

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Barbora Vojtková

Xenodiagnostika a její využití při studiu leishmanióz
Xenodiagnosis and its use in leishmaniasis research

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. RNDr. Petr Volf, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení

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

V Praze, 14. 9. 2014

Podpis

Poděkování:

Mé poděkování patří hlavně prof. RNDr. Petru Volfovi, CSc. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Jovaně Sádlové, Ph.D. a RNDr. Veronice Šeblové-Hrobárikové, Ph.D., které mě seznámily s pokusy používající xenodiagnostiku.

ABSTRAKT

Cílem bakalářské práce bylo vytvořit literární rešerši shrnující možnosti využití xenodiagnostických metod v minulosti a v současném parazitologickém výzkumu. Xenodiagnostika je diagnostická metoda používající krevsajícího členovce (přenašeče) jako biologické médium pro detekci parazita v krvi vyšetřovaného jedince. Využívá skutečnosti, že parazit se ve střevě přenašeče pomnoží a je snáze detekovatelný mikroskopicky. Tato metoda byla poprvé použita roku 1914 francouzským badatelem Emilé Brumptem pro detekci parazita *Trypanosoma cruzi*, který je původcem Chagasovy nemoci. Postupem času se stala jednou z nejučinnějších a nejefektivnějších metod i díky tomu, že se jí začalo zabývat více vědeckých skupin. Byly například stanoveny vhodné druhy přenašečů, délka trvání pokusu, optimální počet přenašečů na jedno vyšetření nebo počet pokusů potřebných pro získání spolehlivého výsledku. Po zavedení molekulárních metod, především polymerázové řetězové reakce, se význam xenodiagnostiky jako diagnostické metody snížil. V současnosti lze však xenodiagnostiku využít především pro zjištění, zda je hostitel infekční pro přenašeče. Tato metoda se tak jeví jako dobrý nástroj pro testování nových rezervoárových hostitelů a pro sledování role různých živočichů v koloběhu onemocnění, která jsou přenášena členovci. Proto byla opakovaně použita při studiu leishmaniózy u domácích zvířat, především u psů nakažených *infantum/chagasi*, ale i u volně žijících zvířat podezřelých z přenosu různých druhů leishmanií v endemických oblastech (zajíci, králíci, krysy a damani nakažení *L. infantum* nebo *L. tropica*).

Klíčová slova: xenodiagnostika, leishmanióza, Chagasova choroba, rezervoárový hostitel *Leishmania infantum*

ABSTRACT

The aim of these theses was to summarize the knowledge about the use of xenodiagnostic methods in the past and their current potential for parasitological research. Xenodiagnosis is a diagnostic method using bloodsucking arthropods (disease vectors) as a biologic medium suitable for detection of parasites in the blood of investigated individuals (vertebrates). It is expected that parasites grow within the midgut of the vector and then are easily detectable microscopically. The method was used for the first time in 1914 by French researcher Émile Bumpt for detection of *Trypanosoma cruzi*, causative agent of Chagas' disease. During few decades and thanks to engagement of many scientific groups, it became one of the most efficient and effective diagnostic methods. For instance, the most suitable species of vectors, the experiment duration and the optimal numbers of vectors and/or experiments were assigned to get reliable results. Xenodiagnosis as a diagnostic method lost its importance after introduction of molecular methods, first of all after onset of polymerase chain reaction. At present, however, the xenodiagnosis is suitable for experiments studying if the host is infectious for the vector. This method appears as a good tool for testing of new reservoir hosts and for the monitoring of the role of various animals in circulation of vector-borne diseases. Therefore, it was repeatedly used in studies on leishmaniasis of domestic animals, particularly dogs infected by *Leishmania infantum/chagasi*, as well as of free living animals which are suspected as reservoirs of various *Leishmania* species in endemic regions (hares, rabbits, rats and hyraxes infected by *L. infantum* or *L. tropica*).

Keywords: Xenodiagnosis, leishmaniasis, Chagas' disease, reservoir host, *Leishmania infantum*

OBSAH:

1	ÚVOD	2
2	XENODIAGNOSTIKA A JEJÍ TYPY	3
3	PŘÍKLADY VYUŽITÍ XENODIAGNOSTIKY V MINULOSTI.....	4
4	XENODIAGNOSTIKA A JEJÍ SOUČASNÉ VYUŽITÍ PŘI STUDIU LEISHMANIÓZ....	7
4.1	Typy leishmanióz z hlediska přenosu	8
4.2	Definice rezervoárového hostitele.....	11
4.3	Použití xenodiagnostiky k průkazu rezervoárových hostitelů <i>Leishmania infantum</i>	12
5	ZÁVĚR	18
6	SEZNAM ZKRATEK.....	19
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	20

1 ÚVOD

Téma své bakalářské práce jsem si vybrala díky tomu, že v laboratoři prof. Petra Volfa právě probíhají pokusy využívající xenodiagnostické metody.

První z pokusů, kterých jsem se mohla zúčastnit, se snaží vysledovat vývoj infekce různých kmenů leishmanií z komplexu *Leishmania enrietti* LV90 v laboratorních zvířatech. U těchto leishmanií není znám přenašeč, uvažuje se jak o flebotomech (Diptera: *Phlebotominae*), tak o tiplících (Diptera: *Ceratopogonidae*). Z tohoto důvodu se nechávají sít flebotomové rodu *Phlebotomus* a tiplíci rodu *Culicoides* na zlatých křečcích (*Mesocricetus auratus*) a morčatech (*Cavia aperea porcellus*) experimentálně nakažených různými kmeny z komplexu *L. enrietti*. Cílem pokusu je též prokázat, zda tato laboratorní zvířata mohou sloužit jako zdroj nákazy pro flebotomy a tiplíky.

Ve druhém pokusu, kterého jsem se zúčastnila, byly použity dva experimentální modely myší Balb/c infikovaných druhem *Leishmania donovani* a *L. major*. Bylo zkoumáno, zda se na těchto infikovaných myších nakazí přirození přenašeči, *Phlebotomus orientalis*, respektive *Phlebotomus duboscqi*. Studie by měla především objasnit roli asymptomatických hlodavců v epidemiologii *L. donovani*. V průběhu několika týdnů proběhly xenodiagnostické pokusy (2. – 15. týden po infekci), kdy samice *P. orientalis* a *P. duboscqi* sály na infikovaných myších. Tyto samice byly po několika dnech vypitvány a obsah jejich střev byl mikroskopicky vyšetřen na přítomnost *L. donovani* nebo *L. major*. Prozatimní výsledky napovídají, že infekční pro přenašeče jsou jak symptomatické myši nakažené *L. major*, tak i asymptomatické myši nakažené *L. donovani*.

Cílem předložené bakalářské práce je proto shrnutí existujících znalostí o:

- 1. použití xenodiagnostických metod v minulosti**
- 2. možnostech využití těchto metod v současném studiu leishmaniózy**

2 XENODIAGNOSTIKA A JEJÍ TYPY

Pojem xenodiagnostika jako první použil roku 1914 francouzský badatel Emilé Brumpt v souvislosti s Chagasovou nemocí. Jedná se o diagnostickou metodu používající přenašeče jako biologické médium pro detekci parazita v krvi vyšetřovaného savčího jedince (Schenone 1999). Přenašečem se v tomto případě míní nenakažený členovci chovaní v laboratoři. V případě detekce Chagasovy nemoci se jedná o nymfy krevsajících ploštic, naopak mluvíme-li o detekci leishmaniózy, jako přenašeči se používají samice rodů *Phlebotomus* nebo *Lutzomyia* (Schenone 1999; Guarga et al. 2000).

Rozlišujeme dva základní typy xenodiagnostiky, přímou a nepřímou. Hlavním rozdílem mezi těmito dvěma typy je, že při přímé XD se vektorů přikládají přímo na kůži vyšetřovaného jedince, kde sají krev (Schenone 1999). Naopak při nepřímé XD se vyšetřovanému jedinci odebere určité množství periferní krve (cca 1,5 ml u člověka), ta se heparinizuje a udržuje při nízké teplotě do doby zpracování. Touto krví se krmí nenakažení přenašeči. Sání členovců probíhá přes membránu, kterou nejčastěji představuje kůže kuřat (Alvar et al. 1997).

