

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Tomáš Bečvář

Biologie leishmanií komplexu *Leishmania enriettii*.

Biology of *Leishmania enriettii* species complex.

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jovana Sádlová, Ph.D.

Praha, 2017

Nejprve bych chtěl velice poděkovat své školitelce RNDr. Jovaně Sádlové, Ph.D. za její pomoc a trpělivost při konzultacích spojených s touto bakalářskou prací. Dále bych chtěl poděkovat své rodině za umožnění studia v Praze a celému laboratornímu kolektivu za milé přijetí a přátelské rady během práce v laboratoři. Dík patří také mé kamarádce Zuzaně Adamové za korekturu.

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

Praha, 28.04.2017

Tomáš Bečvář

## Abstrakt

*Leishmania (Mundinia)* je podrod rodu *Leishmania* vytvořený v roce 2016, ve kterém je zařazeno 5 druhů leishmanií – druhy *L. enriettii* a *L. macropodum* jsou paraziti pouze divokých druhů savců, zatímco druhy *L. martiniquensis*, „*L. siamensis*“ a *L. sp.* izolovaná v Ghaně mají potenciál infikovat i člověka. Areál rozšíření těchto druhů je velmi široký a zasahuje do všech kontinentů světa kromě Antarktidy, čemuž odpovídá i neobvyklá diverzita hostitelů a přenašečů onemocnění. Mezi vektory patří nejen flebotomové - dvoukřídlý krevsající hmyz čeledi Psychodidae (Phlebotominae), ale i tiplici (Diptera: Ceratopogonidae), což je v rámci rodu *Leishmania* zcela unikátní. Škála zvířat, ze kterých byli zástupci podrodu *L. (Mundinia)* izolováni je široká, od klokanů, koní, či dobytka po hlodavce, ale skutečné doklady o jejich rezervoárové roli chybí. Mnohé otázky, zejména přesná identita rezervoárových zvířat a přenašečů, musí být tedy teprve zodpovězeny, než pochopíme celkovou biologii tohoto unikátního podrodu.

Klíčová slova: leishmanióza, leishmania, *Leishmania enriettii*, „*Leishmania siamensis*“, *Leishmania martiniquensis*, leishmanióza koní, fylogeneze, agbamekanu, *Leishmania macropodum*

## Abstract

*Leishmania (Mundinia)* is a subgenus of genus *Leishmania* established in 2016 which includes 5 species of *Leishmania* spp. – *L. enriettii* and *L. macropodum* - parasites of wild mammals and *L. martiniquensis*, „*L. siamensis*“ and *L. sp.* isolated in Ghana – parasites which can infect humans. Geographical distribution of these species is very large and reaches all continents, except of Antarctica. This fact correlates with huge spectre of hosts and vector species. Vectors belong to two families of Diptera: Psychodidae (Phlebotominae) and Diptera: Ceratopogonidae which is unique. *Leishmania (Mundinia)* species were isolated from many species of mammals like kangaroos, horses, cattle and rodents, but role of these species as reservoir hosts remains uncertain. Many questions like true identity of reservoir hosts and vectors have to be answered before the biology of this subgenus will be fully understood.

Key words – leishmaniosis, leishmania, *Leishmania enriettii*, „*Leishmania siamensis*“, *Leishmania martiniquensis*, leishmaniosis of horse, phylogenetics, agbamekanu, *Leishmania macropodum*

## Seznam zkratek

DNA pol. – DNA polymeráza

RNA pol. – RNA polymeráza

rRNA – ribozomální RNA

gGAPDH – glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza

HSP70 – heat-shock protein 70

ITS1 – internal transcribed spacer

SSU rRNA – ribozomální RNA malé ribozomální podjednotky

DNA – deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

PCR – polymerázová řetězová reakce

PSG – promastigote secretory gel

# Obsah

1. Úvod.....	1
2. Fylogenetické postavení leishmanií podrodu <i>Leishmania (Mundinia)</i> neboli druhového komplexu <i>L. enriettii</i> .....	2
2.1. První klasifikace rodu <i>Leishmania</i> .....	2
2.2. Formování podrodu <i>Leishmania (Mundinia)</i> .....	2
2.2.1. Objev <i>L. martiniquensis</i> a zjištění příbuznosti s <i>L. enriettii</i> .....	2
2.2.2. Izolace <i>L. macropodum</i> v Austrálii.....	3
2.2.3. Objev a zařazení PCM2.....	6
2.2.4. <i>Leishmania</i> sp. izolovaná v Ghaně.....	7
2.3. Souhrn.....	8
3. Popis jednotlivých druhů podrodu <i>L. (Mundinia)</i> .....	10
3.1. <i>Leishmania enriettii</i> .....	10
3.1.1. Oblast výskytu onemocnění.....	10
3.1.2. Popis onemocnění.....	10
3.1.3. Přenašeči.....	13
3.1.4. Rezervoárová zvířata.....	13
3.2. <i>Leishmania martiniquensis</i> .....	14
3.2.1. Oblast výskytu.....	14
3.2.2. Popis onemocnění.....	14
3.2.3. Přenašeči.....	18
3.2.4. Rezervoárová zvířata.....	19
3.3. PCM2 neboli „ <i>L. siamensis</i> “.....	19
3.4. <i>Leishmania</i> sp. způsobující kožní leishmaniózu v Ghaně.....	19
3.4.1. Oblast výskytu a historie onemocnění.....	19
3.4.2. Popis onemocnění.....	20
3.4.3. Přenašeči.....	21
3.4.4. Rezervoárová zvířata.....	22
3.5. <i>Leishmania macropodum</i> .....	22
3.5.1. První záznam autochtonní leishmaniózy v Austrálii.....	22
3.5.2. Popis onemocnění.....	23
3.5.3. Přenašeči.....	23
3.5.4. Rezervoárová zvířata.....	23
4. Závěr.....	25

## 1. Úvod

Leishmanióza je lidské a zvířecí onemocnění způsobené jednobuněčnými eukaryotickými parazity rodu *Leishmania*, které je přenášeno krevsajícím dvoukřídłym hmyzem: flebotomy (Diptera: Psychodidae) a podle nových poznatků zřejmě i tiplíky (Diptera: Ceratopogonidae). Podle zprávy WHO se lidská leishmanióza dnes vyskytuje ve více než 100 zemích celého světa a má na svědomí zhruba 20–30 tisíc lidských životů ročně. V endemických oblastech žije více než 1 miliarda lidí (WHO, 2017).

Onemocnění se vyskytuje v různých formách lišících se projevy a závažností. V případě kutánní (kožní) formy (CL) se nakaženému jedinci nejčastěji vyvine jedna ulcerující léze v místě infekce a ve většině případů dojde během několika týdnů až měsíců ke zhojení léze a vytvoření jizvy. U pacientů s oslabenou imunitou se může rozvinout takzvaná difusně kutánní forma onemocnění (DCL), při které se parazit rozšíří po velké části těla hostitele a vytváří mnohočetné, většinou neulcerující léze. Při mukokutánní (kožně slizniční) formě (MCL) dochází k napadení měkkých tkání (sliznic a chrupavek) hostitele v oblasti nosu, ústní dutiny, hltanu a hrtanu a k jejich nenávratnému poškození. Nejzávažnější forma onemocnění je viscerální (útrobní) leishmanióza (VL), kdy parazit napadá vnitřní orgány hostitele a způsobuje klinické příznaky podobné leukémii, kterými jsou například hepatomegalie, krevní anémie, nepravidelně zvýšená teplota a celková únava. Při nedostatečné zdravotní péči vede tato forma onemocnění velmi často ke smrti hostitele. K rozvinutí těžších forem onemocnění dochází velmi často u jedinců s vrozenou či získanou imunodeficiencí, například vlivem současného nakažení virem HIV (Pearson and Sousa, 1996).

Rod *Leishmania* patří do čeledi Trypanosomatidae (kmen Kinetoplastida) a v současné době je rozdělen na čtyři podrody – *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)*, *L. (Mundinia)* a *L. (Sauroleishmania)*. Podrody *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)* a *L. (Mundinia)* jsou paraziti člověka a jiných savců, zatímco podrod *L. (Sauroleishmania)* se vyskytuje v plazech.

V první části této bakalářské práce bude popsáno fylogenetické postavení podrodu *L. (Mundinia)*, nově vytvořeného v roce 2016, a jeho jednotlivých zástupců, kterými jsou *L. enriettii*, *L. martiniquensis*, „*L. siamensis*“, *L. sp.* izolovaná v Ghaně a *L. macropodum*. V druhé části bude detailněji popsána biologie jednotlivých druhů tohoto podrodu.

Hlavní motivací k vytvoření této práce byla absence jakékoliv studie shrnující poznatky známé o této skupině leishmanií. Přitom v tomto komplexu nalezneme i medicínsky významné druhy způsobující různé formy onemocnění člověka a zároveň tento podrod zahrnuje druhy s unikátní biologii (např. přenašeči jsou nejen flebotomové, ale i tiplíky). Zajímavý je i areál rozšíření, neboť zástupce těchto druhů nalezneme na všech kontinentech světa kromě Antarktidy, a to včetně Austrálie, kde se jiné leishmanie nevyskytují.

## 2. *Fylogenetické postavení leishmanií podrodu Leishmania (Mundinia) neboli druhového komplexu L. enriettii*

V této kapitole bude vysvětlen současný pohled na postavení komplexu *L. enriettii* ve fylogenetickém stromu rodu *Leishmania* a zároveň bude přiblížen historický vývoj formování tohoto podrodu.

### 2.1. *První klasifikace rodu Leishmania*

První autoři, kteří rozdělili jednotlivé druhy leishmanií do vyšších taxonomických skupin, byli Lainson a Shaw, kteří během let 1979-1986 rozdělili v té době známé druhy rodu *Leishmania* převážně podle způsobu vývoje ve vektorech do tří podrodů – *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)* a *L. (Sauroleishmania)*. Do podrodu *L. (Leishmania)* byly zařazeny jednotlivé komplexy druhů se suprapylariárním vývojem (vývoj probíhá v mesenteronu a stomodeu přenašečů) jako například komplex druhů *L. donovani* a komplex druhů *L. mexicana*, do kterého byla tehdy zařazena i *L. enriettii*. Do podrodu *L. (Viannia)* byly zařazeny druhy s peripylariárním vývojem (vývoj začíná v proctodeu, poté je kolonizován mesenteron a stomodeum) jako například komplex druhů *L. braziliensis*. Podrod *L. (Sauroleishmania)* byl vytvořen z druhů, jež jsou vázány na plazy a vývoj v přenašeči je většinou hypopylariární (omezen na proctodeum s kontaminativním přenosem na hostitele), někdy i peripylariální (Lainson a Shaw, 1987). Tento pohled byl dlouhá léta uznáván a uvedené tři podrody jsou stále používány. Nicméně teprve v posledních letech se vyjasňuje pozice druhů, které od svého popsání stály většinou mimo tyto velké podrody.

### 2.2. *Formování podrodu Leishmania (Mundinia)*

V této podkapitole bude shrnut historický vývoj podrodu *L. (Mundinia)* dříve známého jako komplex *L. enriettii*. Postupně bude přiblížen objev a metoda zařazení každého druhu. Bližší charakteristika jednotlivých druhů bude popsána v následujících kapitolách.

#### 2.2.1. *Objev L. martiniquensis a zjištění příbuznosti s L. enriettii*

Velice důležitou roli při tvorbě podrodu *L. (Mundinia)* hraje *L. martiniquensis* izolovaná na ostrově Martinik poprvé v roce 1992 z HIV pozitivního pacienta s difúzně kožní leishmaniózou. Protože izoenzymová analýza neukázala shodu s žádným z testovaných referenčních kmenů leishmanií, usoudili autoři, že se nejedná o rod *Leishmania*. Na základě morfologie studované pomocí elektronové mikroskopie byl tento izolát zařazen mezi jednohostitelská trypanosomatida (Dedet et al. 1995). V roce 1997 byl získán izolát z dalšího pacienta, tentokrát HIV negativního (Boisseau-Garsaud et al. 2000). Oba izoláty byly označeny jako MAR1 a MAR2, jejich izoenzymový profil byl identický. Následná analýza genů pro DNA a RNA pol. II a 18S rRNA vedla k zařazení MAR1 do rodu *Leishmania*, konkrétně společně s *L. enriettii* do jedné větve, oddělující se bazálně od ostatních

zástupců skupiny *euleishmania*. Ovšem bootstrapová podpora této větve byla slabá, proto autoři nevyloučili, že izoláty mohou být zařazeny do podrodu *L. (Leishmania)* nebo *L. (Viannia)*, případně tvořit nový podrod v rámci skupiny *euleishmania* bez *L. enriettii* (Noyes et al. 2002). Tyto izoláty byly až v roce 2014 (spolu s dalšími novějšími izoláty) validně popsány jako *L. martiniquensis* (Desbois et al. 2014)

Teprve až fylogenetické zařazení MAR1 a MAR2 dle izoenzymové analýzy genů pro katalytickou podjednotku DNA pol.  $\alpha$  a velkou podjednotku RNA pol. II (Noyes et al. 2002) vedlo k postupnému vytvoření komplexu *L. enriettii* větvičícího se bazálně od ostatních podrodů. Postupně byly do tohoto komplexu přidány 3 další druhy a celkem 15 let ležel komplex druhů *L. enriettii* stranou ostatních podrodů a jeho příbuznost s ostatními skupinami leishmanií nebyla vyjasněná.

