

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA PARAZITOLOGIE



Diplomová práce

Flebotomové jako vektorů kožní leishmaniózy v Turecku

Phlebotomine sandflies as vectors of cutaneous leishmaniasis in Turkey

Bc. Jitka Hlavačková

Vedoucí diplomové práce: Doc. Mgr. Milena Svobodová, Dr.

Praha 2008

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury.

V Praze, 2. září 2008

Jitka Hlavačková

Na tomto místě je mou milou povinností poděkovat těm, bez jejichž pomoci by tato práce nemohla vzniknout. Především bych chtěla poděkovat své školitelce Mileně Svobodové za čas, který věnovala mé diplomové práci, za její cenné rady a za možnost zúčastnit se terénního výzkumu v Turecku. Dále pak členům naší laboratoře za rady, pomoc a příjemné pracovní prostředí, jmenovitě Petrovi Volfovi, Honzovi Votýpkovi, Vítkovi Dvořákovi, Jitce Myškové, Aničce Svárovské, Jovaně Sádlové, Ivě Rohoušové, Jitce Hostomské, Lence Zídkové a nejen jim.

Můj velký dík patří také Alešovi, rodině a přátelům za podporu při studiu a v životě.

Obsah

1 Úvod.....	6
2 Literární přehled.....	8
2.1 Flebotomové.....	8
2.2 Rod <i>Leishmania</i> a jeho životní cyklus.....	9
2.3 <i>Leishmania infantum</i> a její vektoři.....	11
2.4 Historie leishmaniózy v Turecku.....	11
2.5 Viscerální leishmanióza v Turecku.....	12
2.6 Kožní leishmanióza v Turecku.....	13
2.6.1 Region Jihovýchodní Anatólie.....	15
2.6.2 Mediteránní region	16
2.6.3 Egejský region.....	17
2.7 Faunistika flebotomů v Turecku.....	18
2.7.1 Sanliurfa; region Jihovýchodní Anatólie.....	18
2.7.2 Mediteránní region.....	19
2.7.3 Region Centrální Anatólie.....	19
2.8 Specifičtí a permisivní vektoři.....	20
3 Materiál a metodika.....	22
3.1 Determinace flebotomů.....	22
3.1.1 Odchyt a zpracování.....	22
3.1.2 Morfologická determinace.....	24
3.1.3 Měření <i>Phlebotomus</i> cf. <i>syriacus</i>	24
3.1.4 Molekulární analýza ITS2 sekvencí <i>P. cf. syriacus</i>	24
3.1.4.1 Izolace DNA.....	24
3.1.4.2 PCR amplifikace DNA	24
3.1.4.3 Agarózová elektroforéza.....	25
3.1.4.4 Izolace DNA z gelu.....	25
3.1.4.5 Sekvenační reakce.....	26
3.1.4.6 Vyhodnocování sekvenačních dat.....	27
3.2 Chov flebotomů.....	27
3.3 Pitvy flebotomů.....	27
3.4 Charakterizace střevních O-glykoproteinů přenašeče.....	28
3.4.1 SDS-PAGE elektroforéza.....	28
3.4.2 Western blot.....	28
3.4.3 Složení použitých roztoků.....	29

3.5 Laboratorní přenos leishmanií na modelového savce.....	30
3.5.1 Kultivace leishmanií.....	30
3.5.2 Infekce flebotomů sáním přes membránu.....	31
3.5.3 Inokulace myší.....	31
3.5.4 Xenodiagnóza.....	32
3.5.5 Sání infikovaných flebotomů.....	32
3.5.6 Pitvy myší.....	32
3.5.7 Kvantitativní PCR.....	32
4 Výsledky.....	34
4.1 Determinace flebotomů.....	34
4.1.1 Morfologická determinace.....	34
4.1.2 Měření <i>P. cf. syriacus</i>	35
4.1.3 Molekulární analýza ITS2 sekvencí <i>P. cf. syriacus</i>	35
4.2 Charakterizace střevních O-glykoproteinů přenašeče.....	35
4.3 Infekce flebotomů <i>Leishmania infantum</i>	36
4.3.1 <i>P. perniciosus</i> - celkový počet nakažených	37
4.3.2 <i>P. perniciosus</i> - intenzita infekce.....	37
4.3.3 Porovnání infekcí <i>Lutzomyia longipalpis</i> a <i>P. perniciosus</i>	39
4.3.3.1 Počet nakažených flebotomů.....	39
4.3.3.2 Intenzita infekce.....	39
4.4 Laboratorní přenos <i>L. infantum</i> na modelového savce.....	41
4.4.1 Inokulace myší <i>L. infantum</i>	41
4.4.2 Přenos leishmanií sáním flebotomů.....	42
5 Diskuze.....	45
6 Shrnutí.....	54
7 Příloha.....	55
7.1 Morfologické znaky určených flebotomů.....	55
7.2 Cutaneous leishmaniasis caused by <i>Leishmania infantum</i> and transmitted by <i>Phlebotomus tobbi</i> . Svobodová M., Alten B., Zídková L., Dvořák V., Hlavačková J., Myšková J., Šeblová V., Kasap O. E., Belen A., Votýpka J., Volf P. <i>International Journal for Parasitology</i> , in press 2008.....	57
7.3 Abstrakt z Protozoologických dnů 2006.....	63
8 Citovaná literatura.....	64

1 Úvod

Leishmanióza je nemoc způsobená prvky rodu *Leishmania* (Kinetoplastida), kteří způsobují viscerální (orgánovou), kutánní (kožní) a mukokutánní (kožněslizniční) formu nemoci. Vektorem leishmanií jsou samice flebotomů (Psychodidae), a to rod *Phlebotomus* ve Starém světě a *Lutzomyia* v Novém světě. Celkem 66 zemí ve Starém světě a 22 zemí v Novém světě je endemických pro lidskou leishmaniózu s roční incidencí 1 – 1,5 miliónů případů kožní formy a půl miliónu případů viscerální formy. Proto ji Světová zdravotnická organizace (WHO) řadí mezi deset nejzávažnějších lidských infekčních onemocnění. V dnešní době navíc závažnost leishmaniózy roste kvůli koinfekci s HIV.

Turecko leží na rozhraní mezi dvěma kontinenty, Evropou a Asií, a tím představuje z hlediska leishmaniózy velmi zajímavé místo, neboť její kutánní i viscerální forma se vyskytuje v sousedních oblastech, jmenovitě na Kavkaze, v Malé Asii, Mediteránní pánvi a na Balkáně (Ozensoy et al., 1998). Díky své poloze Turecko zahrnuje různé ekologické a klimatické podmínky, což je důležité v epidemiologii leishmaniózy (Ok et al., 2002).

Oblast Cukurova leží v Mediteránním regionu na jihu Turecka a její největší město je Adana. Z této oblasti je hlášeno po regionu Jihovýchodní Anatolie nejvíce případů kožní leishmaniózy v Turecku (Ok et al., 2002). Z lézí pacientů zde byla izolována *Leishmania tropica* (Akman et al., 2000; Serin et al., 2005), údajně *L. major* (Akman et al., 2000) a *L. infantum* (Serin et al., 2005). Jinak ovšem byla *L. infantum* v Turecku izolována převážně z pacientů s viscerální leishmaniózou (Özbel et al., 1995; Akman et al., 2000; Serin et al., 2005).

Podmínky pro stanovení flebotoma vektorem jsou izolace stejného patogena z pacientů a flebotomů, vysoká početnost druhu flebotoma, který je podezřelý z přenosu patogena v dané oblasti, laboratorní infekce těchto flebotomů a přenos na modelového hostitele (Lewis, Ward, 1987). Průkaz, že *P. tobbi* je vektorem kutánní leishmaniózy v oblasti Cukurova, bylo cílem mé diplomové práce.

Flebotomové se dělí na specifické a permisivní druhy. Specifické druhy umožňují vývoj jednoho druhu *Leishmania*, permisivní druhy umožňují vývoj několika různých druhů. Vývoj jednoho či více druhů leishmanií je podmíněn typem glykosylace proteinů v jejich střevě (Myšková et al., 2007). Zajímala jsme se tedy o typ glykosylace ve střevě *P. tobbi*. Mým cílem bylo zjistit, zda se jedná o permisivního či specifického vektora, což má důsledky pro potenciální šíření dalších druhů leishmanií.

Cíle diplomové práce:

- Zjistit druhové spektrum flebotomů ve studovaném ohnisku.
- Zjistit typ glykosylace proteinů ve střevě *P. tobbi*.
- Zjistit, zda a s jakou úspěšností se kutánní kmen *L. infantum* ze studované oblasti vyvíjí v laboratorně chovaných flebotomech a porovnat vývoj tohoto kmene s kmenem *L. infantum* izolovaným z pacienta s viscerální leishmaniózou.
- Zjistit, zda je kožní kmen *L. infantum* ze studované oblasti infekční pro myši kmene BALB/c.
- Přenést *L. infantum* sáním infikovaných flebotomů na myši kmene BALB/c a porovnat vývoj kožního a viscerálního kmene.

2 Literární přehled

2.1 Flebotomové

Flebotomové (Diptera: Psychodidae) jsou drobní (1,5 – 3,5 mm), jemně ochlupení komárci. Jsou široce rozšířeni v tropech a dalších pevninských oblastech s teplým podnebím. Na severní polokouli jsou prokázáni do 48 - 50° zeměpisné šířky a na jižní asi do 40° (Sádlová, 1999).

Je známo kolem 700 druhů patřících do šesti rodů podčeledi Phlebotominae. Ve Starém světě se vykytují rody *Phlebotomus*, *Sergentomyia* a *Chinius* a v Novém světě *Warileya*, *Brumptomyia* a *Lutzomyia*. Pouze zástupci rodů *Phlebotomus* a *Lutzomyia* jsou medicínsky významní a jsou vektoři leishmanií (Lane, 1993). Kromě prvoků přenáší na člověka také řadu virových a bakteriálních onemocnění. Mezi nejdůležitější patří *Phlebovirus* (Bunyaviridae), který způsobuje horečku Papatači a vyskytuje se v Mediteránu a na Středním Východě. Bartonelóza je způsobená bakterií *Bartonella bacilliformis* a vyskytuje se v Peru, Ekvádoru a Kolumbii. Je původcem závažné horečnaté anémie (oroyská horečka), po jejímž ústupu dochází ke kožním změnám (verruža peruana; Sádlová, 1999; Rutledge, Gupta, 2002; Vokurka et al., 2003).

Obě pohlaví se živí přírodními zdroji cukru, např. nektarem či medovicí z mšic. Krev sají pouze samice. Poskytuje jim výživu, kterou potřebují pro vývoj vajíček. Některé druhy ale jsou schopny klást první snůšku vajíček bez přijetí krve. Jednotlivé druhy se liší počtem sání během gonotrofického cyklu. Některé potřebují sát jednou a jiné vícekrát na jednu snůšku vajíček. Častějším sáním flebotomů vzrůstá efektivita přenosu leishmanií na obratlovce. Navíc infikované samice mají s příjmem potravy problémy a pokouší se sát vícekrát (Killick-Kendrick, 1999). Sání jim znesnadňuje ucpání přední části trávicího traktu zátkou, skládající se z metacyklických promastigotů a gelu sekretovaného promastigoty (Stierhof et al., 1999; Rogers et al., 2002). Tlak způsobený rozšiřováním zátky nutí stomodeální valvu k otevření a dochází k regurgitaci střevního obsahu (Rogers et al., 2002). Filamentózní proteofosfoglykan je součástí gelovité ucpávky, která je vyplavována spolu s metacyklickými promastigoty při sání do kůže, a je prokázán jeho vliv na úspěšnost infekce (Stierhof et al., 1999; Rogers et al., 2002; Rogers et al., 2004). Během sání samice uvolňuje do místa vpichu sliny, které způsobují alergickou reakci, ale hrají také důležitou roli v úspěšném přenosu leishmanie do obratlovce. Mají vazodilatační a

imunosupresivní účinky (Killick-Kendrick, 1999).

Dospělci jsou aktivní za soumraku a v noci, ačkoliv v tmavých místnostech a v lesích sají samice i přes den. Některé druhy se páří před, jiné po a další během sání. Samice kladou vejce do vlhkých míst s dostatkem organického materiálu pro výživu larev. Následují čtyři eucefalní, apodní larvální instary a kukla. Doba vývoje jednotlivých stádií je závislá na teplotě. Se vzrůstající teplotou se zkracuje a s nižší teplotou prodlužuje. Vejce jsou obvykle kladena 7. - 10. den po sání. Larvální vývoj trvá nejméně 3 týdny. Dospělci se líhnou z kukel asi po deseti dnech a z počátku vylétávají více samci. V palearktických oblastech může za nepříznivých podmínek přecházet do diapauzy 4. instar, v teplejších a deštivých lokalitách přechází do diapauzy vajíčka (Killick-Kendrick, 1999; Sádlová, 1999).

2.2 Rod *Leishmania* a jeho životní cyklus

Leishmaniózu způsobují dvouhostitelští prvoci rodu *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Asi 30 druhů leishmanií je infekční pro celou řadu savčích hostitelů, včetně člověka (Sádlová, 1999), kterého infikuje okolo 15 druhů (Gramiccia, Gradoni, 2005).

Druhy *Leishmania* jsou si morfologicky velmi podobné, a proto pro určení druhu není možné použít pouze mikroskopickou techniku (Schönian et al., 2003). Dříve se pro identifikaci druhu leishmanií sledovaly epidemiologické záznamy a klinické příznaky (přihlíželo se také k druhu hostitele a vektora). Dnes se stále častěji přistupuje k metodám molekulárním, biochemickým, imunologickým, sérologickým a ultrastrukturální morfologii (Sádlová, 1999).

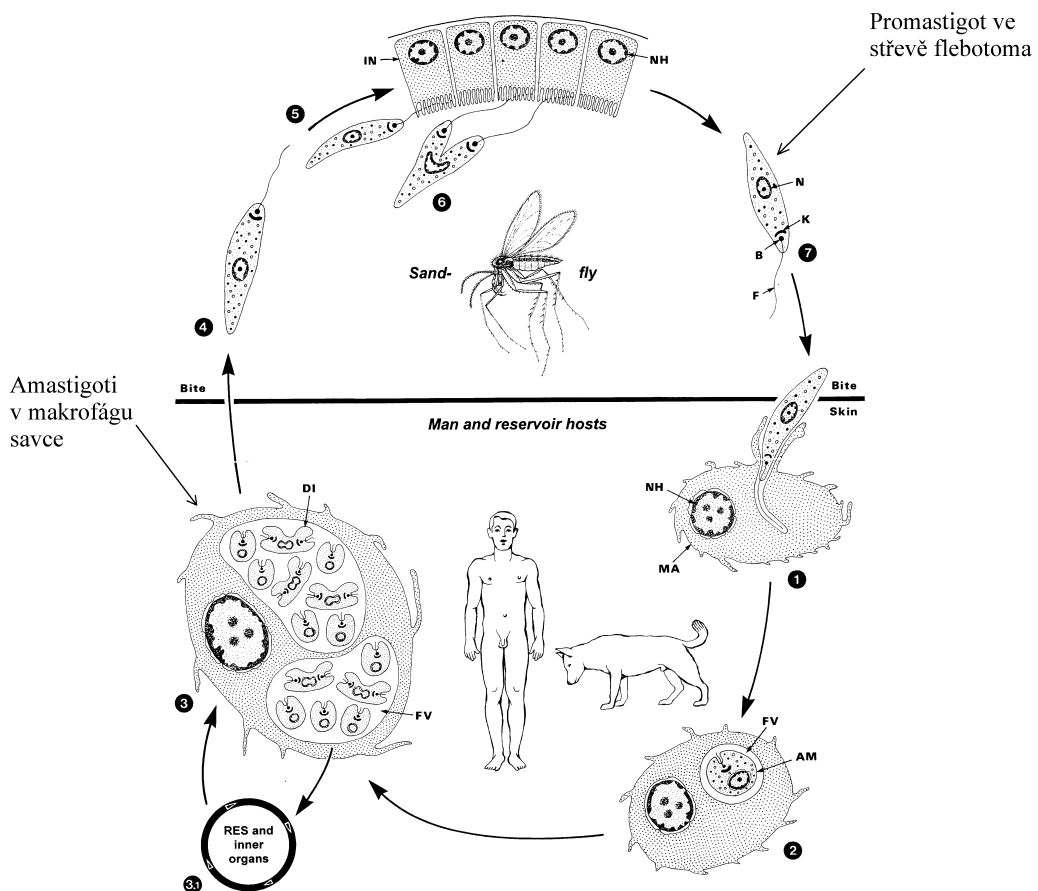
Lidská leishmanióza má různé klinické formy. Existuje kutánní (kožní), mukokutánní (kožněslizniční), difuzně kutánní (diseminovaná kožní) a viscerální (orgánová) leishmanióza. Formu onemocnění ovlivňují různé faktory, například druh leishmanií, druh přenašeče, geny hostitele a především jeho imunitní odpověď (Goddard, 2007). Identifikace druhu pouze na základě geografické distribuce a klinických příznaků může být tedy problematická, jelikož vztah mezi druhem parazita a typem onemocnění není vždy jasný (Schönian et al., 2003). Například *L. braziliensis* komplex a *L. aethiopica* způsobují kutánní i mukokutánní formu nemoci (Schönian et al., 2003), *L. infantum* způsobuje viscerální, ale i kožní formu (del Giudice et al., 1998), *L. tropica* a *L. major* jsou považovány za původce kožní formy, ale byly popsány i jako visceralizující

(Magill et al., 1993; Akman et al., 2000). I přesto se často určují druhy leishmanií pouze na základě geografické distribuce a klinických příznaků (Schönian et al., 2003).

Leishmanióza v současné době postihuje asi 12 miliónů lidí. Ročně je hlášeno asi 1 - 1,5 miliónů nových případů kožní leishmaniózy a 0,5 miliónu nových případů viscerální leishmaniózy. Je zaznamenána v 88 zemích na čtyřech kontinentech a v trvalém ohrožení žije asi 350 miliónů lidí. Nevyskytuje se v Antarktidě a Austrálii (Sádlová, 1999).

Vektorem leishmanií jsou samice flebotomů (viz kapitola 2.1). Ve střevě flebotoma se vyvíjí bičíkaté stádium zvané promastigot, které je přeneseno při sání regurgitací do savčího hostitele. V něm jsou leishmanie pohlceny makrofágy a mění se v nich v amastigotní, bezbičíkaté stádium, které se uvnitř makrofágu dělí. Po prasknutí makrofágu jsou uvolnění amastigoti pohlceni dalšími makrofágy. Pokud je infikovaný makrofág nasát flebotomem, cyklus se uzavírá (viz obr. 2.1).

Vývoj promastigotů ve střevě flebotoma má několik morfologických forem. Je zakončen metacyklickými promastigoty, kteří jsou infekční pro obratlovce.



Obr. 2.1: Životní cyklus leishmanií. Podle Mehlhorna (2001).

2.3 *Leishmania infantum* a její vektoři

L. infantum je původcem zoonotické viscerální leishmaniózy. Při této smrtelně nebezpečné formě onemocnění dochází k rozmnožování parazita v makrofázích retikuloendotelového systému. Výsledkem je generalizované onemocnění se symptomy jako horečka, splenomegalie a pancytopenie. Sporadicky jsou známy také případy kožní leishmaniózy způsobené tímto patogenem. Člověk je k *L. infantum* málo náchylný. Jsou běžné asymptomatické infekce. Klinické projevy nemoci jsou ovlivněny věkem (většinou jsou postiženy děti pod 2 roky), podvýživou a imunosupresí (např. koinfekce s HIV). Hlavním rezervoárovým hostitelem je pes, zatímco v lišce, šakalovi a vlkovi koluje *L. infantum* v lesním cyklu (Gramiccia, Gradoni, 2005).

Ve Starém světě je *L. infantum* zaznamenána ve střední a jihozápadní Asii, severozápadní Číně, Středním Východu, Balkánu, na pobřeží Středozemního moře, v severní a subsaharské Africe. V Novém světě je hlášena od Argentiny po Mexiko (především pak v Brazílii) a byla sem zavlečena spolu s přistěhovalci z Evropy. Užívá se zde pro ni synonymum *L. chagasi* (Sádlová, 1999; Maurício et al., 2000; Gramiccia, Gradoni, 2005).

Vektorem *L. infantum* ve Starém světě jsou druhy flebotomů patřící převážně do podrodu *Larrousius* (někteří jsou již prokázáni jiní pravděpodobní; Sádlová, 1999; Gramiccia, Gradoni, 2005). *Phlebotomus perniciosus* je prokázaným přenašečem v západním a středním Mediteránu. Dalšími prokázanými vektory jsou *P. ariasi*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus*, *P. langeroni*. *P. tobbi* je pravděpodobným přenašečem na Sicílii a ve východním Mediteránu (Killick-Kendrick, 1999). Dalšími pravděpodobnými vektory jsou *P. syriacus*, *P. transcaucasicus*, *P. smirnovi* a jiní (Lewis 1982; Sádlová, 1999). Prokázaným vektorem *L. infantum* v Novém světě je *Lutzomyia longipalpis*, která je považována za komplex druhů. Areály rozšíření tohoto parazita a vektora se nápadně překrývají od Argentiny po Mexiko (Soares, Turco, 2003).

2.4 Historie leishmaniózy v Turecku

První případ viscerální leishmaniózy v Turecku je zaznamenán ze začátku 19. století z Trabzonu, který leží ve východní části Černomořského regionu. Amastigotní formy leishmanie byly identifikovány v roce 1916 ze slezinných a jaterních biopsií z 11 tureckých vojáků v Bagdádu. Z roku 1918 jsou záznamy o viscerální leishmanióze z Izmiru, který leží v Egejském regionu (Ok et al., 2002).

Endemická kožní leishmanióza byla zaznamenána po roce 1833 hlavně z asijské části Turecka a Iránu. V roce 1911 byl parazit poprvé úspěšně vyizolován z leishmaniové léze. Hulusi Behcet, turecký dermatolog, popsal epiteloidní buněčnou vrstvu pod vředem a poukázal na její diagnostický význam v roce 1916 (Ok et al., 2002).



Obr. 2.2: Mapa Turecka. Převzato od Ok et al. (2002). Vysvětlivky: Southeastern Anatolia region – region Jihovýchodní Anatólie; Mediterranean region – Mediteránní region; Central Anatolia region – region Centrální Anatólie; Aegean region – Egejský region; Black sea region – Černomořský region; Eastern Anatolia region – region Východní Anatólie; Marmara region – Marmarský region

2.5 Viscerální leishmanióza v Turecku

Viscerální leishmanióza je nemoc, jejíž příčinou je diseminace parazita po celém retikuloendotelovém systému a pokud se neléčí, je obvykle smrtelná (Herwaldt, 1999 in Tanir et al., 2006). Klinické rysy viscerální leishmaniózy v Turecku jsou shodné s mediteránním typem, který je pozorován u dětí mladších 11 let. Inkubační doba trvá obvykle 2 – 8 měsíců a hlavní klinické symptomy jsou horečka, hepatosplenomegalie, pancytopenie a úbytek hmotnosti (Ok et al., 2002; Tanir et al. 2006).

V Turecku jsou případy viscerální leishmaniózy hlášeny ze všech sedmi regionů (Ok et al., 2002; viz tab. 2.1). K údajům v tabulce ještě připojuji celkem 127 pacientů ze všech regionů hlášených Ministerstvu zdravotnictví v Turecku v letech 2000 - 2004 (Simsek et al., 2007). Tyto případy se překrývají s údaji v tabulce v roce 2000. Za původce viscerální leishmaniózy se považuje *L. infantum*, která byla izolována z pacientů v Egejském a Mediteránním regionu (Özbel et al., 1995; Akman et al., 2000; Serin et al., 2005). Akman et al. (2000) ovšem izolovali z pacientů s viscerálními příznaky i *L. major*.

Tab. 2.1: Distribuce případů viscerální leishmaniózy mezi geografickými regiony v letech 1997 - 2000 (data z Ministerstva zdravotnictví v Turecku in Ok et al., 2002).

	1997	1998	1999	2000	celkem	%
Mediterránní region	51	13	5	9	78	48,4
Egejský region	8	8	4	10	30	18,6
Centrální Anatolie	8	10	9	3	30	18,6
Marmarský region	1	1	1	9	12	7,5
Jihovýchodní Anatolie	1	1	1	2	5	3,1
Černomořský region	2	1	1	1	5	3,1
Východní Anatolie	0	0	1	0	1	0,6
celkem	71	34	22	34	161	100,0

Psi jsou hlavní rezervoáři *L. infantum* (Özbel et al., 1995). Jeden z rysů dětské viscerální leishmaniózy je, že prevalence v psí populaci může dosáhnout až 40 %, přičemž lidských případů je velmi málo (Ashford, Bettini, 1987; Gradoni, 1995 in Ozensoy et al., 1998).

