

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Parazitologie



Bc. Anna Hošková

Vnímavost evropských druhů přenašečů k leishmaniím šířícím se do Evropy

Susceptibility of European vector species to leishmaniasis spreading into
Europe

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Jovana Sádlová Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Jan Votýpka Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

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

V Praze, dne 29.4.2024

Bc. Anna Hošková

Poděkování

V první řadě děkuji své školitelce doc. RNDr. Jovaně Sádlové, Ph.D. za její ochotu, pomoc, čas a cenné rady při experimentech a sepisování této práce. Dále bych chtěla poděkovat svému konzultantovi doc. RNDr. Janu Votýpkovi, Ph.D. za jeho pomoc a rady při určování a analyzování tiplíků. Také velmi děkuji prof. RNDr. Petrovi Volfovi, CSc. za možnost tuto diplomovou práci zpracovávat v jeho laboratoři. Děkuji Ing. Petrovi Haladovi, Ph.D. za pomoc s MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií při určování zdroje krve nasátých tiplíků. Poděkování patří také RNDr. Barboře Vojtkové, Ph.D., Mgr. Tomášovi Bečvářovi, Ph.D. a všem ostatním členům naší laboratoře za jejich ochotu a pomoc, kdykoliv jsem potřebovala. Za izoláty leishmanií, které byly použity v této diplomové práci děkuji doc. Mgr. Mileně Svobodové Dr., prof. MVDr. Davidovi Modrému, Ph.D., MVDr. Petrovi Jahnovi, CSc. a prof. Padetovi Siriyasatienovi, M.D., Ph.D.. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu při studiu a při sepisování této práce.

Abstrakt

První část této práce je zaměřena na testování schopnosti vybraných evropských druhů flebotomů podporovat vývoj *Leishmania major*, *L. donovani* a *L. martiniquensis*. Celkem bylo provedeno 15 experimentálních infekcí a analyzováno 1601 samic flebotomů. Výsledky ukazují, že *Phlebotomus perniciosus* a *P. tobbi* podporují vývoj *L. major* i *L. donovani* (byly pozorovány silné zralé infekce s kolonizací stomodeální valvy a metacyklickými promastigoty), zatímco *L. martiniquensis* nepřežívala defekaci samic. Kompetenci *Sergentomyia minuta* k vývoji leishmanií nebylo možné otestovat, protože samice tohoto druhu nebyly ochotné sát na krmítku, přestože bylo testováno několik typů membrán, krve a experimentálních podmínek.

Druhým cílem této práce byla analýza tiplíků ve dvou oblastech autochtonních nálezů *L. martiniquensis* u koní v České republice. Celkem bylo analyzováno 3341 nasátých a vykladených samic tiplíků ze Slatiňan a 119 z Ústí nad Labem. Na obou lokalitách byli nejhojnější tiplíci z komplexu *Culicoides obsoletus*. Žádný z 97 testovaných poolů nebyl pozitivní na DNA leishmanií, ale v 15 poolech ze Slatiňan byla detekována DNA *Herpetomonas ztiplika* a jeden pool z Ústí n. L. obsahoval DNA *Trypanosoma* sp. ze skupiny *T. theileri*. Pokus o izolaci *L. martiniquensis* pomocí xenodiagnostiky na infikovaném koni byl neúspěšný a odchycený nasátý hmyz na tomto koni byl také negativní na DNA leishmanií, po přeléčení zřejmě životaschopné leishmanie v okolí léze nepřežívaly.

Klíčová slova: *Phlebotomus*, *Leishmania*, *Mundinia*, *Culicoides*, šíření areálů, globální oteplování, migrace

Abstract

The first part of this thesis is focused on testing the ability of selected European sand fly species to support the development of *Leishmania major*, *L. donovani* and *L. martiniquensis*. A total of 15 experimental infections were performed and 1601 female sand flies were analysed. The results show that *Phlebotomus perniciosus* and *P. tobbi* support development of *L. major* and *L. donovani* (mature infections with colonization of the stomodeal valve and metacyclic promastigotes developed), while *L. martiniquensis* did not survive defecation. The vector competence of *Sergentomyia minuta* to *Leishmania* could not be tested because the females of this species refused to take blood meal on feeders, although several types of membranes, blood and experimental conditions were tested.

Further, biting midges were studied in two areas of Czech equine autochthonous cases of *L. martiniquensis*. A total of 3341 bloodfed and parous females from Slatiňany and 119 from Ústí n. L. were analysed. The most abundant were biting midges from the *Culicoides obsoletus* complex. None of the 97 pools were positive for *Leishmania* DNA, but in 15 pools from Slatiňany was detected DNA of *Herpetomonas ztiplika* and one pool from Ústí n. L. contained DNA of *Trypanosoma* sp. from *T. theileri* group. The isolation of *L. martiniquensis* was unsuccessful, and the insects fed on the horse were negative for *Leishmania* DNA. Apparently, viable parasites did not survive in near the lesion after treatment.

Key words: *Phlebotomus*, *Leishmania*, *Mundinia*, *Culicoides*, range expansion, global warming, migration

Seznam zkratek

AMG – abdominální mezenteron

BEFV – virus bovinní efemérní horečky

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

BTV – Bluetongue virus

C. - Culicoides

EP – endoperitrofitický prostor

F. - Forcipomyia

HSP70 – heat shock protein 70

L. - Leishmania

LPG - lipofosfoglykan

Lu. - Lutzomyia

MALDI-TOF – matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace, Time of Flight (doba letu)

MS – hmotnostní spektrometrie

NCBI – The National Centre for Biotechnology Information

OROV – Oporouche virus

P. - Phlebotomus

PCR – polymerázová řetězová reakce

PI – po infekci

PSG – promastigote secretory gel

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce

S. - Sergentomyia

SBV – Schmallenberg virus

SV – stomodeální valva

T. - Trypanosoma

TAE – Tris-Acetát-EDTA

TMG – thorakální mezenteron

Obsah

1 Úvod a cíle práce	1
1.1 Cíle práce	2
2 Literární přehled	3
2.1 Rod <i>Leishmania</i>	3
2.2 Podrod <i>Mundinia</i>	6
2.3 Přenašeči leishmanií	10
2.3.1 Flebotomové	10
2.3.2 Tiplíci	12
2.4. Leishmanióza v Evropě	14
3 Materiál a metodika	18
3.1 Použité roztoky	18
3.2 Kultivace leishmanií	18
3.3 Chov flebotomů	18
3.4 Experimentální infekce	20
3.5 Pitvy flebotomů a hodnocení infekcí	20
3.6 Morfologická analýza leishmanií	21
3.7 Statistika	21
3.8 Experimentální sání s jinými typy membrán na skleněném krmítku a s Hemotekem	22
3.9 Sběr a zpracování tiplíků	23
3.10 Izolace DNA	24
3.11 PCR detekce	24
3.12 Gelová elektroforéza	26
3.13 Sekvence	27
3.14 Kvantitativní PCR	27
3.15 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie	28
3.16 Xenodiagnostika a kultivace na krevním agaru	28
4 Výsledky	30
4.1 Experimentální infekce flebotomů	30
4.1.1 Vývoj <i>L. donovani</i> a <i>L. major</i> v <i>P. perniciosus</i>	30
4.1.2 Vývoj <i>L. donovani</i> a <i>L. major</i> v <i>P. tobbi</i>	33
4.1.3 Vývoj <i>L. donovani</i> a hybrida <i>L. infantum/L. donovani</i> v <i>P. argentipes</i>	36
4.1.4 Vývoj dvou kmenů <i>L. martiniquensis</i> v <i>P. perniciosus</i>	38
4.1.5 Vývoj dvou kmenů <i>L. martiniquensis</i> v <i>P. tobbi</i>	40

4.1.6 Pokusy se <i>Sergentomyia minuta</i>	41
4.2 Sběr a analýza tiplíků a dalších vektorů v oblastech výskytu autochtonních leishmanióz u koní v České republice	42
4.2.1 Sběr tiplíků v hřebčínu ve Slatiňanech	42
4.2.2 Sběr tiplíků v Ústí nad Labem	43
4.2.3 PCR analýza přenašečů nasátých na infikovaném koni	44
4.2.4 Izolace <i>L. martiniquensis</i> pomocí xenodiagnostiky	44
4.2.5 Experimentální infekce nachytaných tiplíků	45
4.2.6 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie	46
5 Diskuze	47
6 Závěr	54
7 Finanční zdroje	56
8 Použitá literatura	57

1 Úvod a cíle práce

Leishmanie jsou parazitické prvoci patřící do řádu Kinetoplastida a čeledi Trypanosomatidae, kteří kolují mezi hmyzím přenašečem a obratlovčím hostitelem. Způsobují onemocnění zvané leishmanióza, které u lidí dokáže vyvolat asi 20 druhů leishmanií.

V jižní Evropě je endemická leishmanióza působená hlavně druhem *L. infantum* a sporadicky jsou zaznamenávané případy způsobené druhem *L. tropica*. Kvůli globálnímu oteplování, posouvání areálů flebotomů, globalizaci, migraci lidí z endemických oblastí a častému cestování stoupá ale riziko introdukce dalších druhů leishmanií do Evropy. V posledních letech se začínají na jihu Evropy objevovat autochtonní případy leishmanióz působené druhy *L. major* a *L. donovani* a předpokládá se, že těchto případů bude přibývat. Mým úkolem v této diplomové práci bylo testování vnímavosti evropských druhů flebotomů k *L. major*, *L. donovani* a *L. martiniquensis*. Byly vybrány permissivní druhy z podrodu *Larrousius* – *Phlebotomus perniciosus* a *P. tobbi* a *Sergentomyia minuta*, které jsou zavedené v našich chovech. Tyto pokusy byly dělané v rámci evropského projektu CLIMOS, který je zaměřen na monitoring flebotomů a jimi přenášených patogenů v souvislosti se současnými klimatickými a enviromentálními změnami.

Ve střední Evropě bylo v posledních letech zaznamenáno už několik autochtonních případů leishmanióz u koní a dobytka, které byly způsobené druhem *Leishmania martiniquensis* a tři případy u koní byly potvrzeny i v České republice. Tento druh leishmanie se řadí do podrodu *Mundinia* a zatímco u koní způsobuje kožní formu onemocnění, v Thajsku rostou počty případů lidské viscerální leishmaniózy způsobené *L. martiniquensis*. Jelikož v našich zeměpisných šířkách (alespoň zatím) nežijí flebotomové, je pravděpodobné, že do přenosu leishmanióz je zde zapojen jiný krevsající hmyz, předpokládanými přenašeči jsou tiplíci. K této domněnce přispívají nálezy přirozeně infikovaných samic rodu *Forcipomyia* v Austrálii, ve kterých byly nalezeny silné zralé infekce, a experimenty publikované naší laboratoří, které ukázaly, že tiplíci *Culicoides soronensis* podporují vývoj všech testovaných druhů leishmanií z podrodu *Mundinia*. Mým druhým úkolem v této diplomové práci byla druhová determinace nachytaných tiplíků v oblastech výskytu autochtonní leishmanióz v České republice a jejich screening na přítomnost DNA leishmanií.

1.1 Cíle práce

1. Testovat vnímavost vybraných evropských druhů flebotomů k *L. major*, *L. donovani* a *L. martiniquensis* pomocí:

- Experimentálních infekcí laboratorně chovaných flebotomů tří druhů: *P. perniciosus*, *P. tobbi*, *S. minuta*
- Sledováním lokalizace a intenzity infekcí ve střevech flebotomů světelným mikroskopem v různých časových intervalech
- Vyhodnocením zastoupení morfologických forem leishmanií pomocí roztlačkových preparátů obarvených Giemsou
- Vyhodnocením intenzit infekcí ve flebotomech pomocí qPCR

2. Analyzovat tiplíky v oblastech výskytu autochtonních nálezů *L. martiniquensis* v České republice pomocí:

- Odchytů hmyzu pomocí CDC světelných pastí
- Druhového určení tiplíků
- Screeningu na DNA leishmanií pomocí nested PCR u nasátých a vykladených samic, popřípadě jiného nachytaného nasátého hmyzu
- Experimentálních infekcí nachytaných nenasátých samic
- Analýzy krve nasátých samic pro identifikaci hostitele pomocí metody MALDI-TOF

2 Literární přehled

2.1 Rod *Leishmania*

Leishmanie jsou dvouhostitelští parazitičtí prvoci, kteří patří do čeledi Trypanosomatidae a řádu Kinetoplastida. Způsobují nemoc zvanou leishmanióza. Bylo popsáno více než 50 druhů leishmanií z nichž asi 20 druhů je patogenních pro člověka (Akhoundi et al., 2017; Burza et al., 2018). Leishmanie kolují mezi obratlovčím hostitelem a hmyzím přenašečem (shrnutí v Kamhawi, 2006).

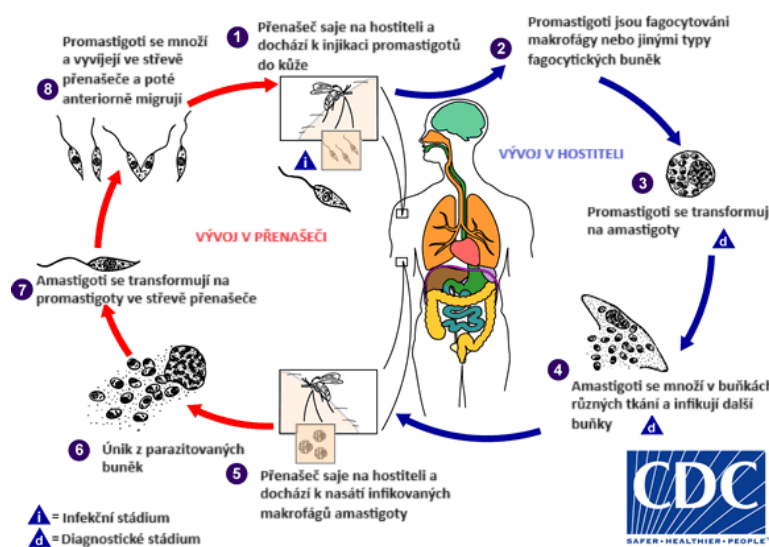
Leishmanióza se řadí mezi zanedbávané tropické nemoci (Neglected tropical diseases) a je endemická v 98 zemích po celém světě, hlavně v tropických a subtropických oblastech Asie, Afriky, Středního východu a Střední a Jižní Ameriky (shrnutí v Cohen a Azas, 2021; Ruiz-Postigo et al., 2021). Ročně přibude asi 1 mil nových případů a více než 13 500 lidí zemře (GBD, 2017). Mezi rizikové faktory pro nákazu leishmaniózou se řadí chudoba, migrace obyvatel, podvýživa, špatná hygiena a snížená imunita obyvatel (WHO, 2024).

Rod *Leishmania* je v současné době rozdělen do 4 podrodů – *Leishmania*, *Vianna*, *Sauroleishmania* a *Mundinia* (Espinosa et al., 2016). Druhy leishmanií, které způsobují leishmaniózu u lidí patří do podrodů *Leishmania*, *Vianna* a *Mundinia*, zástupci podrodu *Sauroleishmania* jsou parazité plazů. Většina druhů leishmanií má suprapylární vývoj – leishmanie se vyvíjejí v mezenteronu, druhy podrodu *Vianna* mají peripylární vývoj – leishmanie kolonizují zadní střevo před tím, než migrují do mezenteronu (Nieves a Pimenta, 2000).

Leishmanie mají ve svém životním cyklu dvě stádia – bičíkaté pohyblivé promastigoty a bezbičíkaté amastigoty (Obrázek 1). Sáním infikované samice flebotoma na obratlovčím hostiteli dochází k injikaci metacyklických promastigotů do kůže hostitele. Ti jsou endocytováni hostitelskými fagocytickými buňkami a usazují se v parazitoformní vakuole, ve které se diferencují na intracelulární bezbičíkaté amastigoty (Bates, 2007; McGwire a Satoskar, 2013). Amastigoti se množí a vyvíjejí ve fagocytických buňkách, ty poté prasknou a uvolnění amastigoti jsou fagocytováni dalšími makrofágy. Amastigoti jsou transportováni lymfatickým a cévním systémem do různých tkání a orgánů hostitele, což poté vede k onemocnění, které může mít různé formy, které popisují níže (shrnutí v Sasidharan a Saudagar, 2021).