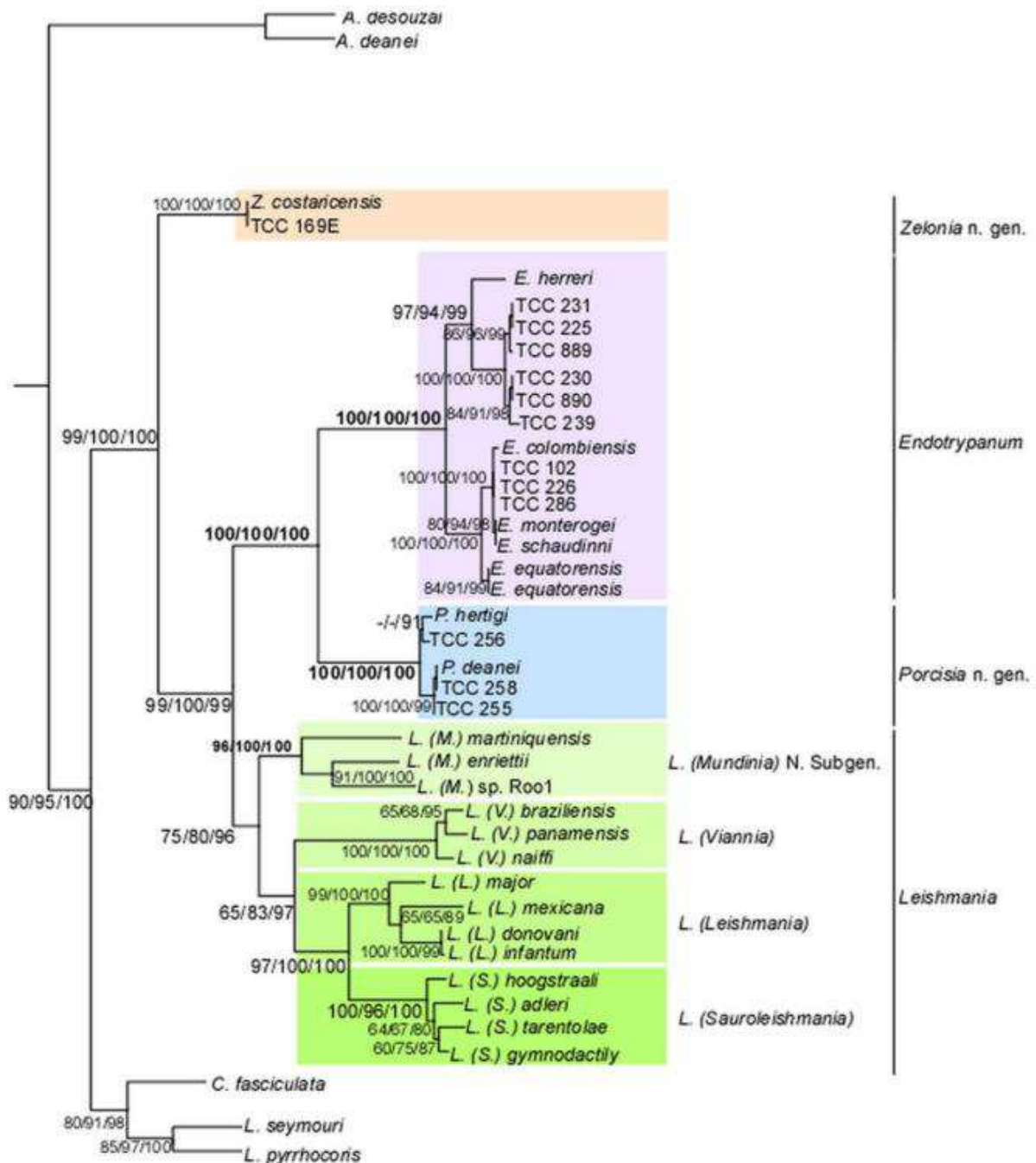
Až v prosinci roku 2016 bylo podle fylogenetické studie založené na porovnání genů pro gGAPDH a HSP70 potvrzeno, že se *L. enriettii*, *L. martiniquensis*, *L. macropodum* (AM-2004) větví bazálně od podrodů *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)* a *L. (Sauroleishmania)* s tím, že jsou nejpříbuznější (92 resp. 96% podobnost) s podrodem *L. (Leishmania)* a s podrodem *L. (Sauroleishmania)* (87 resp. 94% podobnost). Pro tento komplex byl vytvořen další podrod – *L. (Mundinia)*, pojmenovaný po objevitelích druhu *L. enriettii* (Espinosa et al. 2016) (obr. 1).

Studie Espinosy et al. (2016) bohužel nezahrnuje do svých analýz druhu *Leishmania* sp. izolovaná v Ghaně a „*L. siamensis*“. V každém případě jsou ale vztahy uvnitř komplexu *L. enriettii* v tomto stromě stejné, jako ve stromě vytvořeném Kwakye-Nuako et al. v roce 2015 a lze tedy předpokládat, že je možné chápat vztahy uvnitř komplexu *L. enriettii* dle Kwakye-Nuako et al. (2015) pouze přejmenovat druhový komplex *L. enriettii* na podrod *L. (Mundinia)* (obr. 2).

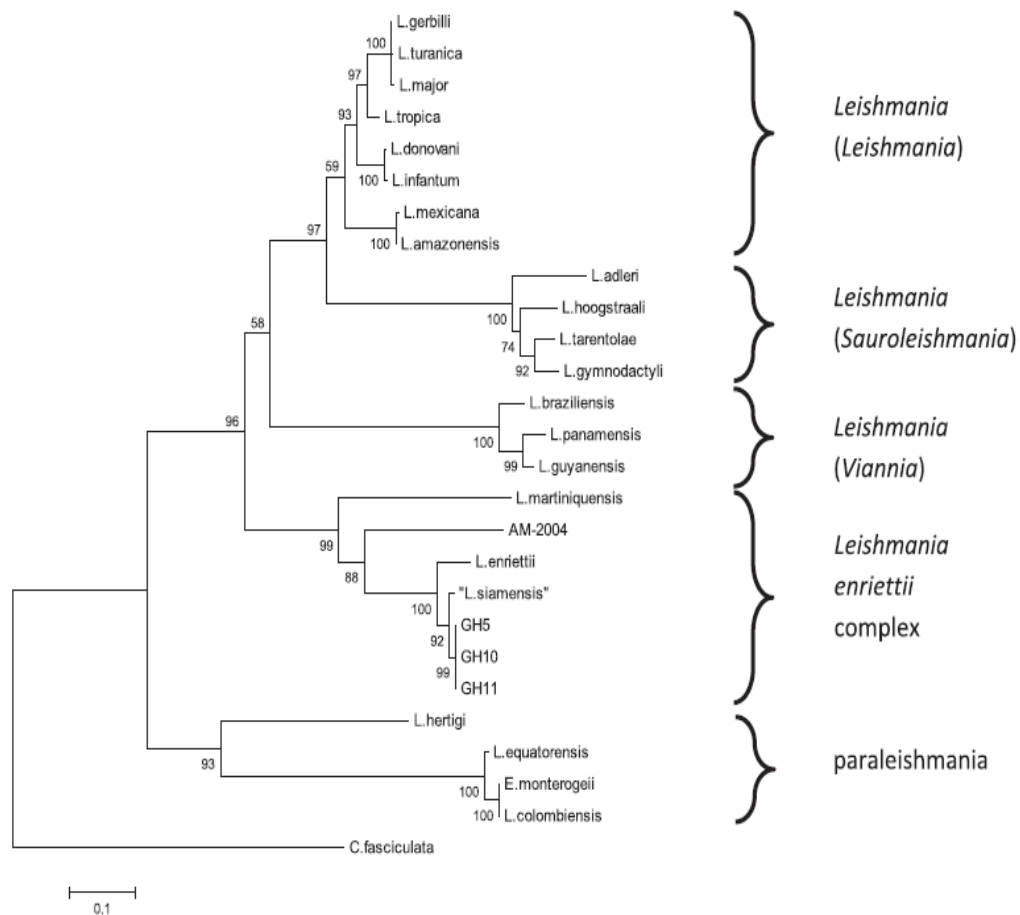
### 2.2.2. Izolace *L. macropodum* v Austrálii

Třetím druhem přidaným do podrodu *L. (Mundinia)*, byl izolát získaný z klokanů *Macropus rufus* v Austrálii (Rose et al. 2004), označený jako AM-2004, který byl teprve nedávno validně popsán jako *L. macropodum* (Barrat et al. 2017). Tento izolát byl po průzkumu a porovnání genů pro RNA pol. II a ITS1 určen jako nový druh, který je nejpodobnější druhu *L. enriettii* a v roce 2011 byl zařazen do větve s *L. enriettii* a izolátem MAR1 z Martiniku (obr. 3) (Dougall et al. 2011).

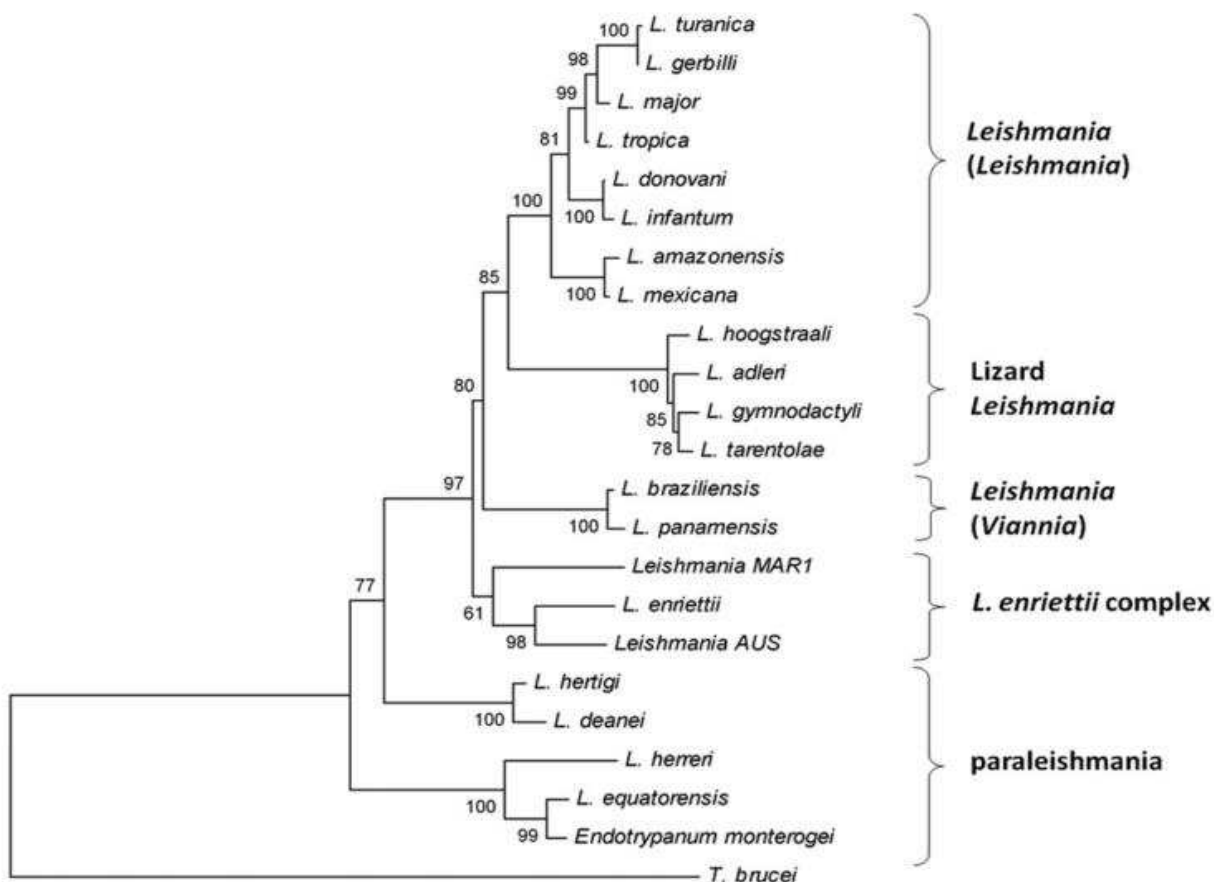




Obr. 1 – Fylogenetický strom heteroxenních trypanosomatid, skupiny Leishmaniinae odvozený podle analýzy založené na sekvencích HSP70 a gGAPDH. Čtyři heteroxenní rody *Endotrypanum*, *Porcisia*, *Zelonia* a *Leishmania* mají vysokou bootstrapovou podporu a nový podrod *L. (Mundinia)* je nejbazálnější skupinou rodu *Leishmania* (Espinosa et al. 2016).



Obr. 2 – Fylogenetický strom vzniklý porovnáním sekvencí ITS1 po objevu ghanského druhu. Zde jsou jednotlivé izoláty označeny jako GH5, GH10 a GH11. (Kwakye-Nuako et al. 2015).

