacerda, 1994). K úplnému vymizení viscerální leishmaniózy došlo pouze v severovýchodní Číně. Pravděpodobně díky rozsáhlému programu založenému na aktivní detekci případů, volně dostupné léčbě a postřikům rizikových míst (Desjeux, 2004). V Indii se tamní přenašeč *P. argentipes* znovu rozšířil po 9 měsících od použití DDT (Mukhopadhyay et al., 1996). Dočasná redukce leishmaniózy byla také několikrát vedlejším efektem kontrolované redukce malárie. Obzvláště při jejím eradikačním programu v Itálii, Řecku, Izraeli, Indii a Pákistánu (Desjeux, 2004).

Jiné strategie se používají k omezení přenosu nákazy u zoonotických leishmanióz. Zde je kladen důraz zejména na eliminaci infekce u rezervoárových hostitelů žijících v blízkosti člověka. V případě *L. infantum* jsou rezervoárovým hostitelem domácí psi. Před tím, než se začnou zavádět jakákoli opatření, je třeba zjistit, jaká je mezi psy distribuce infekce. Nejpoužívanějšími metodami pro detekci nákazy jsou sérologické metody ELISA a IFAT. V tu samou dobu by měla být provedena také klinická vyšetření. U méně než poloviny infikovaných psů jsou viditelné symptomy leishmaniózy. Nicméně velká část psů bez viditelných příznaků se díky xenodiagnóze projevila jako schopna infikovat přenašeče. Ideálně by měli být utraceni všichni symptomatictí nebo séropozitivní psi (WHO 2010). Avšak v Brazílii se toto opatření neprojevilo jako dostatečně efektivní. V jedné studii nedošlo po utracení všech séropozitivních psů ke změně incidence ani u lidí ani u psů (Dietze et al., 1997). V jiné brazilské studii došlo po dvou letech stejného zákroku ke snížení incidence mezi psy z 36 % na 6 %. Po dalších dvou letech se však incidence opět zvedla na 16 %. V kontrolní oblasti, ve které k vyhubení nedošlo, se incidence pohybovala mezi 16-27 % (Ashford et al., 1998). V 50. letech minulého století se však podařilo v Číně eradikovat *L. infantum* vyhubením téměř celé psí populace. Od té doby se v žádné oblasti na světě nic podobného nepodařilo (Ashford, 2000). Samotná léčba psů, prováděna zejména ve Středomoří, se zdá být neúčinná. Většina léčených jedinců se stává infekčními pro přenašeče již po několika měsících od poslední chemoterapie. Navzdory tomu, že klinické příznaky nejsou viditelné, pes zůstává zdrojem infekce (Quinnell and Courtenay, 2009, WHO 2010). V tomto případě se zdá být nejlepší a nejúčinnější možností, jak zabránit šíření infekce, aplikace insekticidů. V poslední době se velmi osvědčily deltamethrinové obojky, jež snížily incidenci leishmaniózy mezi psy v Itálii (Maroli et al., 2001) a Brazílii (Reithinger et al., 2004).

Typickou zoonózou je i kutánní leishmanióza způsobená druhem *L. major*, jejímž RH jsou hlodavci. Ve střední Asii došlo k masové likvidaci hlodavčích kolonií buď jedem nebo rozoráním nor. Stejný postup byl použit také v severní Africe. Změny incidence mezi lidmi však nejsou přesvědčivé (Kamhawi et al., 1993; Ashford, 2000). Návratu hlodavců do vypleněných lokalit se těžko zabraňuje. Možnými překážkami mohou být např. kanály nebo velká lidmi obdělávaná pole. Další možností je vysázení specifických druhů rostlin a stromů, které brání růstu vegetaci, jež hlodavci preferují. Např. druh *Psamomys obesus* si s oblibou vytváří nory v blízkosti keřů čeledi Chenopodiaceae

(Kamhawi et al., 1993).

Z předchozích příkladů je zřejmé, že opatření proti přenosu antroponotické a zoonotické leishmaniózy se mohou velmi lišit. Z tohoto hlediska je velmi podstatné vědět, zda zvířecí rezervoár *L. donovani* existuje či nikoliv a podle toho navrhnout účinnější protiepidemická opatření.

## 8. ZÁVĚR

Velkým omezením studia rezervoáru jakéhokoli patogena je skutečnost, že neexistuje přesná definice pojmu rezervoárový hostitel. Především je důležité rozhodnout, zda do rezervoáru nákazy spadá také náhodný hostitel. Při případné eradikaci infekce by eliminace pouze jednoho z těchto dvou hostitelů mohla vést k různým důsledkům.

Preference sání a místa vhodná k tvorbě líhnišť mohou být jedním ze znaků vedoucích k určení zvířecího rezervoáru. Zdá se ale, že výsledky zkoumání těchto jevů se daleko víc liší druhem přenašeče, danou lokalitou a konkrétní nabídkou zdrojů sání.