Původnějším typem diagnostické metody je přímá XD. Velkou nevýhodou však je kožní alergická reakce, která je vyvolaná bodnutím přenašeče. Tato reakce může být různě závažná. Koreluje především se sensibilizací jedince, pohlavím i stářím. Na základě tohoto zjištění byla vytvořena nepřímá xenodiagnostika (Mott 1980).

Nepřímá XD byla hojně využívána pro detekci leishmaniózy u HIV-pozitivních pacientů, kde sérologické vyšetření není účinné, protože HIV-pozitivní pacienti nevytváří dostatečné množství protilátek proti parazitovi (Molina et al. 1994). Výsledná diagnóza se proto stanovovala na základě většího množství výsledků z různých diagnostických metod, aby výsledek odpovídal co nejvíce skutečnosti (Alvar et al. 1997). Mezi výhody nepřímé xenodiagnostiky patří fakt, že je možné ji použít pro vyšetření *post mortem* (Schenone 1999) nebo, že odebranou krví je možné použít až se čtyřhodinovým odstupem bez snížení účinnosti (Castro et al. 2004).

Xenodiagnostická metoda se hojně používala v minulém století, nejčastěji v souvislosti s Chagasovou nemocí. Jako přenašeči se používaly nymfy krevsajících ploštic, které se po určité době vyšetřovaly na přítomnost trypanostigotních stádií *Trypanosoma cruzi*, které jsou původcem Chagasovy nemoci u savců. Největší význam dosáhla XD ve 30. letech minulého století, kdy se stala hlavním nástrojem pro průkaz parazita v pacientovi (Schenone 1999).

V této době ještě neexistovala možnost prokázat přítomnost parazita pomocí metody PCR. Polymerázová řetězová reakce (PCR), vyvinutá v roce 1983 Karymem Mullisem, je dnes běžnou, relativně lacinou a velmi citlivou metodou, která se používá v lékařských a biologických výzkumných laboratořích pro celou řadu aplikací. Vzhledem k tomu se význam xenodiagnostiky jako diagnostické metody snížil. V dnešní době můžeme tuto metodu využít k jinému účelu, konkrétně k průkazu toho, zda je hostitel infekční pro přenašeče (Volf, osobní sdělení).

3 PŘÍKLADY VYUŽITÍ XENODIAGNOSTIKY V MINULOSTI

V minulosti prošla xenodiagnostika velkým vývojem díky tomu, že se touto problematikou začalo zabývat více vědeckých skupin. Vycházely studie zaměřené na několik důležitých aspektů, které měly zlepšit a hlavně zefektivnit xenodiagnostickou metodu (Dias 1940; Mott 1980; Perlowagora-Szumlewicz a Muller 1982; Bronfen et al 1984; Schenone 1999). Patří mezi ně studie zabývající se počtem nymf potřebných na jedno vyšetření, počtem vyšetření a intervalem mezi nimi, hledáním nejvhodnějšího druhu přenašeče nebo studie srovnávací přímou a nepřímou xenodiagnostiku. Cílem bylo dostat dostatečně průkazný výsledek a zároveň ochránit pacienta před nadměrně stresovou situací nebo alergickou reakcí vzniklou po pobodání hmyzem.

Mezi takové studie patří např. studie Huga Schenona, který popisuje složení XD pokusu takto: zařízení pro detekci *T. cruzi*, původce Chagasovy choroby, se skládá z dřevěné nebo plastové nádobky obsahující 7 - 10 nenakažených nymf třetího instaru ploštic. Na jedné straně je nádobka uzavřena pouze monofylem, aby nymfy mohly pohodlně sát krev na kůži vyšetřovaného jedince. Sají po dobu 20 - 30 minut. Nádobka je většinou umístěna na horní končetině pacienta. Po době potřebné pro inkubaci parazita ve střevě vektora (cca 30 dní) se obsah střeva mikroskopicky vyšetří na přítomnost trypomastigótních stádií *T. cruzi*. Obsah střeva je možné získat různými technikami – kompresí zadečku, pitvou přenašeče, rozdrcením a homogenizací střeva nebo celého hmyzu (Schenone 1999).

K. E. Mott ve své studii (Mott 1980) popisuje kožní alergickou reakci vzniklou po sání *Triatoma infestans* na hostiteli během přímé xenodiagnostiky. Kopřivka je závažnější u dětí a starších lidí a u žen více než u mužů. Intenzivnější alergickou reakci měli lidé po přímé XD používající *Triatoma infestans*, pokud s ní nepřišli předtím do styku. Podobnou reakci vyvolala i přímá XD používající 2 druhy krevsajících ploštic – *T. infestans* a *Panstrongylus*

megistus. Z toho vyplývá, že přímá XD používající nejméně 2 druhy krevsajících ploštic může být spolehlivější pro detekci parazita v hostiteli (Bronfen et al. 1989), na druhé straně, tato metoda má horší vedlejší účinky v podobě kožní alergické reakce (Mott 1980). Studie Y. Bandeira (2002) pak popsala zlepšení sensitivity nepřímé XD, použité při detekci parazita *T. cruzi* v lidských pacientech s chronickou Chagasovou chorobou tím, že použila větší množství krve (místo 10 ml 40ml) a více instarů krevsajících ploštic (místo 60, 360 jedinců *Dipetalogaster maximus*, *Rhodnius neglectus*, *Triatoma infestans* a *Triatoma vitticeps*).

U psů experimentálně nakažených *Leishmania infantum* vědci studovali (Guarga et al. 2000) možnost využití nepřímé XD. Došli k závěru, že nepřímá XD není vhodný nástroj pro detekci *L. infantum*. Hlavním důvodem by mohl být fakt, že psi či lidé nakažení *L. infantum* nebo *L. chagasi* mají omezené množství amastogotních stádií v periferní krvi (Vexenat et al. 1994) a proto v odebrané krvi nemusí být dostatečné množství parazitů, aby došlo k přenosu infekce na přenašeče. Nepřímá XD se neukázala ani jako dobrý ukazatel průběhu onemocnění psí leishmaniózy. V případě přímé XD výsledky lépe korelují s výsledky ostatních metod; srovnání výsledků přímé a nepřímé xenodiagnostiky je shrnuto v tabulce 1.

Na rozdíl od dříve zmíněných autorů popsali Alvar et al. (1997) u pacientů koinfikovaných *L. infantum* – HIV masivní nárůst parazitémie v průběhu onemocnění. Autoři detekovali leishmanie pomocí nepřímé XD používající *Phlebotomus perniciosus* a došli k závěru, že tato metoda je jednou z tehdy nejúčinnějších, neboť mikroskopické či kultivační vyšetření kostní dřeně je sice účinné, ale pro pacienty velice invazivní a bolestivé.

Při studiu Chagasovy choroby se řada experimentů zaměřila na hledání nejvhodnějšího druhu přenašeče. Na XD bylo použito nespočet různých druhů krevsajících ploštic. Ideálním vektorem pro XD vyšetření jsou podle Mintera (1978) epidemiologicky významní přenašeči vyskytující se ve stejné oblasti, ve které žije vyšetřovaný jedinec. Proti této hypotéze se staví Perlowagora-Szumlewicz a Muller (1987), kteří popisují řadu druhů krevsajících ploštic, které označují jako úspěšné xenodiagnostické druhy pro testování jedinců s chronickou infekcí vyvolanou Y kmenem *Trypanosoma cruzi*. Podle úspěšnosti seřadili druhy ploštic následovně: *Panstrongylus megistus*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma rubrovaria* a *Rhodnius neglectus*. Podle autorů se použitím těchto druhů stane XD spolehlivější a efektivnější a může tak konkurovat dalším metodám jako je například PCR.