Pokud vektor nasaje infikované makrofágy, transformují se amastigoti kvůli poklesu teploty a zvýšení pH ve střevě vektora, na procyklické promastigoty (Lawyer et al., 1990; shrnutí v Dostálová a Volf, 2012). Procyklické promastigoti jsou první formy, které se ve vektorovi množí (shrnutí v Dostálová a Volf, 2012). Ve střevě flebotoma je nasátá krev obalena peritrofickou matrix typu I. (chitinózní obal vylučovaný buňkami střevního epitelu) (shrnutí v Lehane, 1997), parazité musí z tohoto obalu

uniknout, aby mohli dokončit vývoj v přenašeči. Asi po 48 hodinách od nasátí se procykliční promastigoti přestávají množit a diferencují se do dlouhých nektomonád. Tyto formy unikají z peritrofické matrix do lumen abdominální části mezenteronu, kde se přichytí na epiteliální buňky střeva a nedochází tak k jejich defekaci společně s nestrávenými zbytky krve (shrnuo v Dostálová a Volf, 2012). Nektomonády poté migrují do thorakální části mezenteronu, kde se diferencují na leptomonády. Tyto kratší formy se zde množí a do nedávna se předpokládalo, že produkují PSG (promastigote secretory gel), který v thorakálním mezenteronu tvoří gelovitou zátku, která ztěžuje další sání flebotoma a dochází proto k regurgitaci střevního obsahu vektora do hostitele, čímž je umožněn přenos leishmanií (Rogers et al., 2002; Gossage et al., 2003). Nové poznatky ale ukazují, že PSG produkují haptomonády, které se diferencují z leptomonád (Catta-Preta et al., 2024). Haptomonády jsou také schopné přichycení na stomodeální valvu (shrnuo v Sunter a Gull, 2017). Přichycení společně s působením chitinolytických enzymů produkovaných leishmaniami způsobuje ztrátu integrity stomodeální valvy, což také usnadňuje přenos leishmanií (Schlein et al., 1992; Volf et al., 2004; Rogers et al., 2008). Infikované samice mají poté problém s příjmem potravy a pokoušejí se sát vícekrát (Killick-Kendrick, 1999). Haptomonády se ale podle nejnovějších poznatků mohou opět uvolnit a pohybovat se volně ve střevě (Catta-Preta et al., 2024). Do nedávna se předpokládalo, že jedinými infekčními formami leishmanií jsou metacykliční promastigoti, kteří vznikají z leptomonád (Ramalho-Ortigao et al., 2010; shrnuo v Dostálová a Volf, 2012). Nové studie ale naznačují, že i haptomonády dokáží iniciovat infekci v obratlovčím hostiteli, a dokonce mohou být převládajícími formami při přenosu. Také se tradovalo, že metacykliční promastigoti jsou nedělicí se pohyblivé formy, ale ukazuje se, že rané metacykly jsou často připojené bičíkem k mezenteronu a dokáží se dělit (Catta-Preta et al., 2024).



Obrázek 1 – Životní cyklus leishmanií; převzato a upraveno z <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

Různé projevy onemocnění závisí na druhu parazita a imunitním stavu infikovaného jedince (Alvar et al., 2012). Rozlišujeme 3 základní formy leishmaniózy – kutánní, mukokutánní a viscerální. Kutánní leishmaniózu způsobují dermatotropické kmeny leishmanií z podrodů *Leishmania* (*L. major*, *L. tropica*, *L. infantum*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*), *Vianna* (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*) a *Mundinia* (*L. chancei*, *L. orientalis*, *L. martiniquensis*) (Dedet et al., 1995; shrnuto v Akilov et al., 2007; shrnuto v Reithinger et al., 2007; Kwakye-Nuako et al., 2015; Jariyapan et al., 2018). Většinou je to nejméně závažná forma onemocnění. Projevuje se kožními lézemi a vředy na exponovaných částech těla, které se většinou zhojí, ale často po nich zůstávají doživotní jizvy, což s sebou nese psychosociální důsledky (Bennis et al., 2017). Kožní leishmanióza může být lokalizovaná, to znamená, že léze je pouze v místě sání flebotoma, nebo difúzní, kdy se léze šíří na další místa (Alvar et al., 2012).

Mukokutánní leishmanióza je závažnější forma. Dochází zde k infiltraci amastigotů do vrstev sliznice a dochází k tvorbě destruktivních lézí v oblasti nosu, úst nebo i hrdla, které mohou být doprovázené sekundárními infekcemi. Mukokutánní leishmaniózu způsobují druhy leishmanií vyskytující se hlavně ve Střední a Jižní Americe (*L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*) a je často spojená s vysokou morbiditou (Pace, 2014; Handler et al., 2015).

Viscerální leishmanióza je nejzávažnější forma onemocnění a neléčená může končit fatálně (shrnuto v Kevric et al., 2015; shrnuto v Duthie et al., 2018). Tuto formu onemocnění způsobují hlavně viscerotropické kmeny *L. infantum* (ve Střední a Jižní Americe je to poddruh *L. i. chagasi*) a *L. donovani*. V jihovýchodní Asii je hlavním původcem viscerální leishmaniózy *L. martiniquensis* (Srivarasat et al., 2022). Na Středním východě byla zaznamenána viscerální leishmanióza způsobená druhem *L. tropica* (Mebrahtu et al., 1989; Schnur, 1989; Oren et al., 1991). Parazit se při této formě leishmaniózy dostává do krve a endoretikulárního systému, dochází k jejich množení v makrofázích v játrech, slezině a kostní dřeni. Bez léčby může být i tato forma leishmaniózy fatální (McGwire a Satoskar, 2013).

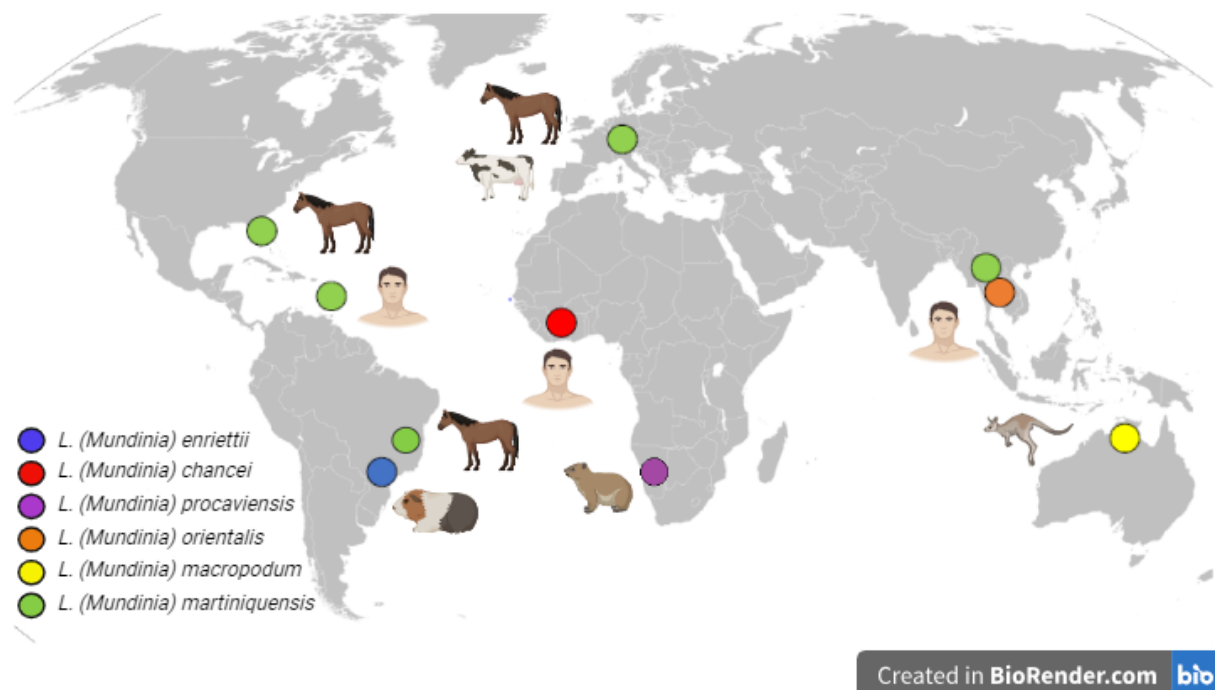
Po vyléčení viscerální leishmaniózy způsobené druhem *L. donovani* se může objevit post-kalazar dermální leishmanióza. Parazit zůstává v kůži a mohou být krevsajícími vektory přenášeni na další hostitele (Pace, 2014). Projevuje se makulárními, papulárními a nodulárními lézemi na obličeji, ramenou, trupu a dalších částech těla (WHO, 2024).

Cyklus leishmaniózy je buď antroponotický, zde je jediným rezervoárovým hostitelem člověk, nebo zoonotický, kdy jako rezervoároví hostitelé slouží různé jiné druhy savců. Ti mohou, ale nemusí vykazovat symptomy onemocnění. Rezervoárovými hostiteli leishmanií jsou nejčastěji hlodavci, psi, vačnatci, opice, lenochodi nebo damani (Faye et al., 2012; Burza et al., 2018; shrnuto v Sasidharan a Saudagar, 2021). Téměř všechny druhy leishmanií, které jsou patogenní pro člověka, jsou asociovány

se zoonotickým cyklem (Bates, 2007; Bruschi a Gradoni, 2018). U *L. donovani* se předpokládalo, že má antroponotický cyklus, ale mnohé studie naznačují, že alespoň v některých částech areálu rozšíření nejspíš také v jejím životním cyklu hrají roli zvířecí rezervoároví hostitelé (Kassahun et al., 2015; Alam et al., 2018; Konno et al., 2022).

2.2 Podrod *Mundinia*

Podrod *Mundinia* byl popsán v roce 2016 (Espinosa et al., 2016), do té doby byli jeho zástupci známi jako *Leishmania enriettii* komplex. V současnosti se do něj řadí šest druhů leishmanií. *Leishmania orientalis*, *L. martiniquensis* a *L. chancei* jsou druhy patogenní pro člověka, zatímco *L. enriettii*, *L. macropodum* a *L. procaviensis* jsou zřejmě patogenní pouze pro zvířata (Espinosa et al., 2016; shrnuto v Paranaiba et al., 2017; Kwakye-Nuaoko et al., 2023). Podrod *Mundinia* leží na bázi fylogenetického stromu rodu *Leishmania* a představuje tak nejstarší skupinu leishmanií. Pravděpodobně se tento podrod vyvinul ještě před rozpadem Gondwany, vysvětlovalo by to jeho celosvětové rozšíření (Obrázek 2), různorodost savčích hostitelů a potenciální možnost jejich přenosu jiným hmyzem, než flebotomy (Šeblová et al., 2015b; Barratt et al., 2017; Butenko et al., 2019; Chanmol et al., 2019; Bečvář et al., 2021).



Obrázek 2 – Geografické rozšíření druhů z podrodu *Mundinia*; převzato a upraveno ze Sádlová et al., 2022

Dosud není prokázán žádný rezervoárový hostitel ani potvrzený vektor žádného druhu z podrodu *Mundinia*. Nedávná studie ukazuje vnímavost křečků čínských a pestrušek písečných k těmto druhům leishmanií (Bečvář et al., 2024), což umožňuje jejich další laboratorní výzkum a zároveň naznačuje, že jako rezervoároví hostitelé by mohly sloužit některé druhy hlodavců. Předpokládalo se, že jsou tyto leishmanie přenášeny flebotomy stejně jako ostatní podrody rodu *Leishmania*. Ukazuje se ale, že by v přenosu mohli hrát roli tiplíci, což by také mohlo vysvětlovat výskyt těchto leishmanií v chladnějších oblastech (Barratt et al., 2017). Experimentální výsledky ukazují, že všech pět druhů leishmanií z podrodu *Mundinia* se vyvíjí lépe v tiplících *Culicoides soronensis* než ve flebotomech a tři druhy leishmanií byly dokonce přeneseny sáním infikovaných tiplíků na savčího hostitele (Šeblová et al., 2015b; Chanmol et al., 2019; Bečvář et al., 2021).

Prvním popsáným druhem z podrodu *Mundinia* byl druh *Leishmania enriettii*, vyzolovaný z domácích morčat v Brazílii (Muniz a Medina, 1948). Zatím nebyl zaznamenán žádný lidský případ způsobený tímto druhem leishmanie. Další případy byly popsány jen u morčat (Luz et al., 1967; Machado et al., 1994), u kterých *L. enriettii* způsobuje nejčastěji kožní formu onemocnění (Machado et al., 1994; Šeblová et al., 2015b). Jelikož popisované případy onemocnění domácích morčat jsou velmi vzácné a experimenty s divokými morčaty *Cavia aperea* byly neúspěšné, uvažuje se, že jsou morčata pouze náhodnými hostiteli a rezervoárové hostitele musíme hledat jinde (Muniz a Medina, 1948; Bečvář et al., 2020). Byly provedeny experimentální infekce s křečkou *Mesocricetus auratus*, kdy docházelo k vývoji dočasných lézí v místě inokulace (Belehu a Turk, 1976; Šeblová et al., 2015b). Při experimentech s křečkou čínskou byla zvířata infekční pro flebotomy do 15. týdne po infekci a DNA *L. enriettii* byla nalezena v inokulovaném uchu jednoho zvířete a ve spádové lymfatické uzlině inokulovaného ucha druhého zvířete. Nákaza probíhala asymptomaticky. Naopak při pokusech s pestruškami písečnými se u zvířat, která byla použita pro xenodiagnostiku, objevily kožní léze. Leishmanie v pestruškách přežily až do 20. týdne a u všech testovaných zvířat byla DNA *L. enriettii* detekována v inokulovaných uších, u některých zvířat také v lymfatických uzlinách, předních i zadních packách, ocasu a slezině (Bečvář et al., 2024). Experimenty s divokými morčaty *Cavia aperea*, makaky a psy byly neúspěšné (Muniz a Medina, 1948). Stejně jako rezervoároví hostitelé jsou i přenašeči neznámí. Nejprve se uvažovalo o *Lutzomyia monticola*, která byla nalezena v blízkosti výskytu jednoho z případů. Pokusy o experimentální přenos ale byly neúspěšné (Luz et al., 1967; Machado et al., 1994; Lainson, 1997). Jak už bylo řečeno výše, ve studiích s tiplíky *Culicoides soronensis* byl pozorován poměrně úspěšný vývoj *L. enriettii*. Docházelo u nich k tvorbě pozdních infekcí a kolonizaci stomodeální valvy. Při stejných pokusech s *Lu. longipalpis* k takovému vývoji infekcí nedocházelo. Tyto poznatky naznačují, že by tito paraziti mohli být přenášeni spíše místními tiplíky (Šeblová et al., 2015b; Bečvář et al., 2021).

Leishmania macropodum je jediným druhem leishmanií vyskytujícím se v Austrálii a je patogenní u klokanů (Rose et al., 2004), způsobuje u nich kožní leishmaniózu. Léze byly objeveny na ocase, uších a končetinách, ale i na kloace a v oblasti očí a mohou být charakterizovány výrazným průnikem do dermis. Zda klokani slouží jako rezervoároví hostitelé není zcela jasné, protože všechna nakažená zvířata byla chovaná v zajetí a jen jeden druh klokana, u kterého byly leishmanie detekovány, se přirozeně vyskytuje v endemických oblastech leishmanióz (Dougal et al., 2009). U lidí nebyly v Austrálii zaznamenány žádné případy kožní leishmaniózy (Panahi et al., 2023). Při pokusech s pestruškami písečnými docházelo k asymptomatickým infekcím a parazité v nich přežívali do 20. týdne po infekci. DNA *L. macropodum* byla poté nalezena v inokulovaných uších a v jednom případě i v ocase (Bečvář et al., 2024). U tohoto druhu je už téměř jisté, že je přenášen tiplíky. Při terénním výzkumu byly všichni odchycení flebotomové negativní na DNA leishmanií. Naopak až 15 % tiplíků rodu *Forcipomyia* bylo pozitivních. Při pitvách střev těchto tiplíků byly objeveny silné zralé infekce, výskyt metacyklických promastigotů a kolonizace stomodeální valvy (Dougal et al., 2011).