Podstatnou součástí prokázání existence zvířecího RH jsou metody, jež byly k testování zvířat použity. Každá metoda – ať už přímá či nepřímá – užitá k detekci parazita má své přednosti, ale i jistá omezení. Při použití jakékoli z nich, by měla být tato skutečnost brána v úvahu, zvláště pak při vyhodnocování výsledků. Pro detekci *L. donovani* je klíčové rozlišit druhy v rámci *L. donovani* komplexu.

V tuto chvíli je za jediný zdroj infekce *L. donovani* považován člověk. Žádný druh domácích ani divokých zvířat se neprojevil jako jednoznačný RH. Tato otázka zůstává otevřená u psovitých šelem, zejména domácích psů, jež jsou obecně uznávaným rezervoárem *L. infantum*. Vážným adeptem z řad domácích zvířat jsou také kozy. Myš nilská (*Arvicanthis niloticus*), spolu s dalšími druhy hlodavců patří spíše mezi příležitostně nakažená zvířata žijící ve volné přírodě. Potencionálním sylvatickým rezervoárem je zřejmě promyka ichneumon (*Herpestes ichneumon*).

## 9. POUŽITÁ LITERATURA

**Addy, Ak, M., Kk, G., and Ak, H. (1983).** Host preference of *Phlebotomus argentipes* in different biotopes. *Trop. Geogr. Med.* 35, 343–345.

**Agrela, I., Sanchez, E., Gomez, B., and Feliciangeli, M.D. (2002).** Feeding behavior of *Lutzomyia pseudolongipalpis* (Diptera: Psychodidae), a putative vector of visceral leishmaniasis in Venezuela. *J. Med. Entomol.* 39, 440–445.

**Aguilar, C.M., Fernández, E., de Fernández, R., and Deane, L.M. (1984).** Study of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. The role of domestic animals. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79, 181–195.

**Alam, M.S., Ghosh, D., Khan, M.G.M., Islam, M.F., Mondal, D., Itoh, M., Islam, M.N., and Haque, R. (2011).** Survey of domestic cattle for anti-*Leishmania* antibodies and *Leishmania* DNA in a visceral leishmaniasis endemic area of Bangladesh. *BMC Vet. Res.* 7, 27.

**Alam, M.Z., Yasin, G., Kato, H., Sakurai, T., and Katakura, K. (2013).** PCR-based detection of *Leishmania donovani* DNA in a stray dog from a visceral Leishmaniasis endemic focus in Bangladesh. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 75, 75–78.

**Alexander, B., Lopes de Carvalho, R., McCallum, H., and Pereira, M.H. (2002).** Role of the Domestic Chicken (*Gallus gallus*) in the Epidemiology of Urban Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1480–1485.

**Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., and Nieto, J. (2004).** Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57, 1–88.

**Alvar, J., Yactayo, S., and Bern, C. (2006).** Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* 22, 552–557.

**Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., and WHO Leishmaniasis Control Team (2012).** Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One* 7, e35671.

**Anjili, C.O., Ngichabe, C.K., Mbatia, P.A., Lugalia, R.M., Wamwayi, H.M., and Githure, J.I. (1998).** Experimental infection of domestic sheep with culture-derived *Leishmania donovani* promastigotes. *Vet. Parasitol.* 74, 315–318.

**Ashford, R.W. (1996).** Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.* 14,

523–532.

**Ashford, R.W. (2000).** The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* *30*, 1269–1281.

**Ashford, D.A., David, J.R., Freire, M., David, R., Sherlock, I., Eulálio, M.C., Sampaio, D.P., and Badaro, R. (1998).** Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *59*, 53–57.

**Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., and Ferrer, L. (2008).** Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* *24*, 324–330.

**Barbierato, M., Argentini, C., and Skaper, S.D. (2012).** Indirect immunofluorescence staining of cultured neural cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *846*, 235–246.

**Barnett, P.G., Singh, S.P., Bern, C., Hightower, A.W., and Sundar, S. (2005).** Virgin Soil: The Spread of Visceral Leishmaniasis into Uttar Pradesh, India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *73*, 720–725.

**Bartůňková, J., Paulík, M., and a, kolektiv (2011).** *Vyšetřovací metody v imunologii: 2., přepracované a doplněné vydání* (Grada Publishing a.s.).

**Bashaye, S., Nombela, N., Argaw, D., Mulugeta, A., Herrero, M., Nieto, J., Chicharro, C., Cañavate, C., Aparicio, P., Vélez, I.D., et al. (2009).** Risk Factors for Visceral Leishmaniasis in a New Epidemic Site in Amhara Region, Ethiopia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *81*, 34–39.

**Bern, C., Joshi, A.B., Jha, S.N., Das, M.L., Hightower, A., Thakur, G.D., and Bista, M.B. (2000).** Factors associated with visceral leishmaniasis in Nepal: bed-net use is strongly protective. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *63*, 184–188.