Tabulka 1: Sání a hodnota infekce samic *P. perniciosus* při přímé a nepřímé xenodiagnostice

	Pes	Plemeno	Přímá xenodiagnostika			Nepřímá xenodiagnostika		
			LF	FF%	IF%	LF	FF%	IF%
Asymptomatictí psi	Č. 1	Pyrenean mastiff	55	67,3	0	61	1,6	0
	Č. 2	Cocker Spainel	45	88,9	12,5	25	68,0	0
	Č. 3	Mongrel	53	90,6	79,2	41	85,4	11,4
Oligosymptomatictí psi	Č. 4	German shepherd	27	62,9	70,6	NT	NT	NT
	Č. 5	Pyrenean mastiff	72	97,2	18,6	56	21,4	8,3
	Č. 6	German shepherd	62	88,7	43,6	20	50,0	0
	Č. 7	Beagle	53	98,1	65,4	44	47,7	0
Polysymptomatictí psi	Č. 8	Great Dane	15	73,3	63,6	47	6,4	66,7
	Č. 9	Mongrel	34	100	8,8	31	48,4	0
	Č.10	German shepherd	40	82,5	39,4	13	38,5	0
	Č.11	German shepherd	52	73,1	73,7	37	81,1	0
	Č.12	Husky	38	39,5	46,7	21	47,6	0

NT = netestováno, LF = počet žijících samic, FF% = procento nasátých samic vztahených na počet LF, IF% = procento nakažených samic vztahených na počet FF

Převzato a upraveno z (Guarga et al. 2000).

Bronfen (1989) navrhla současné použití nejméně 2 druhů krevsajících ploštic. To potvrzuje i další studie (Moreira a Perlowagora-Szumlewicz 1997), která popisuje signifikantní rozdíly mezi pozitivními xenodiagnózami používající *P. megistus* nebo *T. infestans* (10,73 % versus 0,98 %). Pokud se pro xenodiagnostiku použili oba druhy současně (*P. megistus* a *P. vitticeps*), pozitivní výsledky byly výrazně vyšší (32,25 %) než pozitivní výsledky získané při samostatném použití jednoho z nich (například *T. vitticeps* - 5,88 %).

Účinnost xenodiagnostického vyšetření lze zvýšit i použitím většího počtu krevsajících ploštic na jedno xenodiagnostické vyšetření nebo opakovaným vyšetřením (Schenone 1999; Dias 1940). Perlowagora-Szumlewicz a Muller (1987, 1982) popisují takzvané „poinfekční doplňkové sání“, které až třikrát snižuje pravděpodobnost chybného negativního výsledku.

4 XENODIAGNOSTIKA A JEJÍ SOUČASNÉ VYUŽITÍ PŘI STUDIU LEISHMANIÓZ

V dnešní době nám xenodiagnostika poskytuje důležitá data týkající se potenciální schopnosti nakaženého jedince přenášet onemocnění.

Pro xenodiagnostické vyšetření se při studiu leishmanióz obvykle používají druhy, které se vyskytují v endemické oblasti, lze je chovat v laboratoři a které jsou náchylné pro daný druh leishmanie. Například pro druh *L. infantum*, vyskytující se ve středomoří, se používá nejčastěji *Phlebotomus perniciosus*, který je v této oblasti hlavním vektorem (Bongiorno et al. 2013; Guarga et al. 2000; Molina et al. 1994; WHO 2010). Naopak brazilské studie zaměřené na *L. infantum* používají jako přenašeče *Lutzomyia longipalpis* (Laurenti et al. 2013; Vexenat et al. 1994).

V xenodiagnostických experimentech, které prokázaly, že damani (*Procavia capensis*) mohou být rezervoárem *L. tropica* byl jako přenašeč použit *Phlebotomus arabicus*, který je druhem flebotoma typickým pro studované ohnisko *L. tropica* v Izraeli (Svobodová et al. 2006). Další studie Svobodové et al. (Svobodová et al. 2003) využila xenodiagnostiku k průkazu přenosu *L. tropica* z asymptomatických krys (*Rattus rattus*) na *P. sergenti*.

Nejčastěji byla xenodiagnostika použita při studiu rezervoárů *L. infantum*. Proto tomuto tématu věnuji samostatnou kapitolu 4.3.

4.1 Typy leishmanióz z hlediska přenosu

Leishmanióza se vyskytuje převážně v oblasti subtropického a tropického pásu. Největší dopad má toto onemocnění v rozvojových zemích. Uvádí se, že přibližně 350 milionů lidí je leishmaniózou ohroženo a více jak 2 miliony z nich se nově nakazí každý rok (WHO 2010). Leishmaniózu vyvolávají parazité z rodu *Leishmania*, kteří kolují mezi obratlovci a přenašeči (obr. 1.). Tento rod obsahuje velké množství morfologicky nerozlišitelných druhů (nebo komplexů druhů). Druhy lze rozlišit jen pomocí biochemických či molekulárních technik.

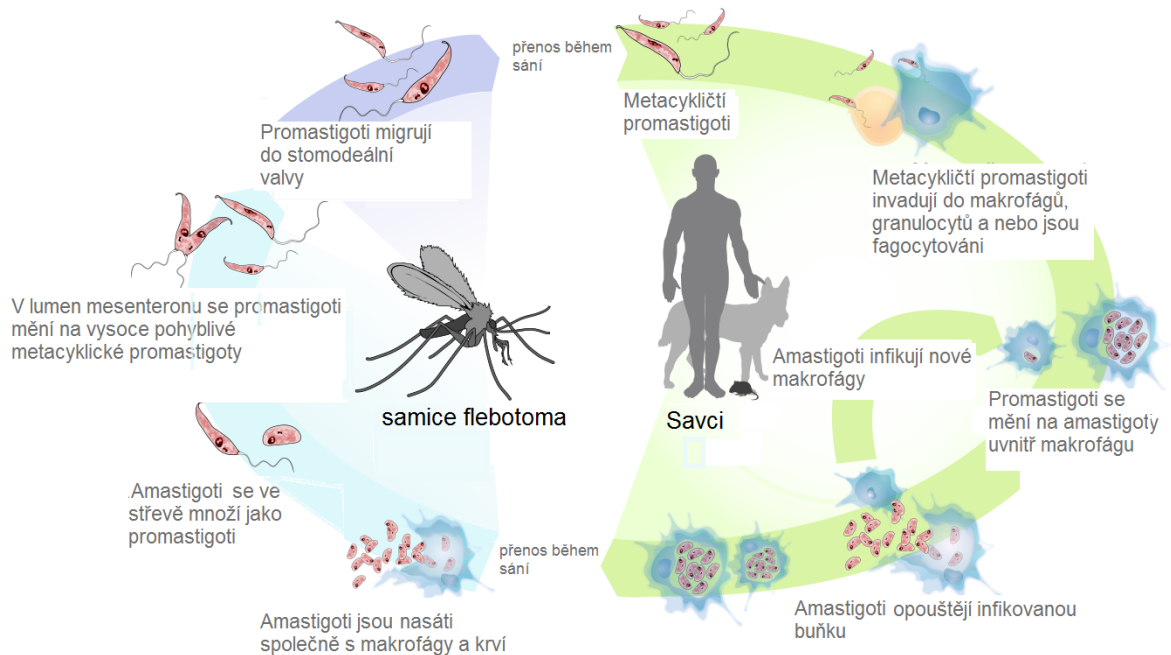
Podle klinického projevu rozlišujeme 3 základní typy leishmanióz. Příznaky infekce prvotně pozorujeme na kůži, a pokud zde infekce zůstane lokalizovaná po celou dobu onemocnění, mluvíme o takzvané kožní leishmanióze, způsobené například infekcí *L. tropica*, *L. major* nebo *L. brazilliensis*. Pokud infekce zasáhne i sliznici, jedná se o muko-kutánní leishmaniózu, nejčastěji způsobenou *L. braziliensis* v Jižní Americe. Nejvíce invazivním projevem tohoto onemocnění je viscerální neboli útrobní leishmanióza, která invaduje do vnitřních orgánů. Napadá především mízní uzliny, slezinu, játra a kostní dřeň. Tento typ onemocnění je vyvolán infekcí parazitem z komplexu *L. donovani*. Jaký typ se u nakaženého jedince projeví je dán hlavně vlastnostmi parazita, imunitním systémem hostitele a jeho genetickou výbavou. U celé řady živočichů je známo, že nedochází k žádnému projevu onemocnění, i když v jejich těle nacházíme infekční parazitická stádia. O takových jedincích říkáme, že mají asymptomatický, neboli bezpříznakový, průběh onemocnění (Quinnell a Courtenay 2009; Jacobson 2003; Reithinger et al. 2007).