Dalším druhem je *Leishmania martiniquensis*. Tento druh byl poprvé popsán u HIV pacienta na karibském Martiniku, u kterého způsoboval difúzní kožní leishmaniózu (Dedet et al., 1995). V současné době se zdá, že má *L. martiniquensis* celosvětové rozšíření (Müller et al., 2009; Lobsiger et al., 2010; Reuss et al., 2012; Pothirat et al., 2014). V Thajsku způsobuje u lidí viscerální a diseminovanou formu kožní leishmaniózy (Pothirat et al., 2014; Intakhan et al., 2020; Srivarasat et al., 2022). Dalšími hostiteli, pro které je tento druh patogenní, jsou koně a krávy, způsobuje u nich kožní formu onemocnění. K autochtonním nálezům skotu došlo ve Švýcarsku. Nákazy u koní byly hlášeny z Floridy, Německa, Švýcarska, Rakouska (Müller et al. 2009; Lobsiger et al. 2010; Reuss et al. 2012; Menezes et al., 2019; výskyt v Rakousku zatím nepublikován) a tři infikovaní koně byly zaznamenáni i v České republice (Jahn, Modrý, Votýpka, zatím nepublikováno). Nově byl zaznamenán i první případ *L. martiniquensis* v Jižní Americe v Brazílii (Mendes Júnior et al., 2023). Rezervoároví hostitelé tohoto druhu leishmanie jsou neznámí. DNA *L. martiniquensis* byla v Thajsku detekována v kryších (Chusri et al., 2014). Při pokusech s křečičky čínskými byla zvířata infekční pro vektory do 20. týdne po infekci. DNA *L. martiniquensis* byla pak nalezena hlavně v inokulovaných uších, ale i v lymfatických uzlinách a zadních packách. Nákazy probíhaly asymptomaticky. Naopak u pestrušek písečných, které byly použity na xenodiagnostiku, se objevily kožní léze, jedno zvíře ztrácelo váhu a jedno zemřelo. Tyto symptomy vykazovaly pestrušky infikované thajským kmenem *L. martiniquensis* Cu2, ostatní použité kmény v této studii způsobovaly asymptomatické nákazy. Pestrušky byly infekční pro flebotomy až do 20. týdne po infekci a DNA *L. martiniquensis* byla poté detekována téměř ve všech testovaných tkáních (Bečvář et al., 2024). Přenašeči jsou také neznámí. DNA *L. martiniquensis* byla nalezena jak ve flebotomech rodu *Sergentomyia* (Kanjanopas et al., 2013; Chusri et al. 2014), tak u několika druhů tiplíků – *Culicoides*

peregrinus, *C. oxystoma*, *C. mahasarakhamense*, *C. huffi*, *C. fordai* a *C. fulvus* (Songumpai et al., 2022; Sunantaraporn et al., 2022). Kaewmee et al. (2023) předpokládají, že by potenciálním vektorem *L. martiniquensis* v Thajsku mohl být *Culicoides peregrinus*. Ve čtyřech vydefekovaných samicích byli nalezeni promastigoti tohoto druhu leishmanie v předním střevě, což naznačuje, že se zde začala vytvářet infekce (Kaewmee et al., 2023). Roli v přenosu budou tedy spíše hrát tiplíci než flebotomové. Svědčí tomu, jak lokality výskytu autochtonních případů (někdy bez výskytu flebotomů), tak i pokusy dělané s tiplíky *C. soronensis*, které prokázaly laboratorní přenos (Bečvář et al., 2021).

Druhým patogenním druhem pro člověka je *Leishmania orientalis*. Dříve byl tento druh často zaměňován s *L. martiniquensis* (Pothirat et al., 2014). V Thajsku způsobuje stejně jako *L. martiniquensis* kožní i viscerální formu leishmaniózy (Bualert et al., 2012; Suprisunjai et al., 2017; Jariyapan et al., 2018; Anugulruengkitt et al., 2023). Tento druh byl zatím izolován pouze z člověka, takže rezervoároví hostitelé jsou stejně jako u ostatních druhů leishmanií z podrodu *Mundinia* neznámí. Pokusy s křečičky čínskými stejně jako v předchozích případech ukázaly asymptomatické nákazy, kdy byla zvířata infekční pro flebotomy do 20. týdne po infekci a DNA *L. orientalis* byla detekována hlavně v inokulovaných uších, u jednoho zvířete i ve spádové lymfatické uzlině inokulovaného ucha. Při pokusech s pestruškami písčnými čtyři zvířata zemřela. U jednoho zvířete došlo ke ztrátě chlupů a úbytku na váze. Leishmanie v pestruškách přežily až do 20. týden po infekci. DNA *L. orientalis* byla poté detekována ze 75 % pestrušek v téměř všech testovaných tkáních (Bečvář et al., 2024). Přenašeči *L. orientalis* také nejsou známí. DNA byla nalezena ve flebotomech rodu *Sergentomyia* (Kanjanopas et al., 2013; Siripattanapipong et al., 2018) a v jižním Thajsku v tiplících *C. peregrinus* a *C. oxystoma* (Songumpai et al., 2022; Sunantaraporn et al., 2022). Vývoj leishmanií a přenos na hostitele byl jako v předchozím případě prokázán pokusy s tiplíky *C. soronensis* (Chanmol et al., 2019; Bečvář et al., 2021). Při těchto pokusech tvořila *L. orientalis* zralé infekce i u *Phlebotomus argentipes*. Docházelo i ke kolonizaci stomodeální valvy a přítomnosti metacyklických stádií, ale přenos na hostitele byl neúspěšný (Bečvář et al., 2021).

Dalším zástupcem podrodu *Mundinia* je *Leishmania chancei*, která je zodpovědná za lidské kožní leishmaniózy v Ghaně (Kwaky-Nuako et al., 2015). Stejně jako u ostatních druhů jsou rezervoároví hostitelé neznámí. Při experimentech s hlodavci, kteří se vyskytují v endemických oblastech, přežily leishmanie v *Mastomys natalensis* 20 týdnů, rozšířily do různých tkání, ale nebyly schopny nakazit přenašeče (Sádlová et al., 2020). Při pokusech s křečičky čínskými přežily leishmanie také do 20. týdne a DNA *L. chancei* byla detekována pouze v inokulovaných uších. Stejně jako v předchozích případech probíhaly nákazy asymptomaticky. Naopak u pestrušek písčných docházelo ke kožním lézím, ztrátě chlupů a jedno zvíře dokonce zemřelo. Pestrušky byly pro vektory infekční až do 20. týdne. Parazitě diseminovali po celém těle a DNA *L. chancei* byla poté detekována téměř ve

všech testovaných tkáních (Bečvář et al., 2024). Přenašeči také nejsou známí. Experimenty s tiplíky *C. soronensis* ale ukázaly, že se v nich tento druh dobře vyvíjí a došlo i k úspěšnému přenosu na hostitele (Bečvář et al., 2021).

Nejnověji popsaným druhem je *Leishmania procaviensis*. Tento druh byl vyizolovaný z damanů v Namibii. Zatím nebyl zaznamenán žádný lidský případ způsobený tímto druhem leishmanie, a tak se předpokládá, že není patogenní pro člověka (Kwakye-Nuako et al., 2023).

2.3 Přenašeči leishmanií

Dominantními přenašeči leishmanií jsou flebotomové, i když v posledních letech se diskutuje, že by do přenosu mohli být zapojeni tiplíci, jak už bylo naznačeno v předchozí kapitole.

S rozvojem molekulárních metod byla DNA leishmanií nalezena v různých krevsajících bezobratlých. Aby ale mohl být vektor považován za potvrzeného přenašeče leishmaniózy, musí splňovat několik kritérií (shrnutí Killick-Kendrick, 1990):

- Přenašeč musí sát na lidech
- U zoonotické formy leishmaniózy musí sát i na rezervoárovém hostiteli
- Přenašeč musí být v přírodě infikován stejným druhem leishmanie, který se vyskytuje u lidí
- Přenašeč musí podporovat úplný vývoj parazita ve svém střevě
- Přenašeč musí být schopen přenést parazita při sání na hostiteli

2.3.1 Flebotomové

Flebotomové jsou malé krevsající mušky, které žijí v tropických a subtropických oblastech. Řadí se do řádu Diptera, podřádu Nematocera, čeledi Psychodidae a podčeledi Phlebotominae (shrnutí v Akhondi et al., 2016). Momentálně je na světě popsáno okolo 1000 druhů, z nichž asi 100 druhů dokáže přenášet leishmanie (shrnutí v Maroli et al., 2013; shrnutí v Ready et al., 2013). Ve Starém světě žijí rody *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Chinius*, *Idiophlebotomus* a *Australophlebotomus* a v Novém světě *Lutzomyia*, *Brumptomyia*, *Hertigia* a *Warileya* (Killick-Kendrick, 1999; Depaquit a Léger, 2017).

Životní cyklus flebotomů zahrnuje 4 hlavní stádia – vajíčka, larvy, kukly a dospělce. Flebotomové žijící v tropických oblastech dokážou svůj životní cyklus dokončit v průběhu celého roku, v subtropických oblastech a na jihu mírného pásma pouze v teplejších měsících. Samice flebotoma naklade v průměru 30-70 vajíček na krytá místa s dostatečnou vlhkostí a organickým materiálem (například díry v zemi, zvířecí nory, podklad z listů) (Killick-Kendrick, 2001; Service, 2012). Po 4-20 dnech se vajíčka líhnou, tato doba může záviset na počasí, v chladnějším počasí se tato doba může

prodloužit nebo mohou vajíčka přejít do diapauzy (Service, 2012; Lawyer et al., 2017). Larvální instary jsou 4 a jejich vývoj trvá 20-30 dní. Tato doba závisí na druhu flebotoma, okolní teplotě nebo potravních zdrojích (Volf a Volfová, 2011) a může trvat i několik měsíců, pokud přejdou do diapauzy kvůli zimě (Killick-Kendrick, 2001; Service, 2012). Larvy flebotomů jsou terestrické a živí se organickou hmotou (Killick-Kendrick, 1999). Poté se larvy zakuklí a po 6-13 dnech se z nich stanou dospělci (Service, 2012). Obvykle se nejprve líhnou samci, kteří ve volné přírodě žijí asi týden, samice žijí déle a projdou více než jedním gonotrofickým cyklem (Rutledge a Gupta, 2002). Obě pohlaví se živí rostlinnými cukry, ke kladení vajec navíc samičky potřebují nasát krve. Klazení vajíček poté následuje po 5-8 dnech (Lane, 1993). Některé druhy mohou být i autogenní a samičky tak dokáží produkovat minimálně jednu snůšku vajíček bez nasátí krve (el-Kammah, 1973).

Flebotomové jsou thelmofágové, používají své mandibuly jako nůžky, kterými naruší kůži a cévy a sají vytékající krev (Lane, 1993). Mnoho druhů flebotomů je exofágních, ale u některých druhů je známo, že jsou endofágní a endofilní a rádi sají v lidských a zvířecích příbytcích. Neaktivnější jsou hlavně v noci a za soumraku. Přes den odpočívají na chladných a vlhkých místech (Killick-Kendrick, 1999).

Flebotomové jsou rozděleni podle schopnosti přenášet různé druhy leishmanií na specifické a permissivní druhy. Specifické druhy flebotomů dokážou přenášet pouze jeden druh leishmanie. Příklady specifických přenašečů *L. major* jsou *P. papatasi* (Pimenta et al., 1994) a *P. duboscqi* (Svárovská et al., 2010)., specifickým přenašečem *L. tropica* je *P. sergenti* (Kamhawi et al., 2000). Ve specifických vektorech využívají leishmanie pro své přichycení k epitelu mezenteronu povrchový lipofosfoglykan (LPG), který je druhově specifický a váže se na galektin na povrchu mikrokloků střevních buněk (shrnuto v Kamhawi, 2006). Většina druhů flebotomů se ale řadí mezi permissivní přenašeče, tzn., že podporují vývoj více druhů leishmanií. Patří mezi ně například *Lutzomyia longipalpis*, *P. arabicus*, *P. argentipes* nebo *P. perniciosus* (shrnuto v Dostálová a Volf, 2012). Mechanismus přichycení leishmanií ve střevě permissivního přenašeče zatím není zcela jasný, ale zdá se, že narozdíl od specifických přenašečů, je na LPG nezávislý (Volf a Myšková, 2007). Předpokládá se, že důležitou roli při vazbě leishmanií ve střevě vektora by mohly hrát O-glykosylované proteiny. Ty tvoří mukózní vrstvu na mikrovilárním epitelu střeva flebotoma a vážou se k povrchu promastigotů, pravděpodobně díky lektinovým receptorům leishmanií (Myšková et al., 2007; Myšková et al., 2016).

I když jsou flebotomové známí hlavně jako přenašeči leishmanií, přenášejí i jiné patogeny. Například ve Střední a Jižní Americe přenášejí bakterie *Bartonella bacilliformis*, které způsobují horečnatá onemocnění (shrnuto v Minnick et al., 2014; Pons et al., 2016). Dále jsou flebotomové odpovědní za přenos některých arbovirů, konkrétně se jedná o rod *Phlebovirus* (řád Bunyavirales, čeled'

Phenuiviridae). Phleboviry jsou obalené (-)ss RNA viry (shrnuto v Alkan et al., 2013; shrnuto v Moriconi et al., 2017). Většinou způsobují nekomplikované až středně těžké horečky – sand fly fever, pappataci fever. Toscana virus má výrazný tropismus k centrálnímu a perifernímu nervovému systému a způsobuje neuroinvasivní stavy, jako je meningitida a encefalitida (Peyrefitte et al., 2005; shrnuto v Alkan et al., 2013; Howell et al., 2015; shrnuto v Moriconi et al., 2017).

2.3.2 Tiplíci

Tiplíci se stejně jako flebotomové řadí do řádu Diptera. Patří do čeledi Ceratopogonidae a většina druhů je entomofágní nebo se živí nektarem. Jen čtyři rody tiplíků jsou hematofágní – *Leptoconops*, *Austroconops*, *Forcipomyia* a *Culicoides* (Borkent, 2005).

Tiplíci jsou 1-3 mm velké mušky a vyskytují se téměř ve všech podnebných pásích po celém světě (Országh, 1980) kromě Nového Zélandu, Patagonie, Havajských ostrovů a Antarktidy (Mellor, 2000).

Stejně jako u flebotomů zahrnuje jejich životní cyklus 4 stádia – vajíčka, larvy, kukly a dospělce. Samičky kladou desítky až stovky vajíček na vlhká místa s organickým materiálem, například na břehy vodních ploch, na zaplavovaná místa, do tlející vegetace nebo do hnoje uvnitř stájí (Országh, 1980). Po několika dnech se z vajíček líhnou larvy, které se živí tímto organickým materiálem. Larvální instary jsou 4. V oblastech, kde jsou tiplíci aktivní celoročně, trvá larvální vývoj zhruba dva měsíce. U tiplíků vyskytujících se v arktických oblastech může trvat až několik let. U tiplíků vyskytujících se v mírném pásu slouží larvální stádium k přezimování. Poté dochází ke kuklení, které se děje buď pod vodní hladinou nebo ve vlhkém substrátu. Po 3-10 dnech se z kukly líhne dospělec, který žije asi měsíc (Service, 2001).

Po vylíhnutí dospělců dochází k jejich páření. Samci tvoří roje, díky kterým je samice snáze najdou. Obvykle dojde jen k jedné kopulaci a ve spermatéce samice zůstávají spermie pro oplodnění několik snůšek vajec. Stejně jako u flebotomů, potřebují samičky pro vývoj vajíček krev. Mezi hostitele tiplíků se řadí savci, ptáci, plazi, obojživelníci i bezobratlí, ale většina druhů tiplíků preferuje savce nebo ptáky (Martínez-de la Puente et al., 2015). Několik málo druhů tiplíků je schopno autogenie (Borkent, 2005). Některé druhy tiplíků dokáží za svůj život dokončit jen jeden gonotrofický cyklus, ale například druhy jako *Culicoides obsoletus* nebo *C. punctatus*, které jsou v České republice běžné, dokáží gonotrofický cyklus dokončit až třikrát (Országh, 1980).

Na celém světě bylo popsáno okolo 1350 druhů tiplíků (Borkent a Dominiak, 2020). V Evropě se vyskytuje okolo 120 druhů tiplíků (Szadziwski et al., 2013) a z České republiky je hlášených 52 druhů (Tóthová a Knoz, 2009; Rádrová et al., 2016). Z rodu *Culicoides* se u nás vyskytují tiplíci šesti podrodů -

Avaratia, *Beltranmyia*, *Culicoides*, *Monoculicoides*, *Oecata* a *Pontoculicoides* (Tóthová a Knoz, 2009). Nejhojnějšími druhy jsou u nás tiplíci z komplexu *C. obsoletus*. Tento druhový komplex je rovněž nejhojnější i ve střední a severní Evropě. Řadí se do něj 4 druhy – *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* a *C. chiopterus* (Goffredo a Meiswinkel, 2004; Savini et al., 2005). Tyto druhy tiplíků jsou spíše mamaliofilní a vyskytují se v okolí hospodářských zvířat nebo spárkaté lesní zvěře. Dalšími hojnými druhy na našem území jsou *C. pulicaris*, *C. punctatus* nebo *C. pallidicornis* (Rádrová et al., 2016).

Tiplíci jsou významní trapiči hospodářských zvířat a člověka. Bodnutí tiplíkem se vyznačuje ostrou bolestí a lokálním zčervenáním, svědění pak může přetrvávat několik týdnů (Weinburgh a Pratt, 1962). Nejnáchylnější k pobodání tiplíky jsou koně. Může u nich docházet k dermatitidě zvané „sweet itch“ nebo „Queensland itch“. Projevuje se rudými pupeny na kůži a zvýšenou citlivostí (Foil a Foil, 1988).