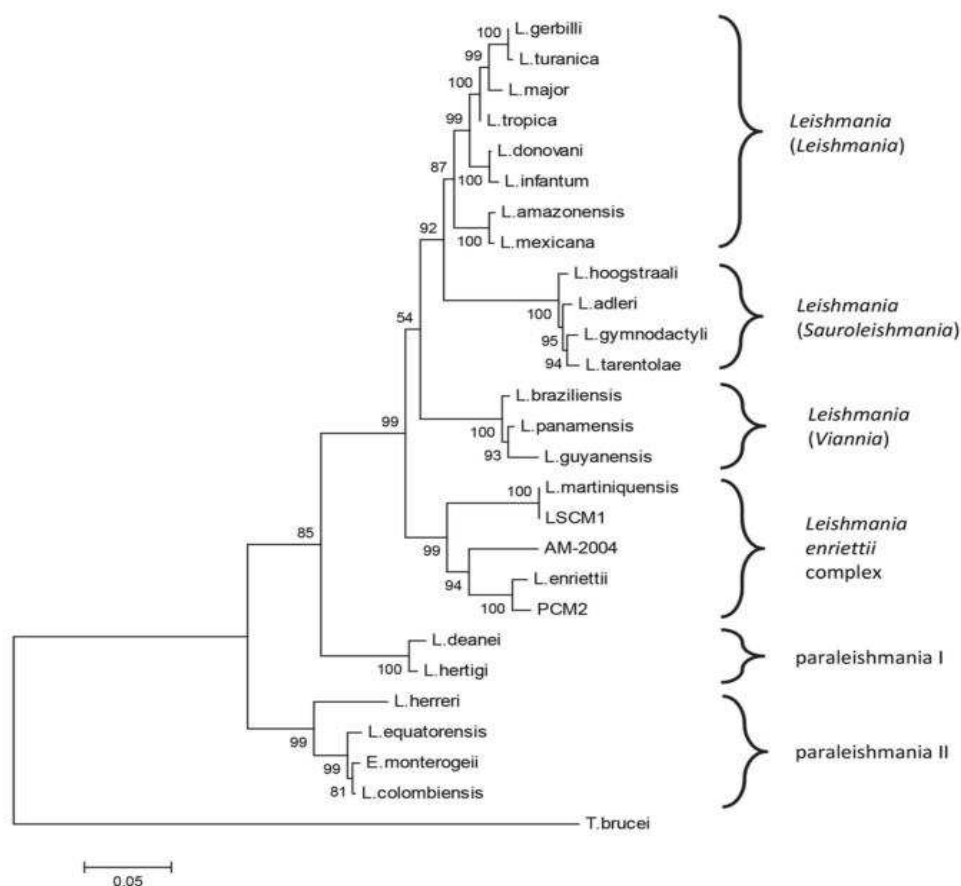


Obr. 3 – Fylogenetický strom pro rod *Leishmania* a příbuzné rody vytvořený analýzou genu pro RNA polymerázu II. *Leishmania macropodum* je zde označena jako *Leishmania AUS* (Dougall et al. 2011).

### 2.2.3. Objev a zařazení PCM2

Dalším druhem, který byl přidán do podrodu *Leishmania* (*Mundinia*), je takzvaná „*L. siamensis*“. Jelikož zatím nedošlo k jejímu oficiálnímu popsání v souladu s mezinárodními pravidly zoologické nomenklatury, není tento název validní. V této práci budu tedy používat „*L. siamensis*“ v uvozovkách jako nomen nudum.

V literatuře se hovoří o druhu „*L. siamensis*“ v souvislosti s kmenem izolovaným autory Sukmee et al. (2008), ale studie Pothirat et al. (2014) dokázala, že se v tomto případě i u všech ostatních thajských leishmanií označovaných jako „*L. siamensis*“ jedná ve skutečnosti o *L. martiniquensis*. Jedinou výjimkou je izolát PCM2 (Bualert et al. 2012), který pro tvorbu fylogenetického stromu použili i Pothirat et al. (2014) (obr. 4). Pro zařazení byly použity geny pro ITS1 a velkou podjednotku RNA pol. II. Zároveň bylo také dokázáno, že izoláty z Evropy (Müller et al. 2009, Lobsinger et al., 2010) a USA (Reuss et al. 2012) označované v té době jako „*L. siamensis*“ také náleží k druhu *L. martiniquensis*.



Obr. 4 – Fylogenetický strom vzniklý porovnáním sekvencí RNA pol. II. LSCM1 je *L. martiniquensis* a PCM2 je nový druh, označovaný jako „*L. siamensis*“ (Pothirat et al. 2014).

#### 2.2.4. *Leishmania* sp. izolovaná v Ghaně

Do této chvíle posledním druhem přidaným do podrodu *L. (Mundinia)* je dodnes nepojmenovaný druh *Leishmania* sp., který způsobuje kožní formu leishmaniózy v Ghaně, konkrétně v oblasti ležící mezi jezerem Volta a hranicí se státem Togo, poblíž města Ho. Prvními, kdo zaznamenali a zařadili tento druh byli Villinski et al. (2008). Při tvorbě fylogenetického stromu nebyla sice použita *L. enriettii*, ale autoři porovnali geny pro SSU rRNA s *L. martiniquensis* a *L. macropodum* a ITS1 s *L. macropodum*. Výsledkem této analýzy bylo zařazení ghanského izolátu mezi zmíněné dva druhy.

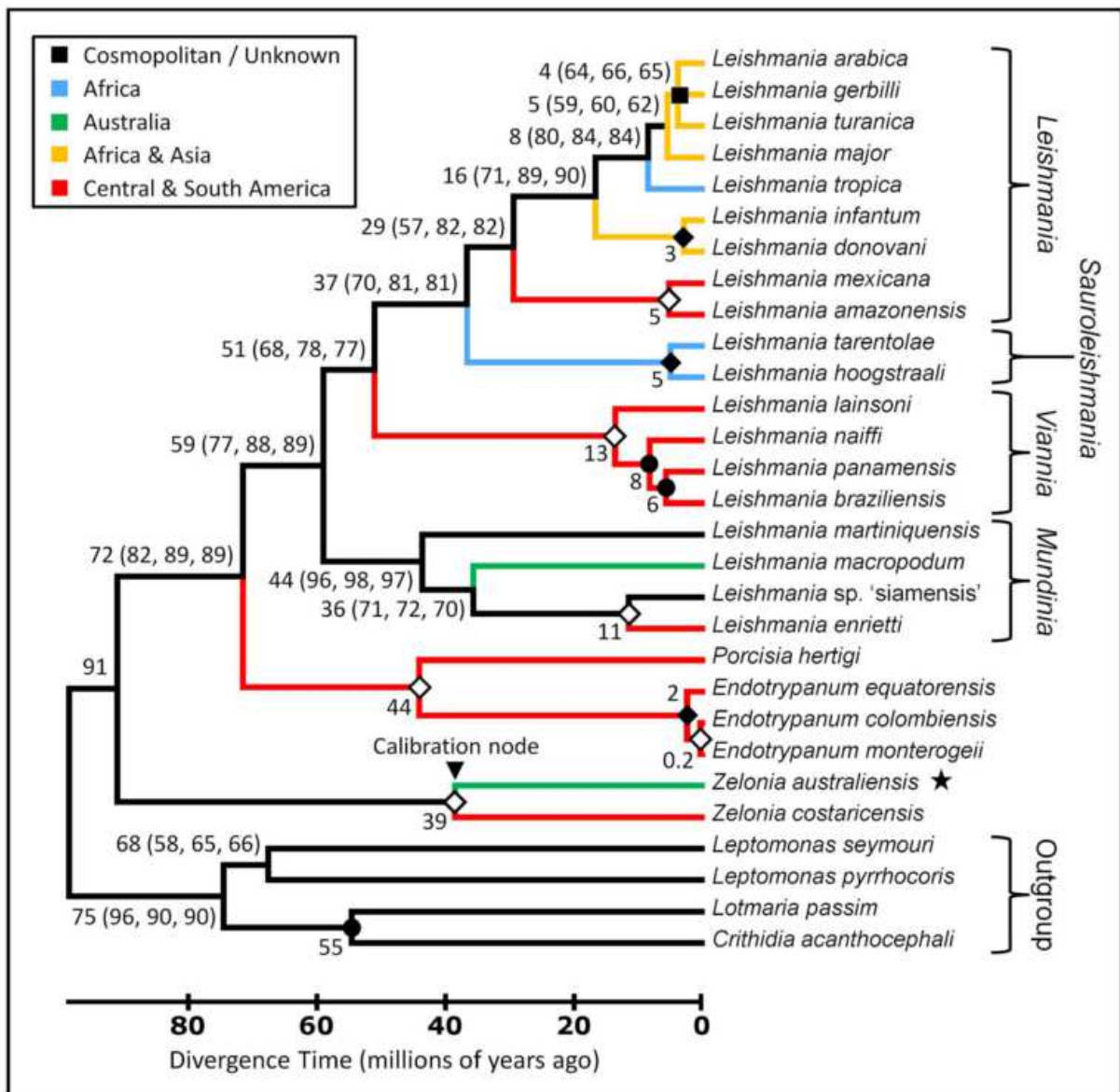
Rozsáhlejší práce studující ghanský druh *Leishmania* sp. vyšla v roce 2015 (Kwakye-Nuako et al. 2015). Fylogenetická analýza genu pro ITS1 zařadila tento druh do komplexu *L. enriettii* s tím, že se jedná o druh nejpříbuznější PCM2 označený ve studii jako „*L. siamensis*“ (98,29% identita), následovaným *L. enriettii* (90,26% identita) (Obr. 2). Druhý fylogenetický strom na základě sekvence genu pro RNA pol. II také řadí ghanský druh do komplexu *L. enriettii*, i když zde byl jako nejpodobnější určen druh *L. enriettii* (98,42% identita), následován PCM2 (98,08% identita), bootstrapová podpora je zde ale jen 48 %.

### 2.3. Souhrn

Porovnáním dosud vyšlých studií se jeví jako nejucelenější fylogenetický strom hodnotící příbuznost druhů v rámci komplexu *L. enriettii* ten, který v roce 2015 vytvořili Kwakye-Nuako et al. už proto, že v této studii bylo analyzováno všech pět druhů podrodu *L. (Mundinia)* najednou (obr. 4). Nejpříbuznější jsou si *Leishmania* sp. izolovaná v Ghaně a „*L. siamensis*“. *Leishmania martiniquensis* a *L. macropodum* se větví bazálně od ostatních druhů a *L. enriettii* leží mezi druhy *L. macropodum* a „*L. siamensis*“.

Podrod *L. (Mundinia)* (či *L. enriettii* komplex) se prakticky ve všech studiích, které se jeho fylogenetickým zařazením zabývaly, větví bazálně od ostatních podrodů rodu *Leishmania* (obr. 1-5). Pokud jde o jeho příbuznost s těmito ostatními podrody leishmanií, pak lze asi nejvíc věřit studii Espinosa et al. (2016), která kvantitativně hodnotí příbuznost s ostatními podrody a je v ní uvedeno, že se *L. (Mundinia)* větví bazálně od *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)* a *L. (Sauroleishmania)* s tím, že je nejpříbuznější (92 resp. 96% podobnost) s *L. (Leishmania)* a s *L. (Sauroleishmania)* (87 resp. 94% podobnost).

Monofyletický původ tohoto podrodu dokazuje také studie Barrat et al. (2017), která nejen, že se s ostatními publikovanými studiemi shoduje bazálním odvětvením podrodu *L. (Mundinia)* od ostatních podrodů rodu *Leishmania*, ale zároveň je v ní odhadnuta doba odvětvení jednotlivých druhů (obr. 5). Barrat et al. (2015) využili známou dobu oddělení Austrálie od Jižní Ameriky pro kalibraci oddělení nově popsáného druhu *Zelonia australiensis* od jeho sibling species *Z. costaricensis* z Jižní Ameriky. Na základě této znalosti pak odhadli dobu vzniku dvojhositelských leishmanií (skupiny *Euleishmania* a *Paraleishmania*) z jednohositelských předků do období existence Gondwany ve střední křídě (před cca 91 mil let). Z hlediska fylogeneze podrodu *L. (Mundinia)* je zde významný odhad doby odvětvení *L. macropodum* od ostatních druhů - tato doba je stejně jako v případě *Zelonia australiensis* shodná se vznikem Austrálie jako samostatného kontinentu. Tento fakt podporuje hypotézu vzniku leishmanií na starodávném superkontinentu dle Harkins et al. (2015). Autoři vysvětlují kosmopolitní rozšíření leishmanií podrodu *L. (Mundinia)* tím, že jeho jednotlivé druhy vznikly ze společného předka vikariantní speciací po rozpadu tohoto superkontinentu.



Obr. 5 - Fylogenetický strom vzniklý porovnáním genů pro 18S rDNA a velkou podjednotku RNA pol. II. Čísla mimo závorky znamenají dobu odštěpení v milionech let. Čísla v závorkách znamenají bootstrapovou podporu pro jednotlivé metody vytváření stromu. Černý kosočtverec znamená 100% podporu pro všechny tři metody, nevybarvený 99%, černý kruh 60% nebo méně a černý čtverec znamená collapsed node. Hvězdičkou je označena *Z. australiensis*. Jednotlivé větve mají barvu podle aktuálního známého rozšíření druhu (Barrat et al. 2017).

Pro formování kladogramů se dříve používala izoenzymová analýza, která je v dnešní době nahrazována metodou sekvenace a následného porovnání genů, které nejsou příliš konzervované, tudíž vypovídají o příbuznosti, a je na jejich základě možné odlišit jednotlivé druhy (jako např. geny pro části RNA pol. II, DNA pol.  $\alpha$ , HSP70 a ITS1). Použitím těchto metod lze docílit mnohem spolehlivějších a přesnějších výsledků než izoenzymovou analýzou, díky čemuž postupně přebírají majoritní úlohu při tvorbě fylogenetických stromů.