**Bern, C., Hightower, A.W., Chowdhury, R., Ali, M., Amann, J., Wagatsuma, Y., Haque, R., Kurkjian, K., Vaz, L.E., Begum, M., et al. (2005).** Risk Factors for Kala-Azar in Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* *11*, 655–662.

**Bhattarai, N.R., Van der Auwera, G., Khanal, B., De Doncker, S., Rijal, S., Das, M.L., Uranw, S., Ostyn, B., Praet, N., Speybroeck, N., et al. (2009).** PCR and direct agglutination as *Leishmania* infection markers among healthy Nepalese subjects living in areas endemic for Kala-Azar. *Trop. Med. Int. Health TM IH* *14*, 404–411.



**Bhattarai, N.R., Van der Auwera, G., Rijal, S., Picado, A., Speybroeck, N., Khanal, B., De Doncker, S., Das, M.L., Ostyn, B., Davies, C., et al. (2010).** Domestic animals and epidemiology of visceral leishmaniasis, Nepal. *Emerg. Infect. Dis.* *16*, 231–237.

**Braz, R.F.S., Nascimento, E.T., Martins, D.R.A., Wilson, M.E., Pearson, R.D., Reed, S.G., and Jeronimo, S.M.B. (2002).** The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *67*, 344–348.

**Bucheton, B., Kheir, M.M., El-Safi, S.H., Hammad, A., Mergani, A., Mary, C., Abel, L., and Dessein, A. (2002).** The interplay between environmental and host factors during an outbreak of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Microbes Infect.* *4*, 1449–1457.

**Burns, J.M., Shreffler, W.G., Benson, D.R., Ghalib, H.W., Badaro, R., and Reed, S.G. (1993).** Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *90*, 775–779.

**Camargo, J.B., Langoni, H., Troncarelli, M.Z., Machado, J.G., Lucheis, S.B., and Padovani, C.R. (2010).** Performance of IFAT, ELISA, direct parasitological examination and PCR on lymph node aspirates for canine visceral leishmaniasis diagnosis. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* *16*, 414–420.

**Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J.-A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovão, J.M., Afonso, M.O., et al. (2006).** Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Trop. Med. Int. Health* *11*, 1708–1714.

**Cardoso, L., Schallig, H.D.F.H., Neto, F., Kroon, N., and Rodrigues, M. (2004).** Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop.* *91*, 95–100.

**Casanova, C., Andrighetti, M.T.M., Sampaio, S.M.P., Marcoris, M.L.G., Colla-Jacques, F.E., and Prado, Â.P. (2013).** Larval Breeding Sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Visceral Leishmaniasis Endemic Urban Areas in Southeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* *7*, e2443.

**Celeste, B.J., Angel, S.O., Castro, L.G.M., Gidlund, M., and Goto, H. (2004).** *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* *37*, 1591–1593.

**Chappuis, F., Rijal, S., Soto, A., Menten, J., and Boelaert, M. (2006).** A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ* 333, 723–0.

**Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J., and Boelaert, M. (2007).** Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 873–882.

**Chargui, N., Haouas, N., Gorcii, M., Akrouit Messaidi, F., Zribi, M., and Babba, H. (2007).** Increase of canine leishmaniasis in a previously low-endemicity area in Tunisia. *Parasite Paris Fr.* 14, 247–251.

**Chaves, L.F., Hernandez, M.-J., Dobson, A.P., and Pascual, M. (2007).** Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 23, 311–316.

**Conroy, J.D., Levine, N.D., and Small, E. (1970).** Visceral Leishmaniosis in a Fenner Fox (*Fennecus zerda*). *Pathol. Vet. Online* 7, 163–170.

**Courtenay, O., Macdonald, D.W., Lainson, R., Shaw, J.J., and Dye, C. (1994).** Epidemiology of canine leishmaniasis: a comparative serological study of dogs and foxes in Amazon Brazil. *Parasitology* 109 (Pt 3), 273–279.

**Courtenay, O., Quinnell, R.J., Garcez, L.M., Shaw, J.J., and Dye, C. (2002).** Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. *J. Infect. Dis.* 186, 1314–1320.

**Courtenay, O., Gillingwater, K., Gomes, P.A.F., Garcez, L.M., and Davies, C.R. (2007).** Deltamethrin-impregnated bednets reduce human landing rates of sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* in Amazon households. *Med. Vet. Entomol.* 21, 168–176.

**Criado-Fornelio, A., Gutierrez-Garcia, L., Rodriguez-Caabeiro, F., Reus-Garcia, E., Roldan-Soriano, M.A., and Diaz-Sanchez, M.A. (2000).** A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet. Parasitol.* 92, 245–251.

**Curi, N.H. de A., Miranda, I., and Talamoni, S.A. (2006).** Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 99–101.