Z hlediska využití xenodiagnostiky při studiu leishmanióz nás však více zajímá rozdělení leishmanióz z hlediska přenosu v různých endemických oblastech.

Podle tohoto kritéria rozeznáváme 2 základní formy onemocnění (obr. 2):

- Zoonotickou leishmaniózu, kde rezervoárovým hostitelem jsou divoká nebo domestikovaná zvířata
- Antroponotickou leishmaniózu, kde onemocnění koluje pouze mezi lidmi.

Obrázek 1: Životní cyklus rodu *Leishmania*

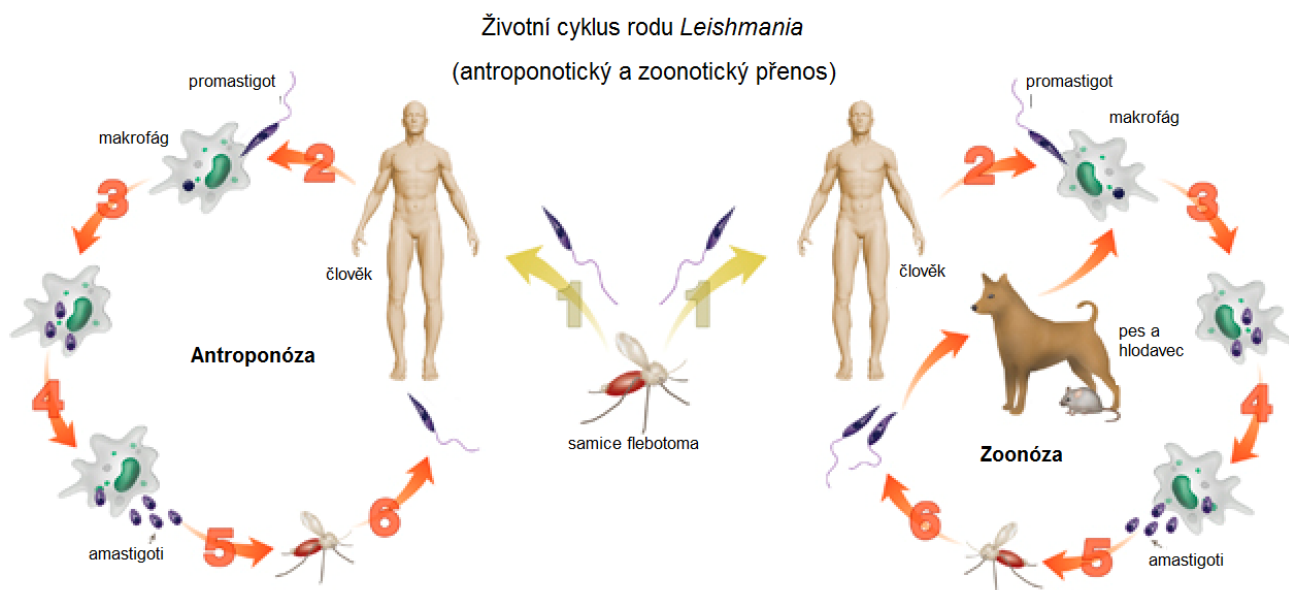


Převzato a upraveno z:

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e0/Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg/1280px-Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg.png

Druhy komplexu *Leishmania donovani* kolují v přírodě různým způsobem. *Leishmania infantum* způsobuje zoonotickou viscerální leishmaniózu (ZVL) v Asii, na Středním Východě, v Evropě a v Latinské Americe. Rod *Leishmania donovani* je původcem viscerální leishmaniózy (VL), nazývané také nemoc kala-azar, v Indii, v Nepálu, na Středním východě a ve východní Africe (Quinnell a Courtenay 2009). Tato leishmanie zřejmě koluje v některých ohniscích jako zoonóza, v jiných jako antroponóza.

Obrázek 2: Cyklus rodu *Leishmania* – antroponotický versus zoonotický přenos



Převzato a upraveno z: (Kumar a Engwerda 2014)

Ve východní Africe je cyklus *L. donovani* převážně zoonotický, na rozdíl od Indie. Nasvědčují tomu například velmi časté infekce hlídačů přírodního parku Dinder v Súdánu, který je jinak neobydlený (Zijlstra et al. 2003). V Indii, kde je VL antroponóza (Ready 2014), by mohli být hlavními rezervoáry onemocnění pacienti s post kala-azar dermální leishmaniózou (Singh et al. 2006). Post kala-azar dermální leishmanióza (PKDL) je chronické onemocnění projevující se jako dermatitida, postihující 10 – 20 % pacientů v Indii a až 60 % pacientů v Súdánu, kteří se vyléčili z viscerální leishmaniózy (Ramesh a Mukherjee 1995).

Tato odlišnost v typu přenosu by mohla být způsobena i životním stylem obyvatel v těchto endemických oblastech. Většina ohnisek VL na indickém subkontinentu je dlouhodobě lokalizována ve vesnicích se stálým obyvatelstvem. Naproti tomu ve východní Africe převažuje pastevecký způsob života, který je spojen s častou migrací. Lidé tak v této oblasti přicházejí do styku s divokými zvířaty častěji než v případě indických obyvatel (Ready 2014).

I když každý druh rodu *Leishmania* obvykle spadá do jedné z těchto kategorií, můžeme najít výjimky. Například *Leishmania tropica* je původcem kožní leishmaniózy a onemocnění je většinou antroponózou. Existují však i zoonotická ohniska *L. tropica*, kde jsou

rezervoárovými zvířaty damani, což bylo potvrzeno i xenodiagnostickými experimenty (Svobodová et al. 2006). Při experimentální infekci jiných potenciálních hostitelů, krys *Rattus rattus*, probíhalo onemocnění bezpříznakově, přesto 8 z 10 jedinců bylo infekčních pro přenašeče *P. sergenti*. Procento nakažených samic flebotomů dosahovalo v průměru 2,9 % (0 – 7 %). I když byli pomocí PCR detekováni paraziti u krys v obou uších, tlapkách a ocasu, samice přenašeče se nakazily jen v případě, pokud sály na uchu, do kterého byli intradermální inokulací vpraveni parazité (Svobodová et al. 2003).

4.2 Definice rezervoárového hostitele

Pouhá přítomnost infekce u nějakého savčího druhu nemusí nutně znamenat, že tento druh je rezervoárem tohoto onemocnění. Aby se druh stal rezervoárovým hostitelem, je nutné prokázat, že populace parazita je na daném druhu hostitele závislá. To znamená, že se mezi jedinci populace musí parazit šířit dlouhodobě. To vyžaduje důkladné ekologické, medicínské a epidemiologické studie (WHO 2010).

Obecně platí, že možnost průkazu zda je druh rezervoárovým hostitelem, je závislá na počtu dostupných studií a pozorování. Můžeme však určit základní kritéria, podle kterých budeme posuzovat řazení druhu mezi rezervoáry onemocnění (WHO 2010; Quinnell a Courtenay 2009):

- RH (rezervoárový hostitel) by se měl poměrně hojně vyskytovat v dané endemické oblasti. Měl by být také poměrně dlouhověký, aby v něm parazit mohl přežít období, kdy přenašeči nejsou přítomni z důvodu sezonních cyklů.

- RH musí být v kontaktu s flebotomy a musí pro ně poskytovat významný zdroj potravy. Například ve Starém Světě jsou RH většinou druhy žijící v koloniích a v norách. Taková populace poskytuje ideální habitat pro přenašeče a umožňuje jim snadněji přenášet infekci mezi jedinci v této populaci.