### 3. Popis jednotlivých druhů podrodu *L. (Mundinia)*

#### 3.1. *Leishmania enriettii*

Druhem definujícím podrod *L. (Mundinia)* je *L. enriettii*, která byla objevena Medinou v roce 1946 v laboratorních morčatech z Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas de Curitiba v Brazílii a popsána v roce 1948 (Muniz a Medina, 1948). Lainson a Shaw (1997) uvádějí, že přestože není *L. enriettii* infekční pro člověka, tak se díky dobrému růstu na krevním agaru a přítomnosti velkých a dobře detekovatelných amastigotů v kožních lézích brzy stala oblíbeným laboratorním modelem pro imunologické a chemoterapeutické studie rodu *Leishmania*. Tento druh bývá v literatuře často označován jako záhadná leishmanie, protože po popsání Munizem a Medinou se po celých 20 let neobjevil další izolát a původ onemocnění morčat zůstával záhadou. Až v roce 1967 byla *L. enriettii* znovu izolována z domácích morčat na předměstí Curitiba (Luz et al. 1967 v Machado et al. 1994) a na dlouhou dobu se jednalo opět o ojedinělý případ. K dalšímu zachycení nákazy *L. enriettii* došlo až o více než 20 let později, když si manželský pár ze São Paula v červnu roku 1988 pořídil na trhu pár morčat a o 7 měsíců později (leden 1989) je s sebou odvezli na farmu v Capão Bonito (hranice São Paulo-Paraná), poblíž pozůstatků blahočetového pralesa. O nějaký čas později (v literatuře neupřesněno) došlo na uších morčat k vývinu rychle rostoucích a ulcerujících lézí. Pomocí izoenzymové analýzy, neobvykle velkých amastigotů a projevu leishmanie na pokusných morčatech a v kultuře bylo potvrzeno, že se jedná o *L. enriettii* (Machado et al. 1994).

##### 3.1.1. Oblast výskytu onemocnění

Případů, kdy došlo k identifikaci *L. enriettii* je pouze několik a nikdy nebyla publikována práce o rozsáhlejším terénním výzkumu, který by tento druh zachytil, protože je těžké určit přesnou oblast výskytu. Vzhledem k potvrzeným případům se bude ale nejspíše jednat o předměstské zóny a přilehlé lesy východního pobřeží Brazílie, kde se vyskytuje i *Lutzomyia monticola*, což je s největší pravděpodobností přenašeč *L. enriettii* (viz. dále).

##### 3.1.2. Popis onemocnění

*Leishmania enriettii* způsobuje kožní (Muniz, Medina, 1948) a viscerální (Seblova et al. 2015) formu onemocnění u morčat *Cavia porcellus* a kožní formu onemocnění u křečků *Mesocricetus auratus* (Belehu et al. 1976), přičemž se u každého zvířete projevuje jiným způsobem.

Při použití infekční dávky  $1 \times 10^6$  amastigotů dochází u morčat během dvou až tří týdnů po inokulaci k tvorbě ulcerujících lézí, které se během 8-16 týdnů sami zhojí (Bryceson et al. 1970). Po inokulaci  $1 \times 10^7$  promastigotů ze stacionární fáze kultury do ušních boltců se léze morčatům vyvinuly během 5-6 týdnů po infekci, velikost lézí dosáhla až 14 x 10 mm v 9-12 týdnu po infekci, kdy byl pokus ukončen. Po inokulaci stejného množství leishmanií do oblasti čenichu se morčatům také tvořily rychle rostoucí nekrotizující a ulcerující léze (obr. 6) (Seblova et al. 2015).

Na rozdíl od infekcí křečků dochází i k vývinu metastatických lézí, které však většinou neulcerují, což je pravděpodobně způsobeno jejich lokalizací v hlubší vrstvě dermis. Během 8-9 týdnů si zvířata vytvoří imunitu vůči *L. enriettii* a veškeré další pokusy o jejich infekci vedou k negativním výsledkům (Byceson et al. 1970). Podle studie z roku 2015 dochází u morčat i k visceralizaci a napadnutí sleziny a lymfatických uzlin s četností 20-500 parazitů na orgán (Seblova et al. 2015).

U křečků dochází v místě inokulace  $1 \times 10^7$  promastigotů ze stacionární fáze kultury k vývinu neulcerujících lézí (obr. 7), které se až do 5. týdne po infekci zvětšují, poté dochází k jejich zmenšování a během 10-14 týdnů k úplnému zhojení (Seblova et al. 2015). Při pokusech iniciovaných inokulací  $2 \times 10^6$  amastigotů velikost lézí koreluje s množstvím živých parazitů (Tab. 1) a důležité je, že léze vznikají pouze v místě inokulace a křečci jsou po zhojení lézí imunní vůči další nákaze (Belehu et al. 1976).

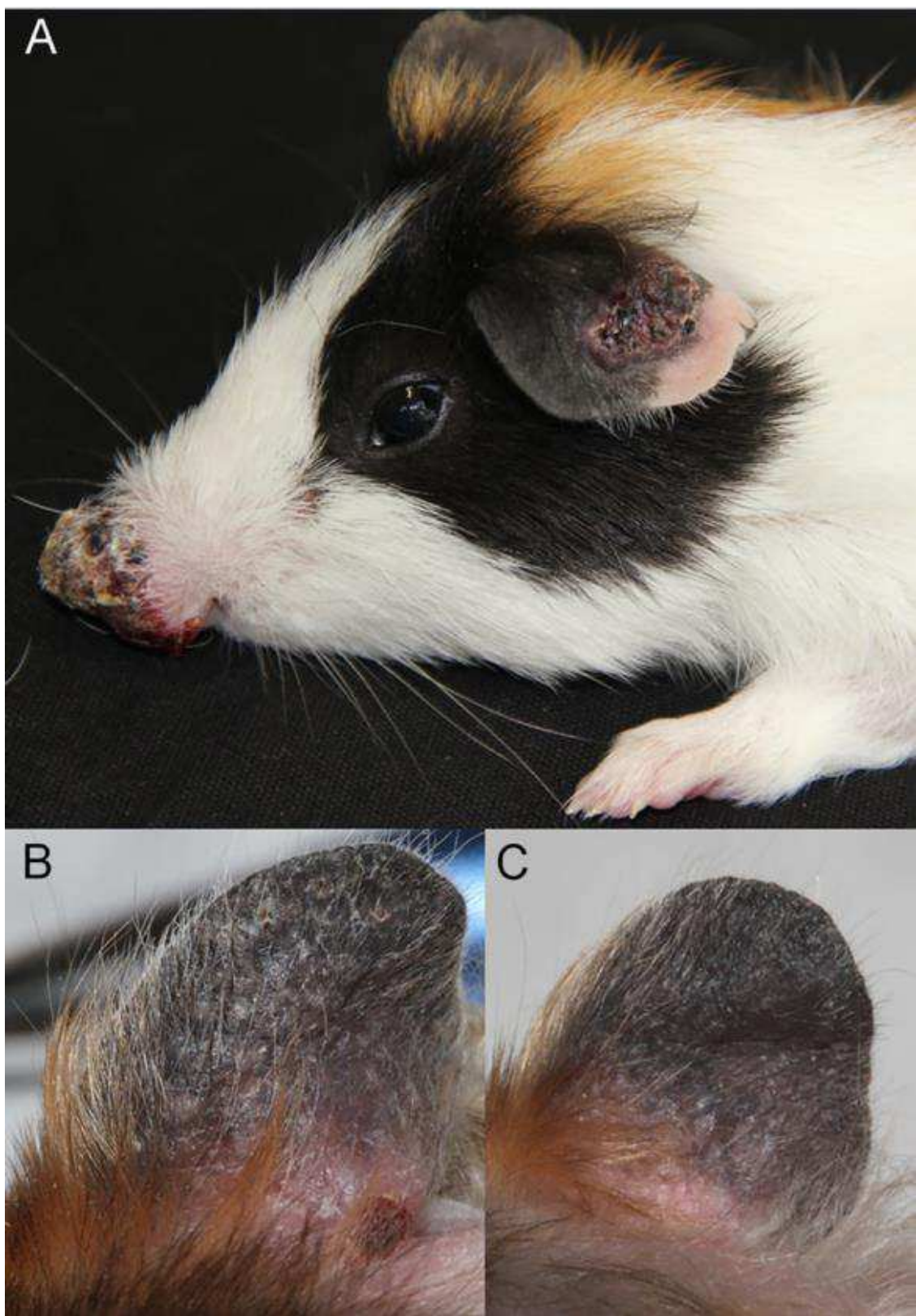
**Tab. 1** – Souvislost mezi laterální tloušťkou čenichu s počty parazitů v křečcích po intradermální inokulaci  $2 \times 10^6$  amastigotů *L. enriettii* (Belehu et al. 1976).

Doba infekce (týden od inokulace)	Počet zvířat s živými parazity	Průměrné zvětšení laterální šířky čenichu (%)	Průměrný počet parazitů v tkáni infikovaného čenichu ( $\times 10^6$ ) <sup>a</sup>
1	6/6	21,0 ± 2,0 <sup>b</sup>	6,1 ± 0,5
2	6/6	45,0 ± 5,3	8,4 ± 1,2
3	6/6	47,0 ± 15,1	8,7 ± 0,4
4	6/6	85,0 ± 10,8	13,8 ± 1,9
5	6/6	112,0 ± 22,9	25,3 ± 5,5
6	6/6	79,0 ± 31,4	6,1 ± 0,5
8	3/6	5,0 ± 1,0	2,9 ± 0,9
10	1/6	0,0 ± 0,0	2,4 ± 0,1
12	0/6	0,0 ± 0,0	
14	0/6	0,0 ± 0,0	

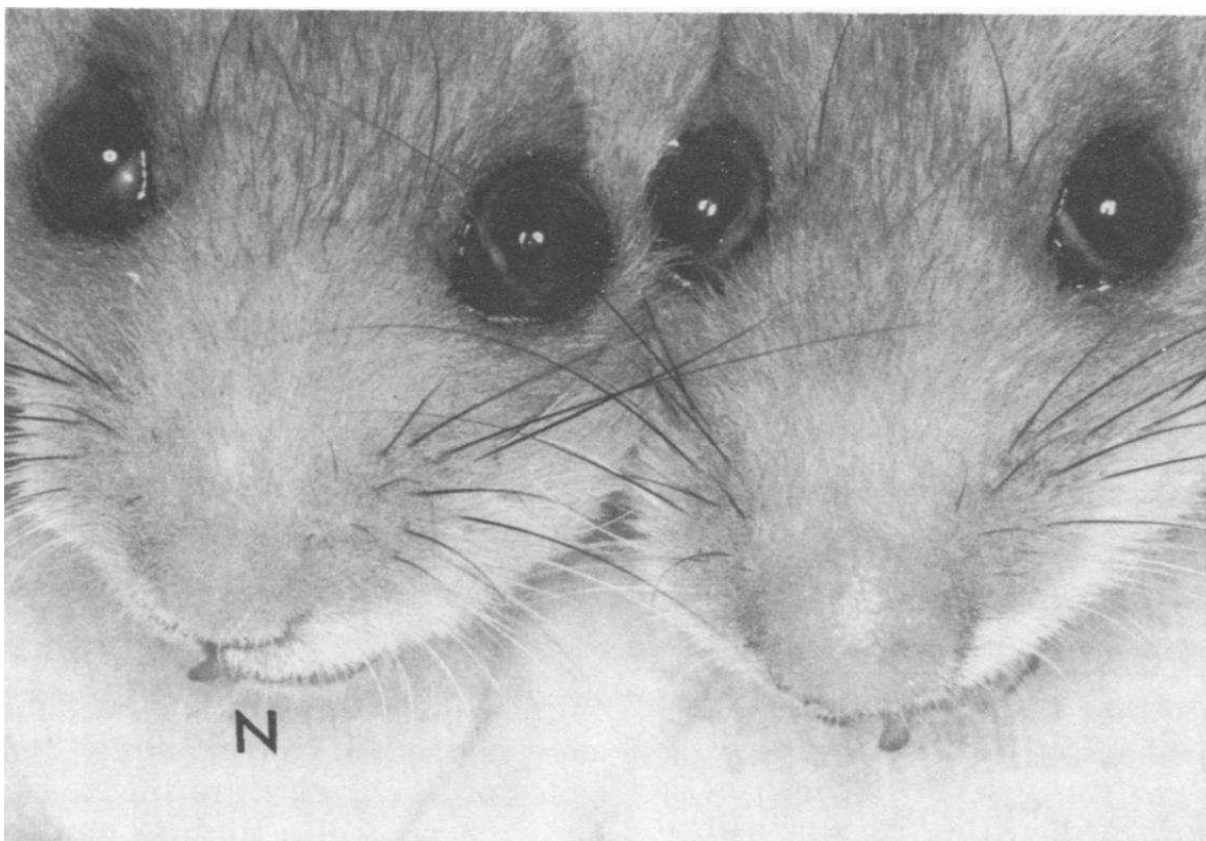
<sup>a</sup> Celá oholená část čenichu byla odstraněna, zhomogenizována a paraziti byli odděleni filtrací skrz jemnou nylonovou síťku a spočítání pomocí hemocytometru.

<sup>b</sup> Průměr ± standartní odchylka





Obr. 6 – Kožní symptomy na morčeti nakaženém *L. enriettii*. Manifestace infekce na uchu a nose morčete 12 týdnů po infekci (A). Fotografie stejného ucha zlatého křečka 6 týdnů po infekci (B) a 12 týdnů po infekci (C).



Obr. 7 – Neulcerující léze na nose syrského křečka 4 týdny po intradermální inokulaci  $2 \times 10^6$  amastigotů *L. enriettii* do čenichu porovnané se stejně starým kontrolním křečkem (N) (Belehu et al. 1976).

### 3.1.3. Přenašeči

Za nejpravděpodobnějšího přenašeče je považována *Lutzomyia monticola* nalezená ve zbytcích blahočetového pralesa, kde byla nachytána na kmenech stromů, v hnízdech vačic a na lidského dobrovolníka. V roce 2015 bylo potvrzeno, že se *L. enriettii* vyvíjí v *Culicoides sonorensis*, což vede k domněnce, že by *L. enriettii* mohla být v přírodě přenášena tiplíky, ovšem tiplíky jiného druhu, protože areál *C. sonorensis* je omezen na Severní Ameriku (Seblova et al. 2015). Autoři testovali vývoj *L. enriettii* také ve flebotomech druhu *Lutzomyia longipalpis* a tiplících druhu *C. nubeculosus*, ovšem v *L. longipalpis* leishmanie jen výjimečně kolonizovaly stomodeální valvu a v *C. nubeculosus* byly vydefekovány se zbytky nestrávené potravy. Pro 100% identifikaci přirozeného přenašeče musí být provedeno další laboratorní testování i terénní výzkumy.