Daldal et al. (1998 in Ok et al. 2002) se domnívají, že *P. syriacus* (patřící do podrodu *Larrousius*; viz kapitola 2.3) je vektorem *L. infantum* v západní části Černomořského regionu. Žádný promastigot však nebyl nalezen v chycených flebotomech (Ok et al., 2002).

P. perfiliewi je uváděn jako nejhojnější druh v Centrální Anatolii, kde byly zaznamenány sporadické případy viscerální leishmaniózy (Yagci et al., 1997 in Özcel et al., 1999). Ertaaklar et al. (2005 b) identifikovali v Centrální Anatolii 6 druhů rodu *Phlebotomus*. Z toho *P. neglectus*, *P. tobbi*, *P. transcaucasicus* jsou prokázanými nebo pravděpodobnými vektory *L. infantum* (Killick-Kendrick, 1999).

2.6 Kožní leishmanióza v Turecku

Kožní leishmanióza má většinou charakter ostře ohraničené, vředovité léze s následným vznikem vtažené jizvy (Vokurka et al., 2003). Vzácně se může rozvinout v difuzní kožní leishmaniózu s násobnými nevředovitými uzlíky, které pokrývají velkou oblast kůže, nebo v mukokutánní leishmaniózu s komplikacemi, které postihují oronasopharyngeální sliznici a chrupavku (Gramiccia, Gradoni, 2005).

V Turecku léze obvykle začínají jako erythem (rudé pupínky na kůži), postupně se zvětšují až na 1 - 2 cm během 6 měsíců a ulcerují. Vřed je bezbolestný s odumřelým základem a často se ztvrdlými okraji. Je krytý pevně přiléhajícím strupem (Uzun et al., 1999). Infekce se nejčastěji vyskytuje u věkové skupiny 10 – 19 let. Většinou mají pacienti

jedinou lézi lokalizovanou na hlavě, krku nebo horních končetinách (Memisoglu et al., 1995 in Ok et al., 2002; Uzun et al., 1999). Nízký podíl nemocných dospělých pacientů je způsoben dříve získanou imunitou nebo tím, že dospělí méně vyhledávají léčbu a nejsou tedy zahrnuti ve statistických údajích (Ok et al., 2002).

V Turecku se vyskytují *L. tropica*, *L. major* a *L. infantum* (Özbel et al., 1995; Akman et al., 2000). *L. tropica* a *L. major* jsou obvykle zodpovědné za kožní leishmaniózu, zatímco *L. infantum* obvykle způsobuje viscerální leishmaniózu, ale jsou známy i sporadické případy kožní formy (Ok et al., 2002; Serin et al., 2005). *L. tropica* byla izolována z pacientů postižených kožní leishmaniózou ze Sanliurfy (Gramiccia et al., 1984; Akman et al., 2000; Gurel et al., 2002). Byla také popsána z Mediteránního regionu, převážně z města Adany (Özpoyraz et al., 1995 in Uzun et al., 1999; Saylan et al., 1986 in Uzun et al., 1999; Akman et al., 2000; Serin et al., 2005). *L. major* je popisována sporadicky po celém území Turecka (Özbel et al., 1995; Akman et al., 2000), ale je otázkou, nakolik jsou tyto údaje pravdivé (Volf, osobní sdělení).

Převážně za antroponotickou formu je ve světě zodpovědná *L. tropica*, zatímco *L. major* i *L. infantum* jsou zodpovědné za zoonotickou formu onemocnění (Gramiccia, Gradoni, 2005). Pískomilové (*Psammomys obesus* a *Meriones* sp.) jsou hlavní rezervoáři *L. major* na Blízkém východě, ale v Turecku jakékoli informace o těchto hlodavcích jakožto rezervoárech *L. major* chybí (Volf, osobní sdělení). Za hlavní hostitele *L. tropica* považují Uzun et al. (2004) nemocné lidské pacienty, avšak Svobodová et al. (2003) uvažují o možné roli hlodavců v přenosu *L. tropica*.

Hlavním prokázaným vektorem *L. tropica* je ve světě *P. sergenti* a hlavním vektorem *L. major* je *P. papatasi* (Killick-Kendrick, 1999).

V Turecku jsou případy kožní leishmaniózy hlášeny ze šesti regionů (Ok et al., 2002; viz tab. 2.2). K údajům v tabulce ještě připojuji celkem 11547 pacientů hlášených Ministerstvu zdravotnictví v Turecku v letech 2000 - 2004; 97 % těchto případů je z regionu Jihovýchodní Anatólie a Mediteránního regionu (Simsek et al., 2007). Tyto případy se překrývají s údaji v tabulce v roce 2000. Nejvíce informací existuje o regionech Jihovýchodní Anatólie, Mediteránním a Egejském. Situaci v nich se nyní pokusím blíže rozebrat.

Tab. 2.2: Distribuce případů kožní leishmaniózy mezi geografickými regiony v letech 1994 – 2000 (data z Ministerstva zdravotnictví v Turecku in Ok et al., 2002).

	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	celkem	%
Jihovýchodní Anatolie	4185	2810	2410	482	802	275	272	11236	61,7
Mediterránní region	1494	1036	1447	714	606	708	818	6823	37,5
Centrální Anatolie	13	4	0	6	10	17	22	72	0,4
Egejský region	0	0	0	30	22	6	12	70	0,4
Černomořský region	0	0	0	0	0	2	9	11	0,1
Východní Anatolie	0	0	0	0	0	2	2	4	0,0
Marmarský region	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
celkem	5692	3850	3857	1232	1440	1010	1135	18216	100,0

2.6.1 Region Jihovýchodní Anatolie

Nejvíce údajů je z města Sanliurfa (dříve Urfa). Sanliurfa se nachází v semiaridní rovině ve výšce 550 m. n. m.; klima je subtropické s horkým, suchým létem a chladnou, vlhkou zimou (Toprak, Ozer, 2005). V Jihovýchodní Anatolii byl nedávno dokončen velký zavlažovací projekt (GAP), který zahrnuje hráze a zavlažovací kanály, a měl zásadní vliv na změny v hustotě obyvatel, klimatu, využití půdy a výši sklizně. Bohužel také zvýšil riziko malárie a kožní leishmaniózy (Ok et al., 2002).

V roce 1950 byla zaznamenána epidemie kožní leishmaniózy v jihovýchodním Turecku (Gurel et al., 2002). Po zásahu proti komárům, pořádaném pro potlačení malárie, došlo k značnému poklesu kožní leishmaniózy (Gurel et al., 2002). V roce 1980 začala ovšem incidence kožní leishmaniózy v Sanliurfě opět růst. Epidemie vrcholila v roce 1983, kdy bylo pozorováno 1741 případů (Gurel et al., 2002). Pak došlo opět k útlumu a v roce 1990 bylo zaznamenáno 552 případů; následoval náhlý vzrůst zaznamenaných případů na více než 3000 v roce 1994 (Aksoy et al., 1995 in Özcel et al., 1999). V roce 1997 došlo k poklesu na 790 případů a v roce 1999 bylo zaznamenáno 277 případů (Gurel et al., 2002). Většina případů je ze staré části města s nízkou sociální úrovní (Volf et al., 2002; Gurel et al., 2002) a ve všech případech se jednalo o *L. tropica*, jejímž vektorem je zde pravděpodobně *P. sergenti* (Gramiccia et al., 1984; Le Pont et al., 1996; Alptekin et al., 1999; Özcel et al., 1999; Akman et al., 2000; Gurel et al., 2002; Volf et al., 2002).

K poklesu poslední epidemie došlo, dle mínění Özcela et al. (1999), díky lepší informovanosti dospělých lidí a školních dětí, lepší diagnostice a léčbě. Nejdůležitějším faktorem je pravděpodobně přirozená imunizace lidí díky dřívější infekci (Özcel et al., 1999; Volf et al., 2002). Cyklický vznik a pokles epidemie v této oblasti je přičítán migraci nové vnímavé populace nebo kolísání populace rezervoárů (Ashford, 1999 in Volf et al.,

2002). Tuto teorii potvrzuje i zjištění, že *P. sergenti*, nejdůležitější přenašeč *L. tropica*, zůstal nejpočetnějším druhem flebotomů i po odeznění epidemie (Alptekin et al., 1999; Volf et al., 2002).

Význam zachování preventivních programů potvrzuje studie z provincie Diyarbakir (Aytekin et al., 2006) nacházející se nedaleko města Sanliurfa. Tyto dvě oblasti mají podobné geografické a klimatické podmínky. V provincii Diyarbakir byla v roce 2002 zaznamenána vzrůstající incidence pacientů s kožní leishmaniózou. Největší skupina pacientů byla mladší dvaceti let. Autoři považují za hlavní důvod nárůstu pacientů horké klima, hráze na řekách, starou zástavbu, nízkou hygienickou úroveň a pokles používání postřiků s insekticidy kvůli regulaci malárie. Podotýkají, že na tuto oblast má také vliv velký zavlažovací projekt GAP. Ekologické změny způsobené tímto projektem způsobily nárůst populací vektorů leishmaniózy a malárie. Navrhují rychlé zavedení potřebných opatření ke snížení nárůstu případů, především osvětu a kontrolu lidí žijících v této endemické oblasti.

Aytekin et al. (2006) si myslí, že původcem kožní leishmaniózy v provincii Diyarbakir je *L. tropica*. Bohužel identifikace patogena byla provedena pouze mikroskopickým prohlížením Giemsou obarveného roztěru z lézí pacientů. Tato metoda není dostačující ke zjištění druhu *Leishmania*. Používá se pouze ke zjištění přítomnosti leishmanií.

Zeyrek et al. (2007) také připomínají další nárůst případů v letech 2002 - 2005 (2800, 2500, 4100, 2600) v celém Turecku. Většina (70 %) případů je zaznamenána z provincie Sanliurfa.

2.6.2 Mediteránní region

Ve východní části Mediteránního regionu leží oblast Cukurova, jejíž největší město je Adana. Po Jihovýchodní Anatolii je zde zaznamenáno nejvíce případů kožní leishmaniózy (Ok et al., 2002). Od roku 1985 je Cukurova považována za nový endemický region kožní leishmaniózy (hlavně Adana a přilehlé oblasti; Özpoyraz et al., 1995 in Uzun et al., 1999; Saylan et al., 1986 in Uzun et al., 1999). V tomto regionu bylo v letech 1987 - 1997 identifikováno 3074 pacientů s kožní leishmaniózou (Uzun et al., 1999) a 1030 pacientů v letech 1998 - 2002 (Uzun et al., 2004).

Region je deštivý v zimě, velmi horký v létě a má vysokou vlhkost (okolo 90 %; Özcel et al., 1999). Se vznikem velkého zavlažovacího Projektu Jihovýchodní Anatolie (GAP projekt) v roce 1997 došlo k rozsáhlým ekologickým změnám v této oblasti (Uzun et

al., 1999; Uzun et al., 2004). Uzun et al. (2004) se zmiňují o nárůstu případů kožní leishmaniózy od roku 1998. K nárůstu pacientů s kožní leishmaniózou přispívá též cestování a migrace obyvatel, nepravidelné používání insekticidních sprejů proti flebotomům a neúspěšná léčba pacientů s kožní leishmaniózou (Uzun et al., 2004). Mediteránní region, a hlavně město Adana, je nejdůležitější centrum zemědělství a průmyslu v Turecku (Uzun et al., 2004). Imigruje sem mnoho sezónních i stálých dělníků, lidí s nízkou sociálně-ekonomickou úrovní, většinou z jihovýchodního Turecka, kde je kožní leishmanióza hyperendemická (Uzun et al., 2004).

V Adaně byla z pacientů s kožní formou leishmaniózy izolována *L. tropica*, *L. infantum* a v jednom případě *L. major* (Akman et al., 2000; Serin et al., 2005). Vektor kožní leishmaniózy v tomto regionu nebyl určen; flebotomové chycení v Osmaniye (město blízko Adany) byli identifikováni jako *P. sergenti* a údajně byli pozitivní na *L. tropica* (M. Kasap, osobní sdělení in Uzun et al., 2004). *P. sergenti* je také považován za vektora *L. tropica* při poslední epidemii kožní leishmaniózy v Sanliurfě (viz kapitola 2.6.1).

Identifikace vektora kožní leishmaniózy v provincii Hatay (rozkládá se na pobřeží jihovýchodní části Mediteránního regionu) je komplikovanější o to, že dosud nebyl identifikován ani druh leishmanií způsobujících onemocnění (Yaman, Özbel, 2004). Yaman a Özbel (2004) se domnívají, že v oblastech s výskytem *P. sergenti* by mohla být původcem onemocnění *L. tropica*.

2.6.3 Egejský region

Egejský region leží v západní části Turecka. Je to hornatá oblast s deštivou zimou a horkým létem s vysokou vlhkostí (okolo 80 %; Özcel et al., 1999).

První zmínky o pacientech s kožní leishmaniózou ze západní části Turecka od roku 1989 popisují Savk et al. (1999). Píší o 23 případech z Aydinu (Egejský region) diagnostikovaných od roku 1996 do roku 1998. Ertabaklar et al. (2005 a) již popisují 159 pacientů diagnostikovaných od roku 1996 do roku 2003. Maximum případů zaznamenávají během let 2000 - 2001. Socio-ekonomický průzkum ukázal, že většina pacientů žije v nejistých sociálních podmínkách. Někteří dospělí pacienti byli negramotní. Ve srovnání s východní částí Turecka je tento region ovšem více sociálně-ekonomicky vyvinutý. Aydin je turisticky atraktivní město a každý rok ho navštíví množství lidí z Turecka i z jiných zemí. V poslední době do této části imigrovaly tisíce lidí z východní části země a pravděpodobně sem zavlekly i kožní leishmaniózu. Tento region se díky tomu stal prvním místem s ohniskem kožní leishmaniózy v západním Turecku (Ertabaklar et al., 2005 a).

Identifikace parazita do druhu ovšem nebyla provedena, a proto není vyloučeno, že původcem této kožní leishmaniózy je *L. infantum*, která se vyskytuje v okolních oblastech (Volf, osobní sdělení).

2.7 Faunistika flebotomů v Turecku

2.7.1 Sanliurfa; region Jihovýchodní Anatólie

Existuje několik studií popisujících flebotomí faunu v Sanliurfě. Většina chycených flebotomů patřila k druhu *P. sergenti* nebo *P. papatasi* (Le Pont et al., 1996; Alptekin et al., 1999; Volf et al., 2002; Svobodová et al., 2003; Toprak, Ozer, 2005).

Jeden z prvních článků, který se zabývá druhy flebotomů v Sanliurfě, publikovali Le Pont et al. (1996). Uvádějí, že ve stájích a domech byli chyceni *P. papatasi* (66 %) a *P. sergenti* (33 %). Uzavírají, že flebotomové chycení ve stájích a domech pravděpodobně potvrzují městský cyklus *Leishmania tropica*, již přenáší *P. sergenti*.

Alptekin et al. (1999) se v letech 1994 – 1996 zabývali též druhovým složením flebotomů a hojností jednotlivých druhů. Během roku 1995 více jak 99 % flebotomů tvořili *P. papatasi* (72 %) a *P. sergenti* (28 %). Dále byli chyceni *P. syriacus*, *P. brevis*, *P. halepensis*, *P. kazeruni*.

Další studie provedená v Sanliurfě v letech 1997 – 1999 (Volf et al., 2002), tedy po odeznění epidemie, zaznamenává znovu druhy flebotomů a popisuje i nové minoritní druhy z této oblasti dříve nepopsané. Celkem bylo identifikováno osm druhů flebotomů, 99 % opět tvořili *P. sergenti* (72 %) a *P. papatasi* (27 %). Ostatní druhy byly zastoupeny méně než v jednom procentu, a to *P. brevis*, *P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. mascitti*, *P. halepensis* a *P. alexandri*. *P. mascitti* a *P. neglectus* nebyli nikdy dříve zaznamenáni z této oblasti.

Ve studii Svobodové et al. (2003) je opět zaznamenáno, že 99 % chycených flebotomů byli *P. sergenti* a *P. papatasi*, přitom *P. sergenti* představoval 65 % z celkového množství chycených flebotomů. Odchyty byly uskutečněny v roce 1999.

Toprak a Ozer (2005) svou studii uskutečnili v letech 2000 – 2002. V jejich odchycích byl nejvíce zastoupen *P. papatasi* (45 %), *P. perfiliewi* (22 %) a *P. sergenti* (19 %). Dále pak byli nalezeni *P. major*, *P. neglectus*, *P. brevis*, *P. alexandri*, *P. galilaeus* (syn. *P. perfiliewi galilaeus*), *P. halepensis*, *P. kazeruni* a *P. mascitti*. V případě určeném jako *P. major* jde o špatnou identifikaci (Volf, osobní sdělení).

2.7.2 Mediteránní region

Yaman a Özbel (2004) uskutečnili odchyt flebotomů v roce 2001 v provincii Hatay, která leží na pobřeží Středozemního moře na jihovýchod od města Adana. Nejvíce byli zastoupeni *P. sergenti* (60,8 %) a *P. papatasi* (18,8 %). Minoritní zastoupení měli *P. syriacus*, *P. neglectus*, *P. tobbi*, *P. simici*, *P. alexandri* a *P. kyreniae*.

Simsek et al. (2007) studovali flebotomí faunu v letech 2004 a 2005 v provinciích Hatay, Adana a Kahramanmaras. V provincii Hatay byli nejvíce zastoupeni *P. papatasi* (30,8 %), *P. tobbi* (27,1 %), *P. galilaeus* (11,8 %) a *P. sergenti* (10,2 %). Minoritní zastoupení měli *P. transcausicus*, *P. halepensis*, *P. syriacus*, *P. neglectus*, *P. simici*, *P. alexandri*, *P. jacusieli* a *P. perfiliewi*. V provincii Adana byli nejvíce zastoupeni *P. tobbi* (72,5 %) a *P. papatasi* (16,7 %). Minoritní zastoupení měli *P. neglectus*, *P. sergenti*, *P. galilaeus*, *P. syriacus*, *P. transcausicus*, *P. alexandri*, *P. simici*, *P. halepensis* a *P. perfiliewi*. V provincii Kahramanmaras byli nejvíce zastoupeni *P. transcausicus* (60,2 %) a *P. galilaeus* (11,2 %). Minoritní zastoupení měli *P. papatasi*, *P. sergenti*, *P. syriacus*, *P. tobbi*, *P. simici*, *P. neglectus*, *P. halepensis* a *P. brevis*.

2.7.3 Region Centrální Anatolie

V provincii Konya sledovali druhové spektrum flebotomí fauny Yaman a Dik (2006) v roce 1997. Nejvíce byli zastoupeni *P. papatasi* (78,4 %) a *P. halepensis* (10,9 %). Dále byli odchyceni *P. sergenti*, *P. simici*, *P. kandelakii*, *P. similis*, *P. jacusieli*, *P. neglectus*, *P. transcausicus*, *P. syriacus*, *P. kyreniae* a *P. balcanicus*.

Ertabaklar et al. (2005 b) uskutečnili odchyt flebotomů v roce 2002 v severní části tohoto regionu v provincii Corum. Nejvíce byli zastoupeni *P. transcausicus* (57,2 %), *P. neglectus* (18,4 %), *P. halepensis* (11,5 %). Minoritní zastoupení měli *P. tobbi*, *P. papatasi* a *P. jacusieli*.

Simsek et al. (2007) studovali flebotomí faunu v letech 2004 a 2005 v regionu Centrální Anatolie, a to v provinciích Nigde a Konya. V provincii Nigde byli nejvíce zastoupeni *P. halepensis* (64,4 %) a *P. papatasi* (31,5 %). Dále byli odchyceni *P. sergenti*, *P. syriacus*, *P. transcausicus*, *P. simici*, *P. alexandri* a *P. tobbi*. V provincii Konya byli nejvíce zastoupeni *P. halepensis* (50,8 %), *P. papatasi* (16,5 %), *P. transcausicus* (12,9 %) a *P. simici* (10,5 %). Dále byli odchyceni *P. sergenti* a *P. similis*.

2.8 Specifičtí a permisivní vektorů

Leishmanie prodělávají vývoj ve střevě flebotoma, až do své diferenciaci do infekční metacyklické formy adaptované pro přenos do savce. Zásadním krokem při vývoji leishmanií je vazba na střevo flebotoma, která umožňuje parazitovi vyhnout se vyloučení při defekaci nestrávených částí krve (Kamhawi, 2006).

Flebotomové se řadí do dvou kategorií – „specifičtí“ a „permisivní“ vektorů (Myšková et al., 2007). Mezi specifické vektory patří *P. papatasi*, v jehož střevě se může vyvíjet pouze *L. major* a *P. sergenti*, v kterém se vyvíjí pouze *L. tropica* (Pimenta et al., 1994; Kamhawi et al., 2000). U těchto flebotomů vazbu leishmanií na střevo zprostředkovává nejhojnější povrchový glykokonjugát promastigotů lipofosfoglykan (LPG; Kamhawi, 2006; Myšková et al., 2007). U páru *Leishmania major* – *Phlebotomus papatasi* byla role LPG při vazbě na střevo studována nejpodrobněji. Vazba je zde kontrolována druhově specifickou modifikací LPG (Pimenta et al., 1992; Pimenta et al., 1994; Butcher et al., 1996; Kamhawi, 2006). LPG se váže terminální cukernou skupinou na receptor LPG ve střevě flebotoma. Jako receptor LPG byl identifikován lektin specifický pro galaktózu PpGalec (střevní galektinový receptor; Kamhawi et al., 2004; Kamhawi 2006).

Naopak u permisivních vektorů je možné, aby se v jejich střevě vyvíjelo několik druhů leishmanií (Myšková et al., 2007). Patří sem například *Lutzomyia longipalpis* (Walters et al., 1993 in Myšková et al., 2007), *P. argentipes* (Pimenta et al., 1994), *P. halepensis* (Sádlová et al., 2003) a *P. arabicus* (Myšková et al., 2007). Mechanismy permisivity ještě stále nejsou plně objasněny. Byly navrhovány různé kandidátní molekuly pro vazbu leishmanie na střevo flebotoma (Myšková et al., 2007), např. povrchové bičkové proteiny promastigotů (Warburg et al., 1989). Dnes je zřejmé, že existuje jiný lektinový mechanismus v permisivních vektorech, který je nezávislý na LPG (Myšková et al., 2007). LPG deficientní mutanti *L. major* jsou totiž schopni dobře růst v permisivních vektorech *L. longipalpis* a *P. arabicus* a produkují v nich těžké infekce (Myšková et al., 2007). Podobně *L. tropica* s modifikovaným LPG (Soares et al., 2004) není schopna růstu ve *P. sergenti*, ale může růst v permisivním vektorovi *P. arabicus* (Svobodová et al., 2006). Roli (zřejmě) hrají O-glykosylované proteiny ve střevě flebotoma, které nesou N-acetyl-galaktosaminové (GalNAc) epitopy. Tyto O-glykosylované proteiny se nacházejí pouze ve střevech permisivních druhů (Svobodová et al., 2006; Myšková et al., 2007). Potenciálními kandidáty na receptor GalNAc jsou heparin-vázající proteiny a

lektinové molekuly na povrchu promastigotů u různých druhů leishmanií (Hernandez et al., 1986 in Myšková et al., 2007; Mukhopadhyay et al., 1989; Kock et al., 1997; Svobodová et al., 1997).

Permisivní flebotomové se tedy mohou jednoduše stát vektory nových druhů leishmanií. Například *L. tropica* se změněným LPG může přenášet *P. arabicus* (Jacobson et al., 2003; Svobodová et al., 2006) a *L. longipalpis* se stala novým vektorem *L. infantum* v Latinské Americe (Maurício et al., 2000).