Tiplíci jsou také důležití přenašeči nejrůznějších patogenů jako jsou viry, protozoa nebo helminti. Asi nejznámějším patogenem přenášeným tiplíky je Bluetongue virus (BTV), který způsobuje katarální horečku ovcí a dalších kopytníků. Jedná se o horečnaté onemocnění, při kterém dochází k překrvení ústní dutiny a otoku sliznic, nadměrnému slinění a nasálnímu výtoku, později může dojít i k nekróze epitelu nosu a úst. Může docházet i k zánětům v oblasti paznehtů a bolestivosti nohou a v ojedinělých případech dochází k cyanóze jazyka (Mellor, 2001a; Darpel et al., 2007). Virus přenáší mnoho druhů tiplíků, v Evropě hlavně *C. imicola*, v severnějších oblastech tiplíci z *C. obsoletus* komplexu, *C. pulicaris*, *C. punctatus*, *C. newsteadi*, *C. paolae* a *C. circumscriptus* (shrnuto v Purse et al., 2015; Foxi et al., 2016; Foxi et al., 2019). V subsaharské Africe přenášejí tiplíci africký mor koní, což je virové onemocnění a úmrtnost se pohybuje kolem 90 % (shrnuto v Mellor et al., 2000). Postihuje oběhovou a dýchací soustavu a způsobuje rozsáhlé vnitřní krvácení (Howell, 1960). Nejdůležitějším vektorem je *C. imicola* (de Waal et al., 2016). Virus bovinní efemérní horečky (BEFV) vyvolává u hovězího dobytka vážné příznaky jako je horečka, rozedma plic, bronchiolitida, ochablost a anorexie (Burgess a Spradbrow, 1977). Dalším patogenem je Schmallenberský virur (SBV). U přežvýkavců způsobuje horečku, průjem a sníženou produkci mléka, může mít ale také teratogenní účinek a způsobovat potraty, předčasné porody či narození deformovaných mláďat (shrnuto ve Wernike et al., 2015). Viry přenášené tiplíky jsou nejčastěji zoonózy, pouze Oporouche virus (OROV) je patogenní jen pro člověka. Způsobuje horečky, bolesti hlavy, svalů a kloubů, nevolnost, zvracení, průjem, anorexie či fotofobie (Pinheiro et al., 1982; Mellor, 2001b).

Z protozoárních infekcí jsou tiplíci zodpovědní za přenos původců ptačí malárie. Důležitý je *Leucocytozoon caullery*, který způsobuje akutní hemoragickou horečku u drůbeže v severovýchodní Asii (Fallis a Bennett, 1961). *Haemoproteus meleagridis* způsobuje kulhavost, ztrátu váhy a zpomalení

růstu u hrabavých ptáků v Severní Americe (Atkinson, 2001) a mezi opicemi je v Africe přenášen *Hepatocystis kochi* (Greiner a Bennet, 1977).

Pravděpodobně také přenášejí ptačí trypanosomy. DNA *Trypanosoma* spp. byla detekována v několika nachytaných jedincích *C. kibunensis*, *C. pictipennis*, *C. obsoletus*, *C. reconditus* a *C. segnis* (Bernotiené et al., 2020) a přirozené infekce *T. bennetti* byly nalezeny v *C. alazanicus*, *C. pictipennis*, *C. festivipennis* a *C. clastrieri* (Svobodová et al., 2017). Experimentální infekce *C. nubeculosus* a *C. impunctatus* s *T. everetti* ukázaly, že trypanosomy jsou schopné vývoje a produkce metacyklických trypomastigotů v obou druzích tiplíků (Bernotiené et al., 2020).

Tiplíci mohou ale také hostit jednohostitelská kinetoplastida. Prvním popsáním druhem byl *Herpetomonas ztiplika* ze samice *C. kibunensis* (Podlipaev et al., 2004b). Dalším druhem je *Sergia podlipaevi*, který byl izolován z *C. festivipennis* a *C. truncorum* (Svobodová et al., 2007). Třetím popsáním druhem je *Herpetomonas trimorpha*, který byl izolovaný z *C. truncorum* (Zídková et al., 2010). Posledním zaznamenaným druhem jednohostitelských kinetoplastid je *Crithidia* sp., DNA tohoto druhu byla poprvé zaznamenána u *C. pictipennis* (Bernotiené et al., 2020).

Z helmintů přenášejí tiplíci ptačí filárie, které jsou ale málo patogenní. Na člověka a hospodářská zvířata mohou přenášet filárie rodu *Mansonella*. Většina infekcí je asymptomatických, občas ale může nákaza vyvolávat symptomy spojené s alergickou reakcí (Crewe, 2001). Na kopytníky mohou ještě přenášet filárie způsobující onchocerkózu (shrnuto v Halouzka a Hubálek, 1996). Tyto filárie mohou způsobovat různé dermatitidy, záněty očí nebo u koní sníženou pohyblivost kloubů (Moignoux, 1951; shrnuto v Halouzka a Hubálek, 1996).

2.4. Leishmanióza v Evropě

V mnoha zemích jižní Evropy je leishmanióza endemická minimálně od starověku. V současné době je ale stále větší riziko šíření onemocnění do dříve neendemických regionů. Mezi hlavní faktory patří šíření přenašečů a rezervoárových hostitelů do nových oblastí v důsledku globálního oteplování, migrace uprchlíků z endemických regionů, rostoucí urbanizace a globalizace (Dujardin et al., 2008; shrnuto v Pavli a Martezou, 2010; Berry a Berrang-Ford, 2016; shrnuto v Oryan a Akbari, 2016; Kholoud et al., 2018). Se vzrůstajícím cestovním ruchem a turismem přibývají také počty případů importovaných leishmanióz (shrnuto v Rocha et al., 2022; Van der Auwera et al., 2022) a riziko zavlečení nových druhů leishmanióz je tím vyšší. Výskyt flebotomů může také ovlivnit šíření zemědělství do semiaridních oblastí a zavádění umělých zavlažovacích systémů (shrnuto v Maia, 2024). Největší vliv na rozšiřování areálů flebotomů má ale již zmiňované globální oteplování. Důkazem jsou nálezy flebotomů v oblastech kontinentální Evropy – Německo, Rakousko, Švýcarsko a Slovensko (Naucke a Pesson, 2000; Naucke a

Schmitt, 2004; Dionísio et al., 2011; Naucke et al., 2011; Lopes et al., 2013; Dvořák et al., 2016; Kniha et al., 2021).

Nejčastějším původcem leishmaniózy v Evropě je *L. infantum*. Tento druh leishmanie patří spolu s *L. donovani* do druhového komplexu *L. donovani* (Hide a Bañuls, 2006). *L. infantum* způsobuje leishmaniózy endemicky v 17 státech jižní Evropy (Maia et al., 2023), ale v posledních letech se rozšiřuje stále více na sever. Byly zaznamenány autochtonní případy u koní, psů a dětí v jižním Německu, Rakousku a Rumunsku (Bogdan et al., 2001; Koehler et al., 2002; Maroli et al., 2008; Naucke et al., 2008; Mircean et al., 2014). Nejvýznamnějšími rezervoárovými hostiteli *L. infantum* jsou psi (Faye et al., 2010; Burza et al., 2018). Nakažení psi mohou být symptomatictí, ale i asymptomatictí, kteří vypadají zdravě a nemají žádné příznaky onemocnění, ale mohou hrát důležitou roli v přenosu onemocnění (shrnutí v Michel et al., 2011; Miró a López-Vélez, 2018). Pokud vykazují klinické příznaky, jedná se jak o kožní, tak i viscerální projevy onemocnění, které může být bez léčby smrtelné (Quinnell a Courtenay, 2009). Dalšími rezervoárovými hostiteli *L. infantum* v Evropě jsou kočky, zajáci, králíci nebo krysy a předpokládá se, že by potenciálními rezervoárovými hostiteli mohli být i lišky, vlci nebo koně (shrnutí v Cardoso et al., 2021). Lidé jsou náhodnými hostiteli a *L. infantum* u nich způsobuje život ohrožující viscerální nebo lokalizovanou a samohojící se kožní leishmaniózu (Gradoni et al., 2017). Potvrzenými evropskými přenašeči je několik druhů flebotomů podrodu *Larrousius* – *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. perfiliowi*, *P. neglectus* a *P. tobbi* (Dvořák et al., 2018; Maia et al., 2023). V současné době se uvažuje, že by do přenosu mohly být zapojeny i druhy *Sergentomyia minuta* a *Phlebotomus mascittii* (shrnutí v Maia, 2024). *Sergentomyia minuta* se hojně vyskytuje v endemických oblastech výskytu leishmaniózy způsobovaných *L. infantum* (Depaquit a Léger, 2017) a už několikrát byla v tomto druhu flebotoma v jižní Evropě detekována DNA *L. infantum* (Pereira et al., 2017; Latrofa et al., 2018; Abbate et al., 2020). *P. mascittii* je nejseverněji rozšířený druh flebotoma, byl zaznamenán i na Slovensku (Dvořák et al., 2016; Dvořák et al., 2018; Kniha et al., 2021) a také v něm byla detekována DNA *L. infantum* (shrnutí v Maia, 2024). S těmito druhy flebotomů ale zatím nebyly provedeny žádné experimentální infekce, které by prokázaly, zda se v nich *L. infantum* dokáže vyvíjet a zda jsou schopny tento druh leishmanie přenášet na hostitele.

Ve střední Evropě se u koní a dobytka začala objevovat kožní leishmanióza způsobovaná *L. martiniquensis*. Jedná se o Německo (Müller et al., 2009), Švýcarsko (Lobsiger et al., 2010), Rakousko (zatím nepublikováno) a Českou republiku (Jahn, Modrý, Votýpka, zatím nepublikováno). Na rozdíl od případů v Thajsku (Pothirat et al., 2014; Intakhan et al., 2020; Srivarasat et al., 2022) nebyl ale v Evropě zaznamenán žádný lidský případ.

V Řecku se sporadicky objevuje také kožní leishmanióza, kterou způsobuje *L. tropica* (Garifallou et al., 1984; Christodoulou et al., 2012; Barriatua et al., 2021). Poprvé byla identifikována v roce 1984, nicméně kožní leishmanióza byla v této oblasti pozorována už dávno před tím (Ntais et al., 2013). Potvrzeným přenašečem *L. tropica* je *P. sergenti* (Depaquit et al., 2002). Experimenty s *P. perniciosus* a *P. tobbi* ukázaly, že se tento druh leishmanie v nich dokáže dobře vyvíjet a prokázaly i přenos na hostitele. Minimálně tyto dva zástupci z podrodu *Larroussius* by tedy potenciálně mohli hrát roli v přenosu *L. tropica* (Bongiorno et al., 2019; Vaselek a Volf, 2019). Tento druh leishmanie je hojný v Sýrii a sousedních zemích (Al-Salem et al., 2016; Du et al., 2016; Kanani et al., 2019). Protože se kvůli syrské občanské válce a dalším konfliktům do Evropy dostávají uprchlíci právě z těchto zemí, přibývají zde zavlečené případy způsobené *L. tropica* (Di Muccio et al., 2015; Mockenhaupt et al., 2015; Söbirk et al., 2018; Boggild et al., 2019; Guery et al., 2021). Vzhledem k tomu, že *P. sergenti*, *P. perniciosus* a *P. tobbi* mají v jižní Evropě široké rozšíření, stoupá riziko vzniku nových endemických ohnisek *L. tropica* (Depaquit et al., 2001; Afonso et al., 2005; Ready, 2010; Šeblová et al., 2015a).

Na Kypru jsou od roku 2006 zaznamenávány lidské případy leishmaniózy způsobené *L. donovani* (Antoniou et al., 2008; Antoniou et al., 2009) a v roce 2014 zde byl potvrzen lokální cyklus (Koliou et al., 2014). Nedávno byly také v Turecku zaznamenány autochtonní případy *L. donovani* (Özbilgin et al., 2016; Özbilgin et al., 2022; Özbel et al., 2022), poprvé v roce 2014, kdy zde docházelo kvůli občanské válce k intenzivní migraci lidí ze Sýrie (Koltas et al., 2014). Stejně jako v předchozím případě, je možná potenciální introdukce *L. donovani* prostřednictvím infikovaných osob do nových oblastí s výskytem permissivních druhů flebotomů (shrnuto v Maia, 2024).

V jižním Turecku byly nedávno zaznamenány také případy způsobené *L. major* a předpokládá se, že už zde probíhá celý přenosový cyklus (Özbilgin et al., 2016). Ačkoliv by se šance na zavlečení *L. major* do Evropy mohly zdát nízké v souvislosti s tím, že jejími rezervoárovými hostiteli jsou dominantně pískomilové, nemusí tomu tak být (shrnuto v Maia, 2024). Ukazuje se, že spektrum rezervoárových hostitelů je poměrně široké – například různí další hlodavci jako hraboši a gundi nebo třeba i ježci (Faiman et al., 2013; Tomás-Pérez et al., 2014). V Turecku byla nalezena DNA *L. major* ve slezině myšice (Karakuş et al., 2020). Asi nejzajímavějším nálezem byla v Portugalsku detekce DNA *L. major* v samici *Sergentomyia minuta* (Campino et al., 2013) a u toulavých koček (Pereira et al., 2020), což může naznačovat, že *L. major* v jižní Evropě už cirkuluje (shrnuto v Maia, 2024). Přispívá k tomu i fakt, že potvrzeným přenašečem *L. major* je *P. papatasi*, který se v jižní Evropě vyskytuje.

V souvislosti s introdukcí exotických druhů leishmanií do oblastí, kde už nějaké druhy leishmanií cirkulují, může docházet k tvorbě hybridů (shrnuto Maia, 2024). Ti pak mohou být jinak infekční pro flebotomy nebo u hostitelů způsobovat odlišnou patogenitu oproti původním kmenům

(Volf et al., 2007). V Turecku byl zaznamenán autochtonní případ leishmaniózy způsobené hybridem *L. infantum/donovani* (Özbilgin et al., 2022). Pokusy ukázaly, že se tento hybrid dokáže vyvíjet v *P. tobbi* a *P. perniciosus* (Šeblová et al., 2015a). V Portugalsku byl zaznamenán lidský případ viscerální leishmaniózy u HIV pacienta způsobený hybridem *L. major/L. infantum* (Ravel et al., 2006). Experimenty s tímto hybridem ukázaly, že se dokáže vyvíjet v *P. papatasi* (Volf et al., 2007). Široký areál rozšíření druhů flebotomů, kteří jsou vnímaví k těmto hybridům, přispívá k možnosti potenciálního šíření leishmanióz do nových oblastí (Volf et al., 2007).

Kvůli klimatickým změnám, změnám areálů vektorů a rezervoárových hostitelů, rostoucímu cestování a migraci uprchlíků z endemických zemí se tedy předpokládá, že šíření leishmanióz do nových regionů bude pokračovat (shrnutí v Maia, 2024). Permisivita podrodu *Larroussius* (Volf a Myšková, 2007) a vnímavost evropských druhů flebotomů k hybridům leishmanií (Volf et al., 2007; Šeblová et al., 2015a) tyto hypotézy jen podporuje.

3 Materiál a metodika

3.1 Použité roztoky

- Fyziologický roztok - 150 mM NaCl
- Ředící roztok (pro počítání leishmanií v Bürkerově komůrce) - 0,85% NaCl + 1% formaldehyd (CH₂O)
- Médium pro kultivaci leishmanií - médium M199 (Sigma) + 10% fetální kravské sérum (Gibco) + 1% BME vitamíny (Sigma) + 250 ug/ml amikacin (Bristol- Myers Squibb) + 2% sterilní moč
- Krevní agar pro kultivaci *L. martiniquensis* z přenašečů - pevná složka: Bacto Neopeptone 2g (BD), Bacto Agar (BD) 2g, NaCl 0,6g doplněno do 100ml H₂O, sterilizováno autoklávnem 20min, po zchlazení přidáno 25ml sterilní defibrilované králičí krve (Bioveta), tekutá složka (Over-lay): výše popsané médium používané pro běžnou kultivaci leishmanií
- 70% nedenaturovaný ethanol - na uchovávání nachytaných tiplíků

3.2 Kultivace leishmanií

V mé diplomové práci byly použity druhy *Leishmania infantum* (MHOM/TR/2000/OG-VL), hybrid *L. infantum/L. donovani* (ITOB/TR/2005/CUK3), *L. donovani* (MHOM/NP/03/BPK282), *L. major* (MHOM/LX/87/CS3) a *L. martiniquensis* (MHOM/TH/2019/Cu2 a MEQU/CZ/2019/Aig1).

Tyto kultury jsou uchovávány v kryobance v tekutém dusíku v zamrazovacích ampulích CryoTube™ Vials (NUNC) v médiu obsahujícím 5–10 % kryokonzervační látky DMSO (Sigma-Aldrich). 1 až 2 týdny před pokusy byly kultury rozmrazeny a přeočkovány do tekutého kultivačního média M199 a kultivovány při 23 °C v kultivačních zkumavkách. Kultury byly pravidelně přeočkovávány do nového média, vždy 3-5 kapek na 1,5 ml média. Pro pokusy byly používány pouze nízké pasáže (do p10) a kultury v exponenciální fázi růstu.