### 3.1.4. Rezervoárová zvířata

Identita rezervoárového zvířete pro *L. enriettii* zůstává prozatím záhadou. Vzhledem k tomu, že jedinými zvířaty, u kterých bylo dosaženo signifikantních výsledků jsou domácí morčata, bylo by logické hledat rezervoárové hostitele mezi hlodavci z podřádu Caviomorpha. Ovšem pokusy o experimentální infekci divokých morčat *Cavia aperea* nebyly úspěšné, stejně jako pokusy o infekci dalších savců jako např. makaků rhesus, krys, myši či psů (Muniz, Medina, 1948).

### 3.2. *Leishmania martiniquensis*

Geograficky nejrozšířenějším a spektrem živočichů, u kterých vyvolává onemocnění, asi nejpestřejším zástupcem podrodu *L. (Mundinia)* je *L. martiniquensis*, které bude věnována tato podkapitola.

Na karibském ostrově Martinik byl od roku 1917 celkem třikrát popsán případ lidské kutánní leishmaniózy, ale parazit nebyl podroben důkladnější studii (Boisseau-Garsaud et al. 2000) a není tedy jisté, zda-li se jednalo právě o *L. martiniquensis*, proto nebudou v této práci brány tyto případy v potaz. V roce 1992 byla *L. martiniquensis* poprvé izolována z HIV pozitivního pacienta a nesprávně určena jako nižší jednohostitelský trypanosomatid hmyzu, který jen kvůli pacientově imunodeficienci způsobené virem HIV vyvolal jeho onemocnění. Tento izolát byl označen jako MAR1 (Dedet et al. 1995). V roce 1997 byl na témže ostrově nalezen další pacient s lézí na pravém obočí, tentokrát HIV negativní. Izoenzymovou analýzou bylo potvrzeno, že zodpovědný parazit je stejný jako v předchozím případě a byl označen jako MAR2 (Boisseau-Garsaud et al. 2000). Ke správnému fylogenetickému zařazení došlo o 12 let později, kdy byla *L. martiniquensis*, v té době nepopsaná a označená jako MAR1, zařazena do bazálně se odštěpující větve společně s *L. enriettii* (viz. výše) (Noyes et al. 2002). K popsání druhu *L. martiniquensis* došlo až v roce 2014 (Desbois et al. 2014).

#### 3.2.1. Oblast výskytu

Do roku 2014 se věřilo, že je *L. martiniquensis* endemitem ostrova Martinik, ale Pothirat et al. (2014) dokázali, že se jedná o téměř celosvětově rozšířeného parazita, když potvrdili, že se o nákazu druhem *L. martiniquensis* jedná ve skutečnosti i v autochtonních případech koní z Floridy, Německa a Švýcarska (Reuss et al. 2012, Müller et al. 2009), skotu ze Švýcarska (Lobsinger et al. 2010) a lidí z Thajska (Pothirat et al. 2014), o kterých se dříve myslelo, že jsou způsobené druhem „*L. siamensis*“, jehož biologie je popsána níže. Tím pádem je tento druh geograficky nejrozšířenější z podrodu *L. (Mundinia)* a jedním z nejrozšířenějších druhů rodu *Leishmania* vůbec.

#### 3.2.2. Popis onemocnění

Vzhledem k velice rozsáhlému areálu výskytu tohoto druhu vedla pravděpodobně koevoluce k adaptaci na různé lokální hostitele, a proto nalezneme *L. martiniquensis* jak ve formě, kdy infikuje pouze zvířata, tak i ve formě, kdy nakazí i člověka (spíše se asi jedná o nákazy náhodného charakteru, kdy je člověk jen vedlejší hostitel, zoonózy). V této podkapitole budou shrnuty projevy onemocnění známé ze všech areálů výskytu.

U koní způsobuje *L. martiniquensis* kutánní formu onemocnění charakterizovanou ulcerujícími lézemi s možným vývinem difuzní formy. Léze jsou nejčastěji lokalizovány na hlavě, uších a hrudi (Tab. 2) (Müller et al. 2009). U jediného zdokumentovaného případu onemocnění skotu došlo k vývinu difuzní kožní formy onemocnění charakterizované velkými ulcerujícími vředy

rozšířenými na různých částech těla (Obr. 8) (Lobsinger et al. 2010). Při experimentální infekci myši BALB/c došlo k visceralizaci onemocnění a následné identifikaci parazita v játrech, slezině, lymfatických uzlinách a v mozku (Garin et al. 2001).

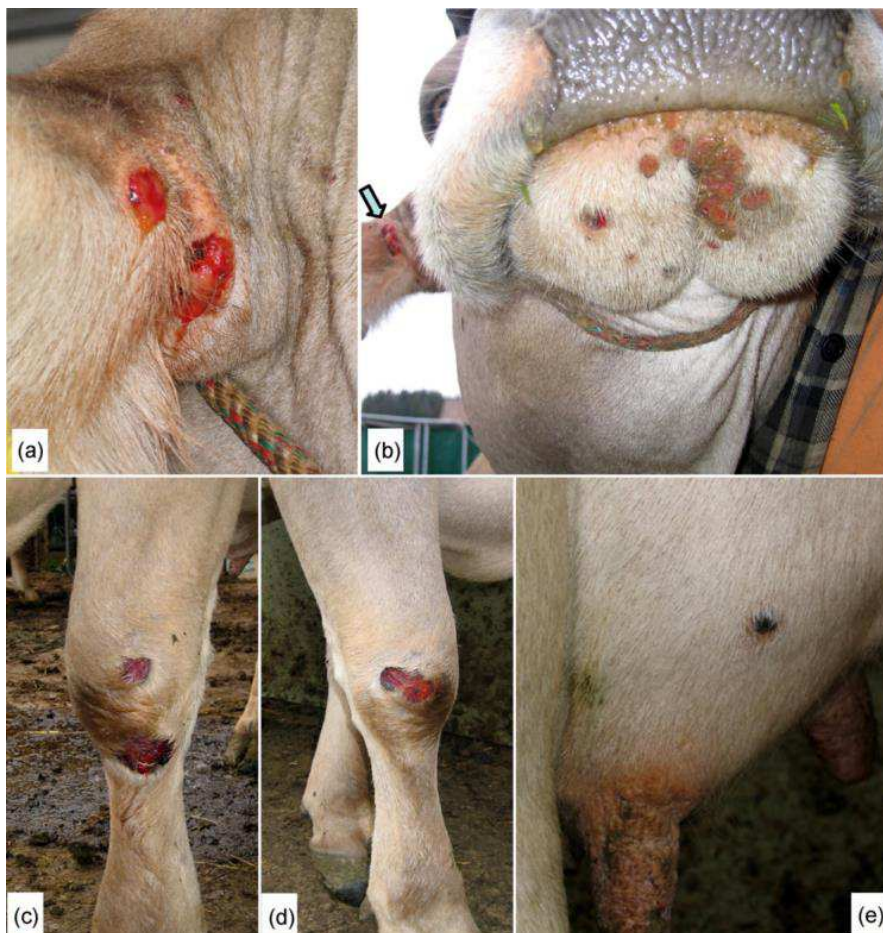
**Tab. 2** - Anamnéza a klinická data 9 případů koní s kutánní leishmaniózou (Müller et al. 2009).

Číslo případu	Věk (roky)	Pohlaví	Umístění v době nálezu	Původ	Počet nodulů	Umístění nodulů	Dodatečné informace
1	5	H/Ka <sup>a</sup>	Bavorsko	Německo <sup>b</sup>	5-7	Hlava	Po chirurgickém odstranění nedošlo k relapsu
2	3	H	Porýní	Island	15-20	Hlava	Po chirurgickém odstranění nedošlo k relapsu
3	5	H/Ka	Porýní	Německo <sup>b</sup>	2	Hlava, bok	Jeden nodul byl chirurgicky odstraněn a nedošlo k relapsu, ostatní se samy zhojily
4	3	Neznámé	Neznámé	Neznámý	Neznámý	Podpaždí	Žádné
5	7	H/Ka	Porýní	Dánsko	1	Ucho	Jednou došlo k relapsu
6	6	H	Porýní	Švýcarsko <sup>b</sup>	1	Hlava	Spontánní zhojení
7	17	H/Ka	Porýní	Německo	Mnohočetné	Hrud'	5 let byly noduly voskovány a mizely, některé zůstaly
8	6	K <sup>a</sup>	Severní Švýcarsko	USA	Mnohočetné	Hlava	Noduly se vyvinuly během březosti, relaps po porodu
9	8	H/Ka	Severní Švýcarsko	Maďarsko	1	Hlava	Kůň byl 2x v jižní Francii, po chirurgickém odstranění nedošlo k relapsu

<sup>a</sup>H: hřebec, K: klisna, Ka: kastrováný

<sup>b</sup> Pobyť mimo střední Evropu vyloučen anamnézou.





Obr. 8 – Klinické projevy kutánní leishmaniózy u krávy: ulcerující a exsudativní kožní léze na bázi ucha (a); četné kruhovitě plakovité léze a noduly na čenichu (b) (šipka ukazuje na léze na uchu zvětšené na obrázku (a)); velké ulcerující kožní léze na kotníchích (c a d) a léze na vemeni (Lobsinger et al. 2010).

U lidí se projevuje onemocnění druhem *L. martiniquensis* celým spektrem forem leishmanióz, kromě kožně slizniční. Kožní formu charakterizovanou jedinou lézí popisuje například případ z Martiniku z roku 1997, kdy se u nakaženého pacienta vyskytla cca 2 cm široká, ulcerující léze na pravém obočí. Po aplikaci léčby došlo během dvou měsíců k zahojení léze a k vytvoření jizvy v místě infekce (Boisseau-Garsaud et al. 2000). Difuzní kožní formou trpěl zatím jediný zdokumentovaný pacient (HIV pozitivní), u kterého se neulcerující léze vyskytovaly po celém těle, včetně rukou a hlavy (Obr. 9) (Dedet et al. 1995). Při onemocnění viscerální formou trpěli pacienti typickými příznaky pro toto onemocnění, kterými jsou například hepatosplenomegalie, krevní anémie, zvýšená teplota a bolesti břicha a hlavy (Sukmee et al. 2008, Liautaud et al. 2015). Velmi zajímavý je případ HIV pozitivního člověka, u kterého se vyvinula jak difuzní kožní forma charakterizovaná ulcerujícími lézemi na trupu a dolních končetinách (Obr. 10), tak viscerální forma. Navíc byla DNA *Leishmania martiniquensis* identifikována i v jeho slinách, což teoreticky naznačuje možnost přenosu z člověka na člověka orální cestou, ale tato hypotéza musí být důkladně prostudována, aby mohla být potvrzena (Chusri et al. 2012).



Obr. 9 – (A) Mnohočetné nodulární kutánní léze na pacientově ruce (B) Giemsou barvený roztěr jedné léze s četnými amastigoty (Dedet et al. 1995).



Obr. 10 – Mnohočetné papulární a ulcerující léze na zádech pacienta (Chusri et al. 2012).

### 3.2.3. Přenašeči

Na žádné z lokalit nebyl zatím spolehlivě identifikován vektor zodpovědný za přenos *L. martiniquensis*, ovšem na Martiniku se vyskytuje pouze *Lutzomyia atroclavata* a dle nepublikovaných dat Desboise také druh *L. caynensis*, tudíž přenašečem bude s největší pravděpodobností alespoň jeden z těchto druhů (Desbois et al. 2014).

V Thajsku se podle výzkumu z roku 2013 jedná s největší pravděpodobností o druh *Sergentomyia (Neophlebotomus) gemmea*, protože v samicích těchto flebotomů byla nalezena DNA *L. martiniquensis* (Kanjanopas et al. 2013). Navíc se jedná o nejpočetnější druh rodu *Sergentomyia* a *Phlebotomus* v oblasti výskytu onemocnění (Tab. 3). Ovšem nález DNA ještě není důkazem, že daný druh je schopen leishmanie přenést – zatím žádný druh rodu *Sergentomyia* nebyl definitivně potvrzen jako přenašeč leishmanií (Maia and Depaquit, 2016). Druhým nejpočetnějším druhem je *S. iyengari*, který tím pádem také nemůžeme vynechat ze seznamu podezřelých. Za zmínku stojí určitě také nález *Phlebotomus argentipes*, který slouží jako přenašeč *L. donovani* a byl odchycen v různých oblastech výskytu onemocnění v Thajsku. Jeho roli jako přenašeče *L. martiniquensis* však autoři považují za málo pravděpodobnou kvůli nízkému zastoupení tohoto druhu v odchyceném vzorku (Sukra et al. 2012).

Na Floridě by mohl *L. martiniquensis* přenášet některý z druhů *Lutzomyia shannoni*, *L. cubensis*, *L. vexator* a *L. cruciata* (Reuss et al. 2012). V Evropě se zatím nepodařilo objevit žádného možného přenašeče onemocnění, ovšem spektrum druhů flebotomů přítomných v oblastech výskytu leishmanií je velmi omezené (v Německu a Švýcarsku se vyskytují pouze *P. mascitii* a *P. perniciosus*) (ECDC, 2017). Vzhledem k příbuznosti *L. martiniquensis* s australskými leishmaniemi nelze ovšem teoreticky vyloučit ani roli tiplíků (Ceratopogonidae) v přenosu tohoto druhu.

**Tab. 3** - Druhové složení 1451 odchycených samic flebotomů ze třech studovaných lokalit v jižním Thajsku během května – června roku 2009 (Sukra et al. 2012).