3 Materiál a metodika

3.1 Determinace flebotomů

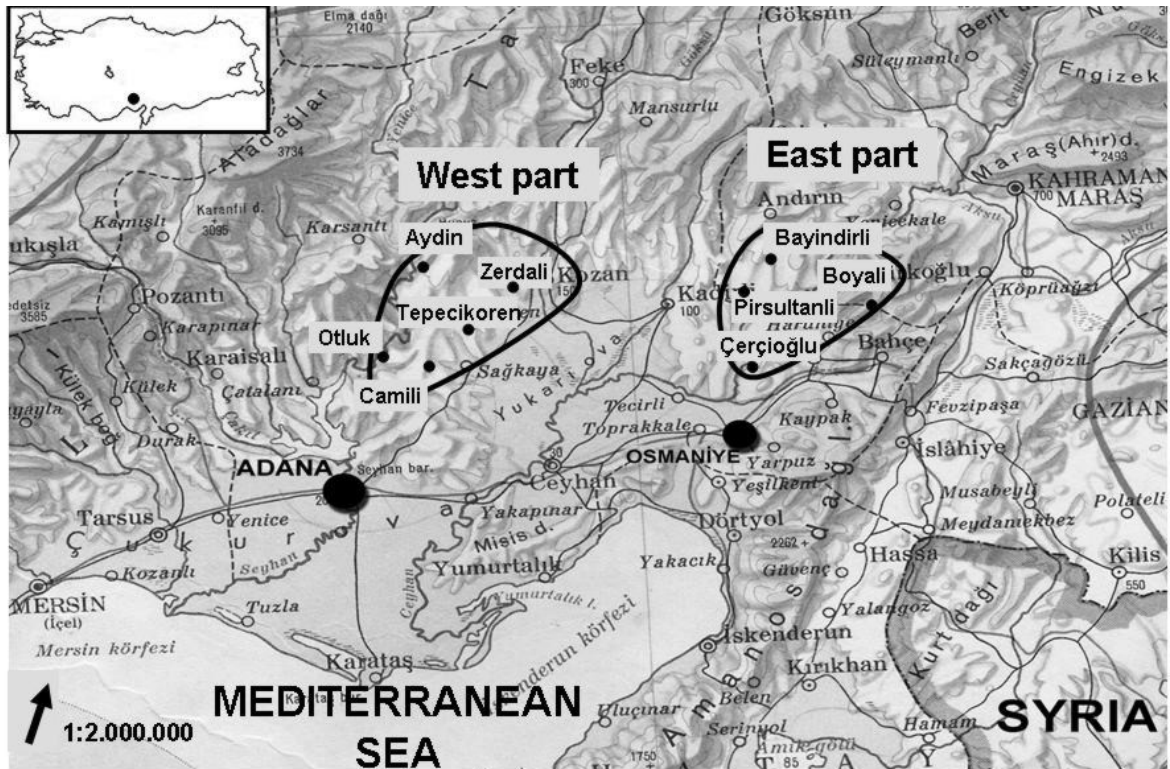
3.1.1 Odchyt a zpracování

Flebotomové byli odchyceni ve vesnicích ve východní části Mediteránního regionu v oblasti Cukurova v Turecku. Vesnice leží na severu této oblasti ve dvou lokalitách - východní a západní (viz obr. 3.1). Odchyty probíhaly v září v letech 2005, 2006 a 2007 do CDC (Centres for Disease Control) světelných pastí (viz obr. 3.2) v chlévech, domech a na dvorech. Flebotomové byli nalákáni světlem z rozsvícené žárovky a poté byli vtaženi díky podtlaku z točící se vrtulky do připevněné sítě. Past byla zapnuta za soumraku a ráno vypnuta. Síťka byla stažena provázkem a vložena do igelitu s kouskem vaty pro zvýšení vlhkosti. Malá část flebotomů byla chycena během dne nasátím pomocí exhaustoru (viz obr. 3.3).

Následně byli flebotomové vytříděni. Mrtvé samice a všichni samci byli uloženi do mikroskopavek s čistým 70 % nebo 96 % ethanolem. Část samců byla determinována na místě a ostatní byli převezeni do naší laboratoře. Dovezené samce jsem pak určovala dle morfologických znaků a s pomocí molekulárních metod (viz kapitoly 3.1.2 a 3.1.4).

Živé samice byly uspány na ledu, krátce proprány v 96 % čistém ethanolu, promyty a pitvány ve sterilním fyziologickém roztoku (Braun; viz kapitola 3.3). Střevo bylo prohlíženo pod mikroskopem pro zjištění přítomnosti promastigotů leishmanií. Pozitivní střevo byla kultivována pro izolaci leishmanií. Hlava a genitálie byly použity pro determinaci.

V září roku 2007 jsem se zúčastnila odchytů flebotomů v Turecku. Spolu s ostatními členy týmu jsem kladla CDC světelné pastě ve vesnicích a následně jsem pitvala část samic flebotomů.



Obr. 3.1: Zkoumané území. West part - západní část, East part - východní část. Svobodová et al., in press 2008.



Obr. 3.2: CDC světelná past. Skládá se ze žárovky, vrtulky, akumulátoru, sítěky a stříšky proti dešti (foto Šeblová V.).



Obr. 3.3: Exhaustor s chycenými flebotomy (foto Hlavačková J.).

3.1.2 Morfologická determinace

Flebotomové byli určeni podle morfologických znaků (viz kapitola 7.1) pod binokulární lupou SZX12 (Olympus) při zvětšení 90× a v případě nejasností byl z flebotoma připraven mikroskopický preparát, který byl prohlížen pod mikroskopem (Carl Zeiss) při zvětšení 100 - 400×.

Mikroskopický preparát byl připraven zalitím hlavy, křídel a dvou třetin zadní části těla flebotoma mezi podložní a krycí sklo do Berleseho směsi (Polysciences, Inc.). Po 3 dnech došlo k projasnění a zviditelnění dalších determinačních znaků. Hrud' flebotoma byla ponechána v 70 % nebo 96 % ethanolu v mikrozkuhavce pro případné další určení pomocí molekulárních metod.

Samci druhů *Phlebotomus (Larrousius) syriacus* a *Phlebotomus (Larrousius) neglectus* se od sebe špatně odlišují dle morfologických znaků (viz kapitola 7.1). Určení konkrétního druhu bylo provedeno pomocí měření částí hypopygií (viz kapitola 3.1.3) a molekulární analýzy hrudi flebotomů (viz kapitola 3.1.4).

3.1.3 Měření *Phlebotomus* cf. *syriacus*

Z hlavy, křídel a dvou třetin zadní části těla byl zhotoven mikroskopický preparát (viz kapitola 3.1.2). Hypopygium (orgán samce sloužící k přidržení samice při kopulaci) flebotoma bylo nasnímáno programem QuickPHOTO Micro 2.2 (Promicra) s použitím mikroskopu BX51 (Olympus). Pomocí stejného programu byly změřeny části hypopygia, a to styl a koxit. Jejich velikostí se tyto druhy údajně liší (Lewis, 1982). Statistické zpracování bylo provedeno v programu Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.).

3.1.4 Molekulární analýza ITS2 sekvencí *P. cf. syriacus*

3.1.4.1 Izolace DNA

DNA z hrudi flebotomů (viz kapitola 3.1.2) byla izolována pomocí High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) podle protokolu Isolation of Nucleic Acids from Mammalian Tissue. Vyizolovaná DNA byla skladována při -20 °C.

3.1.4.2 PCR amplifikace DNA

Byla amplifikována ITS2 (internal transcribed spacer 2) a použitými primery byly

C1a: 5'-CCT GGT TAG TTT CTT TTC CTC CGC T-3' a JTS3: 5'-CGC AGC TAA CTG TGT GAA ATC-3' (Depaquit et al., 2002).

Do tenkostěnných PCR mikrozkušavek byla připravena reakční směs pro PCR reakci (viz níže). PCR reakce probíhala na cycleru My Cycler (Bio-Rad). Průběh cyklu viz tabulka 3.1.

Reakční směs pro PCR reakce:

PPP Master Mix (Top-Bio s.r.o.) – Mg ²⁺ 2x koncentrovaný	12,5 µl
25 mM MgCl ₂ (Top-Bio s.r.o.)	1,5 µl
5' primer	1 µl
3' primer	1 µl
Templátová DNA	2 µl
PCR H ₂ O (Top-Bio s.r.o.)	7 µl

Tab. 3.1: Průběh PCR reakce.

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Iniciační denaturace	94	300	1
Denaturace	94	30	39
Nasednutí primeru	62	60	
Polymerace	72	60	
Finální elongace	72	600	1

3.1.4.3 Agarózová elektroforéza

Výsledek PCR amplifikace byl ověřen pomocí horizontální agarózové elektroforézy. Agarózový gel byl připraven o koncentraci 1 %. Do krajních jamek v gelu byly přidány markery (Fermentas) a do ostatních jamek bylo vpipetováno 5 µl vzorku. Amplifikovaná DNA byla vizualizována ethidiumbromidem.

3.1.4.4 Izolace DNA z gelu

Do předem zvážených mikrozkušavek byla dána DNA vyříznutá pod UV světlem pomocí skalpelu a zvážena. Promytí vyříznutého gelu bylo provedeno dle protokolu MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen). V posledním kroku bylo použito 10 µl H₂O.

3.1.4.5 Sekvenační reakce

K DNA izolované z gelu byla přidána reakční směs pro sekvenační reakci.

Složení reakční směsi pro sekvenační reakci:

Terminator Ready reaction Mix (Applied Biosystems)	4 µl
Sekvenační pufr (Applied Biosystems)	2 µl
Primer	2 µl
DNA	2 µl
PCR H ₂ O (Top-Bio s.r.o.)	10 µl

Sekvenační reakce probíhala na cycleru My cycler (Bio-Rad). PCR produkty byly sekvenovány v obou směrech. Průběh sekvenační reakce viz tabulka 3.2.

Tab. 3.2: Průběh sekvenační reakce.

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Iniciační denaturace	96	30	1
Denaturace	96	10	25
Nasednutí primeru	50	10	
Polymerace	60	240	

1. po proběhnutí sekvenační reakce bylo k produktu přidáno 50 µl 96 % ethanolu a 2 µl 3M NaAc; objem se promísil
2. mikrozkuhavka se nechala stát při pokojové teplotě 15 minut
3. precipitovaná DNA byla centrifugována 15 minut při 12000 rpm (MiniSpin; Eppendorf AG)
4. výsledný supernatant byl opatrně odebrán
5. do mikrozkuhavky bylo přidáno 180 µl 70 % ethanolu
6. vše bylo centrifugováno 5 minut při 12000 rpm (MiniSpin; Eppendorf AG)
7. supernatant byl opět opatrně odebrán
8. zbylý pelet byl sušen při pokojové teplotě

Mikrozkuhavka s peletem byla poslána do Laboratoře pro sekvenaci DNA PřF UK v Praze na další kroky sekvenace. Zde byl použit sekvenátor 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.1.4.6 Vyhodnocování sekvenačních dat

Získané sekvence byly zpracovány pomocí programu Seqman 3.61 (DNASTAR Inc.).

3.2 Chov flebotomů

K pokusům byli používáni flebotomové *Phlebotomus tobbi* z Turecka, *P. perniciosus* ze Španělska a *Lutzomyia longipalpis* původem z Brazílie chováni v naší laboratoři. Kolonie flebotomů jsou chovány v místnosti o teplotě 26 °C a vzdušné vlhkosti 60 – 70 %. Dospělci flebotomů jsou v nylonových sítích o velikosti 40×40×40 cm natažených na kovových konstrukcích. Sítě, v kterých je umístěna Petriho miska s vatou napuštěnou roztokem sacharózy nebo medu, jsou umístěny v igelitových pytlích s kouskem navlhčené vaty pro zvýšení vlhkosti. Roztok 50 % sacharózy se připravuje krátkým povařením v mikrovlnné troubě. Roztok 50 % medu se tepelně upravuje 30 minut při 56 °C.

Samice flebotomů sají 1 - 2× týdně krev na uspaném (myš, křeček) nebo v boxu fixovaném (králík) laboratorním zvířeti dle typu kolonie. Jako narkotikum je používána směs Narkamonu (5 % ketamin; Spofa), Rometaru (2 % xylazin; Spofa) a sterilního fyziologického roztoku (Hoechst–Biotika). Výsledná koncentrace je 15 mg xylazinu a 150 mg ketaminu na 1 kg váhy zvířete. Nasáté samice jsou následně vytříděny do menších sítí o velikosti 20×20×20 cm. Samice po defekaci (5. - 7. den po sání) jsou umístěny do kelímků se sádrou navlhčenou destilovanou vodou. Samice kladou vejce během dalších 2 – 5 dnů. Po tuto dobu se jim na monofilovou síť nataženou na kelímku dává kousek vaty napuštěný roztokem sacharózy nebo medu (viz výše).

Po vykladení jsou uhynulé samice z kelímku vyjmuty. Vylíhlé larvy jsou krmeny 3× týdně jemně mletou směsí králičího trusu a pelet (v poměru 1:1), fermentovanou 3 – 4 týdny za 100 % vlhkosti a teplotě 25 °C. Kelímky s vajíčky, larvami a kuklami jsou uloženy v plastových dózách se sterilizovaným pískem navlhčeným destilovanou vodou pro zvýšení vlhkosti. Vylíhlí dospělci jsou vypouštěni 3× týdně do nylonových sítí. Životní cyklus flebotomů trvá 5 – 8 týdnů.

3.3 Pitvy flebotomů

Samice byly uspany chladem v kelímku umístěném v dóze s ledovou tříští.

Následně byly přeneseny na podložní sklo do kapky trisového pufru nebo fyziologického roztoku. Pod binokulární lupou, pomocí 2 jemných pinzet, byla oddělena hlava a poslední zadečkové články. Střevo bylo vytaženo zadečkovou částí.

Střeva byla buď shromažďována pro přípravu vzorků v mikrozkušnicích s trisovým pufrem a uchovávána při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (viz kapitola 3.4.1) nebo přímo prohlížena pod mikroskopem pro stanovení intenzity infekce (viz kapitola 3.5.2).

3.4 Charakterizace střevních O-glykoproteinů přenašeče

3.4.1 SDS-PAGE elektroforéza

Byl použit vzorek připravený ze střev samic *Phlebotomus tobbi*. Střeva byla pitvána a uchovávána v trisovém pufru při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (viz kapitola 3.3). Při pitvě byly odstraněny malpighické trubice. Vzorek byl $2\times$ zmražen v tekutém dusíku a homogenizován mikrohomogenizátorem. Následně byl ke vzorku přidán vzorkový redukující pufr s merkapthoethanolem (v poměru 4:1; Laemmli, 1970). Vzorek s pufrem byl povařen 3 minuty ve vodní lázni.

Střevní proteiny byly rozděleny pomocí SDS-PAGE elektroforézy (Laemmli, 1970). Jako aparatura byla použita vertikální elektroforéza Mini-Protean III (Bio-Rad) a jako zdroj napětí PS 500 XT (Hofer). Byl použit 10 % polyakrylamidový gel o tloušťce 1 mm a elektroforéza probíhala za konstantního napětí 200 V. Jako standardy byly použity biotinylované SDS-PAGE standardy, low range (Bio-Rad).

3.4.2 Western blot

Proteiny rozdělené v gelu byly fixovány 20 % methanolem v SDS pufru (Laemmli, 1970). Poté byly přeneseny na nitrocelulósovou membránu NC 2, póry $0,2\text{ }\mu\text{m}$ (Serva) metodou „semi-dry blotting“ za použití přístroje Semi-Phor (Hofer Scientific Instruments) 90 minut za konstantního proudu ($1,5\text{ mA}$ na 1 cm^2). Pro kontrolu úspěšného přeblotování byla pro zviditelnění proteinů na membráně užita červeň Ponceau S (0,1 % roztok červeně v 1 % kyselině octové; Sigma-Aldrich). Pak byla membrána nařezána na jednotlivé proužky a odbarvena vodou. Proužky membrány byly blokovány přes noc ve $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 5 % roztoku bovinního sérumalbuminu (BSA; Sigma-Aldrich) o koncentraci 0,05 g/ml v Tris-Tween. Všechny další kroky probíhaly při pokojové teplotě.

Proužky membrány byly promývány v Tris-Tween 15 minut. Pro značení byl použit

lektin HPA značený biotinem (Sigma-Aldrich) o koncentraci 1,25 µg/ml v Tris-Tween. Pro negativní kontrolu byl lektin preinkubován 30 minut s 0,2 M N-acetyl-D-galaktosaminem v Tris-Tween. Inkubace membrány s lektinem trvala 1 hodinu. Následně bylo vše promyto 3× 10 minut v Tris-Tween. Dále byla membrána inkubována v roztoku konjugátu streptavidinu s peroxidázou (Sigma-Aldrich) o koncentraci 2,5 µg/ml 1 hodinu. Následně byla membrána 3× 10 minut promyta v Tris-Tween a 1× 10 minut v trisovém pufru.

Dále byla membrána inkubována s čerstvě připraveným substrátovým barvicím roztokem (viz kapitola 3.4.3) po dobu 5 minut. Po zviditelnění proteinových proužků byla reakce zastavena destilovanou vodou a membrána byla usušena.

3.4.3 Složení použitých roztoků

Fyziologický roztok:

NaCl 150 mM

Trisový pufr:

Tris (Trizma base; Sigma-Aldrich) 20 mM

NaCl 150 mM

Dotitrovat pomocí HCl na pH 7,5 – 9.

Tris-Tween:

Trisový pufr

Tween 20 (Serva) 0,05 %

Substrátový barvicí roztok

Čistý peroxid vodíku (30 %) 6 µl

Chloronaftol 6 mg

Methanol 2 ml

Trisový pufr 10 ml

3.5 Laboratorní přenos leishmanií na modelového savce

3.5.1 Kultivace leishmanií

Leishmanie byly kultivovány ve dvousložkovém médiu v plochých kultivačních zkumavkách (Nunc), přizpůsobených pro prohlížení inverzním mikroskopem, při teplotě 23 °C. Pevnou složkou byl krevní agar SNB-9. Tekutou složkou byl overlay nebo R+S.

Krevní agar SNB-9

Neopepton (Difco)	2 g
Bacto Agar (Difco)	2 g
NaCl	0,6 g
Destilovaná voda	100 ml
Defibrinovaná králičí krev (Bioveta a. s.)	25 ml

Odvážený neopepton, agar a NaCl byly rozpuštěny v destilované vodě a vyklávaný. Ve sterilním boxu pak byla přidána defibrinovaná králičí krev. Roztok byl rozpipetován do plochých kultivačních zkumavek po 1,5 ml. Médium se nechalo ztuhnout v šikmé poloze a uchovávalo se při teplotě 4 °C.

Overlay

Neopepton (Difco)	2 g
NaCl	0,6 g
Destilovaná voda	100 ml
Amikacin (50-100 µg/ml; Bristol-Myers Squibb)	0,5 ml

Odvážený neopepton a NaCl byly rozpuštěny v destilované vodě a vyklávaný. Následně byl přidán amikacin.

Médium R + S

Médium RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)	22 ml
Schneider's Drosophila Medium, Modified (Sigma-Aldrich)	22 ml
Inaktivované fetální sérum (Sigma-Aldrich)	5 ml
Sterilní lidská moč	1 ml
Amikacin (50-100 µg/ml, Bristol-Myers Squibb)	0,25 ml

3.5.2 Infekce flebotomů sáním přes membránu

Samice flebotomů byly nakaženy sáním defibrinované sterilní králíčí krve (Bioveta), smíchané s promastigoty leishmanií, přes membránu z kuřecí kůžičky.

Kůžička z kuřete (1 – 3 dny starého) byla zbavena peří a tuku. Ve sterilním boxu pak byla promyta 2× 10 minut v 70 % čistém ethanolu a následně 2× 10 minut ve sterilním fyziologickém roztoku. Následně byla připevněna na sterilní skleněné krmítko parafilmem.

Krevní buňky byly odděleny od séra stočením na centrifuze BR4i (Trigon-plus). Krvinky byly 3× promyty sterilním fyziologickým roztokem a sérum bylo inaktivováno ve vodní lázni o teplotě 56 °C po dobu 30 – 45 minut. Následně bylo sérum s krvinkami smícháno dohromady. Do krmítka bylo vpipetováno 3 ml inaktivované krve smíchané s promastigoty leishmanií (koncentrace leishmanií v krvi byla 1×10^6).

Byl použit druh *L. infantum*, a to buď kutánní kmen TOB2 (ITOB/TR/2005/TOB2) izolovaný naším týmem z *P. tobbi* ve zkoumané lokalitě nebo viscerální kmen OG-VL (MHOM/TR/2000/OG-VL) izolovaný v provincii Hatay v Turecku (dar Kwang-Poo Changa z Rosalind Franklin University of Medicine and Science, North Chicago, USA). U kmene TOB2 byly použity 5 - 10 dní staré kultury pasáže 2 - 7. U kmene OG-VL neznáme počet pasáží před jeho získáním do naší laboratoře. Nicméně pro mé pokusy jsem použila 4 - 6 dní starou kulturu pasáže 2 - 3.

Krmítko bylo upevněno ve stojanu a na něj byla připevněna síťka s flebotomy 3 – 10 dní starými. Krev byla udržována při teplotě 37 °C vodní lázní s vnější cirkulací. Flebotomové sáli po dobu 2 hodin a následně byly nasáté samice vytříděny. Síť s flebotomy byly nechány v teplotě 23 - 26 °C.

Střeva samic flebotomů byla pitvána (viz kapitola 3.3) před defekací pro kontrolu úspěšnosti infekce (1. - 3. den po sání) a po defekaci pro zjištění intenzity infekce (7. - 9. den po sání) ve fyziologickém roztoku. Střeva byla prohlížena pod mikroskopem o zvětšení 100 - 400×. Podle množství parazitů byla infekce určována jako slabá (1 – 100 promastigotů), střední (100 - 1000 promastigotů) a silná (více než 1000 promastigotů). Tato metoda se osvědčila v naší laboratoři (Čiháková, Volf, 1997). Statistické zpracování bylo provedeno v programu Statgraphics 5.0 (Manugistics, Inc.).

3.5.3 Inokulace myší

Samice *L. longipalpis* 8. den po infekčním sáním kutánního kmene *L. infantum*

TOB2 byly vypitvány (viz kapitoly 3.5.2 a 3.3). Střeva byla s fyziologickým roztokem přendána z podložního sklíčka do mikrozkuhavky a rozdrcena. Myšim kmene BALB/c uspaným etherem bylo intradermálně vstříknuto 10 µl homogenátu do ucha nebo chodidla. Následně bylo místo vpichu sledováno 1× týdně 14 - 15 týdnů.

3.5.4 Xenodiagnóza

Myš kmene BALB/c, inokulovaná *L. infantum* kmene TOB2 (viz kapitola 3.5.3), byla uspana anestezií (viz kapitola 3.2) a vložena do pytlíku z textilie. Část těla s lézí byla vytažena dírkou v pytlíku ven. Takto připravená myš byla vložena do sítě se samicemi *L. longipalpis* 3 – 10 dní starými. Nasáté samice byly vytríděny. Síť s flebotomy byla nechána v termostatu o stabilní teplotě 23 °C. Střeva samic byla vypitvána (viz kapitola 3.3) 2. - 3. a 9. - 10. den po sání pro zjištění infekce.

3.5.5 Sání infikovaných flebotomů

Myš kmene BALB/c uspaná anestezií (viz kapitola 3.2) byla vložena do sítě se samicemi flebotomů *L. longipalpis* nebo *P. perniciosus* 7. - 16. den po infekčním sání na membráně. Flebotomové byli infikováni *L. infantum*, a to buď kutánním kmenem TOB2 nebo viscerálním kmenem OG-VL (viz kapitola 3.5.2). Ihned po sání byly samice odchyceny a místo vpichu bylo zaznamenáno do protokolu. Po skončení sání byly odchycené samice vypitvány (viz kapitola 3.3) pro zjištění míry infekce. Následně byly myši, na kterých sáli infikovaní flebotomové, pozorovány 1× týdně 13 týdnů.

3.5.6 Pitvy myší

Myši byly zabity 13 - 15 týdnů po infekci. Čistými pitevními nástroji byla postupně odebrána tkáň z místa vpichu, nejbližší uzlina, játra a slezina. Odebraná tkáň byla skladována při teplotě -70 °C.

3.5.7 Kvantitativní PCR

Rozstříhaná myší tkáň byla drcena mikrohomogenizátorem v 40 µl pufru Net 50 (složení viz níže). DNA byla izolována pomocí kitu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) podle protokolu Isolation of Nucleic Acids from Mammalian Tissue. Vyizolovaná DNA byla skladována při -20 °C.

Složení amplifikační směsi viz níže. Byly použity primery popsané v Mary et

al., 2004 (forward primer 5'-CTT TTC TGG TCC TCC GGG TAG G-3' a reverse primer 5'-CA CCC GGC CCT ATT TTA CAC CAA-3'). Průběh cyklu v cycleru Rotor-Gene 2000 (Corbett Research) je v tabulce 3.3.