3.3 Chov flebotomů

Pro pokusy byly použity druhy flebotomů z chovů naší laboratoře – *Phlebotomus perniciosus* (Španělsko), *P. tobbi* (Turecko), *P. argentipes* (Indie), *P. papatasi* (Turecko), *P. duboscqi* (Senegal) a *Sergentomyia minuta* (Portugalsko).

Kolonie flebotomů se chovají v insektáriu, kde se udržují vhodné podmínky pro jejich vývoj. Je zde trvale udržovaná vlhkost 60-70 %, teplota 25-26 °C a fotoperioda 14 hodin světla a 10 hodiny tmy. Dospělí flebotomové jsou vypouštěni do nylonových sítí přivázaných na kovových konstrukcích, které jsou umístěny do igelitových pytlů. Optimální vlhkost v pytli (70-90 %) zajišťuje vata navlhčená

destilovanou vodou v mističce, která je položená na síť. Dospělci jsou krmeni 50% roztokem sacharózy. Malinký kousek vaty napuštěný tímto roztokem je položený v síti v malé Petriho misce. Jednou nebo dvakrát týdně se samice nechávají nasát na uspané myši kmene BALB/c, gekonovi nebo imobilizovaném králíkově (záleží na druhu). Po defekaci jsou samice exhaustorem přemístěny do sádrou vylitých kelímků, které jsou navlhčeny destilovanou vodou. Zde dochází ke kladení vajíček, po kterém dochází k úhynu samic. Kelímky uzavřené víčkem s monofilem jsou umístěny do plastových boxů, na dně boxu je navlhčený vysterilizovaný písek k udržování správné vlhkosti. Z vajíček se poté líhnou larvy (L1-L4), ty jsou krmené namletým králičím trusem, který je 4 týdny fermentovaný za teploty 25 °C a vysoké vlhkosti. Larvy L4 se nakonec zakuklí a vylétávají noví dospělci, kteří se vypouštějí do sítí. Za laboratorních podmínek trvá životní cyklus flebotomů 5-8 týdnů (Volf a Volfová, 2011).



Obrázek 3 – Vybavení pro chov flebotomů; **a** – dva různé typy skleněných exhaustorů a skleněné krmítko, které se používá na experimentální infekce; **b** – boxy s kelímků, ve kterých se vyvíjejí larvičky a sítě s dospělými flebotomy v igelitových pytlích uložené v termostatu; **c** – digestoř na výrobu potravy pro larvičky; **d** – detail zrání potravy pro larvičky během fermentace; **e** – kelímky s larvičkami uzavřené víčkem s nylonovou tkaninou, stěny kelímků jsou pokryté sádrou; **f** – nylonové síť přivázané na kovovou konstrukci (převzato Volf a Volfová, 2011)

3.4 Experimentální infekce

Na experimentální infekční sání je nejprve potřeba si připravit kůžičky z 1-3 dny starých kuřátek. Kůže jsou stahovány z hřbetní a břišní strany oškubaného kuřete. Poté je kůžička promyta ve sterilním fyziologickém roztoku, kde dochází i ke zbavení tuku, následně v 70% čistém etanolu a znovu ve fyziologickém roztoku. Hotové kůžičky se skladují v -20 °C (Volf a Volfová, 2011).

Na pokus je třeba 3-4 dny stará kultura leishmanií v růstové fázi. Promastigoti jsou promyty ve fyziologickém roztoku a spočítání pomocí Bürkerovy komůrky. Poté jsou leishmanie resuspendovány v krvi na finální koncentraci 10^6 leishmanií/ml. 300 μ l naředěné kultury je smícháno s 2700 μ l tepelně inaktivované beraní krve (35 minut ve vodní lázni při 56 °C).

Na skleněné krmítko se natáhne kuřecí kůžička a pomocí parafilmu připevní. Pomocí tenké Pasteurovy pipety se krmítko naplní směsí krve s leishmaniami. Krmítka se připevní na stojany a na krmítka se pomocí gumiček a kolíčků připevní malé sítky s flebotomy nebo tiplíky natažené na ocelové konstrukci (20x20x20 cm). Krmítka je pomocí vodní lázně s vnější cirkulací ohříváno na 37 °C.

Sání probíhá zhruba 2 hodiny v přítmí při teplotě v místnosti mezi 25-27 °C. Poté je síťka sundána z krmítka a nasáté samice se třídí pomocí exhaustoru do nové sítky. Síťka s nasátými samicemi je vložena do pytle, na síťku se položí malá Petriho miska s navlhčeným kouskem vaty destilovanou vodou pro udržení vlhkosti a jako potrava je jim podáván kousek vaty v malé Petriho misce nasáklý 50% sacharózou (Volf a Volfová, 2011). Pytle se sítěkami jsou umístěné v termostatu při teplotě 26 °C.

3.5 Pitvy flebotomů a hodnocení infekcí

Nasáté samice byly pitvány v různých časových intervalech po sání – 2. den pro ověření správného provedení pokusu a přežívání leishmanií v nasáté krvi, 4. den pro ověření, zda leishmanie přežijí ve flebotomech defekaci a 10. den pro ověření, zda leishmanie dokáží ve flebotomech tvořit infekční stádia.

Samice flebotomů byly uspány v kelímku na ledu a poté přeneseny do kapky fyziologického roztoku na podložním skle. Pod binokulární lupou byly zbaveny hlavy, křídel a končetin pomocí pinzety a vyrobeného pitvátko (entomologická minucie zasazená do dřevěné špejle). Následně bylo vytaženo střevo a přeneseno do nové kapky fyziologického roztoku. Poté bylo přikryto krycím sklíčkem a vzniklý preparát byl pozorován pod světelným mikroskopem. Byla pozorována lokalizace a intenzita infekce a vše bylo zaznamenáváno do protokolu. Intenzitu rozlišujeme na slabou (méně než 100 leishmanií), střední (100-1000 leishmanií) a silnou (více než 1000 leishmanií) (Myšková et al., 2008). Lokalizace leishmanií ve střevě byla hodnocena podle Sádlová et al. (2010) – u nasátých samic před defekací

endoperitrofický prostor (uvnitř peritrofické matrix), dále pak abdominální mezenteron, thorakální mezenteron, kardia a stomodeální valva.

3.6 Morfologická analýza leishmanií

U flebotomů infikovaných *L. martiniquensis* byly roztakové preparáty dělány vždy 2. den po sání ze všech vypitvaných střev, protože promastigotní stádia leishmanií z podrodu *Mundinia* nejsou v rané fázi infekce moc pohyblivá a mají spíše kulovitý tvar, takže nejsou dobře odlišitelná od krvinek. Tyto roztakové preparáty pitvaných střev byly tedy prohlíženy za účelem zjištění procenta infikovaných samic. U flebotomů infikovaných leishmaniami z podrodu *Leishmania* byly roztakové preparáty dělány 10. den po sání pro zjištění, zda leishmanie dokáží vytvářet metacyklická stádia, která jsou infekční pro obratlovčího hostitele.

Vypitvané střevo bylo v kapce fyziologického roztoku na podložním skle rozmáčknuto krycím sklem a rozetřeno. Roztěr byl poté fixován methanolem a po zaschnutí na něj byl nanesen barvicí roztok Giemsa-Romanovského (Sigma), který byl 20x ředěný destilovanou vodou. Takto se sklíčka nechávala barvit 20 minut, poté se opláchla vodou z kohoutku a nechala uschnout.

Nabarvené preparáty byly prohlíženy pod světelným mikroskopem (Olympus BX51) se zabudovanou kamerou (DP-70) při zvětšení 1000x a za použití imerzního oleje. Jednotlivé leishmanie byly foceny v programu QuickPHOTO MICRO 2.2 (Olympus). V programu ImageJ (Java) byla následně měřena délka těla, délka bičíku a šířka těla jednotlivých leishmanií. Vždy bylo měřeno 200 leishmanií u každé kombinace druhů flebotoma a leishmanie. Z každého sklíčka bylo změřeno 50 leishmanií (4 sklíčka na každou kombinaci). Naměřená data byla následně vyhodnocena v programu SPSS. Naměřené leishmanie 10. den po infekci jsme rozlišovali na tři morfologické formy – nektomonády (délka těla je větší než 14 μm), leptomonády (délka těla je menší než 14 μm a délka bičíku je menší než dvojnásobek délky těla) a metacyklické promastigoty (délka těla je menší než 14 μm a délka bičíku je větší než dvojnásobná délka těla) (Sádlová et al., 2010).

3.7 Statistika

Všechny statistické analýzy byly provedeny v programu SPSS verze 27. Rozdíly v procentech infikovaných samic a poměru morfologických forem byly analyzovány Pearsonovým Chí-kvadrátovým testem, v případě čtyřpolní tabulky Fisherovým Chí-kvadrátovým testem. Pokud bylo více než 20 % očekávaných četností menších než 5 nebo N menší než 30, byly použity exaktní verze testu a v případě výskytu nul také Monte Carlo simulace. Rozdíly v zastoupení jednotlivých kategorií mezi druhy byly testovány pomocí z-testu. Na analýzu počtu promastigotů zjištěných pomocí qPCR byly použity Neparametrický Mediánový test a Kruskalův-Wallisův test, protože hodnoty neměly normální

rozdělení (ověřeno pomocí online kalkulátoru <https://www.gigacalculator.com/calculators/normality-test-calculator.php>).

3.8 Experimentální sání s jinými typy membrán na skleněném krmítku a s Hemotekem

Při pokusech se *Sergentomyia minuta* byly použity i jiné typy membrán než kuřecí kůžičky, jejichž příprava a použití je popsáno v kapitole 3.4.

Jednou z variant bylo nasolené prasečí střevo, které je běžně dostupné pro přípravu klobás a párků. Střevo bylo nejprve dva dny macerováno v destilované vodě a fyziologickém roztoku při 4 °C, po 12 hodinách se roztok měnil. Následně bylo střevo podélně rozstříženo a rozřezáno na čtverce přibližně 4 x 4 cm. Tyto čtverce byly poté promývány další 3 dny ve fyziologickém roztoku, který se 12 hodinách měnil. Následně byly čtverce rozloženy do Petriho misek a uchovávány v -20 °C.

Dalším typem byla umělá membrána (Hemotek feeding membrane, Hemotek Ltd). Ta byla nejprve opět nastříhána na čtverce o velikosti asi 4 x 4 cm. Poté byly jednotlivé čtverce promyty 2x v čistém 70% etanolu a 2x ve sterilním fyziologickém roztoku.

Oba tyto typy membrán byly na krmítko přichyceny stejným způsobem jako kuřecí kůžička, jak je popsáno v kapitole 3.4.

Při některých pokusech s kuřecí kůžičkou a umělou membránou byla použita krevní plazma. Krev ve zkumavce byla zcentrifugována 10 min při 4380 RPM. Poté byl supernatant obsahující krevní plazmu odebrán a zahříván ve vroucí vodě, dokud tekutina nezglotatěla. Takto vzniklý gel byl umístěn na Petriho misku a byla v něm namáčena membrána připevněná na skleněném krmítku. Nakonec byla krevní plazma na krmítku usušena pomocí fénu (osobní sdělení Petr Volf).

Kromě skleněných krmítek napojených na vodní lázeň jsme také zkusili membránové sání za použití Hemoteku. Zařízení bylo nejprve sestaveno podle pokynů výrobce. Poté byla na jednu stranu kovového zásobníku natažena kuřecí kůžička a připevněna pomocí gumičky. Z druhé strany byl zásobník naplněn krví a uzavřen plastovými špunty. Nakonec byl zásobník namontován na podstavec, který byl zahřátý na 37 °C a na kůžičku byla položena síťka s flebotomy.

3.9 Sběr a zpracování tiplíků

V oblastech předpokládaného výskytu autochtonních leishmanióz v České republice byly prováděny odchyty tiplíků (Slatiňany, Ústí nad Labem). Ve Slatiňanech proběhly odchyty v květnu a v září 2022, v Ústí nad Labem v květnu a v červenci 2023.

Tiplíci byli chytáni pomocí CDC světelných pastí, kde jako atraktant sloužilo právě světlo, někdy doplněné o výbojku s UV světlem (Obrázek 4). Tiplíci byli nasátí skrz větráček a zůstali zachycení v síťce. Pasti byly rozmístěné vždy odpoledne a sbírané druhý den ráno. Nachytaný hmyz byl pomocí exhaustoru přemístěn ze sítky do kelímku, který byl vložen do ledu, aby došlo k uspání nachytaného hmyzu. Poté byli z nasbíraného materiálu odebráni tiplíci a umístěni do nedenaturovaného 70% etanolu.



Obrázek 4 – CDC světelné pasti nainstalované pro odchyt tiplíků

Při dalším zpracování byli nachytaní tiplíci roztříděni na nenasáté, nasáté a vykladené samice a určeni do druhů pomocí určovacího klíče (Chvála, 1980). Takto roztřídění tiplíci byli rozděleni do poolů maximálně po 50 jedincích. Pooly s nasátými a vykladenými samicemi byly později otestovány na přítomnost leishmanií nebo jiných trypanosomatid pomocí nested PCR na SSU rRNA. Pokud jsme si u nějakého tiplíka nebyli jisti jeho druhem při určování pomocí Fauna ČSSR, byla z něho vyizolovaná DNA, která byla amplifikovaná na gen cytochrom oxidáza a vzorek byl poslán na sekvenaci.

Nachytané nenasáté samice z odchyty v červenci v Ústí nad Labem nebyly umístěné do etanolu, ale bylo s nimi provedeno infekční sání s *L. martiniquensis*.

Druhy tiplíků na jednotlivých lokalitách byly rozděleny podle dominance na:

- Eudominantní více než 10 %
- Dominantní 5 až 10 %
- Subdominantní 2 až 5 %
- Recedentní 1 až 2 %
- Subrecedentní méně než 1 %

3.10 Izolace DNA

Pro izolaci DNA z flebotomů a tiplíků byl použit High Pure PCR Preparation Kit (Roche). Flebotomové byli nejprve homogenizováni pomocí sterilních plastových pístů, pooly s tiplíky byly homogenizovány v homogenizátoru za použití sterilní nerezové kuličky. Poté byla DNA izolována podle protokolu dodaného výrobcem. DNA byla eluována do 200 µl elučního pufru a poté uskladněna v -20 °C.

3.11 PCR detekce

Pro zjištění přítomnosti leishmanií v nachytaných tiplících byla nejprve použita jednokroková PCR s primery na gen HSP70. Primery cílí na 434 bp dlouhý úsek DNA, který je společný pro všechny čtyři známé podrody leishmanií. Reakce probíhala za použití reakční směsi a protokolu viz tabulky 1 a 2.

Sekvence primerů: Forward primer: 5'-GAGCTGAACAAGAGCATCAAC-3'

Reverse primer: 5'-GGTGATCTGGTTGCGCTTG-3'

Jednotlivé složky	Množství
2x koncentrovaný Emerald Master Mix (Takara Bio)	10 µl
PCR H ₂ O	8 µl
10 µM Forward primer (Merck)	0,5 µl
10 µM Reverse primer (Merck)	0,5 µl
DNA (1-100 ng/reakci)	1 µl

Tabulka 1 – Složení reakční směsi jednokrokové PCR na HSP70

Počet opakování	Teplota	Délka trvání
1x	94 °C	3 min
30x	94 °C	30 s
	59 °C	30 s
	72 °C	30 s
1x	72 °C	7 min
1x	12 °C	∞

Tabulka 2 – Teplotní cyklus jednokrokové PCR na HSP70

Po otestování prvních 8 poolů s tiplíky vyšly 4 pooly pozitivně. Vzorky byly poslané na sekvenaci, ale DNA se neshodovala s DNA leishmanií. Rozhodli jsme se tedy k dalším analýzám poolů s tiplíky použít nested PCR na SSU rRNA. Při nested PCR byly pro amplifikaci SSU rRNA využity vnější a vnitřní primery. Produkt první PCR reakce, za využití vnějších primerů (Maslov et al., 1996), byl použit jako templát pro druhou PCR reakci s vnitřními primery (Votýpka et al., 2015). Složení reakčních směsí a jednotlivé protokoly pro první i druhý krok nested PCR jsou uvedeny v následujících tabulkách 3, 4, 5 a 6.