- Deborggraeve, S., Boelaert, M., Rijal, S., De Doncker, S., Dujardin, J.-C., Herdewijn, P., and Büscher, P. (2008).** Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical visceral leishmaniasis in Nepal and its role in diagnosis of disease. *Trop. Med. Int. Health* 13, 1378–1383.
- Dereure, J., Boni, M., Pratlong, F., Osman, M.E.H., Bucheton, B., El-Safi, S., Feugier, E., Musa, M.K., Davoust, B., Dessein, A., et al. (2000).** Visceral leishmaniasis in Sudan: first identifications of *Leishmania* from dogs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, 154–155.
- Dereure, J., El-Safi, S.H., Bucheton, B., Boni, M., Kheir, M.M., Davoust, B., Pratlong, F., Feugier, E., Lambert, M., Dessein, A., et al. (2003).** Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host-parasite relationships. *Microbes Infect.* 5, 1103–1108.
- Desjeux, P. (2001).** The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95, 239–243.
- Desjeux, P. (2004).** Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305–318.
- Dhiman, R.C., Shetty, P.S., and Dhanda, V. (1983).** Breeding habitats of phlebotomine sandflies in Bihar, India. *Indian J. Med. Res.* 77, 29–32.
- Dietze, R., Barros, G.B., Teixeira, L., Harris, J., Michelson, K., Falqueto, A., and Corey, R. (1997).** Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 25, 1240–1242.
- Dinesh, D.S., Ranjan, A., Palit, A., Kishore, K., and Kar, S.K. (2001).** Seasonal and nocturnal landing/biting behaviour of *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 95, 197–202.
- Elnaiem, D. a., Hassan, H. k., and Ward, R. d. (1997).** Phlebotomine sandflies in a focus of visceral leishmaniasis in a border area of eastern Sudan. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 91, 307.
- Elnaiem, D.A., Elnahas, A.M., and Aboud, M.A. (1999).** Protective efficacy of lambda-cyhalothrin-impregnated bednets against *Phlebotomus orientalis*, the vector of visceral leishmaniasis in Sudan. *Med. Vet. Entomol.* 13, 310–314.
- Elnaiem, D.A., Hassan, M.M., Maingon, R., Nureldin, G.H., Mekawi, A.M., Miles, M., and Ward, R.D. (2001).** The Egyptian mongoose, *Herpestes ichneumon*, is a possible reservoir host of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Parasitology* 122, 531–536.

**Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D.C., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R., et al. (2006).** Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin. Microbiol. Rev.* *19*, 165–256.

**Van Eys, G.J., Schoone, G.J., Kroon, N.C., and Ebeling, S.B. (1992).** Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* *51*, 133–142.

**Feliciangeli, M.D. (2004).** Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Med. Vet. Entomol.* *18*, 71–80.

**Ferro, C., Pardo, R., Torres, M., and Morrison, A.C. (1997).** Larval Microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an Endemic Focus of Visceral Leishmaniasis in Colombia. *J. Med. Entomol.* *34*, 719–728.

**Ganguly, S., Das, N.K., Barbhuiya, J.N., and Chatterjee, M. (2010).** Post-kala-azar dermal leishmaniasis--an overview. *Int. J. Dermatol.* *49*, 921–931.

**Garlapati, R.B., Abbasi, I., Warburg, A., Poché, D., and Poché, R. (2012).** Identification of bloodmeals in wild caught blood fed *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) using cytochrome b PCR and reverse line blotting in Bihar, India. *J. Med. Entomol.* *49*, 515–521.

**Gebre-Michael, T., and Lane, R.P. (1996).** The roles of *Phlebotomus martini* and *P.celiae* (Diptera: Phlebotominae) as vectors of visceral leishmaniasis in the Aba Roba focus, southern Ethiopia. *Med. Vet. Entomol.* *10*, 53–62.

**Gebre-Michael, T., Balkew, M., Alamirew, T., Gudeta, N., and Reta, M. (2007).** Preliminary entomological observations in a highland area of Amhara region, northern Ethiopia, with epidemic visceral leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* *101*, 367–370.

**Gebre-Michael, T., Balkew, M., Berhe, N., Hailu, A., and Mekonnen, Y. (2010).** Further studies on the phlebotomine sandflies of the kala-azar endemic lowlands of Humera-Metema (north-west Ethiopia) with observations on their natural blood meal sources. *Parasit. Vectors* *3*, 6.

**Gelanew, T., Amogne, W., Abebe, T., Kuhls, K., Hailu, A., and Schönian, G. (2010).** A clinical isolate of *Leishmania donovani* with ITS1 sequence polymorphism as a cause of para-kala-azar dermal leishmaniasis in an Ethiopian human immunodeficiency virus-positive patient on highly active antiretroviral therapy. *Br. J. Dermatol.* *163*, 870–874.

**Ghosh, K.N., and Bhattacharya, A. (1991).** Breeding places of *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti (Diptera: Psychodidae) in West Bengal, India. *Parassitologia* 33 *Suppl*, 267–272.