Amplifikována byla kDNA z minikroužků. Výsledky byly analyzovány Rotor-Gene Software (Corbett Research) a kalibrační křivka byla vytvořena dle pozitivních kontrol o známé koncentraci leishmanií. Specifita reakce byla kontrolována v teplotním gradientu teploty tání. Cykly se opakovaly postupně při teplotách od 66 – 99 °C. Pro ověření výsledků byly použity negativní kontroly.

Pufř Net 50:

NaCl 0,1 M
 EDTA pH 8,0 50 mM
 Trisový pufř 10 mM
 H₂O 300 ml
 Upravit na pH 8,0 a doplnit vodou do 300 ml.

Amplifikační směs:

Primery 1 µl
 DNA 1 µl
 iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad) 10 µl
 PCR voda 8 µl

Tab. 3.3: Průběh amplifikační reakce.

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Iniciační denaturace	95	180	1
Denaturace	95	10	45
Nasednutí primeru	56	10	
Polymerace	72	10	

4 Výsledky

4.1 Determinace flebotomů

4.1.1 Morfologická determinace

Celkem bylo nalezeno šest druhů flebotomů (*P. papatasi*, *P. sergenti*, *P. simici*, *P. tobbi*, *P. perfiliewi* a *P. cf. syriacus*) na obou lokalitách. V západní části pět a ve východní čtyři (viz tab. 4.1).

Nejhojněji byl zastoupen v obou lokalitách *P. tobbi*. Zajímavé je, že *P. papatasi* a *P. perfiliewi* se nevyskytují v západní lokalitě, zatímco ve východní zastoupeni jsou. Naopak *P. simici* je zastoupen pouze v západní části.

Z celkového počtu 1639 odchytených samců flebotomů jsem určila 1219 (74,4 %) dovezených do Prahy. U druhu *P. papatasi* jsem určila 67 (98,5 %) z odchytených 68 zástupců, u *P. sergenti* 65 (79,3 %) z 82, u *P. simici* 5 (50 %) z 10, u *P. tobbi* 1018 (73,8 %) z 1380, u *P. perfiliewi* 6 (100 %) ze 6, u *P. cf. syriacus* 58 (62,4 %) z 93. Zbytek samců a všechny samice určili ostatní členové týmu přímo v Turecku.

Tab. 4.1: Druhové zastoupení flebotomí fauny ve zkoumaných lokalitách.

Druh	Západní (2005 - 2006)		Východní (2006 - 2007)	
	N (%) samci	N (%) samice	N (%) samci	N (%) samice
<i>P. (Phlebotomus) papatasi</i>	68 (9,7)	89 (15,4)	0	0
<i>P. (Paraphlebotomus) sergenti</i>	6 (0,9)	5 (0,9)	76 (8,1)	68 (11,6)
<i>P. (Adlerius) simici</i>	0	0	10 (1,1)	2 (0,3)
<i>P. (Larroussius) tobbi</i>	604 (86,3)	451 (77,9)	776 (82,6)	475 (81,2)
<i>P. (Larroussius) perfiliewi</i>	6 (0,9)	3 (0,5)	0	0
<i>P. (Larroussius) cf. syriacus</i>	16 (2,3)	3 (0,5)	77 (8,2)	24 (4,1)
<i>P. (Larroussius) sp.</i>	0	28 (4,8)	0	16 (2,7)
celkem	700	579	939	585

4.1.2 Měření *P. cf. syriacus*

Byly proměřeny samčí rozmnožovací orgány *P. cf. syriacus* z obou lokalit. Ze západní bylo měřeno 15 jedinců a z východní 40. Výsledky byly porovnány T-testem. Mezi naměřenými hodnotami nebyl zjištěn signifikantní rozdíl, a proto byly údaje ve stejných kategoriích sloučeny. V tabulce 4.2 jsou shrnuty výsledky měření. Celkem bylo proměřeno 55 flebotomů. Naměřené hodnoty odpovídají *P. neglectus*.

Tab. 4.2: Výsledky měření koxitu a stylu u *P. cf. syriacus* srovnané s údaji o *P. syriacus* a *P. neglectus* (Lewis, 1982). SE - střední chyba průměru. Hodnoty jsou uvedeny v mm.

	<i>P. cf. syriacus</i>			<i>P. syriacus</i>	<i>P. neglectus</i>
	Rozsah	Průměr ± SE	Medián	Rozsah	Rozsah
koxit	0,3-0,38	0,35 ± 0,02	0,35	0,40-0,45	0,33-0,35
styl	0,15-0,19	0,17 ± 0,01	0,17	0,20-0,22	0,16-0,19

4.1.3 Molekulární analýza ITS2 sekvencí *P. cf. syriacus*

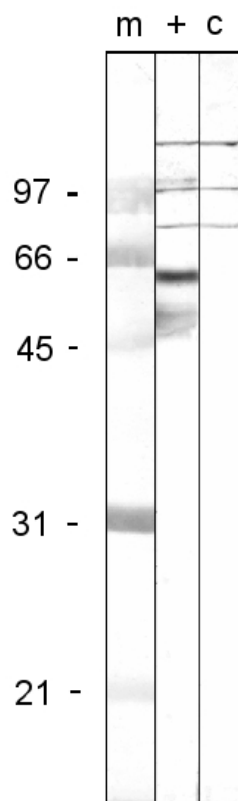
Sekvence získané na základě sekvenační reakce se shodovaly se sekvencemi pro *P. syriacus* a lišily se přibližně ve 20 pozicích od ITS2 sekvencí z *P. neglectus*.

Srovnávané sekvence ITS2 byly od *P. neglectus* z Itálie, Albánie, Řecka, Černé hory (sekvence poskytl Vít Dvořák) a z Makedonie (Gene Bank, číslo sekvence AF205524). ITS2 sekvence od *P. syriacus*, který pocházel z Izraele, poskytl Vít Dvořák.

4.2 Charakterizace střevních O-glykoproteinů přenašeče

Pro charakterizaci glykosylace střevních proteinů *P. tobbi* byl použit lektin HPA značený biotinem rozpoznávající O-typ glykosylace přes N-acetyl-D-galaktosamin. Ve střevě flebotoma se specificky navázal na 3 proteinové proužky o relativní molekulové hmotnosti 46 - 52, 60 a 100 kDa (viz obr. 4.1). Pro kontrolní reakci byl tento lektin inaktivován preinkubací s N-acetyl-D-galaktosaminem.

Nejširší proužek o molekulární hmotnosti 46 - 52 kDa má rozmazaný vzor, což je typické pro silně glykosylované proteiny.



Obr. 4.1: Afinoblot s lektinem HPA. m - markery, + označuje střevo *P. tobbi*, c - kontrola preinkubovaná s N-acetyl-D-galaktosaminem.

4.3 Infekce flebotomů *Leishmania infantum*

Kvůli dostupnosti byla nejprve jako modelový vektor použita *L. longipalpis*. K infekci byl použit kutánní kmen *L. infantum* TOB2. Následnou inokulací jsem chtěla prokázat vhodnost myší kmene BALB/c pro další pokusy. Později byl k dispozici *P. perniciosus*, u kterého jsem srovnávala citlivost k viscerálnímu a kutánnímu kmenu *L. infantum*. Následoval přenos druhým sáním infikovaných flebotomů na myši kmene BALB/c (viz tab. 4.3, grafy 4.1 a 4.2).

U všech pokusů byla úspěšnost infekce kontrolována také před defekací. U infekcí *L. longipalpis* bylo 5 z 8 vypitvaných flebotomů pozitivních. U infekcí *P. perniciosus* bylo ve všech 4 případech vypitváno 6 flebotomů. Všichni byli pozitivní.

Výsledky byly otestovány χ^2 testem nebo Fisherovým testem a dle potřeby byla použita Yatesova korekce. Zjišťovány byly rozdíly na hladině $p = 0,05$.

4.3.1 *P. perniciosus* - celkový počet nakažených

Nejprve jsem porovnávala pokusy s infekcemi *P. perniciosus* (kmeny TOB2 a OG-VL). Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly mezi jednotlivými pokusy, a tak byly počty jedinců ve stejných kategoriích sečteny. V případě výsledků kmene OG-VL však byl výsledek na hranici signifikance. Kmenem TOB2 bylo infikováno 93,3 % v prvním a 100 % v druhém pokusu. Kmenem OG-VL bylo infikováno 96,7 % v prvním a 76,7 % v druhém pokusu (viz tab. 4.3, graf 4.1)

P. perniciosus TOB2 × *P. perniciosus* TOB2

$\chi^2 = 2,1$, $p = 0,47$ (Yatesova korekce)

P. perniciosus OG-VL × *P. perniciosus* OG-VL

$\chi^2 = 5,1$, $p = 0,06$ (Yatesova korekce)

$p = 0,052$ (Fisherův test)

Po sloučení výsledků infekcí *P. perniciosus* ve stejných kategoriích nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi celkovým počtem nakažených kmene TOB2 a OG-VL. Kmenem TOB2 bylo infikováno 96,7 % a kmenem OG-VL 86,7 % (viz tab. 4.3, graf 4.2).

P. perniciosus TOB2 × *P. perniciosus* OG-VL

$\chi^2 = 3,9$, $p = 0,1$ (Yatesova korekce)

4.3.2 *P. perniciosus* - intenzita infekce

Byly porovnávány intenzity nákaz *P. perniciosus* kmene TOB2 a OG-VL mezi dvěma opakujícími se pokusy ve stejných kategoriích (viz tab. 4.3, graf 4.1). U nákaz kmenem TOB2 nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi intenzitou infekcí opakovaných pokusů. Naopak u nákaz kmenem OG-VL byl zjištěn vysoce signifikantní rozdíl mezi intenzitou infekcí opakovaných pokusů.

Kmenem TOB2 bylo infikováno v prvním pokuse v kategorii silná infekce 43,3 %, střední infekce 30 % a slabá infekce 20 % flebotomů a v druhém pokuse v kategorii silná infekce 26,7 %, střední infekce 26,7 % a slabá infekce 46,7 % flebotomů. Kmenem OG-VL bylo infikováno v prvním pokuse v kategorii silná infekce 86,7 %, střední

infekce 3,3 % a slabá infekce 6,6 % flebotomů a v druhém pokuse v kategorii silná infekce 13,3 %, střední infekce 23,3 % a slabá infekce 40 % flebotomů.

P. perniciosus TOB2 × *P. perniciosus* TOB2

$$\chi^2 = 6,4, p = 0,09$$

P. perniciosus OG-VL × *P. perniciosus* OG-VL

$$\chi^2 = 32,3, p < 0,001$$

Dále byly porovnávány intenzity nákaz *P. perniciosus* v jednotlivých pokusech mezi použitými kmeny TOB2 a OG-VL (viz tab. 4.3, graf 4.1). U prvního pokusu byl zjištěn vysoce signifikantní rozdíl mezi použitými kmeny. U druhého pokusu byl také zjištěn signifikantní rozdíl mezi použitými kmeny, avšak s opačným trendem. Intenzity infekcí u obou pokusů v jednotlivých kategoriích viz výše.

P. perniciosus TOB2 × *P. perniciosus* OG-VL

$$\chi^2 = 13,1, p < 0,001$$

P. perniciosus TOB2 × *P. perniciosus* OG-VL

$$\chi^2 = 8,5, p = 0,04$$

Po sloučení výsledků u obou pokusů v příslušných kategoriích byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi intenzitami infekcí kmenem TOB2 a OG-VL (viz graf 4.2). Kmenem TOB2 bylo infikováno v kategorii silná infekce 35 %, střední infekce 28,3 % a slabá infekce 33,3 % flebotomů a kmenem OG-VL v kategorii silná infekce 50 %, střední infekce 13,3 % a slabá infekce 23,3 % flebotomů.

P. perniciosus TOB2 × *P. perniciosus* OG-VL

$$\chi^2 = 9,5, p = 0,02$$

4.3.3 Porovnání infekcí *Lutzomyia longipalpis* a *P. perniciosus*

Byl porovnáván počet nakažených flebotomů a intenzity infekcí *L. longipalpis* a *P. perniciosus* kmenem TOB2. Počty jedinců *P. perniciosus* z obou infekcí kmenem TOB2 byly pro výpočet sečteny (viz tab. 4.3, graf 4.2).

4.3.3.1 Počet nakažených flebotomů

Dle výsledků χ^2 testu po Yatesově korekci byl zjištěn vysoce signifikantní rozdíl mezi infekcemi *L. longipalpis* a *P. perniciosus* kmenem TOB2. *L. longipalpis* bylo nakaženo 47,3 % a je tedy méně citlivá k infekci kmenem TOB2 než *P. perniciosus*, kterého bylo nakaženo 96,7 %.

P. perniciosus TOB2 \times *L. longipalpis* TOB2:

$\chi^2 = 35,7$, $p < 0,001$ (Yatesova korekce)

4.3.3.2 Intenzita infekce

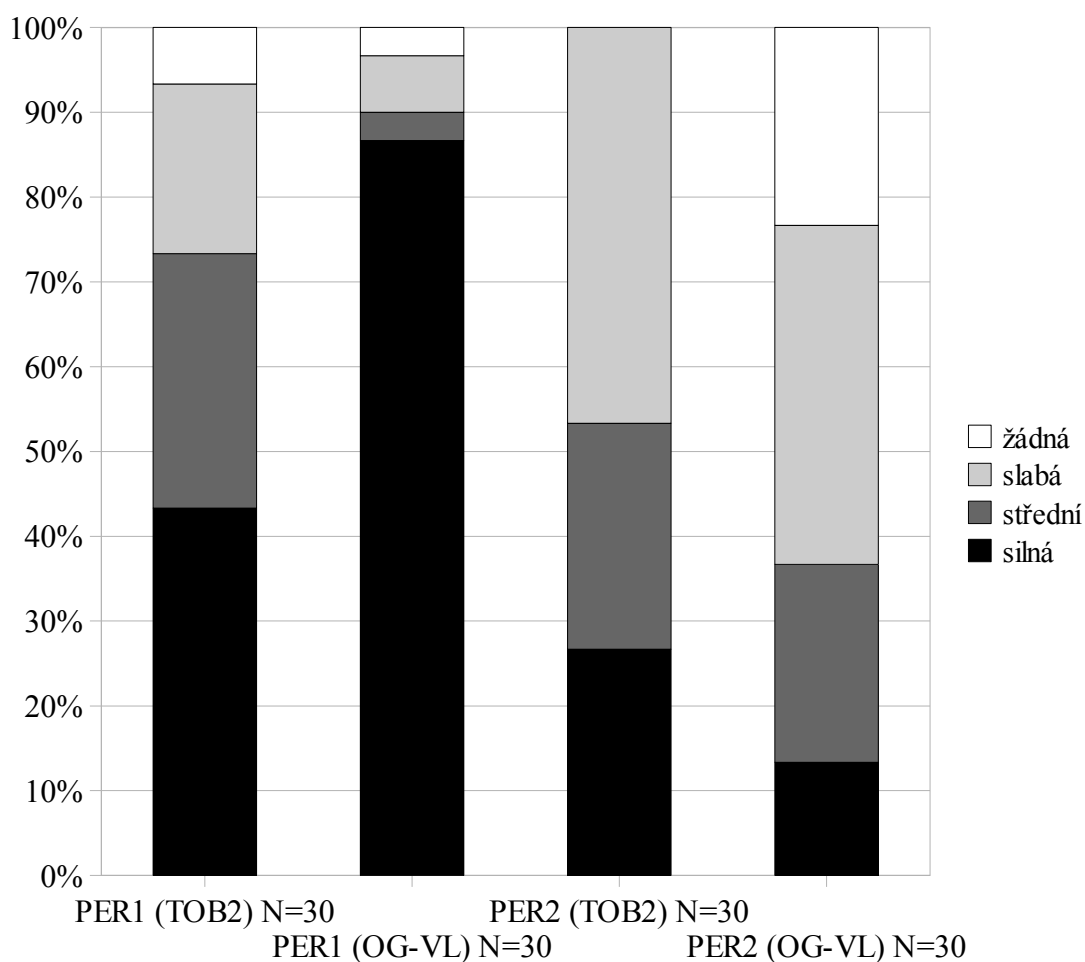
Dle výsledků χ^2 testu byl zjištěn vysoce signifikantní rozdíl mezi intenzitami infekcí *L. longipalpis* a *P. perniciosus* kmenem TOB2. *L. longipalpis* bylo infikováno v kategorii silná infekce 17,5 %, střední infekce 7 % a slabá infekce 22,8 %. *P. perniciosus* bylo infikováno v kategorii silná infekce 35 %, střední infekce 28,3 % a slabá infekce 33,3 %. *L. longipalpis* je tedy méně citlivá k infekci kmenem TOB2 než *P. perniciosus*.

P. perniciosus (TOB2) \times *L. longipalpis* (TOB2)

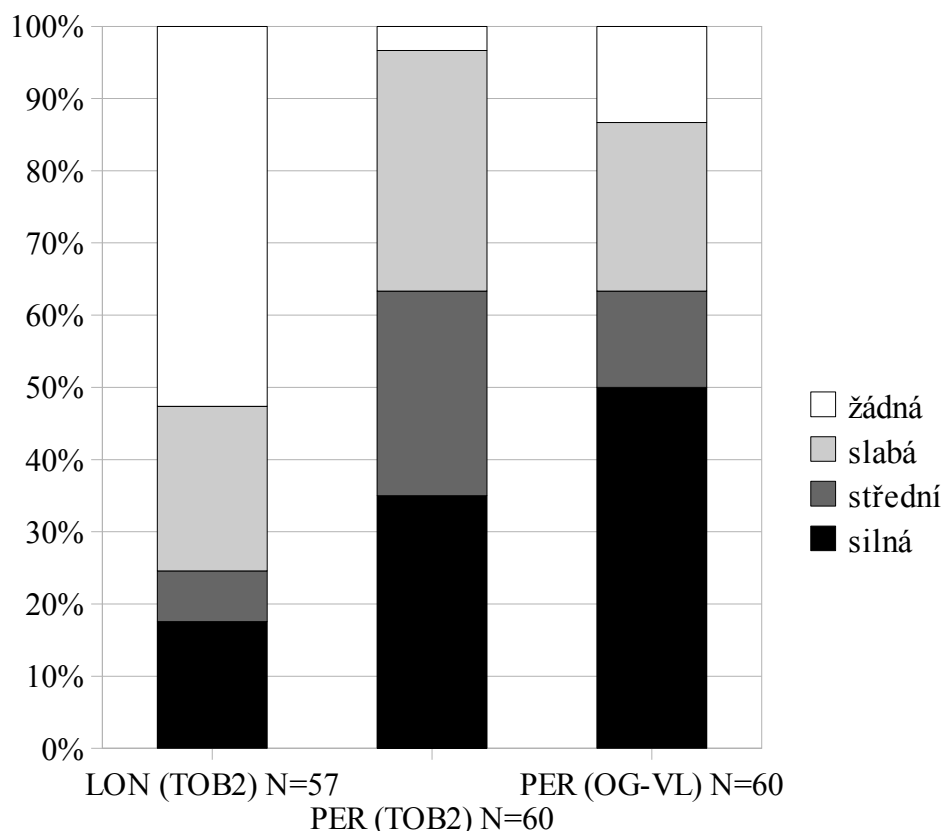
$\chi^2 = 37,9$, $p < 0,001$

Tabulka 4.3: Výsledky infekcí flebotomů *L. infantum*. LON = *L. longipalpis*, PER = *P. perniciosus*, OG-VL = viscerální kmen, TOB2 = kutánní kmen. Síla infekce: +++ silná, ++ střední, + slabá, - žádná. ND (Not Done) – pokus v této kategorii nebyl uskutečněn. Uvedené hodnoty jsou po defekaci flebotomů, a to v rozmezí 7. - 9. den po infekci.

pokus	TOB2				OG-VL			
	+++	++	+	-	+++	++	+	-
LON	10	4	13	30	ND	ND	ND	ND
PER 1	13	9	6	2	26	1	2	1
PER 2	8	8	14	0	4	7	12	7



Graf 4.1: Výsledky infekcí *P. perniciosus L. infantum*. OG-VL = viscerální kmen, TOB2 = kutánní kmen, PER1 a PER2 = jednotlivé pokusy



Graf 4.2: Porovnání infekcí *L. longipalpis* se sloučenými výsledky infekcí *P. peniciosus* *L. infantum*. LON = *L. longipalpis*, PER = *P. peniciosus*, OG-VL = viscerální kmen, TOB2 = kutánní kmen

4.4 Laboratorní přenos *L. infantum* na modelového savce

4.4.1 Inokulace myši *L. infantum*

Osm myší kmene BALB/c bylo inokulováno *L. infantum* kutánního kmene TOB2, a to buď do pravého chodidla zadní nohy (3 myši) nebo do pravého ucha (5 myši). Leishmanie byly izolovány z *L. longipalpis* 8. den po infekci.

Po 2. týdnu vývoje infekce se jedné myši inokulované do ucha vytvořila v místě vpichu léze. Pro průkaz leishmanií jsem nechala sát samice *Lutzomyia longipalpis* na uchu myši s lézí po 5. týdnu vývoje infekce. Před defekcí bylo vypitváno 29 a po defekaci 58 samic. Žádná z vypitvaných lutzomyií nebyla infikována.

Myši byly utraceny po 14 - 15 týdnech od inokulace. Byla jim odebrána tkáň z místa inokulace a nejbližší spádové uzliny. Pro průkaz leishmanií ve vyizolované DNA z tkáni myši byla použita kvantitativní PCR (Q-PCR). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.4.

Kvantitativní PCR prokázala, že šest z osmi myši bylo pozitivních na leishmanie, a to jedna ze tří s místem inokulace do chodidla a všech pět s místem inokulace do ucha. U všech pozitivních myši byly nalezeny leishmanie v tkáni z místa inokulace. U dvou pozitivních myši v tkáni u místa inokulace nebyly nalezeny leishmanie v tkáni příslušné spádové uzliny, a to u jedné myši inokulované do chodidla a u jedné myši inokulované do ucha. Jedné myši, pozitivní v tkáni u místa inokulace – uchu i v příslušné krční uzlině, se vytvořila na uchu léze.

Tímto pokusem jsem prokázala, že myši kmene BALB/c jsou vnímavé k infekci *L. infantum* kutánního kmene TOB2 a také, že ucho je lepší pro uchycení infekce než chodidlo. Mohla jsem tedy tento kmen myši používat pro pokusy s přenosem *L. infantum* sáním infikovaných flebotomů.

Tab. 4.4: Výsledky Q-PCR. Vzorek byl – negativní, +, ++, +++ pozitivní na leishmanie. Přibližné množství zjištěných leishmanií: + do 99, ++ 100-999, +++ 1000 a více. Ano - vytvořena léze, Ne - nevytvořena léze.

Myš	Místo vpichu	Vzorek z místa vpichu	Vzorek z uzliny	Léze
1.	chodidlo	-	-	ne
2.	chodidlo	+++	-	ne
3.	chodidlo	-	-	ne
4.	ucho	+++	+++	ne
5.	ucho	+++	+	ne
6.	ucho	+++	-	ne
7.	ucho	+	+++	ano
8.	ucho	+++	+	ne

4.4.2 Přenos leishmanií sáním flebotomů

Po průkazu vhodnosti myši jako mezihostitelů jsem přistoupila k pokusům přenosu sáním infikovaných flebotomů. Myši byly utraceny po 13 týdnech. Pro průkaz leishmanií ve vyizolované DNA z tkáni myši byla použita kvantitativní PCR (Q-PCR). Byly použity

pouze vzorky tkání u místa sání pozitivních flebotomů a příslušných spádových uzlin. Dále byly použity vzorky tkání sleziny a jater. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.5.

Tabulka 4.5: Výsledky Q-PCR. Vzorek byl – negativní, +, ++, +++ pozitivní na leishmanie. Přibližné množství zjištěných leishmanií: + do 99, ++ 100-999, +++ 1000 a více. ND (Not Done) - v místě nesál žádný pozitivní flebotomus, a proto nebyl vzorek tkáně potenciálního místa sání nebo příslušné spádové uzliny odebrán. TOB2 kutánní kmen, OG-VL viscerální kmen *L. infantum*.