Sekvence primerů na první reakci: Forward primer: 5'-GACTTTTGCTTCCTCTAWTG-3'

Reverse primer: 5'-CATATGCTTGTTC AAGGAC-3'

Sekvence primerů na druhou reakci: Forward primer: 5'-GARTCTGCGCATGGCTCATTACATCAGA-3'

Reverse primer: 5'-CRCAGTTTGATGAGCTGCGCCT-3'

Jednotlivé složky	Množství
2x koncentrovaný Emerald Master Mix (Takara Bio)	6 µl
PCR H ₂ O	5 µl
10 µM Forward a reverse primer (Merck)	0,5 µl
DNA (1-100 ng/reakci)	1 µl

Tabulka 3 – Složení reakční směsi prvního kroku nested PCR

Počet opakování	Teplota	Délka trvání
1x	95 °C	3 min
34x	95 °C	30 s
	55 °C	30 s
	72 °C	2 min
1x	72 °C	3 min
1x	12 °C	∞

Tabulka 4 – Teplotní cyklus prvního kroku nested PCR

Jednotlivé složky	Množství
2x koncentrovaný Emerald Master Mix (Takara Bio)	10 µl
PCR H ₂ O	8 µl
10 µM Forward primer (Merck)	0,5 µl
10 µM Reverse primer (Merck)	0,5 µl
PCR produkt	1 µl

Tabulka 5 – Složení reakční směsi druhého kroku nested PCR

Počet opakování	Teplota	Délka trvání
1x	95 °C	3 min
33x	95 °C	30 s
	63 °C	30 s
	72 °C	1 min 50 s
1x	72 °C	5 min
1x	12 °C	∞

Tabulka 6 – Teplotní cyklus druhého kroku nested PCR

Pomocí jednokrokové PCR na HSP70 byly poté testovány jen vzorky, kde nás zajímala pouze přítomnost DNA leishmanií viz kapitoly 4.2.3 a 4.2.4.

Pro druhovou determinaci tiplíků, u kterých jsme si nebyli jisti jejich druhem určováním pomocí Fauny ČSSR, byla použita jednokroková PCR na cytochrom oxidázu. Reakce probíhala za použití reakční směsi a protokolu viz tabulky 7 a 8.

Sekvence primerů: Forward primer: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGC-3'

Reverse primer: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

Jednotlivé složky	Množství
2x koncentrovaný Emerald Master Mix (Takara Bio)	25 µl
PCR H ₂ O	17 µl
10 µM Forward primer (Merck)	2 µl
10 µM Reverse primer (Merck)	2 µl
DNA (1-100 ng/reakci)	4 µl

Tabulka 7 – Složení reakční směsi jednokrokové PCR na cytochrom oxidázu

Počet opakování	Teplota	Délka trvání
1x	95 °C	5 min
37x	94 °C	30 s
	55 °C	45 s
	72 °C	1 min 30 s
1x	72 °C	10 min
1x	25 °C	∞

Tabulka 8 – Teplotní cyklus jednokrokové PCR na cytochrom oxidázu

3.12 Gelová elektroforéza

Pro výrobu gelu byla agaróza smíchána s 1xTAE pufrem v Erlenmayerově baňce v poměru, aby vznikl 0,8-1,2% gel. Směs byla dána do mikrovlnné trouby a zahřívána na medium, dokud se agaróza úplně nerozpustila. Do směsi byl přidáno barvivo SYBR Safe (Invitrogen) v poměru 1:10000. Poté byla směs

nalita do připraveného stojánku v elektroforetické vaně, do kterého byl ještě vložen hřeben. Po ztuhnutí gelu byl hřeben odebrán, stojánek pootočen, aby byly jamky u záporného pólu, a dolit 1xTAE pufr. Do první jamky bylo napipetováno 7 µl GeneRuler 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific). Do ostatních jamek byly postupně nanášeny jednotlivé PCR reakce po 10 µl. Elektroforetická vana byla poté zavřena a zapojena do zdroje napětí (90-120 V po dobu 30-60 minut). Poté byla DNA detekována UV transluminátorem.

3.13 Sekvence

Positivní produkty byly přečištěny enzymatickým roztokem ExoSAP (Thermo Scientific). 1 µl ExoSAPu bylo smícháno s 5 µl produktu a tato směs byla vložena do termocyklu. Reakce probíhala 4 minuty při 37 °C, 1 minutu při 80 °C a poté teplota klesla na 4 °C.

Při jednokrokové PCR na HSP70 bylo 0,5 µl produktu z PCR reakce smícháno s 0,5 µl reverzního primeru, který byl použit při této reakci, a se 7 µl PCR H₂O. Při nested PCR na SSU rRNA bylo 1-1,5 µl produktu z druhého kroku nested PCR smícháno s 0,5 µl primeru 1000 R (ATGCCTTCGCTGTAGTTCGTCT) a doplněno do 8 µl PCR H₂O. Při jednokrokové PCR na cytochrom oxidázu byl 1 µl produktu z PCR reakce smíchán s 0,5 µl reverzního primeru, který byl použit při této reakci, a se 6,5 µl PCR H₂O. Takto připravené vzorky byly poslány do laboratoře sekvenace DNA do Biocevu.

Pro identifikaci získaných sekvencí byl využíván algoritmus BLAST a nukleotidová databáze NCBI na stránce <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>.

3.14 Kvantitativní PCR

Pro kvantifikaci leishmanií ve střevech flebotomů 10. den po sání bylo využito měření fluorescence při navázání barvy SYBR Green (SsoAdvanced™ Universal SYBR®, Bio-Rad) na dvouvláknový produkt na přístroji iQ5 real-time PCR detection systém (Bio-Rad). Kalibrační křivka byla vytvořena podle pozitivních kontrol o známé koncentraci leishmanií v duplikátech. Neznámé vzorky byly měřeny v triplicátech. Specifita reakce byla kontrolována v teplotním gradientu teploty tání, přičemž cykly se opakovaly postupně při teplotách od 75-93 °C.

K amplifikaci kinetoplastidové DNA byly použity následující primery:

Forward primer: 5'-CTTTTCTGGTCCCTCCGGGTAGG-3'

Reverse primer: 5'-CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA-3'

Reakce probíhala za použití reakční směsi a protokolu viz tabulky 9 a 10.

Jednotlivé složky	Množství
Master Mix SsoAdvanced™ Universal SYBR® (Bio-Rad)	10 µl
PCR H ₂ O	8 µl
10 µM Forward primer (Merck)	0,5 µl
10 µM Reverse primer (Merck)	0,5 µl
DNA (10-100 ng/reakci)	1 µl

Tabulka 9 – Složení reakční směsi qPCR na amplifikaci kDNA

Počet opakování	Teplota	Délka trvání
1x	98 °C	30 s - 3 min
40x	98 °C	30 s
	60 °C	30 s

Tabulka 10 – Teplotní cyklus qPCR na amplifikaci kDNA

3.15 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Několik nasátých samic tiplíků uložených v 70% nedenaturovaném etanolu bylo testováno pomocí MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization). Nasáté samici tiplíka byl oddělen abdomen a ten byl homogenizován pomocí sterilního plastového pístu v 50 µl destilované vody v 1,5 ml Eppendorfově zkumavce. Homogenát byl pak zcentrifugován při 10 000 g po dobu 15 s. 10 µl supernatantu bylo přeneseno do nové mikrozkuhavky obsahující 10 µl 50 mM N-ethylmorpholinacetátového pufru (pH 8,1; Sigma-Aldrich) a 100 ng trypsinu (Promega). Tato směs byla inkubována 20 minut při 37 °C. Poté bylo 0,5 µl této směsi nanášeno na MALDI destičku. Nanášené vzorky byly nechány schnout při laboratorní teplotě a poté byly překryty 0,5 µl MALDI matricí (vodný 50% ACN/0,1% TFA roztok kyseliny α-kyano-4-hydroxyskořicové; 5 mg/ml, Sigma-Aldrich). Peptidová hmotnostní mapovací spektra byla získána na hmotnostním spektrometru Ultraflex III. Data byla prohledávána proti podskupině proteinů obratlovců v databázi SwissProt20171124 pomocí vlastního vyhledávače MASCOT (Matrix Science) (Hlavačková et al., 2019). Tyto analýzy byly dělané v Biocevu v Laboratoři strukturní biologie a buněčné signalizace, Mikrobiologický ústav AV za pomoci Ing. Petra Halady, Ph.D.

3.16 Xenodiagnostika a kultivace na krevním agaru

Během květnového odchyty v Ústí nad Labem byla na koni infikovaném *L. martiniquensis* provedena přímá xenodiagnostika, na kterou byly použity druhy *P. duboscqi* a *P. papatasi*. Samice flebotomů byly umístěny do plastových kelímků, které jsou svrchu uzavřené jemnou sílonovou tkaninou. Dva kelímky s flebotomy byly drženy na hlavě infikovaného koně v okolí kožní léze (Obrázek 5). Druhý den (před defekací samic) bylo 18 nasátých samic flebotomů (a 2 nasátí tiplíci chycení exhaustorem na

infikovaném koni) vypitváno a jejich střeva byla vložena do kultivačních zkumavek s krevním agarem pro izolaci parazitů. Zbylé nasáté samice flebotomů byly uloženy do 1,5ml zkumavek se 100 μ l vody a ty byly uloženy do mrazáku. Byly udělané pooly po 5 nasátých samicích. Poté z nich byla vyizolována DNA a provedena jednokroková PCR na HSP70 pro detekci leishmanií.



Obrázek 5 – Léze koně nakaženého leishmaniózou a prováděná xenodiagnostika

4 Výsledky

Výsledky předkládané diplomové práce jsou rozděleny na dvě části. První část se zabývá vývojem *L. major*, *L. donovani* a *L. martiniquensis* ve vybraných evropských druzích flebotomů (kapitola 4.1), druhá část je zaměřená na sběr a analýzu tiplíků z oblastí předpokládaného autochtonního výskytu *L. martiniquensis* v České republice (kapitola 4.2).

4.1 Experimentální infekce flebotomů

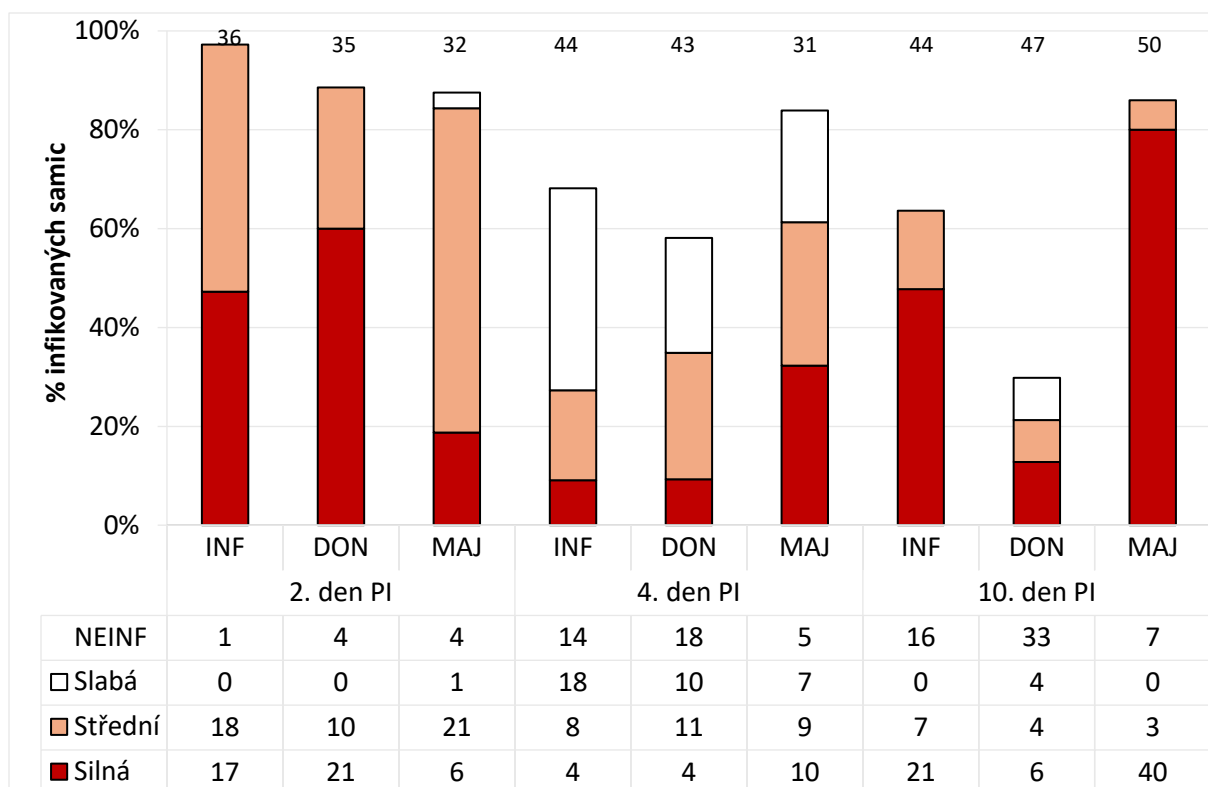
Pro tyto pokusy byly vybrány permissivní druhy evropských flebotomů, *P. perniciosus* a *P. tobbi*, jejichž kolonie jsou dlouhodobě chovány v naší laboratoři, a nově kolonizovaný druh *S. minuta*. Intenzita a lokalizace byla sledována vždy 2., 4. a 10. den po infekčním sání. Infekční dávka byla vždy 10^6 leishmanií na ml krve. Pro pokusy s *P. perniciosus* byla jako kontrola použita *L. infantum* (MHOM/TR/2000/OG-VL) a pro pokusy s *P. tobbi* byl použit hybrid *L. infantum/L. donovani* (ITOB/TR/2005/CUK3) původně získaný právě z tohoto druhu flebotoma. Rozdíly v procentech infikovaných samic a poměru morfologických forem byly analyzovány Chí-kvadrátovým testem.

4.1.1 Vývoj *L. donovani* a *L. major* v *P. perniciosus*

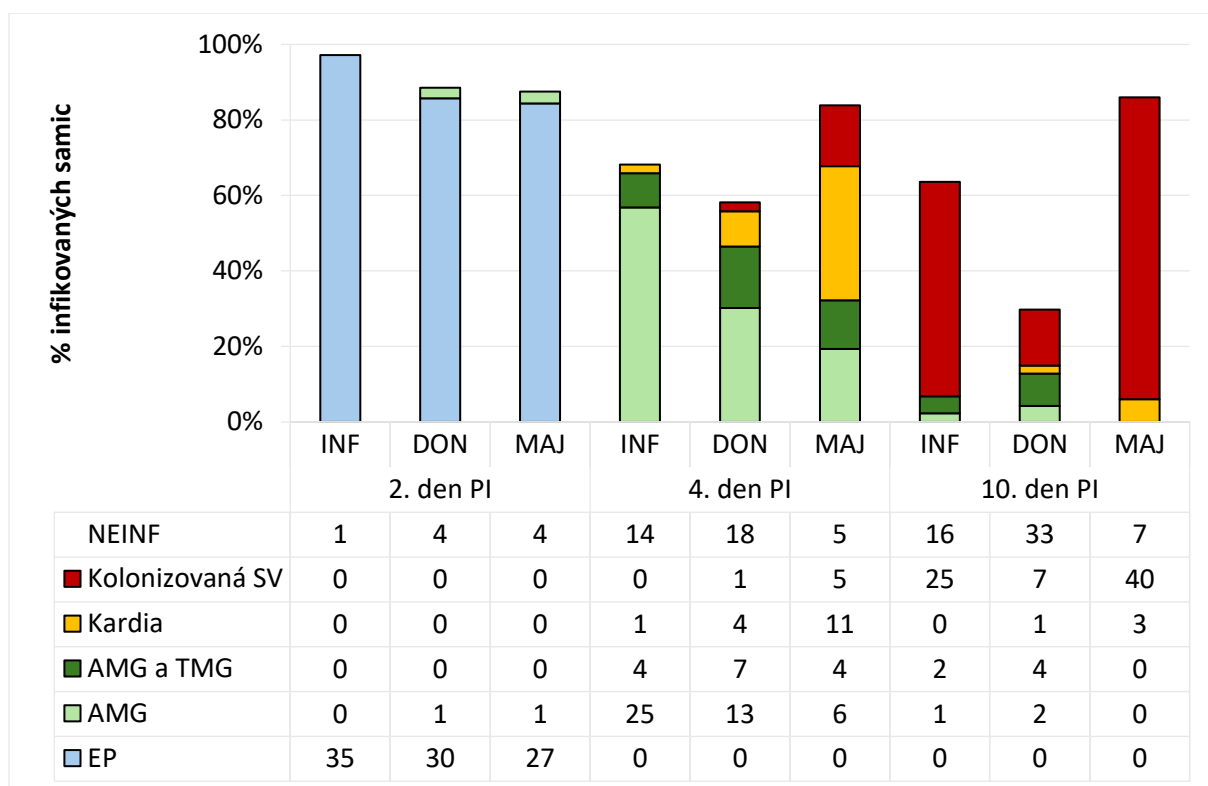
Druhý den po sání, před defekací nestrávených zbytků krve, bylo ve všech skupinách infikováno přes 87 % infikovaných samic (Obrázek 6), procenta se mezi sebou významně nelišila ($P = 0,258$, $\chi^2 = 2,635$). Leishmanie se ve většině vypitvaných střev flebotomů vyskytovaly v endoperitrofickém prostoru, pouze v jednom střevě z každé skupiny byly leishmanie pozorovány už i v abdominálním mezenteronu (Obrázek 7).