- Podíl jedinců, kteří jsou za svůj život nakaženi, je významný, často překročí i 20%. Prevalence se však může značně lišit v závislosti na ročním období.

- Průběh onemocnění u RH by měl být chronický a infekce by měla být v ideálním případě málo patogenní, aby parazit přežíval v RH co nejdéle a hostitel byl pro přenašeče dlouho infekční.

- Parazitická stádia by měla být přítomna v kůži či v krvi v dostatečném množství, aby se co nejlépe dostala při sání do těla přenašeče.

4.3 Použití xenodiagnostiky k průkazu rezervoárových hostitelů *Leishmania infantum*

Hlavním rezervoárem viscerální leishmaniózy způsobené druhem *Leishmania infantum* jsou domácí psi (WHO 2010). Podle přítomnosti klinických příznaků onemocnění dělíme nakažené psy do tří skupin: Asymptomatických, oligosymptomatických a polysymptomatických psi. Asymptomatické psy nemají žádné klinické příznaky onemocnění. Oligosymptomatické mají 1 až 3 mírnější příznaky psí viscerální leishmaniózy, jako je např. lymfatická adenopatie, mírný pokles hmotnosti, nadměrné línání nebo ztráta lesku srsti. Polysymptomatické psy mají více jak 2 závažné příznaky infekce, jako jsou: dermatologické změny (alopecie, suchá dermatitida, kožní léze a vředy), oční poruchy a záněty spojivek, místní a generalizovaná lymfadenopatie, průjem, ztráta hmotnosti a nechutenství, onemocnění pohybového aparátu, horečky, krvácení z nosu a onychogrypóza (Verçosa et al. 2008; Amorim et al. 2011; Mancianti et al. 1988; Michalsky et al. 2007).

Role symptomatických (synonymum polysymptomatických) psů jako přírodních rezervoárů *L. infantum* nebo *L. chagasi* byla opakovaně prokázána (Alvar et al. 2004; Gramiccia a Gradoni 2005; Quinnell a Courtenay 2009; Ready 2014). Podle některých studií jsou symptomatické psy pro flebotomy až 4x více infekční než oligosymptomatické a asymptomatické (Michalsky et al. 2007). Díky tomuto faktu, vzniklo několik strategií jak kontrolovat nakažené psy a jak předejít nákaze dalších. Kontrolní programy byly zavedeny hlavně v Brazílii, Španělsku a Číně, kde je psí viscerální leishmanióza (CVL) hlavním problémem (Tesh 1995; Ready 2014; Courtenay et al. 2002). Kontrolní programy sice nezaznamenaly signifikantní pokles CVL, ale díky nim byly vyvinuty insekticidy na bázi sprejů nebo obojků proti flebotomům, stále běží vývoj účinných vakcín proti *Leishmania infantum* nebo terénní studie zaměřené na detekci séropozitivních psů (Courtenay et al. 2002; Gramiccia a Gradoni 2005; Jorge Alvar et al. 2004).

Role oligosymptomatických a asymptomatických psů není zdaleka tak prokazatelná jako v případě polysymptomatických, proto se tímto tématem zabývá nemalé množství odborných článků. K průkazu epidemiologické významnosti těchto psů se nejčastěji používá přímá xenodiagnostika a zkoumají se též imunologické parametry ve vztahu k riziku infekce jedince. Už roku 1989 byl prokázán význam buněčné imunity v rezistenci proti leishmaniózám na myším modelu (Liew 1989; Scott 1989). Guarga et al. (Guarga et al. 2000) ve své studii zkoumali vztah mezi imunologickým statusem infikovaného psa *L. infantum* a

mírou infekce flebotomů, kteří na tomto psovi sáli. Našli významnou korelaci mezi množstvím parazita detekovaném ve vektoru a procentuálním zastoupením pomocných T-lymfocytů (CD4/TcR $\alpha\beta$ + a CD4/CD45RA+) vyšetřovaného jedince. Z této závislosti vyplývá, že čím nižší je počet pomocných T-lymfocytů, tím vyšší je pravděpodobnost nakažení vektora. Naopak žádná asociace nebyla prokázána v případě cytotoxických T-lymfocytů (CD8/TcR $\alpha\beta$ + a CD8/CD45RA+).

V další studii (Molina et al. 1994) se porovnávala infekčnost u 16 přirozeně nainfikovaných psů *Leishmania infantum*. Všichni psi byli séropozitivní s rozdílnými symptomy, proto byli rozděleni do 3 skupin: 5 asymptomatických, 4 oligosymptomatických a 7 polysymptomatických psů. Na těchto jedincích byla provedena XD pomocí *P. perniciosus*. Po 7 dnech byly samice flebotomů usmrceny a obsah střeva vyšetřen na přítomnost promastigótních stádií. Výsledkem této studie bylo zjištění, že schopnost psa infikovat flebotoma není závislá na rozsahu symptomů, neboť nebyly zjištěny významné rozdíly v počtu infikovaných samic přenašeče mezi jednotlivými klinickými skupinami.

Naopak jiný článek (Verçosa et al. 2008) popisuje signifikantní rozdíly ve schopnosti přenášet onemocnění mezi asymptomatickými a symptomatickými psy. Celkem 14 infikovaných psů bylo vyšetřeno pomocí XD. U 6 z 9 symptomatických vyšel pozitivní výsledek, naopak žádný z 5 asymptomatických psů nenakazil žádnou samici *Lutzomyia longipalpis*. Mohlo to být způsobeno tím, že u asymptomatických psů nebyly detekovány žádné amastigoti v kůži. V článku však není uvedeno, za jak dlouho po infekci byla xenodiagnostika použita. I další studie se přiklání k hypotéze, že asymptomatictí psi hrají jen velmi malou roli v přenosu leishmaniózy (Courtenay et al. 2002).

Na druhé straně, asymptomatictí psi v endemické oblasti Španělska byli schopni nakazit *P. perniciosus* parazitem *Leishmania infantum* (Molina et al. 1994). Tato data ukazují rozdíl mezi studii prováděnými v oblasti Středozeří a v Jižní Americe. Tento rozdíl může být způsobem rozdílným kmenem *Leishmania* a rozdílným druhem přenašečů vyskytujících se v těchto oblastech (Travi et al. 2001).

Existují důkazy, že u velkého počtu asymptomatických psů dojde k rozvoji příznakového onemocnění a protože časem se symptomy objeví i u těchto jedinců, popisují někteří autoři tyto psy jako pre-symptomatické (Courtenay et al. 2002).

Během posledních tří let se objevila série studií, které prokazují, že rezervoárem zoonotické viscerální leishmaniózy působené druhem *L. infantum* mohou být též zástupci čeledi *Leporidae* (zajícovci), konkrétně zajáci a možná i králíci.

PCR použitá pro vyšetření sleziny králíků odchycených ve Španělsku ukázala pozitivní výsledek na nákazu *L. infantum* (Chitimia et al. 2011). Tuto teorii potvrzuje i další studie, ve které našli u zajíce stepního (*Lepus yarkandensis*) protilátky proti *L. infantum* (LiFu et al. 2009).

Molina (Molina et al. 2012) ve své studii používá xenodiagnostiku pro detekci *L. infantum* v zajíci iberském (*Lepus granatensis*) (obr. 3). Bylo vybráno 7 asymptomatických zajíců nakažených *L. infantum*. Pro přímou XD byli jako přenašeči použiti *P. perniciosus*. 4 ze 7 zajíců (57,14 %) měli pozitivní xenodiagnózu, hodnota nákazy u přenašeče činila v průměru 4,7 % (0 – 10,6 %). Výsledky XD jsou uvedeny v tabulce 2.

Při této studii prováděné v roce 2011 v jihovýchodní části Madridu bylo zjištěno, že v přilehlém nově vybudovaném parku žije velká populace zajíců a díky nim je zde i velká populace flebotomů. Zároveň byl v okolí parku diagnostikován nárůst onemocnění vyvolané *L. infantum*. Použitím přímé xenodiagnostiky bylo prokázáno, že zajíci mohou hrát roli v epidemiologii onemocnění. Zajíc iberský (*Lepus granatensis*) by mohl být považován za sekundární rezervoár onemocnění.