**Ghosh, K.N., Bhattacharya, A., and Ghosh, T.N. (1990).** Blood meal analysis of *Phlebotomus argentipes* in eight districts of West Bengal. *J. Commun. Dis.* 22, 67–71.

**Haines, L.R., Thomas, J.M., Jackson, A.M., Eyford, B.A., Razavi, M., Watson, C.N., Gowen, B., Hancock, R.E.W., and Pearson, T.W. (2009).** Killing of Trypanosomatid Parasites by a Modified Bovine Host Defense Peptide, BMAP-18. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e373.

**El Harith, A., Kolk, A.H., Leeuwenburg, J., Muigai, R., Huigen, E., Jelsma, T., and Kager, P.A. (1988).** Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1321–1325.

**Hassan, M.M., Osman, O.F., El-Raba'a, F.M., Schallig, H.D., and Elnaiem, D.-E.A. (2009).** Role of the domestic dog as a reservoir host of *Leishmania donovani* in eastern Sudan. *Parasit. Vectors* 2, 26.

**Haydon, D.T., Cleaveland, S., Taylor, L.H., and Laurenson, M.K. (2002).** Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1468–1473.

**Hoogstraal, H. (1969).** Leishmaniasis in the Sudan republic. 30. Final epidemiologic report (Baltimore: Williams & Wilkins).

**Jarra, W., and Snounou, G. (1998).** Only Viable Parasites Are Detected by PCR following Clearance of Rodent Malarial Infections by Drug Treatment or Immune Responses. *Infect. Immun.* 66, 3783–3787.

**Jusi, M.M.G., Starke-Buzetti, W.A., Oliveira, T.M.F. de S., Tenório, M. da S., Sousa, L. de O. de, and Machado, R.Z. (2011).** Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 20, 219–222.

**Kalayou, S., Tadelle, H., Bsrat, A., Abebe, N., Haileselassie, M., and Schallig, H.D.F.H. (2011).** Serological Evidence of *Leishmania donovani* Infection in Apparently Healthy Dogs using Direct Agglutination Test (DAT) and rk39 Dipstick Tests in Kafta Humera, north-west Ethiopia. *Transbound. Emerg. Dis.* 58, 255–262.

**Kamhawi, S., Arbagi, A., Adwan, S., and Rida, M. (1993).** Environmental manipulation in the control of a zoonotic cutaneous leishmaniasis focus. *Arch. Inst. Pasteur Tunis* 70, 383–390.

**Kelly, D.W., Mustafa, Z., and Dye, C. (1996).** Density-Dependent Feeding Success in a Field Population of the Sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *J. Anim. Ecol.* *65*, 517–527.

**Khanal, B., Picado, A., Bhattarai, N.R., Van Der Auwera, G., Das, M.L., Ostry, B., Davies, C.R., Boelaert, M., Dujardin, J.-C., and Rijal, S. (2010).** Spatial analysis of *Leishmania donovani* exposure in humans and domestic animals in a recent kala azar focus in Nepal. *Parasitology* *137*, 1597–1603.

**Killick-Kendrick, R. (1990).** Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.* *4*, 1–24.

**King, R.C., Stansfield, W.D., and Mulligan, P.K. (2006).** *A Dictionary of Genetics* (Oxford University Press).

**Kolaczinski, J.H., Reithinger, R., Worku, D.T., Ocheng, A., Kasimiro, J., Kabatereine, N., and Brooker, S. (2008).** Risk factors of visceral leishmaniasis in East Africa: a case-control study in Pokot territory of Kenya and Uganda. *Int. J. Epidemiol.* *37*, 344–352.

**Kumar, V., Rama, A., Kesari, S., Bhunia, G.S., Dinesh, D.S., and Das, P. (2013).** Oviposition behaviour of *Phlebotomus argentipes*--a laboratory-based study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *108*, 1065–1067.

**Lacerda, M.M. (1994).** The Brazilian Leishmaniasis Control Program. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *89*, 489–495.

**Lachaud, L., Marchegui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J.P., and Bastien, P. (2002).** Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* *40*, 210–215.

**Lainson, R., and Rangel, E.F. (2005).** *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *100*, 811–827.

**Lainson, R., Shaw, J.J., Silveira, F.T., and Braga, R.R. (1987).** American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *81*, 517.

**Lara-Silva, F. de O., Barata, R.A., Michalsky, E.M., Ferreira, E. de C., Lopes, M.O.G., Pinheiro, A. da C., Fortes-Dias, C.L., and Dias, E.S. (2014).** *Rattus norvegicus* (Rodentia: Muridae) Infected by *Leishmania (Leishmania) infantum* (syn. *Le. chagasi*) in Brazil. *BioMed Res. Int.* *2014*, 592986.