Myš BALB/c	1.	2.	3.	4.
Flebotomus (kmen <i>L. infantum</i>)	<i>L. longipalpis</i> (TOB2)	<i>P. perniciosus</i> (TOB2)	<i>P. perniciosus</i> (OG-VL)	<i>P. perniciosus</i> (OG-VL)
Ocas	-	ND	ND	ND
Uzlina pravá tříselní	-	ND	ND	ND
Uzlina levá tříselní	-	ND	ND	ND
Pysk	ND	ND	ND	-
Ucho levé	-	-	-	-
Víčko levé	ND	ND	-	ND
Uzlina levá krční	-	-	++	-
Ucho pravé	+++	ND	ND	ND
Uzlina pravá krční	-	ND	ND	-
Slezina	-	-	-	-
Játra	+	-	++	+

Na myši číslo 1 sály *L. longipalpis* nakažené *L. infantum* kutánního kmene TOB2 7. den po infekci. Samice sály na ocase, levém a pravém uchu. Na levém uchu sály dvě infikované samice, jedna měla infekci slabou a druhá silnou, ale leishmanie nepřenesly. Na pravém uchu sála jedna samice se středně silnou infekcí a leishmanie přenesla. Na ocase sála jedna samice se silnou infekcí, ale leishmanie nepřenesla.

Na levém uchu myši číslo 2 sála jedna samice *P. perniciosus* se středně silnou infekcí *L. infantum* kutánního kmene TOB2. Sání se uskutečnilo 13. den po infekci flebotomů. Leishmanie nebyly přeneseny.

Na myši číslo 3 sály samice *P. perniciosus* nakažené *L. infantum* viscerálního kmene OG-VL. *P. perniciosus* byli 11. den po infekci. Na levém uchu a levém víčku sály po jedné samici se středně silnou infekcí a jedna z nich nebo obě přenesly leishmanie.

Na myši číslo 4 sály samice *P. perniciosus* nakažené *L. infantum* viscerálního kmene OG-VL. *P. perniciosus* byli 14. den po infekci. Flebotomové sáli po jednom

infikovaném na pysku a levém uchu. V obou samicích byla zjištěna středně silná infekce a jedna z nich nebo obě přenesly leishmanie.

U myší, u kterých byl alespoň jeden vzorek tkáně u místa sání nebo příslušné spádové uzliny pozitivní, jsou pozitivní i játra. Sleziny byly vždy negativní.

Pokusy s druhým sáním flebotomů na myších kmene BALB/c byly opakovány, dokud byly živé infekční samice. Druhé sání *L. longipalpis* bylo uskutečněno na jedné myši, zatímco druhé sání samic *P. perniciosus* infikovaných kmenem OG-VL bylo opakováno na pěti a *P. perniciosus* infikovaných kmenem TOB2 bylo opakováno na osmi myších. Ze všech kombinací flebotomus - leishmanie sály samice flebotomů pouze na čtyřech myších zaznamenaných v tabulce 4.5. Na ostatních myších samice nesály.

5 Diskuze

V Turecku se vykytuje kožní i viscerální forma leishmaniózy. Mezi ohniska s výskytem kožní formy patří i oblast Cukurova v Mediteránním regionu, kam se soustředil náš výzkum. V této oblasti se podařilo našemu týmu izolovat *L. infantum* z léze člověka i z *P. tobbi* a izoláty se shodovaly (Svobodová et al., in press 2008). Tím byla splněna první část podmínek pro stanovení flebotoma vektorem v dané oblasti, jimiž jsou izolace stejného patogena z pacientů a flebotomů, vysoká početnost druhu flebotoma, který je podezřelý z přenosu patogena v dané oblasti, laboratorní infekce těchto flebotomů a přenos na modelového hostitele (Lewis, Ward, 1987). Splnění dalších podmínek pro průkaz, že *P. tobbi* je vektorem *L. infantum* v oblasti Cukurova, bylo cílem mé diplomové práce.

Určovala jsem druhové složení flebotomí fauny ve dvou lokalitách oblasti Cukurova v Turecku - západní a východní (viz obr. 3.1). V každé lokalitě bylo odchyceno víc jak tisíc flebotomů a bylo nalezeno celkem šest druhů ze čtyř podrodů, a to *P. (Phlebotomus) papatasi*, *P. (Paraphlebotomus) sergenti*, *P. (Adlerius) simici*, *P. (Larroussius) tobbi*, *P. (Larroussius) perfiliewi* a *P. (Larroussius) cf. syriacus*. V druhovém složení flebotomí fauny zkoumaných lokalit je zajímavé, že i když jsou od sebe vzdáleny méně než 65 km, liší se. *P. papatasi* a *P. perfiliewi* jsou zastoupeni pouze v západní lokalitě a naproti tomu *P. simici* byl nalezen pouze ve východní lokalitě. Celkové klimatické podmínky jsou podobné v obou lokalitách, avšak mohou být odlišné podmínky mikroklimatické (teplota, vlhkost, světlo, proudění vzduchu; Svobodová et al., in press 2008).

Simsek et al. (2007) identifikovali při svých odchycích v provincii Adana (oblast Cukurova) v 1075 zástupcích *Phlebotomus* 11 druhů. Nejvíce byli zastoupeni *P. tobbi* (73 %) a *P. papatasi* (17 %). Ostatní druhy byly zastoupeny minoritně *P. neglectus*, *P. sergenti*, *P. galilaeus*, *P. syriacus*, *P. transcausicus*, *P. alexandri*, *P. simici*, *P. halepensis* a *P. perfiliewi*. Na rozdíl od nás identifikovali navíc *P. galilaeus*, *P. transcausicus*, *P. alexandri* a *P. halepensis*. V provincii Kahramanmaras Simsek et al. (2007) rozpoznali v 538 chycených zástupcích *Phlebotomus* 10 druhů. Nejvíce byli zastoupeni *P. transcausicus* (60 %) a *P. galilaeus* (11 %). V minoritním množství pak *P. papatasi*, *P. sergenti*, *P. syriacus*, *P. tobbi*, *P. simici*, *P. neglectus*, *P. halepensis* a *P. brevis*. Na rozdíl od nás identifikovali navíc *P. transcausicus*, *P. galilaeus*, *P. halepensis* a *P. brevis*, za to *P. perfiliewi* odchycen nebyl. U obou odchytových lokalit

ve studii Simsek et al. (2007) se složení flebotomí fauny liší od námi odchytených druhů. Rozdíly odrážejí odlišné místa odchyty. V případech určených jako *P. neglectus* se jedná o špatnou identifikaci a jde o *P. syriacus* (viz níže).

P. tobbi, z kterého byla izolována *L. infantum* v oblasti Cukurova (Svobodová et al., in press 2008), byl nejhojnějším flebotomem v obou studovaných lokalitách. Tento druh patří do podrodu *Larroussius*, jehož zástupci jsou přenašeči *L. infantum* ve Starém světě (Lewis 1982; Gramiccia, Gradoni, 2005). Prokázáním hojnosti *P. tobbi* byla splněna jedna z podmínek pro potvrzení stanovení tohoto flebotoma vektorem *L. infantum* ve studované oblasti.

Podmínky pro stanovení flebotoma přenašečem nejsou vždy splněna. V tureckém městě Sanliurfa (region Jihovýchodní Anatolie) nebyli nalezeni žádní promastiti v celkem 1139 vypitvaných samicích (859 *P. sergenti*, 278 *P. papatasi*, 2 *P. brevis*). Nejhojnější druh *P. sergenti* (72 %) je i přesto považován za vektora *L. tropica* v této oblasti (Volf et al., 2002). V severním Izraeli byla *L. tropica* nalezena ve *P. arabicus*, který byl ovšem až třetí nejhojnější. Početnější druhy tuto leishmanii nepřenášely (Svobodová et al., 2006).

V Mediteránním regionu Turecka byl *P. tobbi* ještě nalezen v nedaleké provincii Hatay (ležící v jihovýchodní části regionu; Yaman, Özbel, 2004; Simsek et al., 2007). V regionu Centrální Anatolie byl nalezen v provincii Corum a Nigde (Ertabaklar et al., 2005 b; Simsek et al., 2007). Nebyl nalezen v městě Sanliurfa, které leží v sousedním regionu Jihovýchodní Anatolie.

P. papatasi byl nalezen pouze v západní lokalitě studované oblasti, a to jako druhý nejpočetnější. Je prokázaným vektorem *L. major* v jiných zemích (Killick-Kendrick, 1999). V Mediteránním regionu byl ještě nalezen v provincii Hatay (Yaman, Özbel, 2004; Simsek et al., 2007). V regionu Jihovýchodní Anatolie byl velice hojný v městě Sanliurfa (Le Pont et al., 1996; Alptekin et al., 1999; Volf et al., 2002; Svobodová et al., 2003; Toprak, Ozer, 2005). V regionu Centrální Anatolie byl nalezen v provinciích Konya, Corum, Nigde (Ertabaklar et al., 2005 b; Yaman, Dik, 2006; Simsek et al., 2007).

P. sergenti byl nalezen v západní i východní lokalitě studované oblasti. Je prokázaným vektorem *L. tropica* v jiných zemích (Killick-Kendrick, 1999) a je pravděpodobným vektorem v Sanliurfě (Gramiccia et al., 1984; Le Pont et al., 1996; Alptekin et al., 1999; Özcel et al., 1999; Akman et al., 2000; Gurel et al., 2002; Volf et al., 2002). V Mediteránním regionu byl ještě nalezen v provincii Hatay (Yaman, Özbel, 2004; Simsek et al., 2007). V regionu Jihovýchodní Anatolie byl velice hojný v městě Sanliurfa (Le Pont et al., 1996; Alptekin et al., 1999; Volf et al., 2002; Svobodová

et al., 2003; Toprak, Ozer, 2005). V regionu Centrální Anatolie byl nalezen v provinciích Konya a Nigde (Yaman, Dik, 2006; Simsek et al., 2007).

P. simici byl zastoupen pouze ve východní lokalitě studované oblasti. V Mediteránním regionu byl ještě nalezen v provincii Hatay (Yaman a Özbel, 2004; Simsek et al., 2007). V regionu Centrální Anatolie byl nalezen v provinciích Konya a Nigde (Yaman, Dik, 2006; Simsek et al., 2007).

P. perfiliewi byl zastoupen pouze v západní lokalitě studované oblasti. Patří do podrodu *Larrousius*, jehož zástupci jsou přenašeči *L. infantum* ve Starém světě (Lewis 1982; Gramiccia, Gradoni, 2005) a je prokázaným vektorem v jiných zemích (Killick-Kendrick, 1999). V Mediteránním regionu byl ještě nalezen v provincii Hatay (Simsek et al., 2007). V regionu Jihovýchodní Anatolie byl nalezen v městě Sanliurfa (Volf et al., 2002; Toprak, Ozer, 2005).

P. syriacus byl zastoupen v obou lokalitách studované oblasti. Patří do podrodu *Larrousius*, jehož zástupci jsou přenašeči *L. infantum* ve Starém světě (Lewis 1982; Gramiccia, Gradoni, 2005).

Dle posledních výsledků molekulárních analýz se *P. syriacus* vyskytuje ve východní části Turecka a jemu morfologicky podobný druh *P. neglectus* v západní části (Volf, osobní sdělení). Tito flebotomové se vyskytují obvykle alopatricky (Volf et al., 2002). Z toho usuzují, že v ostatních studovaných lokalitách šlo o špatnou identifikaci, jelikož flebotomové byli determinováni pouze morfologicky. Druh *P. syriacus* byl určován jako *P. neglectus* nebo úplně chybně jako *P. major*, což je dřívější společný název pro *P. syriacus* a *P. neglectus*. To potvrzují i mé výsledky. U jedinců *P. cf. syriacus* jsem nejprve proměřila části samčího rozmnožovacího orgánu (hypopygium). Po zjištění, že rozměry stylu a koxitu se blíží k hodnotám uvedených v Lewisově klíči (1982; viz tab. 4.2) pro *P. neglectus*, který se v této části Turecka nevyskytuje, jsem přistoupila k molekulární analýze ITS2 sekvencí. Ta potvrdila, že sekvence se shodují se sekvencemi pro *P. syriacus*.

Ve studii Yaman a Dik (2006) v provincii Konya (region Centrální Anatolie) naměřili u *P. syriacus* (N = 7) pro koxit hodnoty v rozmezí 0,32 – 0,55 mm a pro stylus 0,16 - 0,27 mm, u *P. neglectus* (N = 6) pro koxit 0,35 - 0,41 mm a pro stylus 0,16 – 0,19 mm. Rozmezí těchto hodnot je podle mě velmi široké a nelze podle nich určit dle Lewisova klíče (1982), o který druh flebotoma se jednalo. Nicméně dle současných názorů by se měl v této části Turecka vyskytovat *P. syriacus* (Volf, osobní sdělení). Volf et al. (2002) zaznamenali nález *P. neglectus* (N = 8 samců) v Sanliurfě (region Jihovýchodní Anatolie). Naměřené hodnoty pro koxit se pohybovaly v rozmezí 0,335 - 0,355 mm a

pro stylus 0,155 - 0,180 mm, což dle Lewisova klíče (1982) odpovídá tomuto druhu. Nicméně dle současných názorů se v Sanliurfě vyskytuje pouze *P. syriacus* (Volf, osobní sdělení).

Pro rozlišení *P. syriacus* a *P. neglectus* tedy není rozhodující morfologická determinace, nýbrž je nutné přistoupit k molekulárně-biologickým metodám. Podle těchto poznatků byl tedy *P. syriacus* ještě nalezen v Mediteránním regionu v provincii Hatay (Yaman, Özbel, 2004; Simsek et al., 2007). V regionu Jihovýchodní Anatólie byl zastoupen v městě Sanliurfa (Alptekin et al., 1999; Volf et al., 2002; Toprak, Ozer, 2005). V regionu Centrální Anatólie byl nalezen v provinciích Konya, Corum a Nigde (Ertabaklar et al., 2005 b; Yaman, Dik, 2006; Simsek et al., 2007).

Další součástí mé práce bylo zjistit, zda *P. tobbi* je permissivní či specifický vektor. K tomu jsem použila lektin HPA, který prokázal přítomnost proteinů s O-glykosidickou vazbou ve střevě samic *P. tobbi*. Jedná se tedy o permissivního vektora (Myšková et al., 2007) a mohou se v něm vyvíjet i jiné druhy leishmanií než již izolovaná *L. infantum* (Léger et al., 2000; Svobodová et al., in press 2008). To představuje pro oblasti s výskytem *P. tobbi* další ohrožení novými druhy tohoto parazita. Permissivitu *P. tobbi* by bylo vhodné potvrdit laboratorními infekcemi různými druhy leishmanií. Bohužel laboratorní kolonii tohoto druhu se dlouhodobě nedaří namnožit na množství flebotomů vhodné pro tyto pokusy.

Ve zkoumaných lokalitách by mohl být vektorem i *P. syriacus*, který patří stejně jako *P. tobbi* do podrodu *Larrousius* (Lewis, 1982). Zástupci tohoto podrodu jsou prokázání či pravděpodobní vektorů *L. infantum* (Killick-Kendrick, 1999; Gramiccia, Gradoni, 2005) a jsou pravděpodobně permissivní (Lewis 1982; Svobodová, osobní sdělení). Je tedy pravděpodobné, že *P. syriacus* je také permissivní druh a mohl by být přenašečem *L. infantum*. *P. syriacus* byl ovšem ve zkoumaných lokalitách zastoupen ve velmi malém procentu a je možné, že infikovaní jedinci pouze nebyli nalezeni.

Dalším tématem mé laboratorní práce mělo být prokázání, že *P. tobbi* se nakazí *L. infantum* a přeneše ji druhým sáním na myši kmene BALB/c, čímž bych splnila poslední část podmínek pro potvrzení vektora v Lewis a Ward (1987). Flebotomové i leishmanie mají být původem ze zkoumané oblasti. Tato poslední podmínka ovšem zatím nemohla být splněna kvůli nedostatečnému namnožení *P. tobbi* v laboratorním prostředí.

Proto jsem pro další pokusy používala jiné druhy flebotomů a mým cílem bylo

porovnat úspěšnost jejich infekcí *L. infantum* a její přenos druhým sáním na myši kmene BALB/c. Nejdříve byla vybrána *L. longipalpis* a později jsem měla možnost použít starosvětský druh *P. perniciosus*, který je pro turecké kmene vhodnějším modelovým vektorem než novosvětská *L. longipalpis*. *P. perniciosus* i *L. longipalpis* jsou prokázáni vektory *L. infantum*. Kromě kmene *L. infantum* (TOB2), izolovaného z flebotomů ve zkoumané lokalitě s výskytem kutánní formy leishmaniózy, máme v laboratoři i kmen *L. infantum* (OG-VL), izolovaný v nedaleké provincii Hatay z pacienta s viscerální formou leishmaniózy. Rozhodla jsem se nejen zjistit, zda kutánní kmen *L. infantum* (TOB2) je schopen vyvíjet se v modelových vektorech, ale i pro porovnání vývoje těchto dvou kmenů ve flebotomech a následně v myších kmene BALB/c.

Sledovala jsem tedy nejdříve nákazy *P. perniciosus* *L. infantum* kožním (TOB2) a viscerálním (OG-VL) kmenem. Zajímalo mě, zda kmen *L. infantum* ovlivňuje podíl infikovaných flebotomů a intenzitu jejich infekce. Nebyl zaznamenán rozdíl mezi procentem nakažených samic *P. perniciosus* stejnými kmene u opakovaných pokusů, a proto bylo možno výsledky sloučit. Rozdíly jsem zaznamenala až při sledování intenzit infekcí. Vysoce signifikantní rozdíl je patrný u intenzit infekcí v opakujících se pokusech u kmene OG-VL. Při srovnání intenzit nálezů samic u opakovaných pokusů kmenem TOB2 naproti tomu nebyl zjištěn signifikantní rozdíl. Tento rozdíl v infekcích kmenem OG-VL se pak projevil i při srovnávání intenzit nálezů mezi různými kmene v jednotlivých pokusech. V prvním pokuse byla vyšší intenzita infekcí kmenem OG-VL a byl zde zjištěn vysoce signifikantní rozdíl od intenzit nálezů kmenem TOB2. V druhém pokuse byla vyšší intenzita infekcí kmenem TOB2, ovšem rozdíl se blížil k hranici signifikance. Po sloučení pokusů ve stejných kategoriích intenzit nálezů byl signifikantní rozdíl mezi porovnávanými kmene, intenzita infekcí byla vyšší u kmene OG-VL.

Podle těchto výsledků izolát *L. infantum* neovlivňuje množství nakažených flebotomů, ale intenzitu jejich nálezů, a to ve prospěch viscerálního kmene OG-VL. Vzhledem k tomu, že opakované pokusy kmenem OG-VL se lišily, nelze tomuto výsledku dávat velkou váhu. Jelikož počet pasáží před získáním do naší laboratoře není znám, vysvětlují si tento rozdíl dlouhým pasážírováním in vitro. Kmen OG-VL mohl tímto způsobem ztratit své původní vlastnosti a může se chovat rozdílně při opakovaných pokusech (např. jinou dynamikou tvorby stadií promastigotů). Izolát OG-VL, uchovávaný v naší laboratoři, tedy není vhodný k pokusům s infekcemi flebotomů. Vliv vnějších podmínek (teplota, vlhkost atd.) je vyloučen, jelikož kmen TOB2 se chová v opakujících se pokusech podobně. Jednotlivé opakující se infekce různými kmene byly provedeny vždy

ve stejnou dobu, za stejných podmínek a flebotomové byli udržováni ve stejných podmínkách i v průběhu pokusu. U kmene TOB2 je počet pasáží in vitro znám a v pokusech s infekcemi *P. perniciosus* nepřekračoval pasáž pět. Nízký počet pasáží in vitro je důležitý pro zachování původních vlastností izolátu *Leishmania* (Sádlová et al., 1999).

Při srovnávání infekcí *L. longipalpis* a *P. perniciosus* mě zajímalo, zda množství infikovaných flebotomů a intenzitu jejich nákazy stejným kmenem *L. infantum* (TOB2) ovlivňuje druh flebotoma. Byl zjištěn vysoce signifikantní rozdíl v počtu nakažených jedinců i v intenzitách jejich nálezů. Počet infikovaných jedinců *P. perniciosus* i intenzity jejich nálezů byly mnohem vyšší. *P. perniciosus* je tedy nejen vhodným modelovým vektorem pro infekce *L. infantum* kutánního kmene TOB2, ale i vhodnějším druhem než *L. longipalpis*.

Následovaly pokusy s infekcemi myší. Zajímalo mě, jak se kožní kmen *L. infantum* vyvíjí v myších ve srovnání s viscerálním kmenem a zda má druh vektora vliv i na formu leishmaniózy. Je prokázáno, že sesterské druhy z komplexu *L. longipalpis*, které se považují za samostatné druhy (Lanzaro et al., 1993 in Warburg et al., 1994), ovlivňují formu leishmaniózy způsobenou stejným izolátem *Leishmania donovani chagasi* (synonymum *L. infantum*; Warburg et al., 1994). Abych vyloučila rozdíly v infekcích myší způsobené odlišnou genetickou výbavou, zvolila jsem inbrední kmen myší BALB/c.

Před pokusem s druhým sáním infikovaných flebotomů jsem nejprve chtěla zjistit, zda se kutánní kmen *L. infantum* TOB2 vůbec vyvíjí v myších kmene BALB/c. Otestovala jsme tedy jeho vývoj v myších intradermální inokulací do ucha nebo nohy. Sulahian et al. (1997) a Garin et al. (2001) sice infikovali myši kmene BALB/c izoláty *L. infantum* z pacientů s kožní leishmaniózou, ale na rozdíl od nás intravenózně, což neodpovídá přirozenému způsobu přenosu sáním. Pro zvýšení pravděpodobnosti úspěšnosti přenosu na myši jsme promastigoty izolovaly z *L. longipalpis* 8. den vývoje infekce. Je prokázáno, že flebotomové zvyšují úspěšnost přenosu leishmanií na hostitele regurgitací filamentózního proteofosfoglykanu do rány spolu s promastigoty, kteří ho sekretují (Stierhof et al., 1999; Rogers et al., 2004). Vývoj izolátu *L. infantum* z pacienta s viscerální leishmaniózou v myších kmene BALB/c po intradermální inokulaci již prokázali Ahmed et al. (2003).

Infikovalo se šest z osmi inokulovaných myší. U myší inokulovaných do nohy se infekce vyvinula u jedné ze tří, ale leishmanie byly zaznamenány pouze v tkáni u místa vpichu. Infekce se vyvinula u všech pěti myší inokulovaných do ucha. Kromě jedné myši, kde byli amastigoti nalezeni pouze v tkáni u místa vpichu, byli u ostatních amastigoti

nalezení ve vzorku z místa vpichu i v příslušné uzlině. Ucho je tedy vhodnějším místem pro vývoj amastigotů leishmanií než chodidlo, pravděpodobně kvůli rozdílnému imunitnímu prostředí. Například u mastocytů prokázal Weber et al. (2003) rozdílné zastoupení v kůži různých částí lidského těla. Tyto buňky se přitom významně podílejí na počáteční fázi imunitní odpovědi proti infekci způsobené *Leishmania major*, jak bylo popsáno na myším modelu (Maurer et al., 2006).

Jedné myši inokulované do ucha se vytvořila v místě vpichu léze. Zajímavé je, že v tkáni u místa inokulace bylo u této myši nalezeno o dva řády méně leishmanií než v příslušné uzlině. To si vysvětlují zánětlivou reakcí v místě vzniku léze, která mohla bránit množení leishmanií. Mezi ostatními myšmi inokulovanými do ucha, a dokonce i u myši inokulované do nohy, bylo nalezeno vždy o dva řády větší množství amastigotů v tkáni u místa vpichu než u myši s lézí.

Prokázala jsem, že kutánní kmen *L. infantum* TOB2 se v myších kmene BALB/c vyvíjí při intradermální inokulaci po izolaci z *L. longipalpis*. Myši kmene BALB/c jsou vhodný modelový organismus pro vývoj infekce kutánního kmene *L. infantum* TOB2.

Poté jsem přistoupila k přenosu tohoto kmene druhým sáním infikovaných flebotomů. Do druhého sání přežívalo velmi málo samic obou druhů i přesto, že jsem jim neposkytla možnost vykladení vajec. Malé přežívání *P. perniciosus* do druhého sání popisují i Pozio et al. (1985) a Knechtli a Jenni (1989), kteří ovšem poskytovali samicím možnost vyklást se. Navíc *L. longipalpis* byly výrazně ochotnější k druhému sání ve srovnání s *P. perniciosus*. Pokus s *L. longipalpis* proběhl na jedné myši a infikované samice ihned sály na několika místech, zatímco pokus s *P. perniciosus* infikovanými kmenem OG-VL byl opakován 5× a kmenem TOB2 8×. Flebotomové infikované kmenem OG-VL sály na dvou myších a jen na jedné myši sála samice infikovaná kmenem TOB2.