Druh	Počet (%)		
	Phang-nga	Suratthani	Nakonsitammarat
<i>S. gemmea</i>	763 (93,4)	327 (74,4)	91 (46,9)
<i>S. iyengari</i>	31 (3,8)	71 (16,1)	56 (28,9)
<i>S. barraudi</i>	17 (2,1)	14 (3,2)	38 (19,6)
<i>S. indica</i>	-	23 (5,2)	7 (3,6)
<i>S. silvatica</i>	-	-	1 (0,5)
<i>S. perturbans</i>	-	-	1 (0,5)
<i>P. argentipes</i>	6 (0,7)	5 (1,1)	-
Celkem	817	440	194

### 3.2.4. Rezervoárová zvířata

Na žádné lokalitě zatím, podobně jako v případě přenašečů, nedošlo k definitivní identifikaci rezervoárového zvířete. Na Martiniku se pravděpodobně jedná o jeden nebo více z importovaných druhů hlodavců a na ostatních lokalitách se může kromě různých druhů hlodavců jednat také o dobytek, koně, kočky a psy (Noyes et al. 2002, Kongkaew et al. 2007, Müller et al. 2009, Sukra et al. 2012).

### 3.3. PCM2 neboli „*L. siamensis*“

V literatuře je o všech případech leishmaniózy z Thajska, vyjma těch, kdy byla potvrzena *L. donovani* a *L. infantum*, hovořeno jako o případech způsobených druhem „*L. siamensis*“, ale studie Pothirat et al. (2014) dokázala, že se ve skutečnosti vždy jednalo o *L. martiniquensis*.

Zatím jediný zdokumentovaný případ lidského onemocnění, kdy skutečně šlo o „*L. siamensis*“, byla HIV pozitivní žena trpící difúzní kožní a viscerální leishmaniózou v provincii Trang v Thajsku. Parazit byl označen jako PCM2 Trang a zařazen do větve společně s *L. enriettii*.

Žena trpěla různě velkými, tvrdými, kožními noduly po celém těle, s největším počtem na obličeji, trupu a dolních končetinách, dále hepatomegalií a silnou anémií. Průběh léčby bohužel nelze popsat, neboť 2 týdny před nasazením amphotericinu B zemřela (Bualert et al. 2012).

O identitě přenašečů a rezervoárových zvířat lze jen polemizovat, neboť neexistují terénní data o nálezů tohoto kmene v krevsajících členovcích a divokých nebo domácích savcích, ale vzhledem k blízké genetické a ekologické podobnosti s druhem *L. martiniquensis* je velmi pravděpodobné, že se bude jednat o stejné spektrum druhů živočichů.

### 3.4. *Leishmania* sp. způsobující kožní leishmaniózu v Ghaně

Do data vytvoření této práce byla vydána pouze jedna studie cílená přímo na zde popisovaný nový druh *Leishmania* sp. (Kwakyé-Nuako et al. 2015) a níže uvedený popis onemocnění vychází převážně z ní. Studie Kweku et al. (2011) se zaměřuje na celkovou situaci týkající se leishmaniózy v oblasti Volta, kde se vyskytuje i *L. major* a nově také *L. tropica* (Nzeli et al. 2014). Často je bohužel nejasné, zda je v jejich studii popisována nová *Leishmania* sp., *Leishmania major* nebo *L. tropica*.

#### 3.4.1. Oblast výskytu a historie onemocnění

Tento druh *Leishmania* sp. izolovaný v oblasti Volta na východě Ghany, kde způsobuje kožní formu leishmaniózy se mezi tamějšími obyvateli stal známým jako nemoc agbamekanu. To v překladu znamená: „Dar od někoho, kdo se vrátil z cesty“ a souvisí pravděpodobně s místní vírou, že onemocnění k nim bylo zavlečeno s častou migrací lidí ze sousedícího Toga (Kwakyé-Nuako et al. 2015).

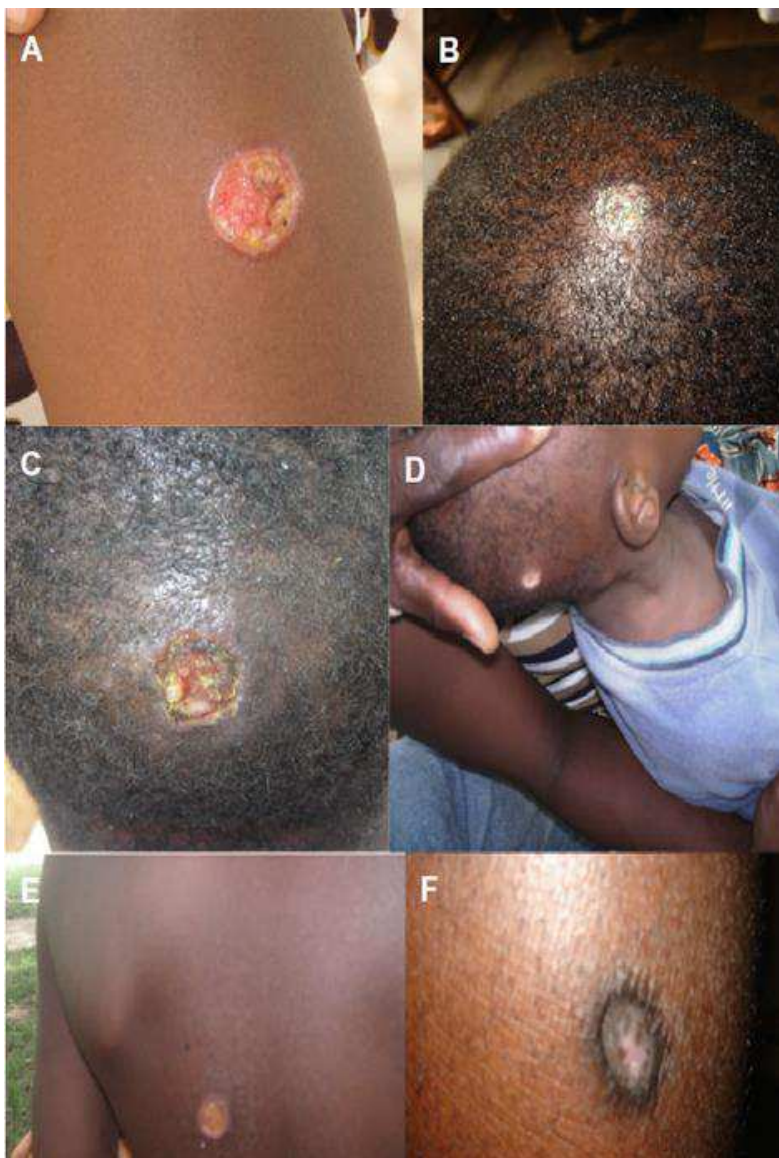


Okres Ho, místo s nejčastějším výskytem leishmaniózy v oblasti Volta, se rozkládá ve vlhkých polo-opadavých lesních zónách kolem města Ho s vesnicemi roztroušenými v okolí. Podle klinických příznaků bylo v této oblasti v letech 2002 a 2003 zaznamenáno 8533 případů z celkových 8876 v oblasti Volta (Kweku et al. 2011). Nicméně parazitologicky potvrzených a do druhu určených diagnóz je velmi málo, a tudíž nelze určit, kolik lidí je zde ve skutečnosti nakaženo novým druhem *Leishmania* sp., neboť se ve zdejší oblasti vyskytuje i *L. major* (Kweku et al. 2011) a *L. tropica* (Nzulu et al. 2014).

V lednu 2006 a únoru 2007 byla ve vesnici Taviefe, která leží zhruba 10 km nad městem Ho, z lézí nakažených lidí vyizolována DNA *Leishmania* spp. Následná analýza genu pro SSU rRNA a ITS1 ukázala, že se jedná nový druh rodu *Leishmania*, který je nejpříbuznější druhu izolovanému z *Macropus rufus* v Austrálii (viz. níže) (Villinski et al. 2008). V roce 2014 bylo navštíveno 5 z 15 vesnic, ve kterých byla v minulosti hlášena leishmanióza a bylo nalezeno celkem 68 lidí s podezřením na kutánní leishmaniózu, 44 z nich vzato do studie a u 41 pak došlo k potvrzení přítomnosti leishmanií. Následná fylogenetická analýza zařadila tento druh do komplexu *L. enriettii* (Kwakye-Nuako et al. 2015). Patří tedy do později vytvořeného podrodu *L. (Mundinia)* (Espinosa et al. 2016).

#### 3.4.2. Popis onemocnění

Nejčastěji nakaženými jsou děti mladší 10 let (celkem 58 % případů), ale léze způsobené tímto druhem *Leishmania* sp. byly nalezeny i u kojenců a lidí starších 50 let. Ve všech případech se jednalo o kožní leishmaniózu s kruhovitými (v jednom případě oválnými) lézemi o průměru kolem 11 mm. Na člověku se nejčastěji nachází jedna léze, v některých případech i dvě až tři. Léze jsou většinou (53 %) lokalizované na hlavě, což může značit buď to, že vektor obecně preferuje jakoukoliv odkrytou část těla nebo to, že k sání preferuje hlavu. Nebyly zaznamenány žádné vážné komplikace během onemocnění, ale mezi časté symptomy patří např. zvýšená teplota, drobné bolesti a komplikace způsobené vředy. Průměrná doba samovolného zhojení lézí je 3,9 týdne a po odhojení zůstává na místě jizva (Obr. 11). Četnost onemocnění roste od června, kulminuje v září a upadá v listopadu, což pravděpodobně velmi úzce souvisí s kolísající početností vektorů (Kwakye-Nuako et al. 2015).



Obr. 11– Vzhled lézí z potvrzených případů lidské kožní leishmaniózy. Případy typických lézí ukázány na několika nemocných: (A) paže, (B-D) hlava, a (E) záda. (F) Příklad jizvy vznikající při hojení léze (Kwakye-Nuako et al. 2015).

### 3.4.3. Přenašeči

Ve Starém světě leishmanióza standardně přenášená druhy z rodu *Phlebotomus*, ale většina nachytaných jedinců v této oblasti patřila do rodu *Sergentomyia*. Konkrétně druhy *S. ingrami* a *S. hamoni* jsou zde podezřelé z přenosu, protože při analýze samic těchto druhů odchycených v lidských obydlích byla nalezena DNA *L. major* a *L. tropica* (Nzulu et al. 2014). I když (jak bylo uvedeno již výše) samotný nálezn DNA v nevydefekovaných samicích není důkazem jejich zapojení do přenosu daného parazita, není vyloučeno, že některý z druhů rodu *Sergentomyia* přeci jen přenáší tento nový druh leishmanie. Identifikovány byly i 2 druhy z rodu *Phlebotomus* – *P. rodhaini* a *P. duboscqi*, ale vzhledem k jejich velmi nízké početnosti v endemické oblasti je jejich úloha v přenosu *Leishmania* sp. v oblasti Volta pravděpodobně málo významná (Kweku et al. 2011).

#### 3.4.4. Rezervoárová zvířata

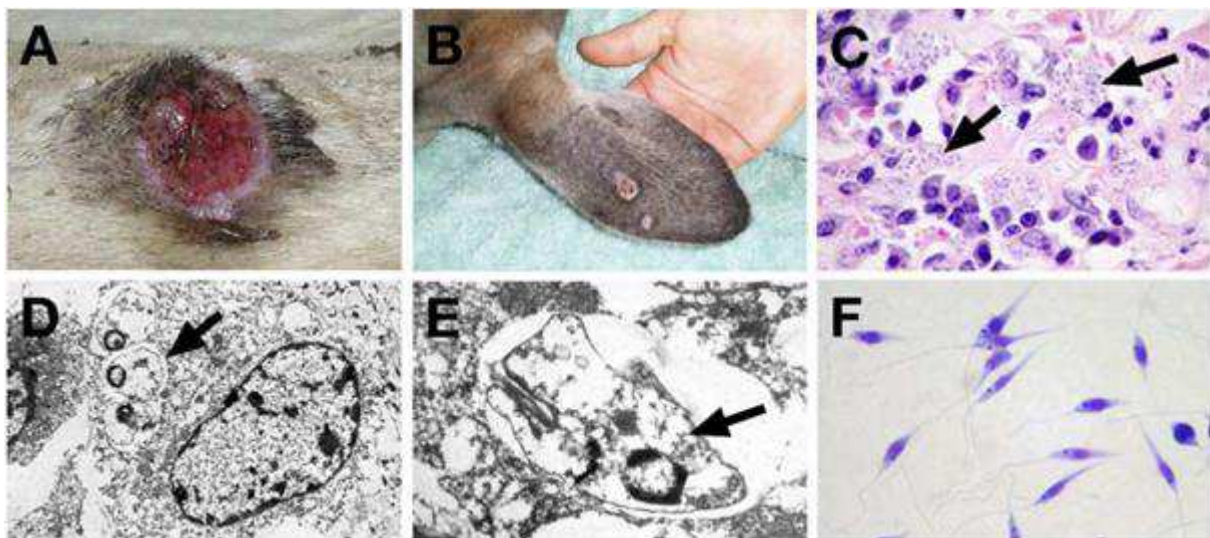
Rezervoárové zvíře v Ghaně zatím nebylo spolehlivě identifikováno. Lze jen konstatovat, že vzhledem k nálezům z okolních států a obecným znalostem o rodu *Leishmania* nelze vyloučit hlodavce, domácí zvířata a další divokou faunu (Kweku et al. 2011).

#### 3.5. *Leishmania macropodum*

##### 3.5.1. První záznam autochtonní leishmaniózy v Austrálii

Do roku 2004 se věřilo, že Austrálie a Antarktida jsou jediné dva kontinenty, na kterých se endemicky nevyskytují druhy rodu *Leishmania*. V Austrálii bylo sice zaznamenáno několik případů nákazy, ale vždy se jednalo o importované případy.