- Lukeš, J., Mauricio, I.L., Schönian, G., Dujardin, J.-C., Soteriadou, K., Dedet, J.-P., Kuhls, K., Tintaya, K.W.Q., Jirků, M., Chocholová, E., et al. (2007).** Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 9375–9380.
- Luppi, M.M., Malta, M.C.C., Silva, T.M.A., Silva, F.L., Motta, R.O.C., Miranda, I., Ecco, R., and Santos, R.L. (2008).** Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. *Vet. Parasitol.* *155*, 146–151.
- Lynch, M., and Milligan, B.G. (1994).** Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* *3*, 91–99.
- Maalej, I.A., Chenik, M., Louzir, H., Ben Salah, A., Bahloul, C., Amri, F., and Dellagi, K. (2003).** Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *68*, 312–320.
- Macedo-Silva, V.P., Martins, D.R.A., Souza De Queiroz, P.V., Pinheiro, M.P.G., Freire, C.C.M., Queiroz, J.W., Dupnik, K.M., Pearson, R.D., Wilson, M.E., Jeronimo, S.M.B., et al. (2014).** Feeding Preferences *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the Sand Fly Vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *J. Med. Entomol.* *51*, 237–244.
- Mackenzie, R.B. (1972).** Public health importance of rodents in South America. *Bull. World Health Organ.* *47*, 161–169.
- Mansour, N.S., Stauber, L.A., and McCoy, J.R. (1970).** Leishmaniasis in the Sudan Republic. 29. Comparison and epidemiological implications of experimental canine infections with Sudanese, Mediterranean, and Kenyan strains of *Leishmania donovani*. *J. Parasitol.* *56*, 468–472.
- Marcili, A., Sperança, M.A., da Costa, A.P., Madeira, M. de F., Soares, H.S., Sanches, C. de O.C.C., Acosta, I. da C.L., Giroto, A., Minervino, A.H.H., Horta, M.C., et al. (2014).** Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania* (L.) *infantum* *chagasi* in South America. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* *25C*, 44–51.
- Maroli, M., Mizzoni, V., Siragusa, C., D’Orazi, A., and Gradoni, L. (2001).** Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med. Vet. Entomol.* *15*, 358–363.

**Maurya, R., Singh, R.K., Kumar, B., Salotra, P., Rai, M., and Sundar, S. (2005).** Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. *J. Clin. Microbiol.* *43*, 3038–3041.

**Mohebbali, M., Hajjaran, H., Hamzavi, Y., Mobedi, I., Arshi, S., Zarei, Z., Akhoundi, B., Naeini, K.M., Avizeh, R., and Fakhar, M. (2005).** Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. *Vet. Parasitol.* *129*, 243–251.

**Moreno, J., and Alvar, J. (2002).** Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* *18*, 399–405.

**Mukhopadhyay, A.K., Hati, A.K., Chakraborty, S., and Saxena, N.B. (1996).** Effect of DDT on *Phlebotomus* sandflies in Kala-Azar endemic foci in West Bengal. *J. Commun. Dis.* *28*, 171–175.

**Mukhtar, M.M., Sharief, A.H., Saffi, S.H.E., Harith, A.E., Higazzi, T.B., Adam, A.M., and Abdalla, H.S. (2000).** Detection of antibodies to *Leishmania donovani* in animals in a kala-azar endemic region in eastern Sudan: a preliminary report. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *94*, 33–36.

**Mutinga, M.J. (1986).** Epidemiology of leishmaniasis in Kenya. Advances in research on vectors and animal reservoirs, and possible control measures. *Int. J. Trop. Insect Sci.* *7*, 199–206.

**Mutinga, M.J., Kamau, C.C., Kyai, F.M., and Omogo, D.M. (1989).** Epidemiology of leishmaniasis in Kenya: V. Wider search for breeding habitats of phlebotomine sandflies in three kala-azar endemic foci. *East Afr. Med. J.* *66*, 173–182.

**Mutinga, M.J., Basimike, M., Kamau, C.C., and Mutero, C.M. (1990).** Epidemiology of leishmaniasis in Kenya. Natural host preference of wild caught phlebotomine sandflies in Baringo District, Kenya. *East Afr. Med. J.* *67*, 319–327.

**Napier, L. E., Smith, R. O. A., (1926).** A study of biopnomics of *Phlebotomus argentipes*, with spatial reference to the conditions in Calcutta. *Indian Med. Res. Mem.* *4*, 161–172

**N. D. Levine, (1970).** Visceral leishmaniosis in a fennec fox (*Fennecus zerda*). *Pathol. Vet.* *7*, 163–170.

**Ngumbi, P.M., Lawyer, P.G., Johnson, R.N., Kiilu, G., and Asiago, C. (1992).** Identification of phlebotomine sandfly bloodmeals from Baringo District, Kenya, by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Med. Vet. Entomol.* *6*, 385–388.

**Oliveira, F.S., Pirmez, C., Pires, M.Q., Brazil, R.P., and Pacheco, R.S. (2005).** PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.* *129*, 219–227.