O dva roky později navázali na toto pozorování další studii Jiménez a kol. (2014). Použili XD pro vyšetření jedinců králíka divokého (*Oryctolagus cuniculus*), který by také mohl hrát významnou roli v koloběhu leishmaniózy ve Španělsku. Stejně jako v případě zajíce iberského (*Lepus granatensis*) je populace králíka divokého (*Oryctolagus cuniculus*) v této oblasti početná.

Tabulka 2: Výsledky xenodiagnostiky prováděné na 7 králících infikovaných *L. infantum*, kteří byli vystavení sání 100 samic *P. perniciosus*

Datum xenodiagnostiky	Kód králíka	Počet nasátých samic flebotomů	Počet vypitvaných samic flebotomů	Celkový počet infikovaných samic flebotomů (%)
01/12/11	L18	85	63	5 (7,9 %)
01/12/11	L19	55	25	0
11/01/12	L34	75	47	5 (10,6 %)
11/01/12	L35	58	38	2 (5,3 %)
11/01/12	L38	82	45	0
11/01/12	L39	63	42	0
11/01/12	L40	80	33	3 (9,1 %)

Převzato a upraveno z (Molina et al. 2012).

Obrázek 3: Xenodiagnostika prováděna zajíci iberském (*Lepus granatensis*)



Převzato z: (Molina et al. 2012)

S cílem objasnit roli zajícovců v cyklu ZVL byla použita přímá XD (*P. perniciosus*) na odchycených jedincích divokých králíků. Celkem bylo odchyceno 48 jedinců, u 11 (22,9 %) z nich byla prokázána existence anti-leishmania protilátek, což odpovídá faktu, že tito jedinci museli přijít do styku s parazitem *L. infantum*. Deset z jedenácti pozitivních králíků bylo vyšetřeno přímou XD, 5 z nich (50 %) bylo schopno nakazit *P. perniciosus* (Jiménez et al. 2014).

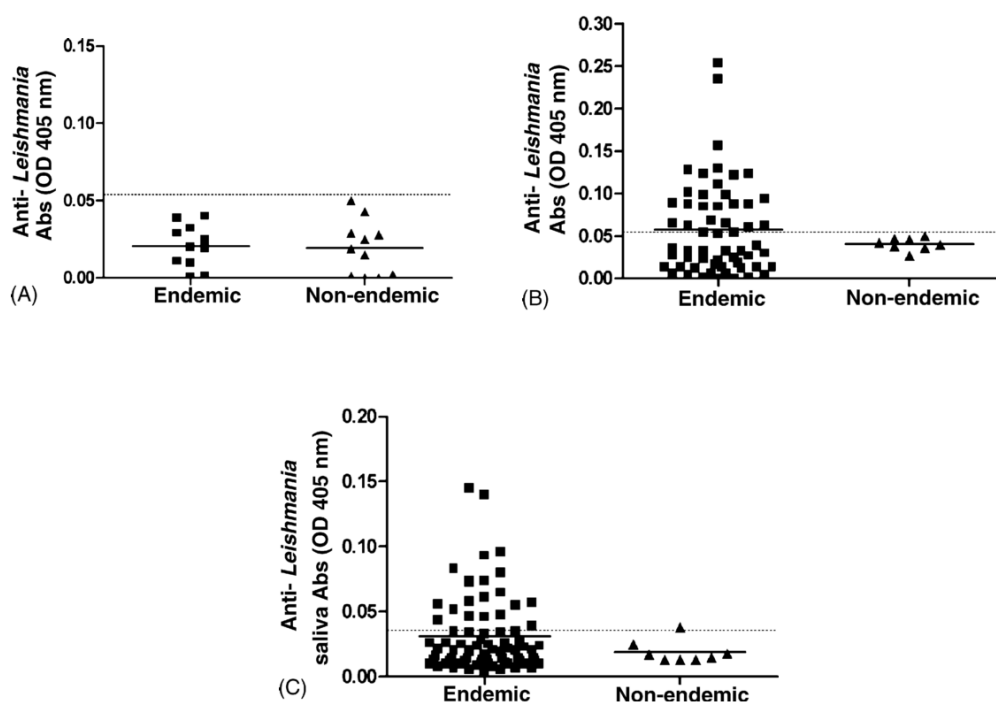
Výsledky těchto pozorování demonstrují, že i zdánlivě zdraví jedinci čeledi zajícovců infikovaní *L. infantum* jsou schopni nakazit přenašeče.

O roli hlodavců v koloběhu *L. infantum* se spekuluje již delší dobu. Krysa obecná (*Rattus rattus*) se díky svému způsobu života a areálem rozšíření stala jedním z druhů, které by mohly hrát nějakou roli při koloběhu leishmanióz v přírodě. Paraziti izolovaní z jedinců *Rattus rattus* byli identičtí s parazity z lidí a psů. Krysy však na rozdíl od lidí a psů nevykazovaly žádné viditelné známky onemocnění (Gradoni and Pozio 1983). Tomuto zjištění odpovídalo i pozorování experimentálně nakažených krys *L. infantum*, u kterých se testovala infekčnost pro okolí pomocí xenodiagnostiky. Nejenže jedinci vykazovali asymptomatický průběh onemocnění, ale byli i schopni infikovat přenašeče (*P. perniciosus*). Krysy byly pro flebotomy velice atraktivní a přenášely infekci nejméně dalšího půl roku (Pozio et al. 1985). Výsledky však podporují hypotézu, že krysa *Rattus rattus* by mohla být za určitých podmínek rezervoárovým hostitelem *L. infantum* v oblasti Turecka.

O jihoamerické lišce *Cerdocyon thous* se dlouho uvažovalo, jako o rezervoáru americké viscerální leishmaniózy, působené *L. chagasi* (synonymum pro *L. infantum* zavlečenou do Jižní Ameriky ze Španělska (Mauricio et al. 2000)). Je to noční šelma, která se při lovu často pohybuje v blízkosti lidských obydlí (Lainson et al. 1969) a několik studií zjistilo, že lišky mají vysokou prevalenci infekce *L. chagasi* (Lainson et al. 1990; Orin Courtenay et al. 2002; Richini-Pereira et al. 2014). Jiná vědecká skupina v Brazílii (Gomes et al. 2007) zjistila, že séra lišek sice mají vysoké hladiny protilátek proti přenašeči *Lutzomyia longipalpis*, ale významně nižší hladinu protilátek proti parazitovi *L. chagasi* než séra vyšetřovaných lidí a psů ze stejné oblasti (Obr. 4). Výsledky napovídají tomu, že lišky přicházejí často do styku s přenašeči, ale že v této oblasti nejspíše neexistuje sylvatický cyklus VL nezávislý na lidech a psech. K této hypotéze se přiklání i další studie (Courtenay et al. 2002), která podrobila 26 odchycených (z toho 20 sérologicky pozitivních a 8 PCR

pozitivních) divokých lišek ze severní Brazílie, 44 xenodiagnostickým pokusům, při kterých bylo celkově použito 1469 samic *L. longipalpis*. Ani jedna z asymptomatických jihoamerických lišek nebyla infekční pro flebotomy. Z toho vyplývá, že pouhá vysoká prevalence infekce nemusí nutně znamenat, že druh je rezervoárovým hostitelem onemocnění.

Obrázek 4: IgG Protilátky proti parazitovi *Leishmania chagasi* u lišek, psů a lidí z Brazílie



Protilátky proti parazitovi *Leishmania chagasi*.

Hladiny sérových protilátek byly stanoveny metodou ELISA v séru (A) *Cerdocyon thous* (cut-off = 0,054), (B) psů (cut-off = 0,55) a (C) lidí (cut-off = 0,036).

Cut-off označeno přerušovanou čarou.

Abs = protilátky, Endemic = endemická oblast, Non-endemic = ne-endemická oblast

Převzato a upraveno z (Gomes et al. 2007).