V roce 2004 byl v australském Severním teritoriu poprvé popsán případ autochtonní kutánní leishmaniózy u klokanů rudých (*Macropus rufus*). Z okrajů lézí byly odebrány vzorky, které byly analyzovány pomocí elektronové mikroskopie, PCR a sekvenace několika genů. Výsledkem těchto analýz bylo prokázání nového druhu *Leishmania* sp. (Rose et al. 2004), který byl v roce 2017 popsán a podle jediných známých hostitelů pojmenován jako *L. macropodum* (Barrat et al. 2017). Při pokusu o infekci myších makrofágů *in vitro* bylo zjištěno, že leishmanie jsou sice schopny infikovat hostitelské buňky, ale při inkubaci v 37 °C do 48 hodin hynou. Při 33 °C jsou schopny zůstat v buňkách živé po delší časový úsek. Autoři provedli i pokus o nákazu myši BALB/c *in vivo*. U nakažených myší nebyly pozorovány žádné léze ani jiné příznaky po dobu 6 měsíců a leishmanie nerostly v kultuře ze sleziny a lymfatických uzlin vyizolované 8 týdnů po infekci (Rose et al. 2004).



Obr. 12 – Fotografie kožních lézí a jejich původců - leishmanií. (A) ulcerující kožní léze z ocasu klokana rudého (*Macropus rufus*). (B) Léze z ucha klokana rudého. (C) Amastigoti v kožních makrofázích, barveno H&E, x 1000. (D) Amastigoti měřící 1,8 – 3,3  $\mu\text{m}$  x 1,0 – 1,8  $\mu\text{m}$  byli detekováni elektronovou mikroskopií v kožních biopsiích, (E) detailní snímek amastigota. (F) Promastigoti z kožních lézí narostli v kultuře, kteří měří 20 – 30  $\mu\text{m}$ , mají dlouhý bičík, centrální jádro a excentrický kinetoplast. Barveno Giemsou, x 1000. (Rose et al. 2004)

### 3.5.2. Popis onemocnění

U klokanů se léze vyskytovaly hlavně na ocase, vnitřních stranách předloktí, zadních nohách a na uších (Obr. 12), měřily v průměru 0,5 – 2 cm a byly charakterizovány mírným až výrazným průnikem do dermis. Kromě makrofágů obsahujících mnoho amastigotů se v okrajích lézí vyskytovalo menší množství plazmatických buněk a lymfocytů. Ve dvou případech se léze objevily i na kloace a v jednom případě na očích, což naznačuje možnost výskytu mukózní formy onemocnění (Dougall et al. 2009).

### 3.5.3. Přenašeči

Mezi lety 2006-2009 byly v oblasti kolem města Darwin různými metodami odchytávány různé druhy dvoukřídlého hmyzu za účelem nalezení přenašeče leishmaniózy v Austrálii. Byli identifikováni flebotomové rodu *Sergentomyia* (Tab. 4) a tiplíci rodu *Forcipomyia* (*Lasiohelea*). Zatímco při analýze rodu *Sergentomyia* nebyl nalezen žádný infikovaný jedinec, tiplíci rodu *Forcipomyia* (*Lasiohelea*) byli označeni za velmi pravděpodobné vektory australského druhu leishmanie. Jedná se o hmyz s denní aktivitou a na lokalitě byli odchyceni jedinci tří druhů *Forcipomyia* (*Lasiohelea*) *peregrinator*, *F. (Lasiohelea) townsvillensis* a dosud nepopsaný druh *F. (Lasiohelea)* sp.

*F. (Lasiohelea) townsvillensis* není s největší pravděpodobností přenašečem, neboť v žádném zkoumaném jedinci nebyla pomocí real-time PCR identifikována DNA *Leishmania* spp. U *Forcipomyia* (*Lasiohelea*) *peregrinator* byla identifikována DNA ve dvou případech, což odpovídá 6% prevalenci a u *F. (Lasiohelea)* sp. byla prevalence dokonce 13% (Tab. 5). Navíc při pitvách bylo ve *F. (Lasiohelea)* spp. nalezeno i ve vydefekovaných jedincích velké množství promastigotů, kteří v jednom případě tvořili ve střevě masu silně připomínající PSG zátku (je známo, že leptomonády leishmanií produkují v thorakální části střeva přenašeče PSG, což znesnadňuje flebotomům sání a podporuje přenos do hostitele (Rogers et al. 2012)). To vše podporuje hypotézu, že *F. (Lasiohelea)* sp. je vektorem přenašečím *Leishmania macropodum* způsobující kožní a kožně-slizniční formu leishmaniózy v Austrálii. Nelze vyloučit ani zapojení druhu *F. (Lasiohelea) peregrinator* do přenosu této leishmanie (Dougall et al. 2011). Schopnost vývoje *L. macropodum* a *L. enriettii* v tiplících byla nedávno potvrzena i experimentálně za použití severoamerického druhu tiplíka *C. sonorensis* (Seblova et al. 2015).

### 3.5.4. Rezervoárová zvířata

Živočichy, u kterých byl v Austrálii potvrzen výskyt leishmaniózy, jsou kromě klokana rudého (*Macropus rufus*) zmíněného výše také klokan horský východní (*Macropus robustus woodwardi*), klokan vraný (*Macropus bernardus*) a klokan hbitý (*Macropus agilis agilis*). Tyto další druhy klokanů zmiňuje druhá studie zaměřená na výzkum leishmaniózy v Austrálii. V roce 2009 byl v jedincích

těchto druhů, chovaných dlouhodobě v zajetí poblíž města Darwin také objeven druh *L. macropodum*, což bylo potvrzeno pomocí PCR genu pro mini-exony (Dougall et al. 2009).

Klokani druhů *M. rufus*, *M. robustus woodwardi* a *M. bernardus* nejsou v endemické oblasti okolo města Darwin (Severní teritorium) původní a byli chováni na farmě. Klokani druhu *Macropus agilis agilis* se sice v oblasti hojně vyskytují, ale popisování nakažení jedinci byli také drženi v zajetí. Jednalo se o mladá zvířata, která se s leishmaniózou pravděpodobně setkala poprvé v životě a léze se jim brzy zhojily, z čehož autoři vyvozují, že se nemusí jednat o rezervoárové zvíře, neboť asi má vrozenou imunitu. Ve volné přírodě tedy zatím nebylo spolehlivě identifikováno rezervoárové zvíře, ale je pravděpodobné, že se jedná o některý druh klokana (Dougall et al. 2009).

**Tab. 4** - Souhrnné údaje o odchycených a prozkoumaných *Sergentomyia* spp. pomocí real-time PCR zahrnutých ve studii (Dougall et al. 2011).

Druh	Samci	Samice	Celkem	Celkem zkoumáno
<i>S. queenslandi</i>	1752	1088	2840	1697
<i>S. hoogstraali</i>	47	11	58	44
<i>S. vanella</i>	16	2	18	13
<i>S. standfasti</i>	12	5	17	11
<i>S. spp</i>	58	57	115	53
Celkem	1885	1163	3048	1818

**Tab. 5** - Souhrnné údaje o tiplicích rodu *Forcipomyia (Lasiohelea)* prozkoumaných pitvou a real-time PCR (Dougall et al. 2011)

Druh	PCR (% pozitivních)	Pitvy (% pozitivních)	Celkem
<i>F. (Lasiohelea) peregrinator</i>	2/36 (6 %)	0/9 (0 %)	45
<i>F. (Lasiohelea) townsvillensis</i>	0/45 (0 %)	0/20 (0 %)	65
<i>F. (Lasiohelea) sp. 1</i>	3/20 (15 %)	2/16 (13 %)	36
<i>F. (Lasiohelea) spp.<sup>a</sup></i>	4/56 (7 %)	2/23 (9 %)	79
Celkem	157	68	225

<sup>a</sup>Neidentifikováno do druhu

#### 4. Závěr

Nově vytvořený podrod *L. (Mundinia)* se větví bazálně od ostatních podrodů rodu *Leishmania* a zahrnuje celkem 5 druhů – *L. enriettii*, *L. martiniquensis*, „*L. siamensis*“, *Leishmania* sp. způsobující onemocnění u člověka v Ghaně a *Leishmania macropodum*. V rámci této skupiny jsou si nejpříbuznější „*L. siamensis*“ a *Leishmania* sp. izolovaná v Ghaně, zatímco *L. martiniquensis* a *L. macropodum* se větví bazálně od ostatních druhů a *L. enriettii* leží mezi druhy *L. macropodum* a „*L. siamensis*“.

Dva z těchto druhů způsobují onemocnění pouze u zvířat a tři také u člověka. *Leishmania enriettii* vyskytující se na východním pobřeží Brazílie působí kožní a viscerální formu onemocnění u domácích morčat. Bohužel nebylo nikdy identifikováno rezervoárové zvíře, ale vzhledem k zachyceným nálezům se s největší pravděpodobností jedná o hystrikognátní hlodavce. Za pravděpodobného přenašeče je považována *L. monticola* nalezená v pralesích a městských částech poblíž hlášených případů, úspěšné experimentální infekce zase naznačují možnost zapojení tiplíků do jejího přenosu. V literatuře je *L. enriettii* označována za záhadný druh a není divu, neboť jednotlivé zdokumentované případy dělí leckdy i více než 20 let a o životním cyklu tohoto druhu v přírodě se dodnes ví opravdu málo, přestože je vědě známa už více než 70 let.

Druh *Leishmania macropodum* nalezneme v Severním teritoriu Austrálie a v současné době se jedná o jediný druh leishmanií v Austrálii. Způsobuje kožní a mukózní formu onemocnění klokanů, kteří jsou také zřejmě jeho rezervoárem. Tento druh leishmanie je pravděpodobně přenašečem tiplíky rodu *Forcipomyia*.

*Leishmania martiniquensis* je nejrozšířenější druh tohoto podrodu a způsobuje jak kutánní, tak viscerální formu leishmaniózy u zvířat i u lidí. Poprvé byla *L. martiniquensis* izolována na ostrově Martinik, po kterém má své jméno a poté byla objevena také v koních v USA, skotu a koních ve střední Evropě a v lidech v Thajsku. Bohužel se zatím s jistotou nepodařilo identifikovat rezervoárová zvířata, ale na Martiniku jde s největší pravděpodobností o některý z dovezených druhů hlodavců a v Thajsku se pravděpodobně jedná o kočky, psy, skot nebo tamější druhy hlodavců.

V USA a Evropě také není o rezervoárech známo nic bližšího. Mezi vektory mohou patřit různé druhy rodů *Lutzomyia* a *Sergentomyia* žijící v endemických oblastech, ale i zde je třeba provést ještě další výzkumy, než budeme moci pronést definitivní závěr. Na Martiniku jde pravděpodobně o jeden nebo oba druhy *L. atroclavata* a *L. shannoni*. V Thajsku je snad přenášena druhem *Sergentomyia gemmea* a v USA některým z floridských druhů rodu *Lutzomyia*. V Evropě zatím nebyly publikovány žádné výsledky terénních výzkumů zaměřených na identifikaci přenašeče, ale vzhledem k velmi omezenému množství druhů v endemických oblastech je možné do hledáčku zařadit druhy *P. perniciosus* a *P. mascitii*. Vzhledem k příbuznosti *L. martiniquensis* s australskými leishmaniemi nelze ovšem teoreticky vyloučit ani roli tiplíků (*Ceratopogonidae*) v přenosu tohoto druhu.

O druhu „*L. siamensis*“ bylo publikováno více prací, ale s jedinou výjimkou šlo ve skutečnosti vždy o *L. martiniquensis*. Druh „*L. siamensis*“ způsobil u pacientky současně nakažené virem HIV kožní i viscerální formu onemocnění najednou. O identitě vektorů a rezervoárových zvířat můžeme zatím jen spekulovat, ale vzhledem k blízké příbuznosti a překrývajícím se areálu výskytu s druhem *L. martiniquensis* se může jednat o stejné spektrum živočichů.

Pátým a zatím posledním druhem patřícím do podrodu *L. (Mundinia)* je *Leishmania* sp. objevená v Ghaně, která na hranicích Ghany a Toga způsobuje kutánní formu onemocnění tamějších obyvatel a je mezi nimi známá jako nemoc agbamekanu neboli „Dar od někoho, kdo se vrátil z cesty“. Bohužel zatím neznáme rezervoárová zvířata, ani vektory onemocnění.

Porovnáme-li jednotlivé fylogenetické studie zahrnující tyto druhy, zjistíme, že se všechny shodují v bazálním odvětvení podrodu *Leishmania (Mundinia)* od ostatních podrodů, což svědčí o dlouhé evoluční historii těchto druhů. Přesto byla většina těchto druhů objevena teprve nedávno (ghanský a australský druh, „*L. siamensis*“). V případě *L. enriettii* je sice druh znám již velmi dlouho, ale za dlouhá desetiletí došlo k zachycení pouze několika ojedinělých případů. Tato „skrytá existence“ je zřejmě dána tím, že se jedná o druhy udržované mezi divokými zvířaty, na něž jsou dlouhou koevolucí dobře adaptované a infekce probíhají asymptomaticky. K jejich objevu pak zřejmě došlo až po náhodné infikaci vedlejšího či náhodného hostitele vnímavého k onemocnění jako je morče domácí (*L. enriettii*), klokan na farmách (*L. macropodum*), domácí zvířata (*L. martiniquensis*) či člověk (v případě „*L. siamensis*“ i *L. martiniquensis* hlavně imunodeficientní jedinci).