- De Oliveira, A.G., Marassá, A.M., Consales, C.A., Dorval, M.E.C., Fernandes, C.E., de Oliveira, G.R., Brazil, R.P., and Galati, E.A.B. (2008).** Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Trop.* 107, 238–241.
- Palit, A., Bhattacharya, S.K., and Kundu, S.N. (2005).** Host preference of *Phlebotomus argentipes* and *Phlebotomus papatasi* in different biotopes of West Bengal, India. *Int. J. Environ. Health Res.* 15, 449–454.
- Palomares, F., and Delibes,, M. (2009).** Resting ecology and behaviour of Egyptian mongooses (*Herpestes ichneumon*) in southwestern Spain. *J. Zool.* 230, 557 – 566.
- Pandya, A.P., and Niyogi, A.K. (1980).** Ecological study on immature stages of phlebotomid sandflies in Gujarat. *Indian J. Med. Res.* 72, 355–358.
- Piarroux, R., Gambarelli, F., Dumon, H., Fontes, M., Dunan, S., Mary, C., Toga, B., and Quilici, M. (1994).** Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients. *J. Clin. Microbiol.* 32, 746–749.
- Pratlong, F., Dereure, J., Bucheton, B., El-Safi, S., Dessein, A., Lanotte, G., and Dedet, J.P. (2001).** Sudan: the possible original focus of visceral leishmaniasis. *Parasitology* 122, 599–605.
- Pratlong, F., Rioux, J.-A., Marty, P., Faraut-Gambarelli, F., Dereure, J., Lanotte, G., and Dedet, J.-P. (2004).** Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4077–4082.
- Prina, E., Roux, E., Mattei, D., and Milon, G. (2007).** *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect.* 9, 1307–1315.
- Quate, L.W. (1964).** *Phlebotomus* sandflies of the Paloich area in the Sudan (Diptera, Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 1, 213–268.
- Quinnell, R.J., and Courtenay, O. (2009).** Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136, 1915–1934.
- Quinnell, R.J., Dye, C., and Shaw, J.J. (1992).** Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. *Med. Vet. Entomol.* 6, 195–200.

- Reale, S., Maxia, L., Vitale, F., Glorioso, N.S., Caracappa, S., and Vesco, G. (1999).** Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J. Clin. Microbiol.* *37*, 2931–2935.
- Reithinger, R., Coleman, P.G., Alexander, B., Vieira, E.P., Assis, G., and Davies, C.R. (2004).** Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *Int. J. Parasitol.* *34*, 55–62.
- Del Río, L., Chitimia, L., Cubas, A., Victoriano, I., De la Rúa, P., Gerrikagoitia, X., Barral, M., Muñoz-García, C.I., Goyena, E., García-Martínez, D., et al. (2014).** Evidence for widespread *Leishmania infantum* infection among wild carnivores in *L. infantum* periendemic northern Spain. *Prev. Vet. Med.* *113*, 430–435.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., and Perieres, J. (1990).** Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comparée* *65*, 111–125.
- Ritmeijer, K., Davies, C., van Zorge, R., Wang, S.-J., Schorscher, J., Dongu'du, S.I., and Davidson, R.N. (2007).** Evaluation of a mass distribution programme for fine-mesh impregnated bednets against visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Trop. Med. Int. Health TM IH* *12*, 404–414.
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., López-Fuertes, L., Timón, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sánchez-Robert, E., Francino, O., and Alberola, J. (2007).** A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int. J. Parasitol.* *37*, 683–693.
- Rosário, E.Y. do, Genaro, O., França-Silva, J.C., Costa, R.T. da, Mayrink, W., Reis, A.B., and Carneiro, M. (2005).** Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *100*, 197–203.
- Rossi, E., Bongiorno, G., Ciolli, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Gramiccia, M., Gradoni, L., and Maroli, M. (2008).** Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Trop.* *105*, 158–165.
- Rosypal, A.C., Tripp, S., and Kinlaw, C. (2010).** Surveillance for Antibodies to *Leishmania* spp. in Dogs From Sri Lanka. *J. Parasitol.* *96*, 230–231.