5 ZÁVĚR

Zlatá éra xenodiagnostiky jako diagnostické metody skončila s nástupem molekulárních diagnostických metod, jako je například polymerázová řetězová reakce (PCR). Dnes se xenodiagnostika používá hlavně pro zjištění infekčnosti hostitele pro přenašeče. Tato metoda si tak našla nové místo v parazitologii a používá se například pro testování nových rezervoárových hostitelů nebo pro sledování koloběhu onemocnění, která krevsající členovci přenášejí. Během posledního desetiletí byla xenodiagnostika opakovaně použita při studiu leishmaniózy u domácích a volně žijících zvířat, která jsou podezřelá z účasti na koloběhu různých druhů leishmanií. Patří mezi ně hlavně domácí psi nakažení *Leishmania infantum/chagasi*, v jednotlivých případech byli studováni též zajáci, králíci, krysy a damani nakažení *Leishmania infantum* nebo *L. tropica*.

6 SEZNAM ZKRATEK

Balb/c	Albino laboratory-bred strain of the House Mouse	Kmen bílé imbrední myši domácí
CD4/5RA ⁺	Type of helper T-lymphocytes	Typ pomocných T-lymfocytů
CD4/TcRaβ	Type of helper T-lymphocytes	Typ pomocných T-lymfocytů
CD8/5RA ⁺	Type of cytotoxic T-lymphocytes	Typ cytotoxických T-lymfocytů
CD8/TcRaβ	Type of cytotoxic T-lymphocytes	Typ cytotoxických T-lymfocytů
CVL	Canine visceral leishmaniasis	Psí viscerální leishmanióza
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
PCR	Polymerase Chain Reaction	Polymerázová řetězová reakce
PKDL	Post kala-azar dermal leishmaniasis	Post kala-azar dermální leishmanióza
RH	Reservoir host	Rezervoárový hostitel
VL	Visceral leishmaniasis	Viscerální leishmanióza
XD	Xenodiagnosis	Xenodiagnostika
ZVL	Zoonotic visceral leishmaniasis	Zoonotická viscerální leishmanióza

7 POUŽITÁ LITERATURA

- Alvar, J., C. Cañavate, M. Jiménez, F. Laguna, R. Molina, and J. Moreno. 1997. Leishmania and Human Immunodeficiency Virus Coinfection : The First 10 Years . *Clinical Microbiology Reviews* 10: 298–319.
- Alvar, J., C. Cañavate, R. Molina, J. Moreno, and J. Nieto. 2004. Canine Leishmaniasis. *Advances in Parasitology* 57: 1–88.
- Amorim, I. F. G. De, S. M. Da Silva, M. M. Figueiredo, E. P. Moura, R. S. De Castro, T. K. De Souza Lima, N. De Figueiredo Gontijo, M. S. M. Michalick, K. J. Gollob, and W. L. Tafuri. 2011. Toll Receptors Type-2 and CR3 Expression of Canine Monocytes and Its Correlation with Immunohistochemistry and Xenodiagnosis in Visceral Leishmaniasis. *PloS One* 6: e27679.
- Bandeira, Y., A. Franco, I. Garcia, A. Rassi, A. C. Rodrigues, G. Rocha, H. Helena, and G. Gabriel. 2002. Correlação Entre a Positividade Do Xenodiagnóstico Artificial E a Quantidade de Sangue E Triatomíneos Utilizados No Exame , Em Pacientes Chagásicos Crônicos Correlation among the Positivity of the Artificial Xenodiagnosis and the Amount of Blood and Triat. *Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35: 29–33.
- Bongiorno, G., R. Paparcone, V. F. Manzillo, G. Oliva, A. M. Cuisinier, and L. Gradoni. 2013. Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish®) Reduces the Intensity of Infection in Phlebotomus Perniciosus Fed on Leishmania Infantum Infected Dogs: a Preliminary Xenodiagnosis Study. *Veterinary Parasitology* 197: 691–95.
- Bronfen, E., J. C. P. Dias, and S. C. Gouveia. 1984. Infecção Experimental de Triatoma Infestans E Panstrongylus Megistus Pela Cepa Y Do Trypanosoma Cruzi. *Revista de Patologia Tropical* 13: 1–7.
- Bronfen, E., F. S. de Assis Rocha, G. B. N. Machado, M. M. Perillo, A. J. Romanha, and E. Chiari. 1989. Isolamento de Amostras Do Trypanosoma Cruzi Por Xenodiagnóstico E Hemocultura de Pacientes Na Fase Crônica Da Doença de Chagas. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 84: 237–40.
- Castro, C., M. Candido, A. Santos, and C. Aida. 2004. Estudo Comparativo Entre O Xenodiagnóstico Artificial Realizado Imediatamente E Quatro Horas Após a Coleta de Sangue Comparative Study between Artificial Xenodiagnosis Performed Immediately and Four Hours after Venous Punch. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37: 128–30.
- Courtenay, O., R. J. Quinnell, L. M. Garcez, and C. Dye. 2002. Low Infectiousness of a Wildlife Host of Leishmania Infantum: The Crab-Eating Fox Is Not Important for Transmission. *Parasitology* 125: 407–14.
- Courtenay, O., R. J. Quinnell, L. M. Garcez, and J. J. Shaw. 2002. Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs : Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. *Oxfords Journals* 186: 1314–20.

- Dias, E.. 1940. Técnica Do Xenodiagnóstico Na Moléstia de Chagas. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 35 (2): 335–42.
- Gomes, R. B., I. L. Mendonça, V. C. Silva, J. Ruas, M. B. Silva, M. S. P. Cruz, A. Barral, and C. H. N. Costa. 2007. Antibodies against *Lutzomyia Longipalpis* Saliva in the Fox *Cercocyon Thous* and the Sylvatic Cycle of *Leishmania Chagasi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101: 127–33.
- Gradoni, L., and E. Pozio. 1983. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VII. Studies on the Role of the Black Rat, *Rattus Rattus*, in the Epidemiology of Visceral Leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 79: 427–31.
- Gramiccia, M., and L. Gradoni. 2005. The Current Status of Zoonotic Leishmaniases and Approaches to Disease Control. *International Journal for Parasitology* 35: 1169–80.
- Guarga, J. L., J. Lucientes, M. A. Peribáñez, R. Molina, M. J. Gracia, and J. Castillo. 2000. Experimental Infection of *Phlebotomus Perniciosus* and Determination of the Natural Infection Rates of *Leishmania Infantum* in Dogs. *Acta Tropica* 77: 203–7.
- Guarga, J. L., J. Moreno, J. Lucientes, M. J. Gracia, M. A. Peribáñez, J. Alvar, and J. A. Castillo. 2000. Canine Leishmaniasis Transmission : Higher Infectivity amongst Naturally Infected Dogs to Sand Flies Is Associated with Lower Proportions of T Helper Cells. *Veterinary Science* 69: 249–53.
- Chitimia, L., C. I. Muñoz-García, D. Sánchez-Velasco, V. Lizana, L. Del Río, L. Murcia, and B. Berri. 2011. Cryptic Leishmaniosis by *Leishmania Infantum*, a Feature of Canines Only? A Study of Natural Infection in Wild Rabbits, Humans and Dogs in Southeastern Spain. *Veterinary Parasitology* 181: 12–16.
- Jacobson, R. L. 2003. *Leishmania Tropica* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) - a Perplexing Parasite. *Folia Parasitologica* 50: 241–50.
- Jiménez, M., E. González, I. Martín-Martín, S. Hernández, and R. Molina. 2014. Could Wild Rabbits (*Oryctolagus Cuniculus*) Be Reservoirs for *Leishmania Infantum* in the Focus of Madrid, Spain? *Veterinary Parasitology* 202:296–300.
- Kumar, R., and Ch. Engwerda. 2014. Vaccines to Prevent Leishmaniasis. *Clinical & Translational Immunology* 3: e13.
- Lainson, R., J. J. Shaw, and Z. C. Lins 1969. Leishmaniasis in Brazil: IV. The Fox, *Cercocyon Thous* (L) as a Reservoir of *Leishmania Donovanii* in Para State, Brazil.”*Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 63: 741–45.
- Lainson, R., C. Dye, J. J. Shaw, D. W. Macdonald, O. Courtenay, A. A. A. Souza, and F. T. Silveira. 1990. Amazonian Visceral Leishmaniasis - Bistribution of the Vector *Lutzomyia Longipalpis* (Lutz and Neiva) in Relation of the Fox *Cercocyon Thous* (Linn.) and Efficiency of This Reservoir Host as a Source of Infection. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)* 85: 135–37.