Čtvrtý den po sání, po defekaci samic, bylo nejvíce infikovaných samic u flebotomů infikovaných *L. major* - 83,9 % (Obrázek 6), ale rozdíly mezi skupinami nebyly signifikantní ($P = 0,065$, d.f. = 2, $\chi^2 = 5,548$). Leishmanie se vyskytovaly v abdominálním a thorakálním mezenteronu, kardií a u několika samic už kolonizovaly stomodeální valvu (Obrázek 7).

Desátý den po sání, bylo 29,8 % samic infikovaných *L. donovani* a 86 % samic infikovaných *L. major* (Obrázek 6). Tentokrát se podíl infikovaných samic signifikantně lišil mezi skupinami, v případě *L. donovani* byl signifikantně nižší a u flebotomů infikovaných *L. major* naopak vyšší, než u kontrolní *L. infantum* ($P < 0,001$, d.f. = 2, $\chi^2 = 32,274$). U obou skupin se tvořily převážně silné zralé infekce a leishmanie kolonizovaly stomodeální valvu (Obrázek 7).



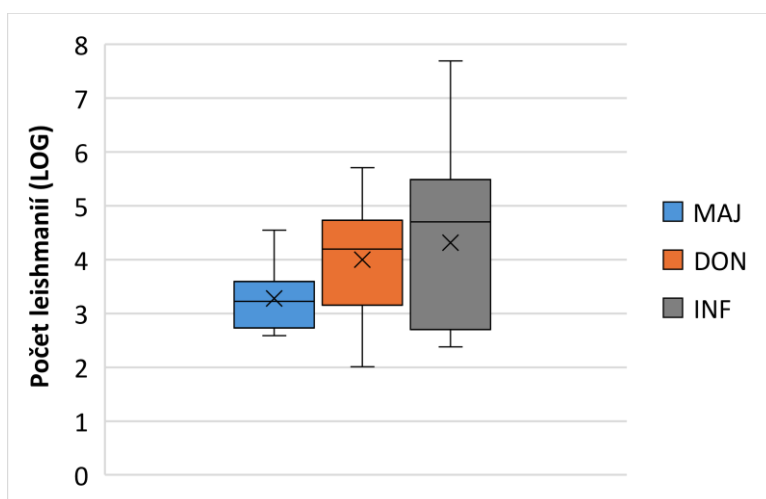
Obrázek 6 – Intenzita infekce samic *P. perniciosus* ze 3 pokusů; INF – *L. infantum* (kontrola), DON – *L. donovani*, MAJ – *L. major*; čísla nad jednotlivými sloupci znázorňují počet pitvaných samic



Obrázek 7 – Lokalizace infekce u samic *P. perniciosus* ze 3 pokusů; INF – *L. infantum* (kontrola), DON – *L. donovani*, MAJ – *L. major*, EP – endoperitrofický prostor, AMG – abdominální mezenteron, TMG – thorakální mezenteron, SV – stomodeální valva

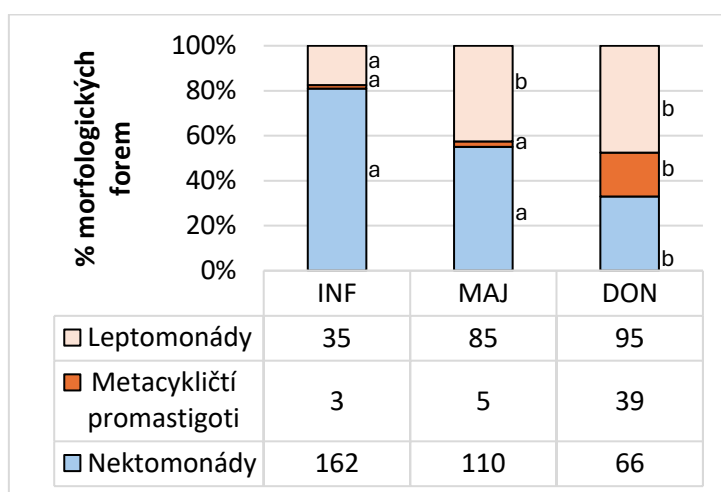
valva

Intenzity infekcí 10. den po sání byly porovnávány také pomocí qPCR. Bylo otestováno 10 střev flebotomů infikovaných *L. donovani*, 12 střev flebotomů infikovaných *L. major* a 13 střev infikovaných kontrolní *L. infantum* (Obrázek 8). Největší počty parazitů byly detekovány v kontrolní skupině s *L. infantum*, rozdíly v mediánech hodnot ani jejich distribuci však nebyly oproti *L. major* a *L. donovani* signifikantní (Neparametrický Mediánový test $P = 0,098$; Kruskal-Wallisův test $P = 0,243$).



Obrázek 8 – Kvantitativní srovnání počtu parazitů ve střevě *P. perniciosus* 10. den po sání; INF – *L. infantum* (kontrola), DON – *L. donovani*, MAJ – *L. major*

Oba sledované druhy leishmanií vytvářely ve flebotomech metacyklická stádia (Obrázek 9). Pomocí roztakových preparátů obarvených Giemsou a následného měření bylo zjištěno signifikantně vyšší zastoupení metacyklických stádií u *L. donovani* než u *L. major* i kontrolní *L. infantum* ($P < 0,001$, d.f. = 4, $\chi^2 = 122,087$).



Obrázek 9 – Zastoupení jednotlivých forem leishmanií v *P. perniciosus* 10. den po sání; INF – *L. infantum* (kontrola), DON – *L. donovani*, MAJ – *L. major*; a,b – písmenka označují kategorie, jejichž zastoupení se mezi druhy signifikantně nelišilo

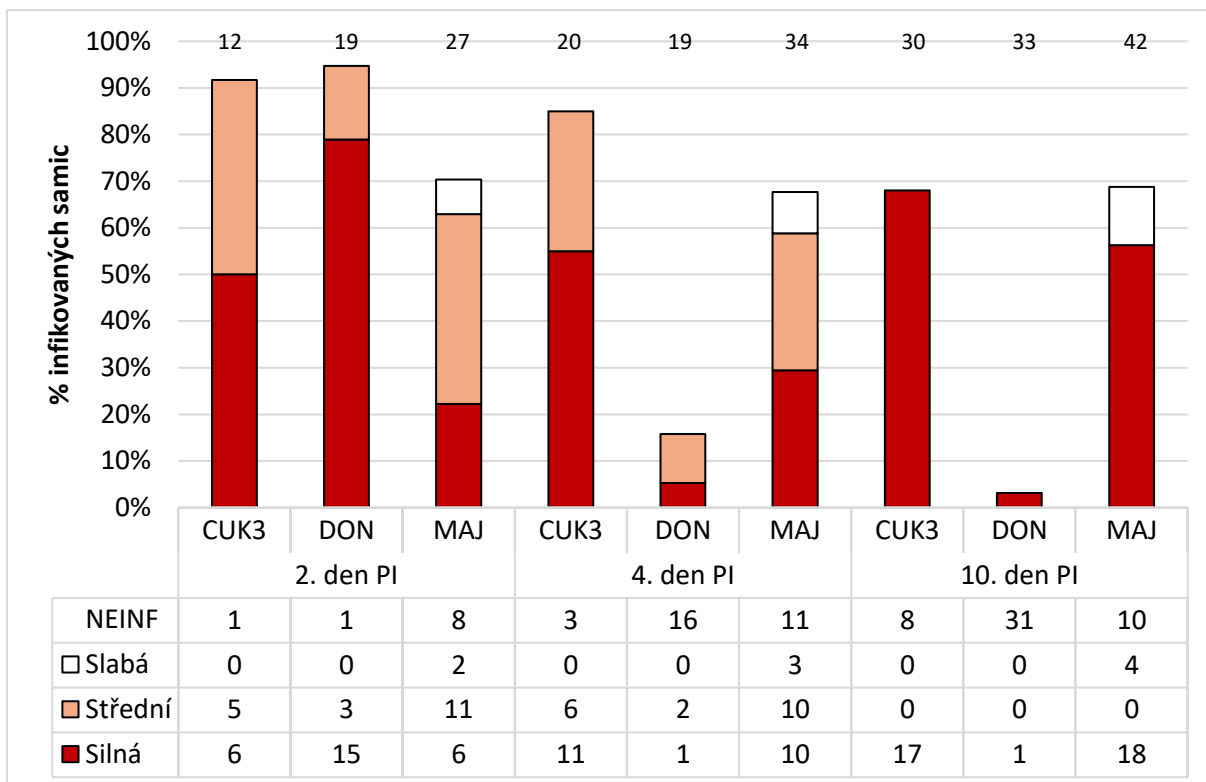
Ukázalo se tedy, že *Phlebotomus perniciosus* podporuje vývoj jak *L. donovani*, tak i *L. major*. Protože ale podíl infikovaných samic byl desátý den po sání signifikantně nižší u *L. donovani* ve srovnání s ostatními skupinami, rozhodli jsme se porovnat vývoj tohoto kmene také v jeho přirozeném přenašeči *P. argentipes* viz kapitola 4.1.3.

4.1.2 Vývoj *L. donovani* a *L. major* v *P. tobbi*

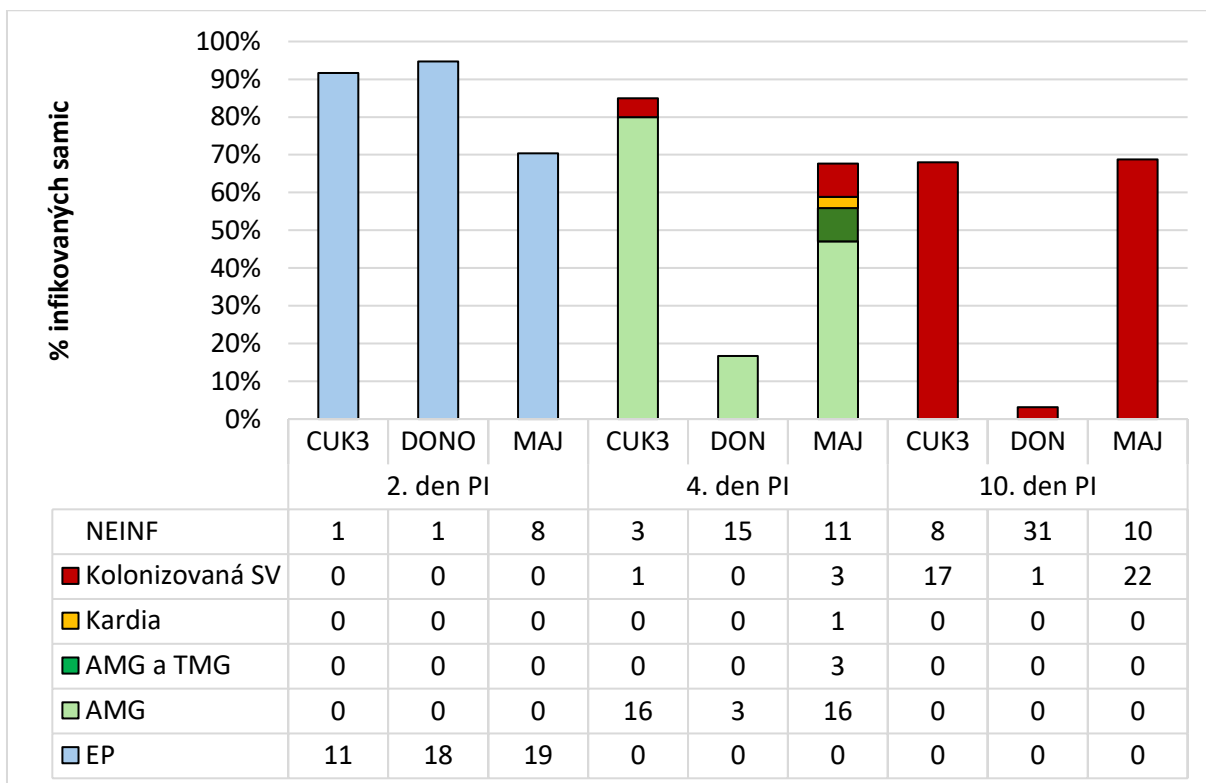
Druhý den po sání bylo pozorováno 94,7 % samic infikovaných *L. donovani* a 70,4 % samic infikovaných *L. major* (Obrázek 10). Rozdíl v procentu infikovaných samic mezi skupinami byl těsně nad hranicí statistické signifikance ($P = 0,070$, $\chi^2 = 4,825$). Leishmanie se vždy vyskytovaly v endoperitrofickém prostoru (Obrázek 11).

Čtvrtý den po sání bylo nalezeno 15,8 % samic infikovaných *L. donovani* a 67,6 % samic infikovaných *L. major* (Obrázek 10). Podíl infikovaných samic byl u *L. donovani* signifikantně nižší oproti ostatním skupinám ($P < 0,001$, d.f. = 2, $\chi^2 = 21,29$). Leishmanie druhu *L. donovani* se vyskytovaly pouze v abdominálním mezenteronu, *L. major* se v některých střevech vyskytovaly v thorakálním mezenteronu a v kardii a u 3 samic už dokonce kolonizovaly stomodeální valvu, stejně jako u kontrolní *L. infantum* (Obrázek 11).

Desátý den po sání byly detekovány pouze 3 % samic infikovaných *L. donovani* a 69 % samic infikovaných *L. major* (Obrázek 10). Podíl infikovaných samic *L. donovani* byl výrazně nižší oproti ostatním skupinám ($P < 0,001$, d.f. = 2, $\chi^2 = 35,909$). Ve všech skupinách se tvořily silné infekce a leishmanie kolonizovaly stomodeální valvu (Obrázek 11).

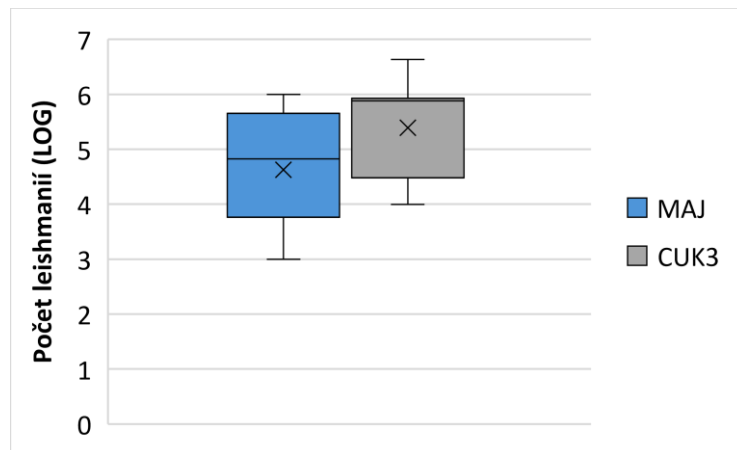


Obrázek 10 - Intenzita infekce samic *P. tobbi* ze 4 pokusů; CUK3 – hybrid *L. infantum/L. donovani* (kontrola), DON – *L. donovani*, MAJ – *L. major*; čísla nad jednotlivými sloupci znázorňují počet pitvaných samic



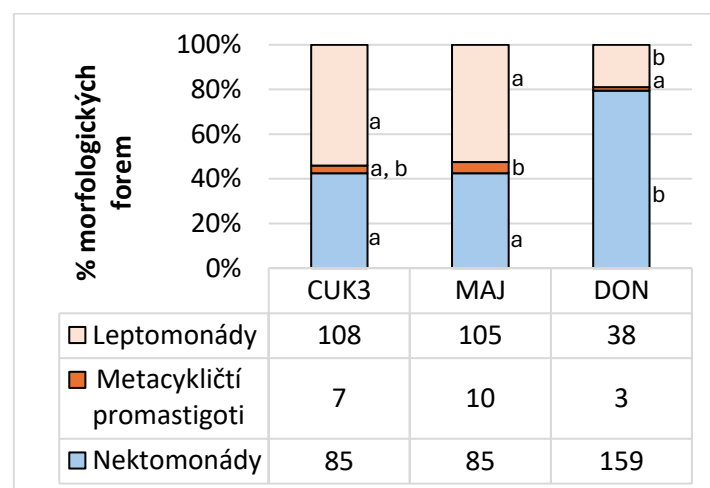
Obrázek 11 - Lokalizace infekce u samic *P. tobbi* ze 4 pokusů; CUK3 – hybrid *L. infantum/L. donovani* (kontrola), DON – *L. donovani*, MAJ – *L. major*, EP – endoperitrofický prostor, AMG – abdominální mezenteron, TMG – thorakální mezenteron, SV – stomodeální valva

Intenzity infekcí desátý den po sání byly u flebotomů infikovaných *L. major* porovnávány s kontrolní *L. infantum* také pomocí qPCR. Bylo otestováno 14 střev infikovaných *L. major* a 6 střev infikovaných kontrolní *L. infantum* (Obrázek 12). U *L. donovani* nemohla být qPCR provedena, protože byla infikovaná jen jedna samice a její střevo bylo použito na roztlakový preparát za účelem zjištění poměru morfologických forem. Větší počty parazitů byly detekovány v kontrolní skupině s hybridem *L. infantum/L. donovani* (CUK3), rozdíl v mediánech hodnot ani jejich distribuci však nebyl signifikantní (Neparametrický Mediánový test $P = 0,628$; Kruskal-Wallisův test $P = 0,099$).