Navíc není pravidlem, že infikované samice přenesou při druhém sání leishmanie (Svobodová, Votýpka, 2003). Například na myši sáté *L. longipalpis* infikované kožním kmenem TOB2 sály čtyři infikované samice, ale leishmanie přenesla jen jedna. K přenosu došlo u tří myší ze čtyř (u nález kmenem TOB2 u jedné ze dvou myší a u nález kmenem OG-VL u obou dvou myší).

Většina prací při nálezách používá metodicky mnohem jednodušší přenos inokulací (např. Sulahian et al., 1997; Garin et al., 2001; Ahmed et al., 2003; Prianti et al., 2007) i přesto, že přenos druhým sáním je nejpřirozenější způsob a napodobuje podmínky pro přenos v přírodě. Proto je tento typ přenosu také podmínkou pro prohlášení flebotoma přenašečem (Lewis, Ward, 1987). Kvůli náročnosti této metody se nám bohužel podařilo

infikovat sáním flebotomů pouze tři myši. Navíc přenos *L. infantum* druhým sáním infikovaných *P. perniciosus* nebo *L. longipalpis* byl prováděn pouze na krysách a křečcích (Pozio et al., 1985; Knechtli, Jenni, 1989; Cabrera et al., 2003) a nemám tedy bohužel možnost adekvátního srovnání.

U myši, na níž sála *L. longipalpis* infikovaná kožním kmenem TOB2, byly leishmanie izolovány z kůže pravého ucha, ale z příslušné spádové krční uzliny k pravému uchu leishmanie izolovány nebyly na rozdíl od čtyř myší z pěti, které byly inokulované intradermálně do ucha. Zajímavé je, že se kožní kmen TOB2 *L. infantum* vyskytl v játrech. To ovšem u izolátu z pacientů s kožní formou leishmaniózy popisuje i Sulahian et al. (1997).

U ostatních myší, na kterých sáli *P. perniciosus* infikovaní kmenem *L. infantum* izolovaným z pacienta s viscerální leishmaniózou, byli amastigoti taktéž detekováni v játrech. U jedné myši byly kromě jater paraziti detekováni také v levé krční uzlině. Protože se jedná o izolát z pacienta s viscerální leishmaniózou nepřekvapilo mě, že paraziti nebyli zaznamenáni v kůži. To popisuje i Ahmed et al. (2003). Po intradermální inokulaci izolátu *L. infantum* (z pacienta s viscerální leishmaniózou) myším kmene BALB/c detektovali v průběhu pokusu přibližně stejné množství parazitů v lymfatické uzlině a postupné vymizení parazitů z kůže u místa inokulace. Amastigoty zaznamenali také v játrech a na rozdíl od nás i ve slezině.

U všech myší infikovaných kožním nebo viscerálním kmenem byli amastigoti detekováni v játrech, ale ne ve slezině. Ve studii Sulahian et al. (1997) infikovali myši BALB/c intravenózně *L. infantum*, a to buď izolátem z pacientů s kožní leishmaniózou nebo izolátem z pacientů s viscerální leishmaniózou. Amastigoti byli u většiny myší zaznamenáni v průběhu pokusu po kultivaci homogenátu v játrech i slezině, i když ke konci pokusu (90. - 100. den) v těchto orgánech nebo alespoň v jednom z nich už detekováni nebyli. Tento průběh byl pozorován u obou typů izolátů. Podobnost s mými výsledky naznačuje, že se amastigoti v průběhu pokusu mohli vyskytovat i ve slezině, ale postupně z ní mohli vymizet a na závěr pokusu již detekováni nebyli.

Během pokusu myši nejevily známky onemocnění, i když následně byli zjištěni amastigoti v jejich tkáních. To popisuje i Garin et al. (2001). Asymptomatický průběh infekce je běžný u leishmaniózy způsobené *L. infantum*. Ovšem v práci Molina et al. (1994) a Guarga et al. (2000) prokázali, že i psi nakažení *L. infantum* bez klinických příznaků jsou schopni nakazit *P. perniciosus*, což je důležité v epidemiologii tohoto onemocnění.

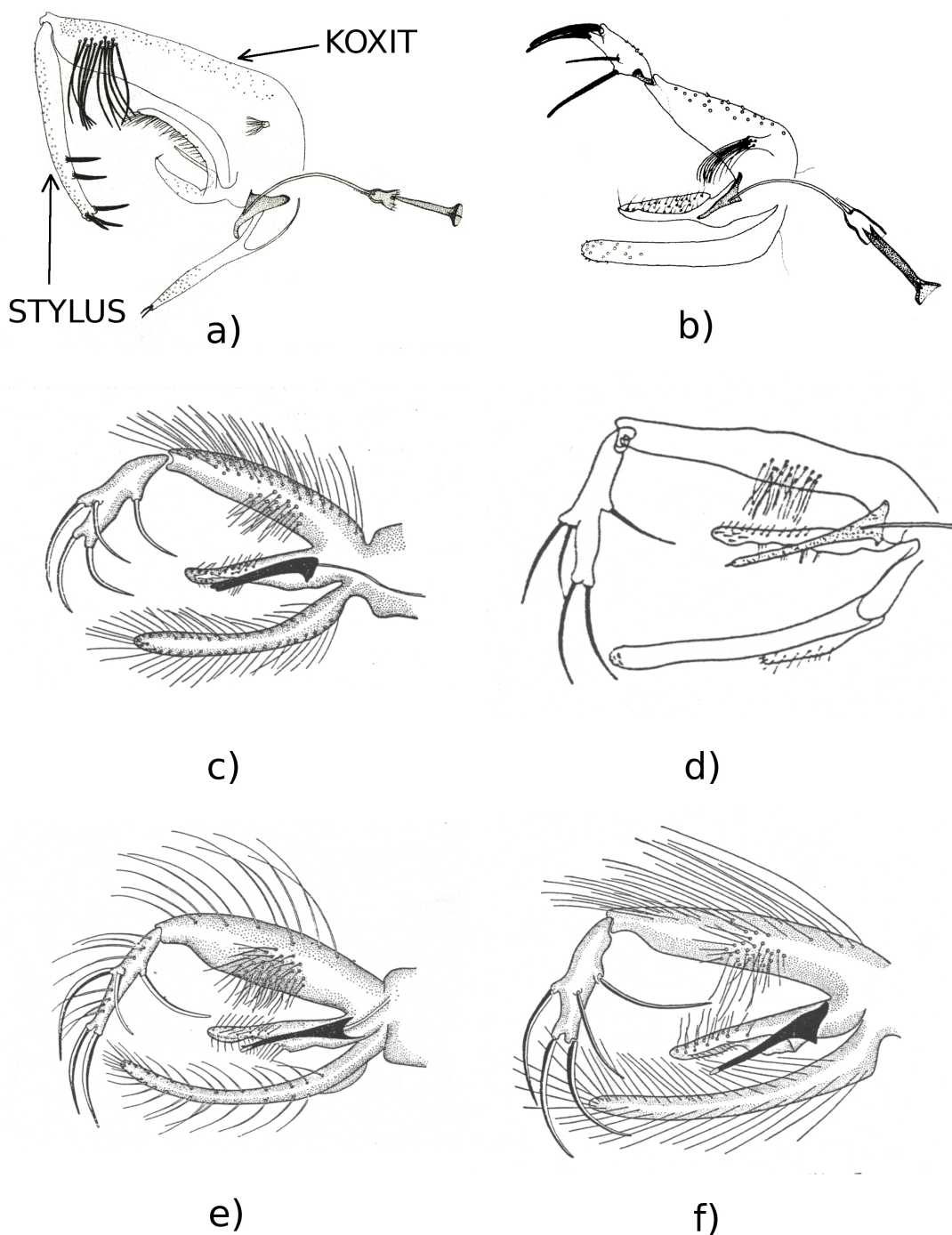
Kutánní kmen *L. infantum* je tedy možné detektovat v kůži na rozdíl od viscerálního kmene i po několika týdnech vývoje infekce. Rozmístění amastigotů v ostatních orgánech je podobné a pozorované rozdíly mohou být ovlivněny pouze malým počtem infikovaných myší. Kutánní kmen TOB2 byl přenesen pouze *L. longipalpis* a nikoliv *P. perniciosus*, a proto nemohu srovnat, zda vývoj tohoto kmene v myších kmene BALB/c ovlivňuje druh flebotoma. I přes použitelnost jiných modelových flebotomů bude vhodné namnožit *P. tobbi* v laboratorních podmínkách na množství použitelné pro pokusy s druhým sáním. Jinak nemůže být *P. tobbi* s jistotou prohlášen prokázaným přenašečem kutánního kmene *L. infantum* TOB2 v oblasti Cukurova v Turecku (Lewis, Ward, 1987).

6 Shrnutí

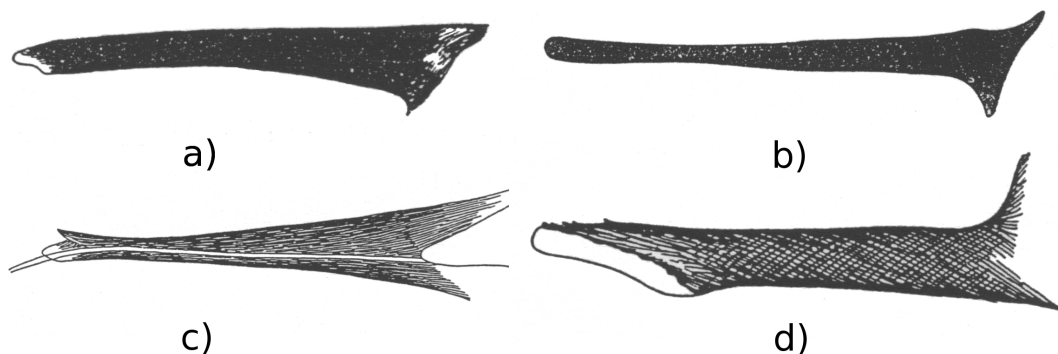
- *Phlebotomus tobbi* je nejhojnějším flebotomem v obou lokalitách výskytu kožní leishmaniózy v Turecku. Přitom vysoká početnost druhu flebotoma, který je podezřelý z přenosu patogena v dané oblasti, je podmínka pro jeho potvrzení jakožto vektora.
- Druhové složení flebotomí fauny se může lišit i v místech vzdálených několik kilometrů při zachování podobných klimatických podmínek.
- Pro rozlišení *P. syriacus* a *P. neglectus* je zásadní použití molekulárně-biologických metod. Měření částí hypopygia je nedostatečné.
- *P. tobbi* je permissivní vektor a mohou se v něm pravděpodobně vyvíjet i jiné druhy leishmanií než z něj izolovaná *L. infantum*. To představuje pro oblasti s výskytem *P. tobbi* potenciální ohrožení různými druhy leishmanií.
- Kmen *L. infantum*, který byl izolován z *P. tobbi* ze zkoumané lokality a je shodný s izolátem z pacientů s kožní leishmaniózou, se úspěšně vyvíjí ve *P. perniciosus* a *L. longipalpis*. *P. perniciosus* je sice vnímavější k laboratorní nákaze *L. infantum*, ale *L. longipalpis* je ochotnější k druhému sání na myších kmene BALB/c.
- Kutánní kmen *L. infantum* infikuje po intradermální inokulaci i po přenosu druhým sáním infikovaných flebotomů myši kmene BALB/c. Pro vývoj *L. infantum* kutánního kmene po intradermální inokulaci je vhodnějším místem ucho než chodidlo. Kutánní kmen *L. infantum* je možné detektovat v kůži na rozdíl od viscerálního kmene i po několika týdnech vývoje infekce.

7 Příloha

7.1 Morfologické znaky určených flebotomů



Obr. 7.1: Hypopygia. a) *P. papatasi*, b) *P. sergenti*, c) *P. simici*, d) *P. syriacus*, e) *P. tobbi*, f) *P. perfiliewi* (obrázky a, b - Depaquit et al., 2001; c, e, f - Perfiljev, 1966; d - Theodor, 1948 in Perfiljev, 1966)



Obr. 7.2: Penisy. a) *P. simici*, b) *P. syriacus*, c) *P. tobbi*, d) *P. perfiliewi*; a, b, c, d - Perfiljev, 1966

Pro determinaci samců ve zkoumaných lokalitách mně postačily znaky na hypopygiu umístěném na zadní části těla. Hypopygium slouží k přidržení samice při kopulaci. Poměr a tvar jeho částí (stylu, koxitu a penisu; viz obr. 7.1 a 7.2) jsem sledovala při určování druhů samců. Z dřívějšího určování samic členama našeho týmu jsem předpokládala podobné druhové složení i u samců. Níže popisuji znaky při určování, na které jsem se soustředila.

Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi se odlišoval od ostatních identifikovaných samců v lokalitě velkým hypopygiem, jehož součástí je velký a tenký stylus (viz obr. 7.1 a).

Hypopygium *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* se odlišovalo od ostatních flebotomů typicky citronkovitým tvarem stylu (znak podrodu *Paraphlebotomus*). Pro tento druh je typický výběžek s menším počtem chlupů na koxitu oproti ostatním zástupcům tohoto podrodu (viz obr. 7.1 b).

Pro rozlišení druhů flebotomů, patřících do podrodu *Larroussius* nebo *Adlerius*, jsem musela sledovat znaky na penisu, jelikož oba podrody mají podobný tvar stylu s 5 chlupy (viz obr. 7.1 c, d, e, f). *Phlebotomus (Adlerius) simici* má dlouhý penis zakončený dvěma zuby (viz obr. 7.2 a). *Phlebotomus (Larroussius) syriacus* a *Phlebotomus (Larroussius) neglectus* mají penis dlouhý a tenký (viz obr. 7.2 b). Tyto druhy si jsou morfologicky velmi podobné a pro jejich rozlišení jsem použila molekulárně-biologické metody. Penis *Phlebotomus (Larroussius) tobbi* je zakončen dvěma zuby a má konkávní tvar (viz obr. 7.2 c). Penis *Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi* je zakončený ploškou (viz obr. 7.2 d).



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal for Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpara



Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*[☆]

Milena Svobodová^{a,*}, Bulent Alten^b, Lenka Zídková^a, Vít Dvořák^a, Jitka Hlavačková^a, Jitka Myšková^a, Veronika Šeblová^a, Ozge Erisoz Kasap^b, Asli Belen^b, Jan Votýpka^a, Petr Volf^a

^aDepartment of Parasitology, Charles University, Vinicna 7, Prague 128 44, Czech Republic

^bHacettepe University, Faculty of Science, Department of Biology, 06532 Beytepe, Ankara, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 May 2008
Received in revised form 26 June 2008
Accepted 29 June 2008
Available online xxxx

Keywords:
Cutaneous leishmaniasis
Sand fly
Transmission
Epidemiology
Anthroponosis
Leishmania infantum
Phlebotomus tobbi

ABSTRACT

Transmission of cutaneous leishmaniasis (CL) caused by *Leishmania infantum* was studied in South Anatolia, Turkey. Small, non-ulcerating lesions prevailed and patients were negative in rK39 tests for antibody detection for human visceral leishmaniasis (VL). The most abundant sand fly species, *Phlebotomus tobbi*, was found positive for *Leishmania* promastigotes with a prevalence of 1.4% (13 out of 898 dissected females). The isolated strains were identical with those obtained from patients with CL and were typed as *L. infantum*. Phylogenetic analysis revealed similarity to MON-188 and a clear difference from the MON-1 clade. Blood-meal identification showed that *P. tobbi* feeds preferentially on cattle and humans. This finding, the high number of CL patients and relative scarcity of dogs in the focus, suggests that the transmission cycle could be anthroponotic.

© 2008 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis are diseases with a wide spectrum of clinical forms, from relatively mild cutaneous lesions to life-threatening visceral diseases. Their causative agents, protozoans of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), are transmitted by phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae).

In Turkey, visceral leishmaniasis (VL) is caused by *Leishmania infantum* and affects mainly children (Ozcel et al., 1999; Ok et al., 2002; Tanir et al., 2006). Cutaneous leishmaniasis (CL) is endemic in several regions of Turkey. It has been attributed almost exclusively to *Leishmania tropica* although sporadic occurrence of *Leishmania major* has been also reported (Akman et al., 2000). The biggest outbreak with over 11,000 reported cases occurred recently in Sanliurfa (Ok et al., 2002) and the parasite has been typed as *L. tropica* (Gramiccia et al., 1991; Waki et al., 2007). However, several other foci exist including Cukurova, a part of the Mediterranean region with Adana being the capital. Since 1985, thousands of new CL cases have emerged there and it has been suggested that the causative agent is *L. tropica* (Ok et al., 2002; Uzun et al., 1999).

In parallel, vectors of *Leishmania* have been investigated in CL foci in Turkey (Volf et al., 2000; Simsek et al., 2007) but infected sand flies were never found.

We performed a study on humans and sand flies in the CL focus in Cukurova region where, according to the local health centers, hundreds of human cases continue to occur every year. Surprisingly, the causative agent of human CL was identified as *L. infantum*. We also found 13 *Phlebotomus tobbi* infected with *L. infantum*, and demonstrated that human isolates of *L. infantum* from the study area are identical to isolates from *P. tobbi*.

2. Materials and methods

2.1. Study area

The study was performed in two adjacent areas in the North part of Cukurova region, south Anatolia, during 2005–2007. South Anatolia is bound by the West Taurus Mountains, the mountain ranges of Taurus and anti-Taurus to the North, and the Amanos Mountains to the East (Fig. 1). The Western part of the focus comprises five villages approximately 55 km northeast of Adana city with an altitude of 150–280 m above sea level: Tepecikören (37°21'46"N, 35°37'40"E), Zerdali, Camili, Aydın and Otluk. The local centre of the Eastern part of the focus is Boyali (37°17'56"N, 36°21'33"E) situated 30 km northeast of Osmaniye

* Nucleotide sequence data reported in this paper are available in DDBJ/EMBL/GenBank databases under Accession Nos. EU545236–EU545255.

☆ Corresponding author. Tel.: +420 2 21951811; fax: +420 2 24919704.

E-mail address: milena@natur.cuni.cz (M. Svobodová).

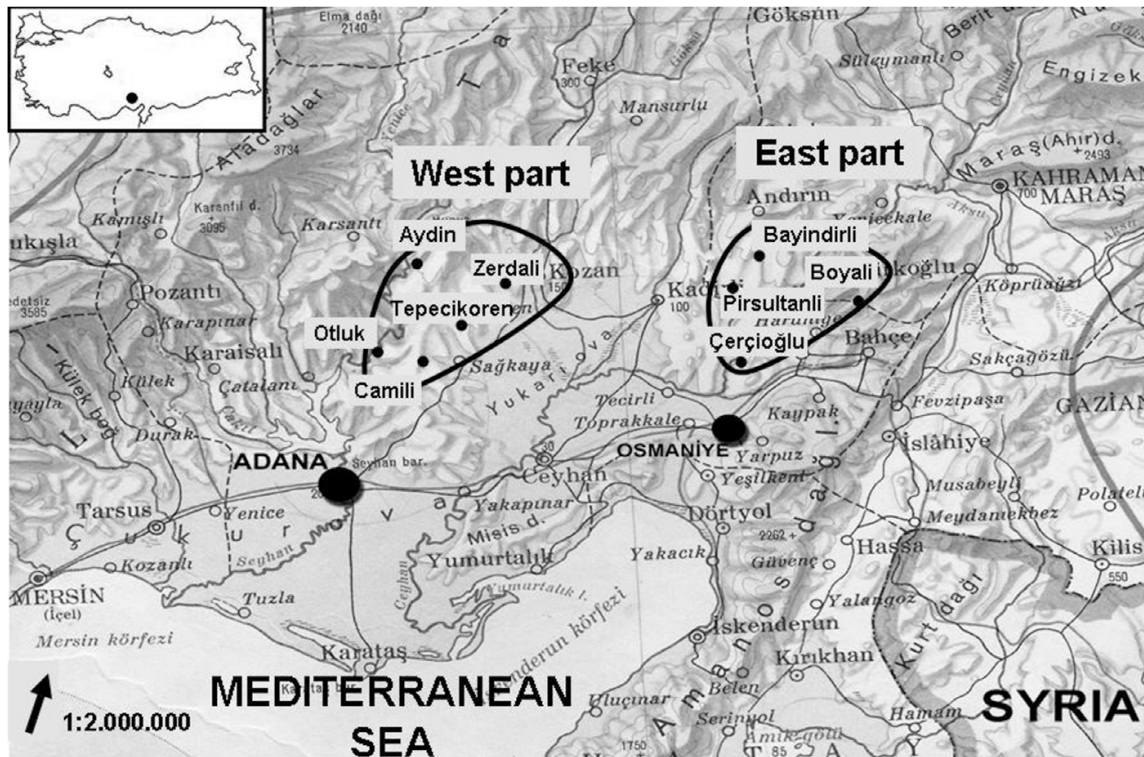


Fig. 1. Map of western and eastern parts of the study area.

79 city and surrounded by several other villages (Alibozlu, Bay-
 80 andirli, Cercioglu, Oluklu, Pirsuntanli and Karakuyu). The altitudes
 81 range from 205 to 320 m above sea level. Most of the area in both
 82 parts of the focus is fertile (“mollisol” soil) and used for agricul-
 83 tural activities, but young *Pinus* (pine-tree) and *Abies* (fir-tree)
 84 forests are also cultivated. Citrus orchards and cotton fields are
 85 more common in the Eastern part. The mean annual precipitation
 86 is 636.8 mm (West) and 761.3 mm (East) with 66% relative
 87 humidity and the mean annual temperature is 18.7 °C (West)
 88 and 19.6 °C (East). Residents live in single-family houses built
 89 from briquette, adobe, stone and cement, surrounded by gardens
 90 with henhouses and sheep or cattle sheds. Treatment of patients
 91 with CL is provided in regional health centres (Kozan in the West
 92 and Duzici in the East) by multiple weekly injections of Glucan-
 93 time (meeglumine antimoniate) for at least 2 months.

94 **2.2. Sand fly collection, dissection and identification**

95 Sand flies were collected in September 2005, 2006 and 2007,
 96 mostly using Centres for Disease Control (CDC) light traps (John
 97 W. Hock, USA) placed inside the houses, animal shelters and in
 98 house yards. A small proportion of sand flies inside the houses
 99 and shelters were collected by hand aspirators. Dead females and
 100 all males were stored in 70% ethanol for morphological identifica-
 101 tion. In males of *Phlebotomus* cf. *syriacus*, the thorax was used for
 102 DNA extraction and molecular identification based on sequencing
 103 of internal transcribed spacer 2 (ITS2), 18S rRNA, and cytochrome
 104 *b* (*cyt b*) genes (see below).

105 Live sand fly females were immobilized on ice, rinsed briefly in
 106 96% ethanol, washed and dissected in 0.9% sterile saline. The head
 107 and genitalia were used for identification and the gut was exam-
 108 ined microscopically for the presence of promastigotes. In blood-
 109 fed females the gut with the rest of the blood-meal was smeared
 110 on a piece of filter paper (Whatman 3; Whatman, Brentford, UK),
 111 allowed to dry and then stored at -20 °C until use.

112 Upon microscopical detection of *Leishmania* infection, the mate-
 113 rial from the slide was divided into two parts. The first was inocu-
 114 lated into glass vials (2.5 ml) containing SNB-9 blood agar made
 115 from defibrinated rabbit blood and overlaid with 1:1 RPMI
 116 1640/Schneider insect medium, supplemented with 10% FCS (Sig-
 117 ma or Gibco), 2% sterile human urine, 10,000 IU penicillin (Biotika),
 118 100 µg/ml amikacin (Bristol-Myers Squibb) and 1500 µg/ml five
 119 fluorocytosine (Sigma). The second was soaked on a piece of filter
 120 paper (Whatman 3) for DNA extraction and *Leishmania* identifica-
 121 tion as a backup in case of unsuccessful cultivation.

122 **2.3. Sampling from patients**

123 Patient sampling was performed in cooperation with local med-
 124 ical doctors. Tissue samples were obtained from lesions by insulin
 125 syringe aspiration and immediately inoculated into 2.5 ml glass
 126 vials with SNB-9 (as above). In addition, blood plasma was taken
 127 from 26 patients with well-developed lesions to detect the pres-
 128 ence of antibodies against causative agents of VL by DiaMed-IT LE-
 129 ISH (DiaMed, Switzerland) immuno-chromatographic dipstick test
 130 using the recombinant antigen K39. Two sera of VL-positive

Please cite this article in press as: Svobodová, M. et al., Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted ..., Int. J. Parasitol. (2008), doi:10.1016/j.ijpara.2008.06.016

131 patients kindly provided by J.-C. Dujardin were used as positive
132 controls.