- Laurenti, M. D., C. N. Rossi, V. L. R. da Matta, T. Y. Tomokane, C. E. Pereira Corbett, N. F. C. Secundino, P. F. P. Pimenta, and M. Marcondes. 2013. Asymptomatic Dogs Are Highly Competent to Transmit *Leishmania (Leishmania) Infantum* Chagasi to the Natural Vector. *Veterinary Parasitology* 196: 296–300.
- Liew, F. Y. 1989. Functional Heterogeneity of CD4+ T Cells in Leishmaniasis. *Immunology Today* 10: 40–45.
- LiFu, L., Y. ShunSheng, B. Wuso, W. Min, X Bing, Z. Yong, and L. Gang. 2009. *Leishmania Infantum* Firstly Isolated from Yarkend Hare (*Lepus Yarkandensis*). *Zhongguo Meijie Shengwuxue Ji Kongzhi Zazhi= Chinese Journal of Vector Biology and Control* 20: 45–47.
- Mancianti, F., M. Gramiccia, L. Gradoni, and S. Pieri. 1988. Studies on Canine Leishmaniasis Control. 1. Evolution of Infection of Different Clinical Forms of Canine Leishmaniasis Following Antimonial Treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82: 566–67.
- Mauricio, I. L., J. R. Stothard, and M. A. Miles. 2000. The Strange Case of *Leishmania Chagasi*. *Parasitology Today* 16: 188–89.
- Michalsky, E. M., M. F. Rocha, A. C. V. M. da Rocha Lima, J. C. França-Silva, M. Q. Pires, F. S. Oliveira, R. S. Pacheco, et al. 2007. Infectivity of Seropositive Dogs, Showing Different Clinical Forms of Leishmaniasis, to *Lutzomyia Longipalpis* Phlebotomine Sand Flies. *Veterinary Parasitology* 147: 67–76.
- Minter, D. M., E. Minter-Goedbloed, and T. F. de C. Marshall. 1978. Comparative Xenodiagnosis with Three Triatomine Species of Different Hosts with Natural and Experimental Chronic Infections with *Trypanosoma (Schizotrypanum) Cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72: 84–91.
- Molina, R., C. Amela, J. Nieto, M. San-Andrés, F. González, J. A. Castillo, J. Lucientes, and J. Alvar. 1994. Infectivity of Dogs Naturally Infected with *Leishmania Infantum* to Colonized *Phlebotomus Perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88: 491–93.
- Molina, R., C. Cafiavate, E. Cercenado, E. Lagunat, F. Lopez-Velez, and J. Alvar. 1994. Indirect Xenodiagnosis of Visceral Leishmaniasis in 10 HIV-Infected Patients Using Colonized *Phlebotomus Perniciosus*. *Aids* 8: 277–78.
- Molina, R., M. I. Jiménez, I. Cruz, A. Iriso, I. Martín-Martín, O. Sevillano, S. Melero, and J. Bernal. 2012. The Hare (*Lepus Granatensis*) as Potential Sylvatic Reservoir of *Leishmania Infantum* in Spain. *Veterinary Parasitology* 190: 268–71.
- Moreira, C. J., and A. Perlowagora-Szumlewicz. 1997. Attempts to Improve Xenodiagnosis: Comparative Test of Sensibility Using *Rhodnius Neglectus*, *Panstrongylus Megistus*, *Triatoma Vitticeps* and *Triatoma Infestans* in Endemic Areas of Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 92: 91–96.

- Mott, K. E., et al. 1980. Cutaneous Allergic Reactions to *Triatoma Infestans* after Xenodiagnosis. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)* 75: 3–10.
- Perlowagora-szumlewicz, A., and C. A. Muller. 1982. Studies in Search of a Suitable Experimental Insect Model for Xenodiagnosis of Hosts with Chagas' disease. 1 - Comparative Xenodiagnosis with Nine Triatomine Species of Animals with Acute Infections by *Trypanosoma Cruzi*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)* 77: 37 – 53.
- Perlowagora-szumlewicz, A., and C. A. Muller. 1987. Studies in Search of a Suitable Experimental Insect Model for Xenodiagnosis of Hosts with Chagas' disease. 2 - Attempts to Upgrade the Reliability and the Efficacy of Xenodiagnosis in Chronic Chagas' disease. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)* 82: 259–72.
- Pozio, E., M. Maroli, L. Gradoni, and M. Gramiccia. 1985. 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: 524–26.
- Quinnell, R. J., and O. Courtenay. 2009. Transmission, Reservoir Hosts and Control of Zoonotic Visceral Leishmaniasis. *Parasitology* 136: 1915–34.
- Ramesh, V., and A. Mukherjee. 1995. Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *International Journal of Dermatology* 34: 85–91.
- Ready, P. D. 2014. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis. *Clinical Epidemiology* 6: 147–54.
- Reithinger, R., J. C. Dujardin, and H. Louzir. 2007. Cutaneous Leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases* 7: 581–96.
- Richini-Pereira, V. B., P. M. Marson, E. Y. Hayasaka, C. Victoria, R. C. da Silva, and H. Langoni. 2014. Molecular Detection of *Leishmania* Spp. in Road-Killed Wild Mammals in the Central Western Area of the State of São Paulo, Brazil. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 20: 27.
- Scott, P. 1989. The Role of TH1 and TH2 Cells in Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 68: 369–72.
- Schenone, H. 1999. Xenodiagnosis. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)* 94: 289–94.
- Singh, R., D. Kumar, V. Ramesh, N. S. Negi, S. Singh, and P. Salotra. 2006. Visceral Leishmaniasis, or Kala Azar (KA): High Incidence of Refractoriness to Antimony Is Contributed by Anthroponotic Transmission via Post-KA Dermal Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases* 194: 302–6.
- Svobodová, M., P. Volf, and J. Votýpka. 2006. Experimental Transmission of *Leishmania Tropica* to Hyraxes (*Procavia Capensis*) by the Bite of *Phlebotomus Arabicus*. *Microbes and Infection* 8: 1691–94.

- Svobodová, M., J. Votýpka, L. Nicolas, and P. Volf. 2003. Leishmania Tropica in the Black Rat (Rattus Rattus): Persistence and Transmission from Asymptomatic Host to Sand Fly Vector Phlebotomus Sergenti. *Microbes and Infection* 5: 361–64.
- Tesh, R. B. 1995. Control of Zoonotic Visceral Leishmaniasis: Is It Time to Change Strategies? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 52: 287–92.
- Travi, B. L., C. J. Tabares, H. Cadena, C. Ferro, and Y. Osorio. 2001. Canine Visceral Leishmaniasis in Colombia: Relationship between Clinical and Parasitologic Status and Infectivity for Sand Flies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 64: 119–24.
- Verçosa, B. L. A., C. M. Lemos, I. L. Mendonça, S. M. M. S. Silva, S. M. de Carvalho, H. Goto, and F. L. Costa. 2008. Transmission Potential, Skin Inflammatory Response, and Parasitism of Symptomatic and Asymptomatic Dogs with Visceral Leishmaniasis. *BMC Veterinary Research* 4: 45.
- Vexenat, J. A., J. A. Castro, R. Cavalcante, J. P. Tavares, M. R. B. da Silva, W. H. Batista, and M. A. Miles. 1994. Visceral Leishmaniasis in Teresina, State of Piauí, Brazil: Preliminary Observations on the Detection and Transmissibility of Canine and Sandfly Infections. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 89: 131–35.
- WHO. 2010. *Control of the Leishmaniases: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010*. 0-186
- Zijlstra, E. E., A. M. Musa, E. A. G. Khalil, I. M. E. I. Hassan, and A. M. El-Hassan. 2003. Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases* 3: 87–98.