Unikátním rysem podrodu je také široké geografické rozšíření těchto druhů – *Leishmania macropodum* je jedinou leishmanií vyskytující se v Austrálii a *L. martiniquensis* je jediným druhem v centrální Evropě. *Leishmania martiniquensis* má rozsáhlý areál výskytu od Karibiku a Floridy přes Evropu až po Thajsko a je také na základě všech fylogenetických analýz nejpůvodnějším druhem v rámci podrodu. Příbuzné fylogeneticky odvozenější druhy mohly tedy vzniknout vikariantní speciací po oddělení jejich areálu (vznik *L. macropodum* např. časově odpovídá oddělení australského kontinentu od Jižní Ameriky (Barratt et al. 2017)) či sympatrickou speciací – např. specializací na nové hostitele. Nelze ovšem také vyloučit, že některé oblasti současného výskytu *L. martiniquensis* jsou až výsledkem druhotného zavlečení parazita s cestovním ruchem či obchodem s dobytkem a jinými hospodářskými zvířaty (Harkins et al. 2015). Otázkou tedy zůstává, zda-li ostatní druhy tohoto podrodu vznikly přímo z *L. martiniquensis* nebo z jiného společného předka. V každém případě důkladnější poznání biologie zástupců tohoto ancestrálního podrodu *L. (Mundinia)* může pomoci objasnit fylogenezi rodu *Leishmania*.

V neposlední řadě je třeba poukázat na unikátní schopnost tohoto podrodu vyvíjet se nejen ve flebotomech, ale i v jiných druzích krevsajícího hmyzu – *L. macropodum* se vyvíjí v tiplicích a jejich experimentální infekce jihoamerickým druhem *L. enriettii* byly také úspěšné. Jelikož taxonomie

leishmanií (rozdělení do podrodů) do značné míry koreluje s odlišnostmi ve způsobu vývoje jednotlivých skupin v přenašečích, je identifikace přenašečů a detailní poznání interakcí leishmanií podrodu *L. (Mundinia)* s těmito přenašeči velkou výzvou pro další výzkum.

Další terénní i laboratorní výzkumy jsou tedy předpokladem porozumění biologii této unikátní, zajímavé a málo probádané skupině parazitů.

Souhrnné informace známé o jednotlivých druzích jsou uvedeny v Tab. 6 a jejich geografické rozložení je názorně ukázáno na Obr. 13.

**Tab. 6** – Souhrnný seznam druhů patřících do podrodu *L. (Mundinia)* společně se stručnou charakteristikou jednotlivých druhů.

Druh	Geografická distribuce	Objev	Rezervoárové zvíře	Vektor	Infekčnost pro člověka	Projev onemocnění
<i>L. enriettii</i>	východní Brazílie	1944	jihoameričtí hlodavci (infrařád Histricognathi)?	<i>L. monticola?</i> <i>Tiplíci?</i>	ne	CL, VL
<i>L. martiniquensis</i>	Martinik, Thajsko, Florida, Německo, Švýcarsko	1995	kráva, kočka, krysa, vačice, pes, kůň?	rody <i>Lutzomyia</i> a <i>Sergentomyia?</i>	ano	CL, DCL, VL
„ <i>L. siamensis</i> “	Thajsko	2009	???	rod <i>Sergentomyia?</i>	ano	DCL, VL
<i>L. sp. z Ghany</i>	Ghana	2015	???	???	ano	CL
<i>L. macropodum</i>	Severní teritorium Austrálie	2004	klokan	tiplíci rodu <i>Forcipomyia</i>	ne	CL





Obr. 13 – Geografické rozšíření druhů podrodu *L. (Mundinia)*.

## Reference:

- Barratt J, Kaufer A, Peters B, Craig D, Lawrence A, Roberts T, et al. (2017) Isolation of Novel Trypanosomatid, *Zelonia australiensis* sp. nov. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) Provides Support for a Gondwanan Origin of Dixenous Parasitism in the Leishmaniinae. *PLoS Negl Trop Dis* 11(<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005215>)
- Belehu, A., & Turk, J. L. (1976). Establishment of cutaneous *Leishmania enriettii* infection in hamsters. *Infection and Immunity*, 13(4), 1235–1241. <http://iaa.asm.org/content/13/4/1235.full.pdf>
- Boisseau-Garsaud, A. M., Cales-Quist, D., Desbois, N., Jouannelle, J., Jouannelle, A., Pratlong, F. & Dedet, J. P. (2000). A new case of cutaneous infection by a presumed monoxenous trypanosomatid in the island of Martinique (French West Indies). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94, 51–52. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90435-8](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90435-8)
- Bryceson, A. D. M., Bray, R. S., Wolstencroft, R. a., & Dumonde, D. C. (1970). Immunity in cutaneous leishmaniasis of the guinea-pig. *Clinical and Experimental Immunology*, 7(2), 301–341. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(70\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(70)90047-7)
- Bualert, L., Charungkiattikul, W., Thongsuksai, P., Mungthin, M., Siripattanapipong, S., Khositnithikul, R., ... Leelayoova, S. (2012). Case report: Autochthonous disseminated dermal and visceral leishmaniasis in an AIDS patient, Southern Thailand, caused by *Leishmania siamensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(5), 821–824. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0707>
- Chusri, S., Hortiwakul, T., Silpapojakul, K., & Siriyasatien, P. (2012). Case report: Consecutive cutaneous and visceral leishmaniasis manifestations involving a novel *Leishmania* species in two HIV patients in Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(1), 76–80. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0749>
- Dedet, J. P., Roche, B., Pratlong, F., Cales-Quist, D., Jouannelle, J., Benichou, J. C., & Hueme, M. (1995). Diffuse cutaneous infection caused by a presumed monoxenous trypanosomatid in a patient infected with HIV. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(6), 644–646. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(95\)90427-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(95)90427-1)
- Desbois N, Pratlong F, Quist D, Dedet JP. *Leishmania (Leishmania) martiniquensis* n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), description of the parasite responsible for cutaneous leishmaniasis in Martinique Island (French West Indies). *Parasite*. 2014; 21:12. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014011>.
- Dougall A.M, Alexander B, Holt DC, Harris T, Sultan AH, Bates PA, et al. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int J Parasitol*. 2011; 41(5):571–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.12.008>
- Dougall A, Shilton C, Low Choy J, Alexander B, Walton S. New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in Northern Australian macropods. *Epidemiol Infect*. 2009; 137(10):1516–20. <https://doi.org/10.1017/S0950268809002313>
- Espinosa, O. A., Serrano, M. G., Camargo, E. P., TEIXEIRA, M., & Shaw, J. J. (2016). An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*, 1-13. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002092>
- Garin, Y. J., Sulahian, A., Méneceur, P., Pratlong, F., Prina, E., Gangneux, J., ... Derouin, F. (2001). Experimental pathogenicity of a presumed monoxenous trypanosomatid isolated from humans in a murine model. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(2), 170–176. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00299.x>
- Harkins, K. M., Schwartz, R. S., Cartwright, R. A., & Stone, A. C. (2016). Phylogenomic reconstruction supports supercontinent origins for *Leishmania*. *Infection, Genetics and Evolution*, 38, 101-109. <http://dx.doi.org/10.1101/028969>
- Kanjanopas, K., Siripattanapipong, S., Ninsaeng, U., Hitakarun, A., Jitkaew, S., Kaewtaphaya, P., ... Leelayoova, S. (2013). *Sergentomyia (Neophlebotomus) gemmea*, a potential vector of *Leishmania siamensis* in southern Thailand. *BMC Infectious Diseases*, 13(1), 333. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-333>
- Kongkaew W, Sirirayaporn P, Leelayoova S, Supparatpinyo K, Areechokchai D, Duang-ngern P, et al. (2007) Autochthonous visceral leishmaniasis: a report of a second case in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 38: 8–12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17539239>

- Kwakye-Nuako G, Mosore MT, Duplessis C, Bates MD, Puplampu N, Mensah-Attipoe I, et al. First isolation of a new species of *Leishmania* responsible for human cutaneous leishmaniasis in Ghana and classification in the *Leishmania enriettii* complex. *Int J Parasitol.* 2015; 45(11):679–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.05.001>
- Kweku, M. A., Odoom, S., Puplampu, N., Desewu, K., Nuako, G. K., Gyan, B., ... Akuffo, H. (2011). An outbreak of suspected cutaneous leishmaniasis in Ghana: lessons learnt and preparation for future outbreaks. *Global Health Action*, 4(March 2017). <https://doi.org/10.3402/gha.v4i0.5527>
- Lainson, R. (1997). On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the Neotropics. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 92(3), 377–87. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761997000300014>
- Lainson, R. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. *The Leishmaniases in Biology and Medicine*. Retrieved from <http://ci.nii.ac.jp/naid/10016268542/en/>
- Leelayoova, S., Siripattanapipong, S., Hitakarun, A., Kato, H., Tan-ariya, P., Siriyasatien, P., ... Mungthin, M. (2013). Multilocus characterization and phylogenetic analysis of *Leishmania siamensis* isolated from autochthonous visceral leishmaniasis cases, southern Thailand. *BMC Microbiology*, 13(1), 60. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-60>
- Liautaud B, Vignier N, Miossec C, Plumelle Y, Kone M, Delta D, et al. First case of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania martiniquensis*. *AmJ Trop Med Hyg.* 2015; 92(2):317–9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0205>
- Lobsiger L, Muller N, Schweizer T, Frey CF, Wiederkehr D, Zumkehr B, et al. An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Vet Parasitol.* 2010; 169(3–4):408–14. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.01.022 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.022>
- Machado, M. I., Milder, R. V., Pacheco, R. S., Silva, M., Braga, R.R., Lainson, R. (1994). Naturally acquired infections with *Leishmania enriettii* Muniz and Medina 1948 in guinea-pigs from São Paulo, Brazil. *Parasitology (ICJ94)*, 109, 135-138 <https://doi.org/10.1017/S0031182000076241>.
- Maia, C., & Depaquit, J. (2016). Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? *Parasite (Paris, France)*, 23, 55. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016062>
- Muniz, J., & Medina, H. S. G. (1948). Leishmaniose tegumentar do cobaio (*Leishmania enriettii*). *Arq Biol Tecnol*, 3(2), 7-25.
- Müller N, Welle M, Lobsiger L, Stoffel MH, Boghenbor KK, Hilbe M, et al. Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. *Vet Parasitol.* 2009; 166(3–4):346–51. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.001>
- Noyes H, Pratlong F, Chance M, Ellis J, Lanotte G, Dedet JP. A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique (French West Indies) is the most divergent member of the genus *Leishmania* ss. *Parasitology.* 2002; 124(Pt 1):17–24. <https://doi.org/10.1017/S0031182001008927>
- Nzelu, C. O., Kato, H., Puplampu, N., Desewu, K., Odoom, S., Wilson, M. D., ... Boakye, D. A. (2014). First Detection of *Leishmania tropica* DNA and *Trypanosoma* Species in *Sergentomyia* Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from an Outbreak Area of Cutaneous Leishmaniasis in Ghana. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002630>
- Pearson, R. D., and A. Q. Sousa. "Clinical spectrum of Leishmaniasis." *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 22.1 (1996): 1-13. [http://www.jstor.org/stable/4459156?seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](http://www.jstor.org/stable/4459156?seq=1#page_scan_tab_contents)
- Pothirat T, Tantiworawit A, Chaiwarith R, Jariyapan N, Wannasan A, Siriyasatien P, et al. First isolation of *Leishmania* from Northern Thailand: case report, identification as *Leishmania martiniquensis* and phylogenetic position within the *Leishmania enriettii* complex. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003339>
- Reuss SM, Dunbar MD, Calderwood Mays MB, Owen JL, Mallicote MF, Archer LL, et al. Autochthonous *Leishmania siamensis* in horse, Florida, USA. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18: 1545–7. <https://doi.org/10.3201/eid1809.120184>
- Rogers ME (2012) The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Front.Microbio.* 3:223. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00223>

Rose, K., Curtis, J., Baldwin, T., Mathis, A., Kumar, B., Sakthianandeswaren, A., ... Handman, E. (2004). Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: Isolation and characterisation of the causative organisms. *International Journal for Parasitology* 34 (2004) 655–664  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.03.001>

Seblova V, Sadlova J, Vojtkova B, Votypka J, Carpenter S, Bates PA, et al. The biting midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) is capable of developing late stage infections of *Leishmania enriettii*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(9)  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004060>

Suankratay, C., Suwanpimolkul, G., Wilde, H., & Siriyasatien, P. (2010). Case report: Autochthonous visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus (HIV)-infected patient: The first in Thailand and review of the literature. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(1), 4–8. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0434>

Sukmee, T., Siripattanapipong, S., Mungthin, M., Worapong, J., Rangsin, R., Samung, Y., ... Leelayoova, S. (2008). A suspected new species of *Leishmania*, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. *International Journal for Parasitology*, 38(6), 617–622.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.12.003>

Sukra, K., Kanjanopas, K., Amsakul, S., Rittatton, V., Mungthin, M., & Leelayoova, S. (2013). A survey of sandflies in the affected areas of leishmaniasis, southern Thailand. *Parasitology Research*, 112(1), 297–302. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3137-x>

Villinski, J. T., Klena, J. D., Abbassy, M., Hoel, D. F., Pupilampu, N., Mehta, S., ... Raczniak, G. (2008). Evidence for a new species of *Leishmania* associated with a focal disease outbreak in Ghana. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60(3), 323–327.  
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.09.013>

#### Internetové zdroje:

ECDC, 2017, [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/vector-maps/Pages/VBORNET\\_maps\\_sandflies.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/vector-maps/Pages/VBORNET_maps_sandflies.aspx) [20.4. 2017]

WHO, 2017, <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> [28.4. 2017]

#### Sekundární citace:

Luz, E., Giovannoni, M. & Borba, A. M. (1967). Infecção de *Lutzomyia monticola* por *Leishmania enriettii*. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná* 9-10, 121-8.