133 2.4. DNA extraction

134 Extraction of total DNA from the material preserved in ethanol
135 (sand fly thorax), filter papers (midguts of blood-fed or infected fe-
136 males), and from successfully established cultures (exponential
137 phase of growth) was performed using a DNA extraction kit (Roche,
138 France) according to the manufacturer's instruction. For the analy-
139 sis of sand fly blood-meals, the total DNA from the filter papers was
140 extracted using standard proteinase k digestion (20 mg/ml; 55 °C
141 overnight). The lysate was extracted with Tris-buffered phenol
142 (pH 8), followed by extraction with phenol-chloroform. Nucleic
143 acid from the aqueous phase was precipitated with ethanol and
144 resuspended in 100 µl of redistilled water.

145 2.5. Leishmania typing

146 PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was
147 performed with LITSR and L5.8S primers (El Tai et al., 2000) to ob-
148 tain the ITS1 region. The PCR were performed in 50 µl total vol-
149 umes of reaction mix (Combi PPP Master Mix, Top-Bio, Czech
150 Republic) using the following conditions: initial denaturation at
151 94 °C for 2 min followed by 32 amplification cycles (94 °C for
152 20 s, 53 °C for 30 s, 72 °C for 1 min); and 72 °C for 6 min. The PCR
153 products were restricted by HaeIII enzyme for 1 h in 60 °C and vi-
154 sualised by electrophoresis with 2% Metaphor agarose gel (Schönian
155 et al., 2003). The following reference strains were used: *L. infantum*
156 (MCAN/IL/1999/LRC-L760, MHOM/TR/2000/OG-VL, MHOM/TR/
157 2003/Adana(dot), *L. tropica* (MHOM/SU/1974/K27) and *L. major*
158 (MHOM/IL/1967/LRC-L137 Jericho II).

159 PCR-based multilocus sequence typing (MLST) was used to dis-
160 tinguish between *L. infantum* and *Leishmania donovani* and for more
161 accurate identification of *Leishmania* strains (Zemanová et al.,
162 2007). We focused on sequence diversity of five enzymes: isocit-
163 rate dehydrogenase (*icd*), cytosolic malic enzyme (*me*), mannose
164 phosphate isomerase (*mpi*), glucose-6-phosphate dehydrogenase
165 (*gpi*) and fumarate hydratase (*fh*). Our isolate from a patient from
166 the Western part of the focus (MHOM/TR/2005/CUK1) was com-
167 pared with one sand fly isolate from the Western part (ITOB/TR/
168 2005/CUK2) and one isolate from the Eastern part (ITOB/TR/
169 2007/CUK10). In addition, a viscerotropic isolate MHOM/TR/
170 2000/OG-VL originating from Hatay, South Anatolia, was se-
171 quenced. PCR products of expected size were purified from the
172 gel using QIAquick gel extraction kits (Qiagen, Germany) according
173 to the manufacturer's instructions and sequenced directly on an
174 automated DNA sequencer (310 Genetic Analyzer; ABI Prism)
175 using the BigDye 3.1 kit (Applied Biosystems, USA). The obtained
176 sequences were deposited in GenBank under the following Acces-
177 sion Nos. EU545236-EU545255. Partial sequences were assembled
178 manually using Seq-Man (DNASTar). Maximum likelihood (ML),

maximum parsimony (MP) and neighbor-joining (NJ) were calcu-
lated by PhyML.win32 (Guindon and Gascuel) and PAUP* 4.0b10
(Swofford) phylogenetic software.

2.6. Blood-meal identification

In 2005 and 2006, blood-meals were identified using the mod-
ified vertebrate-universal specific primers cytB1-F (5'-CCA TCC
AAC ATY TCA DCA TGA TGA AA-3') and cytB2-R (5'-GCH CCT CAG
AAT GAT ATT TGG CCT CA-3') (Kocher et al., 1983; Malmqvist
et al., 2004) to amplify a 305 bp segment of the *cyt b* gene from
host mtDNA. PCR was performed in a 25 µl vol. using a reaction
mix. PCR products were checked on a 1.5% agarose gel; amplified
fragments were isolated and sequenced as described above. Se-
quence analyses were performed using DNASTar software; se-
quences were compared with sequences deposited in the
GenBank database using standard nucleotide BLAST searches.

2.7. Identification of *P. syriacus*

The identification of captured specimens of *P. syriacus* was
based on sequencing of a 450 bp variable region of 18S rRNA and
complete sequences of ITS2 and *cyt b*. A variable region of the
18S rRNA gene (Forward primer 5'-GTGCGGGTTTTCATTACTT-3',
Reverse primer 5'-AACATCCTGGCAAATGTT-3'), ITS2 (Depaquit
et al., 2002) and *cyt b* (Forward primer 5'TATGACTACCATGAGG
ACAAATATC-3', Reverse primer 5'-GCTATTACTCCYCTAACTTRIT
-3', modified from (Esseghir and Ready, 2000)) were amplified
from 10 randomly selected specimens of *P. cf. syriacus*. Six
specimens from Israel (*P. syriacus*) and four from Italy (*Phlebotomus
neglectus*) were used for comparison. PCR was performed in a 50 µl
vol. using a reaction mix with the following cycling profile for SSU:
initial denaturation at 94 °C for 2 min followed by 25 amplification
cycles (94 °C for 30 s, 50 °C for 30 s, 72 °C for 1 min). PCR product
was sequenced as described above. Obtained sequences were
aligned and compared by ML and MP methods calculated by
PhyML and PAUP with known sequences of *P. neglectus* (GenBank
Accession Nos. AJ244367-74, AF161188-91 and AF205524) and
P. syriacus (GenBank Accession No. AJ244375-6) and with se-
quences obtained from control specimens originating from Israel
(*P. syriacus*) and Italy (*P. neglectus*).

3. Results

3.1. Phlebotomine fauna

In total, seven sand fly species were identified (five in the Wes-
tern part and four in the Eastern part of the focus), in both parts the
most abundant being *P. tobbi* (Table 1). Interestingly, *Phlebotomus
papatasi* and *Phlebotomus perfiliewi* were found only in the Western
part while *Phlebotomus simici* was present only in the Eastern part
of the focus. For *P. cf. syriacus* the morphological examination and

Table 1
Phlebotomine sand flies in the study area

Species	Western part (2005)		Eastern part (2006-2007)	
	n (%) females	n (%) males	n (%) females	n (%) males
<i>Phlebotomus (Larrousius) tobbi</i>	428 (77.7)	604 (86.4)	470 (81.2)	572 (81.5)
<i>Phlebotomus (Larrousius) syriacus</i>	3 (0.5)	16 (3.3)	24 (4.1)	52 (7.4)
<i>Phlebotomus (Larrousius) perfiliewi</i>	3 (0.5)	6 (0.9)	0	0
<i>P. (Larrousius) sp. (unidentified)</i>	28 (5.1)	0	16 (2.8)	0
<i>Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi</i>	85 (15.4)	67 (9.6)	0	0
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti</i>	4 (0.7)	6 (0.9)	67 (11.6)	71 (10.1)
<i>Phlebotomus (Adlerius) simici</i>	0	0	2 (0.3)	7 (1.0)
Total	551	699	579	702

Please cite this article in press as: Svobodová, M. et al., Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted ..., Int. J. Parasitol. (2008), doi:10.1016/j.ijpara.2008.06.016

224 measurements of male genitalia did not result in identification as
 225 the specimens were of intermediate phenotype between *P. syriacus*
 226 and *P. neglectus* (length of coxite: average 0.37, continuous range
 227 0.32–0.43 mm; length of style: average 0.17, continuous range
 228 0.15–0.21 mm). Phylogenetic and statistical analysis of 18S rRNA,
 229 ITS2 and *cyt b* genes revealed that all studied samples from Cukur-
 230 ova were significantly closer to *P. syriacus* (genetic *p*-distance
 231 means were 0.00, 0.01 and 1.15, respectively) than to *P. neglectus*
 232 (*p*-distance means were 0.01, 5.45 and 3.55, respectively).

233 3.2. *Leishmania*-infected flies

234 Out of 1,130 females dissected, 13 (1.1%) had promastigotes in
 235 their gut (two out of 551, six out of 228, and five out of 351 dissected
 236 females in 2005–2007, respectively). Nine (one in 2005, five in 2006,
 237 and three in 2007) of these infections were mature with parasites
 238 localised on the stomodeal valve; however in one case the midgut
 239 contained fresh blood from the subsequent blood-meal. In four
 240 (one in 2005 and 2006, and two in 2007) blood-fed females
 241 *Leishmania* parasites were found within the blood-meal. Isolates
 242 were obtained from 11 females, two from the Western (in 2005)
 243 and nine from the Eastern (five in 2006 and four in 2007) part of
 244 the focus. All infected females belonged to *P. tobbi*. *Leishmania* pre-
 245 valence in *P. tobbi* was 0.7%, 2.8% and 1.9% in 2005–2007, respectively.

3.3. Human isolates

246

247 We obtained inocula from 128 people with putative CL (93 and
 248 35 from Western and Eastern parts, respectively). In six cultures,
 249 promastigotes appeared in subsequent microscopical controls;
 250 however, only one isolate resulted in a thriving culture. In total,
 251 26 patients with well-developed lesions were tested by dipstick
 252 test; however no positive result was obtained. Lesions occurring
 253 in patients within the study area are presented on Fig. 2. In most
 254 cases, lesions were non-ulcerating and relatively small (1–2 cm
 255 in diameter). Questioning the patients revealed that lesions lasted
 256 for at least 2 years and approximately one-third of patients had
 257 more than one lesion. In a few cases, ulceration or spontaneous
 258 healing was observed (Fig. 2).

3.4. Parasite typing

259

260 PCR-RFLP of ITS1 was successfully used for typing of a human
 261 isolate, 11 isolates from sand flies, and two DNA samples from
 262 promastigote-positive sand fly females. All samples showed the
 263 same pattern on electrophoresis and belonged to the *L. donovani*/
 264 *L. infantum* group (Fig. 3). The MLST assay determined parasites
 265 as *L. infantum* and sequences of five analysed genes of all three
 266 strains (CUK1, CUK2 and CUK10) were identical. Comparison with

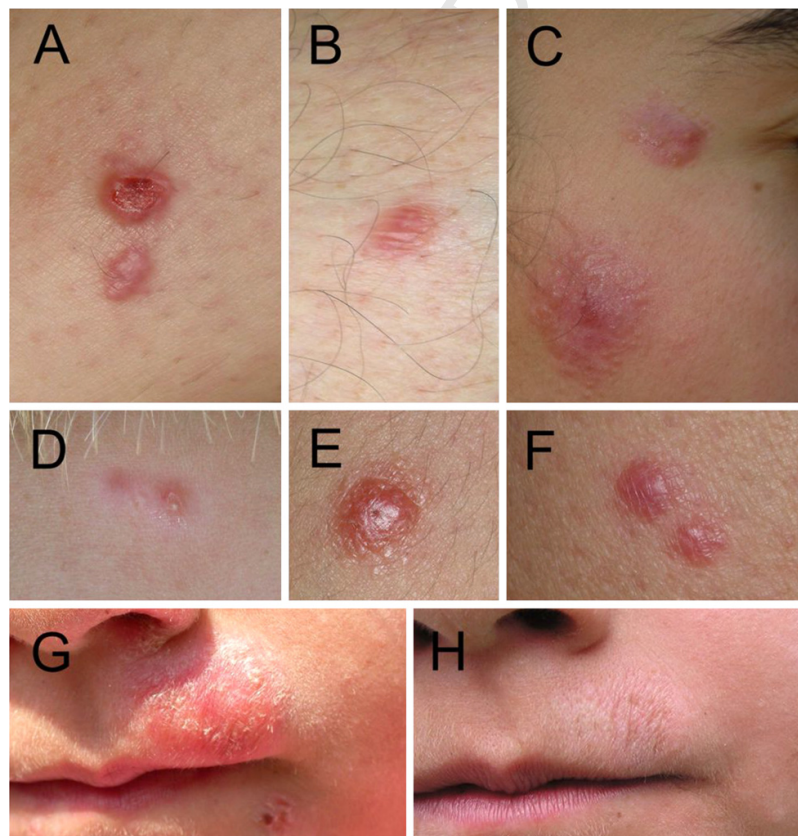


Fig. 2. Lesions occurring in patients in both parts of the study area: (A) active protuberant lesions with ulceration on left shin of 16 year old girl; (B) flat lesion about 2-years-old on left shin of 43-year-old woman; (C) atypical large lesion on right cheek and temple of 14-year-old girl; (D and E) lesions from patients culture-positive for *Leishmania* promastigotes on left thigh of 11-year-old boy and on forehead of 5-year-old boy; (F) typical lesions without ulceration on left calf of 54-year-old woman; (G and H) healing of expanded lesion in 10 year young girl, during and 2 years after treatment.

Please cite this article in press as: Svobodová, M. et al., Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted ..., Int. J. Parasitol. (2008), doi:10.1016/j.ijpara.2008.06.016

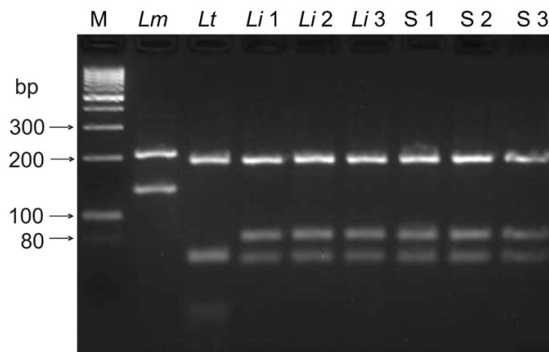


Fig. 3. PCR-restriction fragment length polymorphism of ITS1 fragments of DNA digested with HaeIII. M, 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas); Lm, *Leishmania major* (MHOM/IL/1967/LRC-L137 Jericho II); Lt, *Leishmania tropica* (MHOM/SU/1974/K27); Li 1, *Leishmania infantum* (MCAN/IL/1999/LRC-L760); Li 2, *Leishmania infantum* (MHOM/TR/2004/CL); Li 3, *Leishmania infantum* (MHOM/TR/2000/OG-VL); S1, (MHOM/TR/2005/CUK1); S2, (ITOB/TR/2005/CUK2); S3, (ITOB/TR/2007/CUK10).

Table 2
Identification of sand fly blood-source in 2005–2006

Sand fly host	TOB	PAP	LAR	SER
Cattle	159 (70.7%)	11	6	0
Human	23 ^a (10.2%)	8	0	0
Chicken	5 (2.2%)	2	2	1
Goat	1 (0.4%)	0	0	0
Mouse	1 (0.4%)	0	0	0
Vole	1 ^b (0.4%)	0	0	0
Not identified	35 (15.6%)	8	3	1
Total	225	29	11	2

TOB, *Phlebotomus tobbi*; PAP, *Phlebotomus papatasi*; LAR, *Phlebotomus* sp. (*Larrousius*); SER, *Phlebotomus sergenti*.

^a Include three double meals: cattle–human.

^b One double meal: cattle–vole.

267 other *L. infantum* strains typed by Zemanová et al. (2007) and Turk-
268 ish isolate MHOM/TR/2000/OG-VL typed by us revealed highest
269 similarity of CUK's strains to *L. infantum* strain MHOM/IT/93/
270 ISS800 (MON-188) (Fig. 4).

271 **3.5. Blood-meal identification**

272 In 2005 and 2006, out of 779 dissected females of five sand fly
273 species, 267 individuals (34%) were engorged with blood. Sequenc-

ing of the amplified part of the *cyt b* gene was found to be a very
274 sensitive method with an efficiency level of almost 85% and the
275 source of the blood-meal was determined in 220 specimens. Five
276 mammalian and one avian species were identified as hosts: cattle,
277 human, goat, mouse (*Mus* sp.), vole (*Microtus* sp.) and chicken.
278 The identity of blood-meals of four sand fly species is presented in
279 Table 2. In four females of *P. tobbi*, mixed blood-meals of human-cat-
280 tle (three specimens) and vole-cattle (one specimen) were
281 observed. The major blood sources for *P. tobbi* were cattle (70%)
282 and humans (10%). Furthermore, in four *Leishmania*-infected fe-
283 males of *P. tobbi* (one with fresh and three with extensively di-
284 gested blood) human blood was detected.
285

286 **4. Discussion**

The etiological agent of CL in the Cukurova region was identified
287 as *L. infantum*. Although we have attempted to isolate *Leishmania*
288 from several dozens of patients, only in six samples were prom-
289 astigotes observed in cultivation medium and one isolate has been
290 established in vitro. *Leishmania infantum* is notoriously difficult
291 to cultivate from cutaneous lesions (Gramiccia et al., 1991). This
292 parasite species has been incriminated for the first time as a causative
293 agent of human CL in France (Rioux et al., 1980). Since then, several
294 other countries in the Mediterranean were added to the list (del
295 Giudice et al., 1998; Serin et al., 2005). Long-term research carried
296 out in the Abruzzi region of Italy showed an intensive CL focus,
297 with thousands of recorded cases caused by dermatotropic
298 *L. infantum* (Corradetti, 1952; Gramiccia et al., 1987; Maroli et al.,
299 1987). Several studies from different areas evaluating the rK39 di-
300 pstick test confirmed high sensitivity and specificity of this method
301 for the visceral form of leishmaniasis (Chappuis et al., 2006). Our
302 data obtained by DiaMed-IT LEISH dipstick test clearly demon-
303 strated the non-visceral form of leishmaniasis in tested patients
304 from both parts of the study area.
305

Molecular methods revealed that isolates from humans and
306 sand flies were identical. Moreover, identical parasites were iso-
307 lated from *P. tobbi* females in the Eastern part and Western parts
308 of the study area. Our findings suggest that both parts of study
309 area, despite being up to 65 km apart, represent one focus with
310 the same circulating parasite. Phylogenetic analysis based on MLST
311 showed that this *L. infantum* strain is unambiguously distinct from
312 the MON-1 zymodeme as well as from a viscerotropic isolate of
313 *L. infantum* from South-East Turkey. Among accessible isolates
314 typed using the MLST method, our strain is close to MON-188,
315 the *L. infantum* strain isolated by Gramiccia (Pratlong et al., 2003)
316 in Sicily from an HIV-positive patient with visceral leishmaniasis.

Phlebotomus (Larrousius) tobbi was clearly shown to be a vector
318 of CL in the Cukurova focus. Prevalence of infected females was al-
319 most 1.5%; out of 898 dissected *P. tobbi* females 13 were positive
320 for *L. infantum* promastigotes. The relatively high *L. infantum*
321

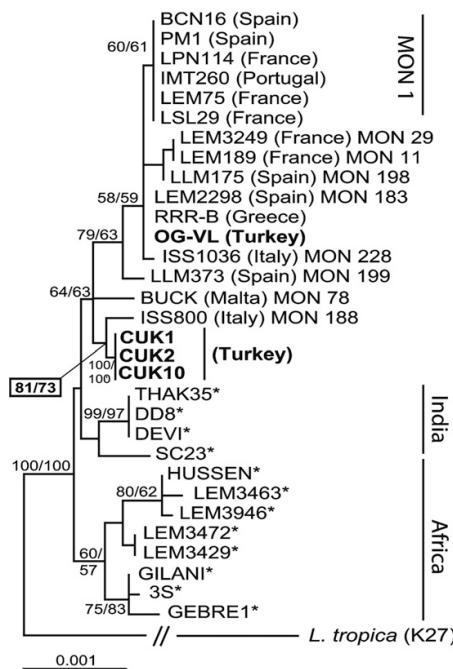


Fig. 4. Phylogenetic analysis of available strains belonging to the *Leishmania donovani* complex based on sequences of the *me*, *mpi*, *g6pdh*, *icd* and *fh* genes. The maximum likelihood (ML) tree (GTR model) was constructed from a concatenated dataset (7614 characters, 161 parsimony-informative) of 32 strains. Numbers above branches represent bootstrap support (ML/maximum parsimony). Strains considered to be *L. donovani sensu stricto* are marked by *. Strains in bold were sequenced by us.

prevalence in *P. tobbi* coincides with widespread human infection throughout the region.

We have found quantitative and qualitative differences in the phlebotomine fauna in both studied sites of the current focus. Although the sites are less than 65 km apart, *P. papatasi* and *P. perfiliewi* are absent in the Eastern part of the focus while *P. simici* is exclusively present here. General climatic conditions seem to be similar in both parts of the focus; however, local microclimatic differences probably occur. Differences in sand fly fauna composition in close *Leishmania* foci of CL including involvement of different vectors are known in other Mediterranean regions (Svobodová et al., 2006).

Despite the differences in phlebotomine fauna composition, *P. tobbi* is the most dominant species in both parts of the focus. Being a member of the *Larrousius* sub-genus, *P. tobbi* is a suspected vector of *L. infantum*. The only previous isolation of *L. infantum* from this species has been reported from Cyprus. However, human *L. infantum* is rare in Cyprus; only visceral cases are reported and the infected sand fly specimen was caught near an infected dog (Léger et al., 2000).

Blood-meal analysis assigned the close relationship of local *P. tobbi* populations with large ruminants, mainly with cattle. However, human blood was the second major blood source and 10% of females had fed on humans. In addition, human blood was detected in four females infected by *L. infantum*. We speculate that the population of *P. tobbi* in Çukurova region is more anthropophilic than populations from other areas. In Azerbaijan and Cyprus, *P. tobbi* were not attracted to humans (Gasanzade et al., 1990; Léger et al., 2000) and in Albania none of the blood-engorged *P. tobbi* females had fed on humans (Velo et al., 2005). The anthropophily of *P. tobbi* populations in the Cukurova region might be caused by local housing conditions, such as close cohabitation of humans with domestic animals and sleeping outdoors. Leishmaniasis caused by *L. infantum* is usually a zoonosis with dogs being reservoir hosts. Surprisingly, within our study we did not find any dog blood in engorged sand fly females, which corresponds with low numbers of dogs in both sites. Relatively high prevalence of CL in local people allows us to speculate about another transmission cycle and an anthroponotic cycle cannot be excluded.

Acknowledgments

We thank Y. Bayazit, M. Soyler, I. Bayar, M. Uluyurt, Z. Egri, Y. Sakalli for help during field work, J.-C. Dujardin for providing positive sera, and Richard Ward for helpful comments. The work was supported by the Czech Science Foundation (206/05/0380, 206/05/P045) and Czech Ministry of Education (MSM 0021620828, LC06009).

References

Akman, L., Aksu, H.S.Z., Wang, R.Q., Ozensoy, S., Ozbek, Y., Alkan, Z., Ozel, M.A., Culha, G., Ozcan, K., Uzun, S., Memisoglu, H.R., Chány, K.-P., 2000. Multi-site DNA polymorphism analyses of *Leishmania* isolates define their genotypes predicting clinical epidemiology of leishmaniasis in a specific region. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47, 545–554.

Chappuis, F., Rijal, S., Soto, A., Menten, J., Boelaert, M., 2006. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ*. doi:10.1136/bmj.38917.503056.7.

Corradetti, A., 1952. The epidemiology and control of oriental sore in Abruzzo, Italy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1, 618–622.

Depaquit, J., Ferté, H., Léger, N., Lefranc, F., Alves-Pires, C., Hanafi, H., Maroli, M., Morillas-Marques, F., Rioux, J.A., Svobodová, M., Volf, P., 2002. ITS2 sequences heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus similis* (Diptera, Psychodidae): Possible consequences in their ability to transmit *Leishmania tropica*. *Int. J. Parasit.* 32, 1123–1131.

El Tai, N.O., Osman, O.F., El Fari, M., Presber, W., Schönian, G., 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (its) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand

conformation polymorphisms (SSCP) and sequencing. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, 1–5.

Essegir, S., Ready, P.D., 2000. Speciation of *Phlebotomus* sandflies of the subgenus *Larrousius* coincided with the late Miocene-Pliocene aridification of the Mediterranean subregion. *Biol. J. Linn. Soc.* 70, 189–219.

Gasanzade, G.B., Safyanova, V.M., Tagi-zade, T.A., Agayev, A., Gadzikbekova, E.A., Savina, M.A., Alieva, K., Emelyanova, L.P., Shalmiyev, G.B., Faramazov, A.Z., 1990. The outbreak of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in the Geokchai district of Azerbaijan Medical Parasitology (Mosk). 2, 41–45. Russian.

del Giudice, P., Marty, P., Lacour, J.P., Perrin, C., Pralong, F., Haas, H., Dellamonica, P., Le Fichoux, Y., 1998. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. Case reports and literature review. *Arch. Dermat.* 134, 193–198.