- Ryan, J.R., Mbui, J., Rashid, J.R., Wasunna, M.K., Kirigi, G., Magiri, C., Kinoti, D., Ngumbi, P.M., Martin, S.K., Odera, S.O., et al. (2006).** Spatial Clustering and Epidemiological Aspects of Visceral Leishmaniasis in Two Endemic Villages, Baringo District, Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *74*, 308–317.
- Saha, S., Ramachandran, R., Hutin, Y.J.F., and Gupte, M.D. (2009).** Visceral leishmaniasis is preventable in a highly endemic village in West Bengal, India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *103*, 737–742.
- Santiago, M.E.B., Vasconcelos, R.O., Fattori, K.R., Munari, D.P., Michelin, A. de F., and Lima, V.M.F. (2007).** An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). *Vet. Parasitol.* *150*, 283–290.
- Sastre, N., Francino, O., Ramírez, O., Enseñat, C., Sánchez, A., and Altet, L. (2008).** Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. *Vet. Parasitol.* *158*, 117–120.
- Schenkel, K., Rijal, S., Koirala, S., Koirala, S., Vanlerberghe, V., Van der Stuyft, P., Gramiccia, M., and Boelaert, M. (2006).** Visceral leishmaniasis in southeastern Nepal: a cross-sectional survey on *Leishmania donovani* infection and its risk factors. *Trop. Med. Int. Health TM IH* *11*, 1792–1799.
- Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H.D.F.H., Presber, W., and Jaffe, C.L. (2003).** PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* *47*, 349–358.
- Shaw, J.J. (1988).** Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *83 Suppl 1*, 486–490.
- Sherlock, I.A., Miranda, J.C., Sadigursky, M., and Grimaldi Júnior, G. (1984).** Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *79*, 511.
- Shortt, H.E., Smith, R.O.A., and Swaminath, C.S. (1930).** The Breeding in Nature of *Phlebotomus argentipes*, *Ann. & Brun. Bull. Entomol. Res.* *21*, 269–271.
- Silva, E.S., Gontijo, C.M.F., and Melo, M.N. (2005).** Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends Parasitol.* *21*, 550–552.
- Silva, L.D.A., Romero, H.D., Prata, A., Costa, R.T., Nascimento, E., Carvalho, S.F.G., and Rodrigues, V. (2006).** Immunologic Tests in Patients After Clinical Cure of Visceral Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *75*, 739–743.

**Singh, R., Lal, S., and Saxena, V.K. (2008).** Breeding ecology of visceral leishmaniasis vector sandfly in Bihar state of India. *Acta Trop.* 107, 117–120.

**Singh, S.P., Picado, A., Boelaert, M., Gidwani, K., Andersen, E.W., Ostyn, B., Meheus, F., Rai, M., Chappuis, F., Davies, C., et al. (2010).** The epidemiology of *Leishmania donovani* infection in high transmission foci in India. *Trop. Med. Int. Health* 15, 12–20.

**Sixl, W., Sebek, Z., Reinthaler, F., and Mascher, F. (1987).** Investigations of wild animals as *Leishmania* reservoir in South Sudan. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 31, 483–485.

**Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., and Ferrer, L. (2001).** Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. *J. Clin. Microbiol.* 39, 560–563.

**Sreenivas, G., Ansari, N.A., Singh, R., Subba Raju, B.V., and al, et (2002).** Diagnosis of visceral leishmaniasis: comparative potential of amastigote antigen, recombinant antigen and PCR. *Br. J. Biomed. Sci.* 59, 218–222.

**Stanley, T., and Wilson, I.G. (2003).** Multilocus enzyme electrophoresis. *Mol. Biotechnol.* 24, 203–220.

**Sundar, S., Singh, R.K., Maurya, R., Kumar, B., Chhabra, A., Singh, V., and Rai, M. (2006).** Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100, 533–537.

**Toz, S.O., Nasereddin, A., Ozbel, Y., Ertabaklar, H., Culha, G., Sevil, N., Ziya Alkan, M., and Jaffe, C.L. (2009).** Leishmaniasis in Turkey: molecular characterization of *Leishmania* from human and canine clinical samples. *Trop. Med. Int. Health* 14, 1401–1406.

**Toz, S.O., Culha, G., Zeyrek, F.Y., Ertabaklar, H., Alkan, M.Z., Vardarli, A.T., Gunduz, C., and Ozbel, Y. (2013).** A Real-Time ITS1-PCR Based Method in the Diagnosis and Species Identification of *Leishmania* Parasite from Human and Dog Clinical Samples in Turkey. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2205.

**Troncarelli, M.Z., Camargo, J.B., Machado, J.G., Lucheis, S.B., and Langoni, H. (2009).** *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 164, 118–123.

**Vythilingam, I., Zainal, A.R., and Hamidah, T. (1999).** Laboratory evaluation of lambda-cyhalothrin a microencapsulated formulation on mosquito nets for control of vector mosquitos. *Southeast Asian J.*

Trop. Med. Public Health 30, 177–183.

**WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, and World Health Organization (2010).** Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010 (Geneva: World Health Organization).

**Yamey, G. (2002).** The world's most neglected diseases. *BMJ* 325, 176–177.

**Zijlstra, E.E., and El-Hassan, A.M. (2001).** 3. Visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95, *Supplement 1*, S27–S58.

**Zijlstra, E.E., Daifalla, N.S., Kager, P.A., Khalil, E. a. G., El-Hassan, A.M., Reed, S.G., and Ghalib, H.W. (1998).** rK39 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of *Leishmania donovani* Infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 717–720.

**Zulueta, A.M., Villarroel, E., Rodriguez, N., Feliciangeli, M.D., Mazzarri, M., Reyes, O., Rodriguez, V., Centeno, M., Barrios, R.M., and Ulrich, M. (1999).** Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniasis in an endemic focus in Eastern Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 945–950.