Gramiccia, M., Gradoni, L., Pozio, E., 1987. *Leishmania infantum sensu lato* as an agent of cutaneous leishmaniasis in Abruzzi region (Italy). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 235–237.

Gramiccia, M., Ben-Ismaïl, R., Gradoni, L., Ben Rachid, M.S., Ben Said, M., 1991. A *Leishmania infantum* enzymatic variant, causative agent of cutaneous leishmaniasis in north Tunisia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85, 370–371.

Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C., 1983. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6196–6200.

Léger, N., Depaquit, J., Ferté, H., Rioux, J.A., Gantier, J.C., Gramiccia, M., Ludovisi, A., Michaelides, A., Christophi, N., Economides, P., 2000. Phlebotomine sandflies (Diptera-Psychodidae) of the isle of Cyprus. II – Isolation, typing of *Leishmania (Leishmania infantum) Nicolle, 1908* (zymodeme MON 1) from *Phlebotomus (Larrousius) tobbi* Adler and Theodor, 1930. *Parasite* 7, 143–146.

Malmqvist, B., Strasevicius, D., Hellgren, O., Adler, P.H., Bensch, S., 2004. Vertebrate host specificity of wild-caught blackflies revealed by mitochondrial DNA in blood. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 271, S152–S155.

Maroli, M., Gramiccia, M., Gradoni, L., 1987. Natural infection of sandfly *Phlebotomus perfiliewi* with *Leishmania infantum* in a cutaneous leishmaniasis focus of the Abruzzi region, Italy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 596–598.

Ok, U.Z., Balciodlu, I.C., Taylan Ozkan, A., Ozensoy, S., Ozbek, Y., 2002. Leishmaniasis in Turkey. *Acta Trop.* 84, 43–48.

Ozcel, M.A., Ozbek, Y., Ozensoy, S., Turgay, N., Daldal, N., Alkan, M.Z., 1999. The current status of leishmaniasis in Turkey. In: Matsumoto, Y. (Ed.), *Epidemiology and Control of Leishmaniasis in Central Eurasia*. Research Report Series No. 1. International Press Editing Centre Incorporation, Tokyo, pp. 27–30.

Pralong, F., Dereure, J., Deniau, M., Marty, P., Faraut-Gambarelli, F., Dedet, J.P., 2003. Enzymatic polymorphism during *Leishmania/HIV* co-infection: a study of 381 strains received between 1986 and 2000 at the international cryobank in Montpellier, France. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 97, 47–56.

Rioux, J.A., Lanotte, G., Maazoun, R., Perello, R., Pralong, F., 1980. *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, the agent of the autochthonous oriental sore. Apropos of the biochemical identification of 2 strains isolated in the eastern Pyrenees. *C.R. Seances Acad. Sci. D* 291, 701–703.

Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H.D.F.H., Presber, W., Jaffe, C., 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 47, 349–358.

Serin, M.S., Daglioglu, K., Bagirova, M., Allahverdiyev, A., Uzun, S., Vural, Z., Kayar, B., Tezcan, S., Yetkin, M., Aslan, G., Emekdas, G., Koksall, F., 2005. Rapid diagnosis and genotyping of *Leishmania* isolates from cutaneous and visceral leishmaniasis by microcapillary cultivation and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of minixon region. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 53, 209–214.

Simsek, F.M., Alten, B., Caglar, S.S., Ozbek, Y., Aytekin, A.M., Kaynas, S., Belen, A., Kasap, O.E., Yaman, M., Rastgeldi, S., 2007. Distribution and altitudinal structuring of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in southern Anatolia, Turkey: their relation to human cutaneous leishmaniasis. *J. Vector Ecol.* 32, 269–279.

Svobodová, M., Votýpka, J., Pecková, J., Dvořák, V., Nasereddin, A., Baneth, G., Sztern, J., Kravchenko, V., Orr, A., Meir, D., Schnur, L.F., Volf, P., Warburg, A., 2006. Distinct transmission cycles of *Leishmania tropica* in 2 adjacent foci, Northern Israel. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1860–1868.

Tanir, G., Taylan Ozkan, A., Dadlar, E., 2006. Pediatric visceral leishmaniasis in Turkey. *Pediatr. Int.* 48, 66–69.

Uzun, S., Uslular, C., Yücel, A., Acar, M.A., Ozpoyraz, M., Memiçođlu, H.R., 1999. Cutaneous leishmaniasis: evaluation of 3074 cases in the Cukurova region of Turkey. *Br. J. Dermatol.* 140, 347–350.

Velo, E., Papparisto, A., Bongiorno, G., Di Muccio, T., Khoury, C., Bino, S., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, M., 2005. Entomological and parasitological study on phlebotomine sand flies in central and northern Albania. *Parasite* 12, 45–49.

Volf, P., Ozbek, Y., Akkafa, F., Svobodová, M., Votýpka, J., Chang, K.P., 2000. Sand flies (Diptera: Phlebotominae) in Sanliurfa, Turkey: Relationship of *Phlebotomus sergenti* with the epidemic of anthroponotic cutaneous leishmaniasis. *J. Med. Entomol.* 39, 12–15.

Waki, K., Dutta, S., Ray, D., Kolli, B.K., Akman, L., Kawazu, S., Lin, C.P., Chang, K.P., 2007. Transmembrane molecules for phylogenetic analyses of pathogenic protists: *Leishmania*-specific informative sites in hydrophilic loops of trans-endoplasmic reticulum *N*-acetylglucosamine-1-phosphate transferase. *Eukaryot. Cell* 6, 198–210.

Zemanová, E., Jirků, M., Mauricio, I.L., Horák, A., Miles, M.A., Lukeš, J., 2007. The *Leishmania donovani* complex: genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. *Int. J. Parasitol.* 37, 149–160.

Q1

474

Please cite this article in press as: Svobodová, M. et al., Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted ..., *Int. J. Parasitol.* (2008), doi:10.1016/j.ijpara.2008.06.016

7.3 Abstrakt z Protozoologických dnů 2006

Svobodová M., Votýpka J., Zídková L., Hlavačková J., Belen A., Alten B., and Volf. P. Phlebotomine sand flies in an endemic focus of cutaneous leishmaniasis in Turkey: identification of the vector. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54: 20S, 2007.

Czech Section—International Society of Protistologists

36th Annual Meeting

24–28 April 2006

Sedlice u Blatne, Czech Republic

(44A–47A)

46A

Phlebotomine sand flies in an endemic focus of cutaneous leishmaniasis in Turkey: identification of the vector. M. SVOBODOVÁ,^a J. VOTÝPKA,^a L. ZÍDKOVÁ,^a J. HLAVAČKOVÁ,^a A. BELEN,^b B. ALTEN^b and P.VOLF^a. ^aDepartment of Parasitology, Charles University, 128 44 Prague, Czech Republic, ^bDepartment of Biology, Hacettepe University, Ankara, Turkey.

Sand flies (Diptera: Psychodidae) were investigated as possible vectors of cutaneous leishmaniasis (CL) in a focus near Adana, South-East Anatolia, Turkey. CDC light traps were placed in houses and animal shelters in endemic villages; of 551 females dissected and identified 77% were *Phlebotomus tobbi*, and 15% were *P. papatasi*. Other species (*P. cf neglectus*, *P. sergenti*, *P. perfiliewi*) each represented less than 1% of sand fly fauna. In males the relative composition of species was similar. Two dissected females of *P. tobbi* (0.4%) harboured promastigotes in their gut. Typing (ITS1-PCR-RFLP using HaeIII enzyme) revealed that both isolates are *Leishmania infantum*. Moreover, a strain isolated from a local patient with CL was identical with sand-fly isolates. *P. (Larroussius) tobbi* is thus considered as a vector of CL in this focus. To our knowledge, this is the first time that *L. infantum* was isolated in a CL focus from both, *P. tobbi* and human patient.

8 Citovaná literatura

- Ahmed S., Colmenares M., Soong L., Goldsmith-Pestana K., Munstermann L., Molina R., McMahon-Pratt D. Intra-dermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity* 71: 401 - 410, 2003.
- Akman L., Aksu H. S. Z., Wang R. Q., Ozensoy S., Ozbel Y., Alkan Z., Ozcel M. A., Culha G., Ozcan K., Uzun S., Memisoglu H. R., Chang K. P. Multi-site DNA polymorphism analyses of *Leishmania* isolates define their genotypes predicting clinical epidemiology of leishmaniasis in a specific region. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 47: 545 - 554, 2000.
- Alptekin D., Kasap M., Luleyap U., Kasap H., Aksoy S., Wilson M. L. Sandflies (Diptera: Psychodidae) associated with epidemic cutaneous leishmaniasis in Sanliurfa, Turkey. *Journal of Medical Entomology* 36: 277 - 281, 1999.
- Ashford R. W., Bettini S. Ecology and epidemiology: Old World. In: *The Leishmaniases in Biology and Medicine*, Peters W. a Killick-Kendrick R. (Eds.), *Academic Press*, London, 365 - 424, 1987.
- Aytekin S., Ertem M., Yağdiran O., Aytekin N. Clinico-epidemiologic study of cutaneous leishmaniasis in Diyarbakir Turkey. *Dermatology Online Journal* 12: 14, 2006.
- Butcher B. A., Turco S. J., Hilty B. A., Pimenta P. F., Panunzio M., Sacks D. L. Deficiency in beta1,3-galactosyltransferase of a *Leishmania major* lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania*-sand fly interaction. *The Journal of biological chemistry* 271: 20573 - 20579, 1996.
- Cabrera O. L., Munstermann L. E., Cárdenas R., Ferro C. PCR as a tool in confirming the experimental transmission of *Leishmania chagasi* to hamsters by *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud* 23: 239 – 244, 2003.
- Čiháková J., Volf P. Development of different *Leishmania major* strains in the vector sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 91: 267- 279, 1997.
- del Giudice P., Marty P., Lacour J. P., Perrin C., Pratlong F., Haas H., Dellamonica P., Le Fichoux Y. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. Case reports and literature review. *Archives of Dermatology* 134: 193 – 198, 1998.
- Depaquit J., Ferté H., Léger N., Lefranc F., Alves-Pires C., Hanafi H., Maroli M.,

- Morillas-Marquez F., Rioux J. A., Svobodová M., Volf P. ITS 2 sequences heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus similis* (Diptera, Psychodidae): possible consequences in their ability to transmit *Leishmania tropica*. *International Journal for Parasitology* 32: 1123 - 1131, 2002.
- Depaquit J., Léger N., Ferté H., Rioux J. A., Gantier J. C., Michaelides A., Economides P. Phlebotomine sandflies of Cyprus. III - Species inventory. *Parasite - Journal de la Societe Francaise de Parasitologie* 8: 11 - 20, 2001.
- Ertabaklar H., Oncu S., Ertug S. A new focus for cutaneous leishmaniasis in the West Coast of Turkey. *Tropical Doctor* 35: 189 - 189, 2005 a.
- Ertabaklar H., Toz S. O., Ozkan A. T., Rastgeldi S., Balcioglu I. C., Ozbel Y. Serological and entomological survey in a zoonotic visceral leishmaniasis focus of North Central Anatolia, Turkey: Corum province. *Acta Tropica* 93: 239 - 246, 2005 b.
- Garin Y. J., Sulahian A., Pratlong F., Meneceur P., Gangneux J. P., Prina E., Dedet J. P., Derouin F. Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. *Infection and Immunity* 69: 7365 - 7373, 2001.
- Goddard J. Flies (Biting) In: *Physician's Guide to Arthropods of Medical Importance*. Fifth Edition, *CRC Press*, Boca Raton, 169 - 189, 2007.
- Gramiccia M., Bettini S., Yasarol S. Isoenzyme characterization of *Leishmania* isolates from human cases of cutaneous leishmaniasis in Urfa, south-east Turkey. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78: 568 - 568, 1984.
- Gramiccia M., Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology* 35: 1169 - 1180, 2005.
- Guarga J. L., Lucientes J., Peribáñez M. A., Molina R., Gracia M. J., Castillo J. A. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Tropica* 77: 203 - 207, 2000.
- Gurel M. S., Ulukanligil M., Ozbilge H. Cutaneous leishmaniasis in Sanliurfa: epidemiologic and clinical features of the last four years (1997 - 2000). *International Journal of Dermatology* 41: 32 - 37, 2002.
- Jacobson R. L., Eisenberger C. L., Svobodová M., Baneth G., Sztern J., Carvalho J., Nasereddin A., El Fari M., Shalom U., Volf P., Votýpka J., Dedet J. P., Pratlong F., Schonian G., Schnur L. F., Jaffe C. L., Warburg A. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in northern Israel. *The Journal of Infectious Diseases* 188: 1065 - 1073, 2003.

- Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology* 22: 439 - 445, 2006.
- Kamhawi S., Modi G. B., Pimenta P. F. P., Rowton E., Sacks D. L. The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology* 121: 25 - 33, 2000.
- Kamhawi S., Ramalho-Ortigao M., Pham V. M., Kumar S., Lawyer P. G., Turco S. J., Barillas-Mury C., Sacks D. L., Valenzuela J. G. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* 119: 329-341, 2004.
- Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology* 17: 279 - 289, 1999.
- Knechtli R., Jenni L. Experimental transmission of *Leishmania infantum* by the bite of *Phlebotomus perniciosus* from Switzerland. *Acta Tropica* 47: 213 - 216, 1990.
- Kock N. P., Gabius H. J., Schmitz J., Schottelius J. Receptors for carbohydrate ligands including heparin on the cell surface of *Leishmania* and other trypanosomatids. *Tropical Medicine and International Health* 2: 863 - 874, 1997.
- Lane R. P. Sandflies (*Phlebotominae*). In: *Medical Insects and Arachnids*, Lane R. P., Crosskey R. W. (Eds.), *Chapman and Hall*, London, 78 – 119, 1993.
- Le Pont P. F., Bayazit Y., Konyar M., Demirhindi H. Cutaneous leishmaniasis in the urban area of Sanliurfa (Turkey). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 89: 274 - 275, 1996.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 - 685, 1970.
- Léger N., Depaquit J., Ferté H., Rioux J. A., Gantier J. C., Gramiccia M., Ludovisi A., Michaelides A., Christophi N., Economides P. Phlebotomine sandflies (Diptera- Psychodidae) of Cyprus. II - Isolation and typing of *Leishmania (Leishmania) infantum* Nicolle, 1908 (zymodeme MON 1) from *Phlebotomus (Larroussius) tobbi* Adler and Theodor, 1930. *Parasite - Journal de la Société Française de Parasitologie* 7: 143 - 146, 2000.
- Lewis D. J. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology Series* 45: 121 - 209, 1982.
- Lewis D. J., Ward R. D. Transmission and vectors. In: *The Leishmaniases in Biology and Medicine*, Peters W., Killick-Kendrick R. (Eds.), *Academic Press*, London,

- 235 – 262, 1987.
- Magill A. J., Grögl M., Gasser R. A., Sun W., Oster C. N. Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. *New England Journal of Medicine* 328: 1383 - 1387, 1993.
- Mary C., Faraut F., Lascombe L., Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *Journal Of Clinical Microbiology* 42: 5249 - 5255, 2004.
- Maurer M., Lopez Kostka S., Siebenhaar F., Moelle K., Metz M., Knop J., von Stebut E. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. *The FASEB Journal* 20: 2460 – 2467, 2006.
- Maurício I. L., Stothard J. R., Miles M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today* 16: 188 - 189, 2000.
- Mehlhorn H. (Ed.). Encyclopedic Reference of Parasitology: Biology, Structure, Function. Second Edition. *Springer*, Berlin, 2001.
- Molina R., Amela C., Nieto J., San-Andrés M., González F., Castillo J. A., Lucientes J., Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 88: 491 - 493, 1994.
- Mukhopadhyay N. K., Shome K., Saha A. K., Hassell J. R., Glew R. H. Heparin binds to *Leishmania donovani* promastigotes and inhibits protein phosphorylation. *The Biochemical Journal*. 264: 517-525, 1989.
- Myšková J, Svobodová M., Beverley S. M., Volf P. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes and Infection* 9: 317 - 324, 2007.
- Ok Ü. Z., Balcioglu I. C., Taylan Özkan A., Özensoy S., Özbel Y. Leishmaniasis in Turkey. *Acta Tropica* 84: 43 - 48, 2002.
- Özbel Y., Turgay N., Özensoy S., Özbilgin A., Alkan M. Z., Özcel M. A., Jaffe C. L., Schnur L., Oskam L., Abranches P. Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediterranean region. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 89: 89 - 93, 1995.
- Özcel M. A., Özbel Y., Özensoy S., Turgay N., Daldal N., Alkan M. Z. The Current Status of Leishmaniasis in Turkey. In: *Epidemiology and Control of Leishmaniasis in Central Eurasia*, Matsumoto Y. (Ed.), *International Press Editing Centre Incorporation*, Tokyo, 27 - 30, 1999.

- Ozensoy S., Ozbel Y., Turgay N., Alkan M. Z., Gul K., Gilman-Sachs A., Chang K. P., Reed S. G., Ozcel M. A. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59: 363 - 369, 1998.
- Perfiljev P. P. Moskity (Semjejtvo Phlebotomidae). In: *Fauna SSSR - Nasekomye dvuchkrylye*, 85 - 321, 1966.
- Pimenta P. F. P., Saraiva E. M. B., Rowton E., Modi G. B., Garraway L. A., Beverley S. M., Turco S. J., Sacks D. L. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 9155 - 9159, 1994.
- Pimenta P. F. P., Turco S. J., Mcconville M. J., Lawyer P. G., Perkins P. V., Sacks D. L. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* 256: 1812 - 1815, 1992.
- Pozio E., Maroli M., Gradoni L., Gramiccia M. Laboratory transmission of *Leishmania infantum* to *Rattus Rattus* by the bite of experimentally infected *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 79: 524 - 526, 1985.
- Prianti M. G., Yokoo M., Saldanha L. C. B., Costa F. A. L., Goto H. *Leishmania (Leishmania) chagasi*-infected mice as a model for the study of glomerular lesions in visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 40: 819 - 823, 2007.
- Rogers M. E., Chance M. L., Bates P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 124: 495 - 507, 2002.
- Rogers M. E., Ilg T., Nikolaev A. V., Ferguson M. A. J., Bates P. A. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430: 463 - 467, 2004.
- Rutledge L. C., Gupta R. K. Moth Flies and Sand Flies (*Psychodidae*). In: *Medical and Veterinary Entomology*, Mullen G., Durden L. (Eds.), *Academic Press*, London, 147 - 161, 2002.
- Sádlová J. The life history of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae* 63: 331 - 366, 1999.
- Sádlová J., Hajmová M., Volf P. *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* vector competence

- for *Leishmania major* and *Le. tropica*. *Medical and Veterinary Entomology* 17: 244 - 250, 2003.
- Sádlová J., Svobodová M., Volf P. *Leishmania major*: effect of repeated passages through sandfly vectors or murine hosts. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 93: 599 - 611, 1999.
- Savk E., Sendur N., Karaman G. Cutaneous leishmaniasis in Aydin, Turkey. *International Journal of Dermatology* 38: 949 - 950, 1999.
- Serin M. S., Daglioglu K., Bagirova M., Allahverdiyev A., Uzun S., Vural Z., Kayar B., Tezcan S., Yetkin M., Aslan G., Emekdas G., Koksall F. Rapid diagnosis and genotyping of *Leishmania* isolates from cutaneous and visceral leishmaniasis by microcapillary cultivation and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of miniexon region. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 53: 209 - 214, 2005.
- Schönian G., Nasereddin A., Dinse N., Schweynoch C., Schallig H. D., Presber W., Jaffe C. L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 47: 349 - 358, 2003.
- Simsek F. M., Alten B., Caglar S. S., Ozbel Y., Aytekin A. M., Kaynas S., Belen A., Kasap O. E., Yaman M., Rastgeldi S. Distribution and altitudinal structuring of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in southern Anatolia, Turkey: their relation to human cutaneous leishmaniasis. *Journal of Vector Ecology* 32: 269 - 279, 2007.
- Soares R. P. P., Barron T., McCoy-Simandle K., Svobodová M., Warburg A., Turco S. J. *Leishmania tropica*: intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different *Phlebotomus* species. *Experimental Parasitology* 107: 105 - 114, 2004.
- Soares R. P. P., Turco S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 75: 301 - 330, 2003.
- Stierhof Y. D., Bates P. A., Jacobson R. L., Rogers M. E., Schlein Y., Handman E., Ilg T. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *European Journal of Cell Biology* 78: 675 - 689, 1999.
- Sulahian A., Garin Y. J., Pratlong F., Dedet J. P., Derouin F. Experimental pathogenicity of viscerotropic and dermatropic isolates of *Leishmania infantum*

- from immunocompromised and immunocompetent patients in a murine model. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 17: 131 - 138, 1997.
- Svobodová M., Alten B., Zídková L., Dvořák V., Hlavačková J., Myšková J., Šeblová V., Kasap O. E., Belen A., Votýpka J., Volf P. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* and transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *International Journal for Parasitology*, in press 2008.
- Svobodová M., Capo C., Mege J. M. A biological role for haemagglutination activity of *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Parasite - Journal de la Societe Francaise de Parasitologie* 4: 245 - 251, 1997.
- Svobodová M., Sádlová J., Chang K. P., Volf P. Short report: Distribution and feeding preference of the sand flies *Phlebotomus sergenti* and *P. papatasi* in a cutaneous leishmaniasis focus in Sanliurfa, Turkey. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68: 6 - 9, 2003.
- Svobodová M., Votýpka J. Experimental transmission of *Leishmania tropica* to hamsters and mice by the bite of *Phlebotomus sergenti*. *Microbes and Infection* 5: 471 - 474, 2003.
- Svobodová M., Votýpka J., Pecková J., Dvořák V., Nasereddin A., Baneth G., Sztern J., Kravchenko V., Orr A., Meir D., Schnur L. F., Volf P., Warburg A. Distinct transmission cycles of *Leishmania tropica* in 2 adjacent foci, northern Israel. *Emerging Infectious Diseases* 12: 1860 - 1868, 2006.
- Tanir G., Taylan Özkan A., Dağlar E. Pediatric visceral Leishmaniasis in Turkey. *Pediatrics International* 48: 66 - 69, 2006.
- Toprak S., Ozer N. Sand fly species of Sanliurfa province in Turkey. *Medical and Veterinary Entomology* 19: 107 - 110, 2005.
- Uzun S., Durdu M., Culha G., Allahverdiyev A. M., Memisoglu H. R. Clinical features, epidemiology, and efficacy and safety of intralesional antimony treatment of cutaneous leishmaniasis: recent experience in Turkey. *Journal of Parasitology* 90: 853 - 859, 2004.
- Uzun S., Uslular C., Yücel A., Acar M. A., Özpoyraz M., Memişoğlu H. R.. Cutaneous leishmaniasis: evaluation of 3074 cases in the Cukurova region of Turkey. *British Journal of Dermatology* 140: 347 - 350, 1999.
- Vokurka M., Hugo J. a kolektiv. Velký lékařský slovník. 3. vydání. *Maxdorf – Jessenius*, Praha, 2003.
- Volf P., Ozbel Y., Akkafa F., Svobodová M., Votýpka J., Chang K. P. Sand flies (Diptera:

- Phlebotominae) in Sanliurfa, Turkey: Relationship of *Phlebotomus sergenti* with the epidemic of anthroponotic cutaneous leishmaniasis. *Journal of Medical Entomology* 39: 12 - 15, 2002.
- Warburg A., Saraiva E., Lanzaro G. C., Titus R. G., Neva F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 345: 223 - 230, 1994.
- Warburg A., Tesh R. B., McMahon-Pratt D. Studies on the attachment of *Leishmania* flagella to sand fly midgut epithelium. *The Journal of Protozoology* 36: 613 - 617, 1989.
- Weber A., Knop J., Maurer M. Pattern analysis of human cutaneous mast cell populations by total body surface mapping. *The British Journal of Dermatology* 148: 224 - 228, 2003.
- Yaman M., Dik B. An inventory of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) found in the Turkish province of Konya. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 100: 265 - 275, 2006.
- Yaman M., Özbel Y. The sandflies (Diptera: Psychodidae) in the Turkish province of Hatay: some possible vectors of the parasites causing human cutaneous leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 98: 741 - 750, 2004.
- Zeyrek F. Y., Korkmaz M., Özbel Y. Serodiagnosis of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* in Sanliurfa Province, Turkey, where ACL is highly endemic. *Clinical and Vaccine Immunology* 14: 1409 - 1415, 2007.