Obrázek 12 - Kvantitativní srovnání počtu parazitů ve střevě *P. tobbi* 10. den po sání; CUK3 – hybrid *L. infantum/L. donovani* (kontrola), MAJ – *L. major*

Oba sledované druhy leishmanií vytvářely ve flebotomech metacyklická stádia (Obrázek 13). Rozdíl v zastoupení metacyklických forem nebyl signifikantně odlišný od kontrolní *L. infantum*, ale u *L. major* bylo metacyklů zastoupeno signifikantně více, než u *L. donovani* ($P < 0,001$, d.f. = 4, $\chi^2 = 74,431$).



Obrázek 13 - Zastoupení jednotlivých forem leishmanií v *P. tobbi* 10. den po sání; CUK3 – hybrid *L. infantum/L. donovani* (kontrola), DON – *L. donovani*, MAJ – *L. major*; a,b – písmenka označují kategorie, jejichž zastoupení se mezi druhy signifikantně nelišilo

Ukázalo se, že také *P. tobbi* podporuje vývoj jak *L. donovani*, tak i *L. major*. Podíl samic infikovaných *L. donovani* byl ale čtvrtý a desátý den po sání velice nízký, ještě nižší, než v *P. perniciosus* (kapitola 4.1.1).

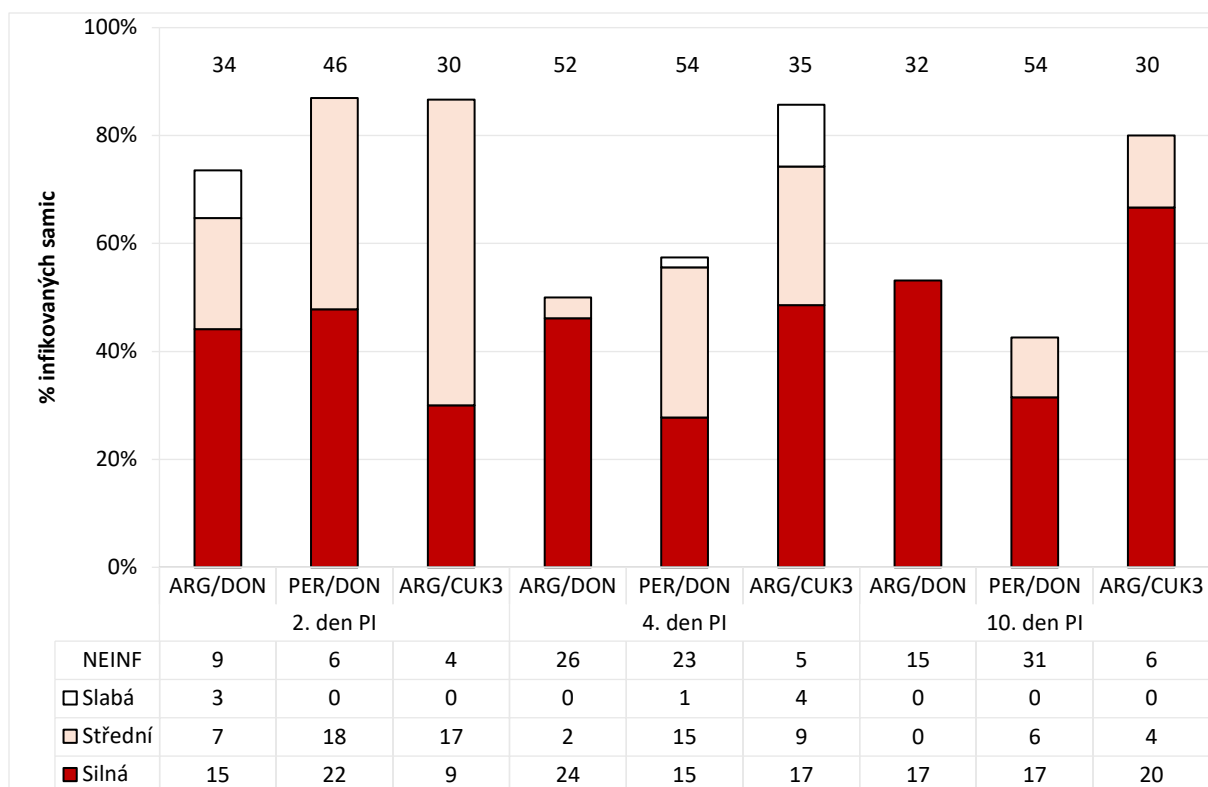
4.1.3 Vývoj *L. donovani* a hybrida *L. infantum/L. donovani* v *P. argentipes*

Protože procento samic infikovaných druhem *L. donovani* bylo v *P. perniciosus* i *P. tobbi* signifikantně nižší než u ostatních skupin, rozhodli jsme se v rámci stejného pokusu infikovat *P. perniciosus* a prokázaného přenašeče *L. donovani* v jižní Asii, druh *P. argentipes*. Pro srovnání byla jedna skupina *P. argentipes* infikována také hybridem *L. infantum/L. donovani* (CUK3), který byl použit jako kontrola při pokusech s *P. tobbi*.

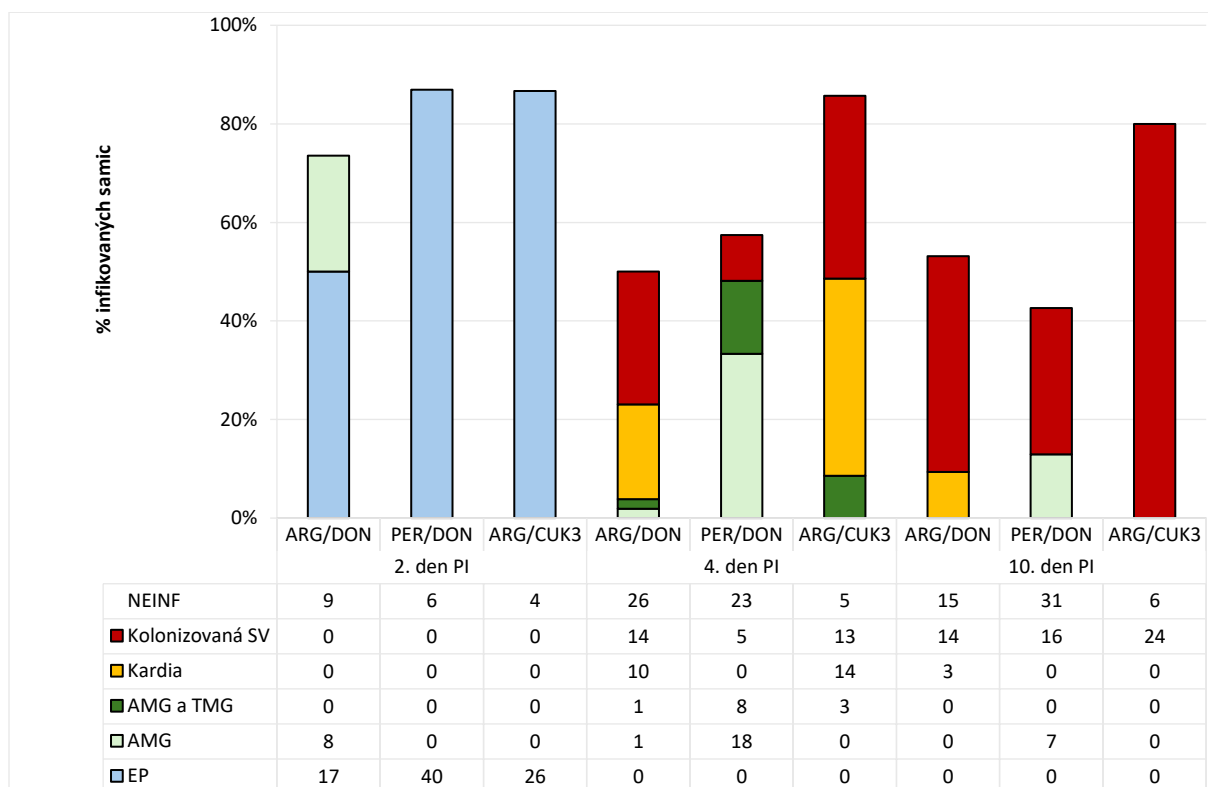
Druhý den po sání se procenta infikovaných samic mezi sebou významně nelišila ($P = 0,245$, d.f. = 2, $\chi^2 = 2,812$).

Čtvrtý den po sání už leishmanie ve všech skupinách kolonizovaly stomodeální valvu (Obrázek 15), ale rozdíl v procentech infikovaných samic byl u obou skupin infikovaných *L. donovani* signifikantně nižší než u hybrida *L. infantum/L. donovani* v *P. argentipes* ($P = 0,002$, d.f. = 2, $\chi^2 = 12,541$).

Jak je patrné z obrázků 14 a 15, 10. den po sání převažovaly ve všech skupinách silné infekce s kolonizovanou stomodeální valvou a podíl infikovaných samic byl opět u druhů *P. perniciosus* a *P. argentipes*, které byly infikované *L. donovani*, signifikantně nižší, než tvořil hybrid *L. infantum/L. donovani* v *P. argentipes* ($P = 0,004$, d.f. = 2, $\chi^2 = 10,986$).



Obrázek 14 - Intenzita infekce samic *P. perniciosus* a *P. argentipes* ze 2 pokusů; ARG – *P. argentipes*, PER – *P. perniciosus*, DON – *L. donovani*, CUK3 – hybrid *L. infantum/L. donovani*; čísla nad jednotlivými sloupci znázorňují počet pitvaných samic

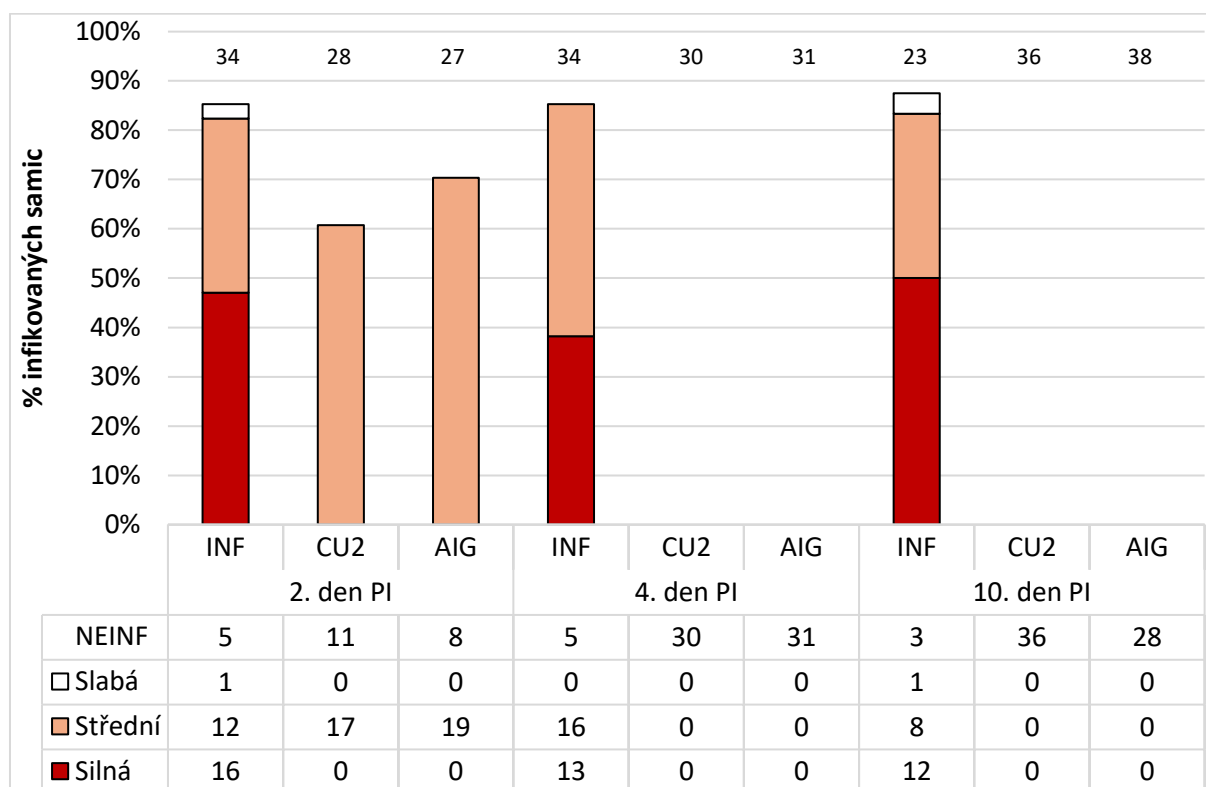


Obrázek 15 - Lokalizace infekce u samic *P. perniciosus* a *P. argentipes* ze 2 pokusů; ARG – *P. argentipes*, PER – *P. perniciosus*, DON – *L. donovani*, CUK3 – hybrid *L. infantum/L. donovani*, EP – endoperitrofický prostor, AMG – abdominální mezenteron, TMG – thorakální mezenteron, SV – stomodeální valva

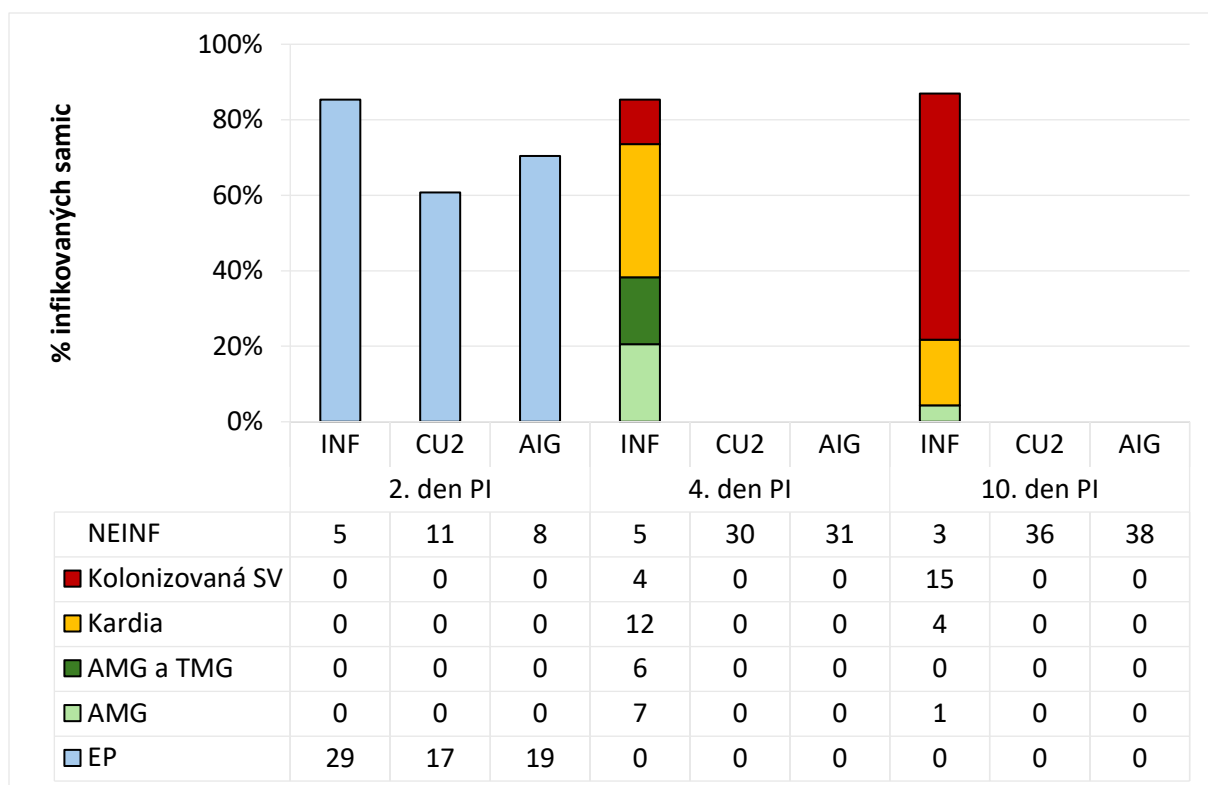
4.1.4 Vývoj dvou kmenů *L. martiniquensis* v *P. perniciosus*

Druhý den po sání byly pozorovány infekce u 60,7 % samic infikovaných thajským kmenem *L. martiniquensis* (MHOM/TH/2019/Cu2) a 70,4 % samic infikovaných českým kmenem *L. martiniquensis* (MEQU/CZ/2019/Aig1) (Obrázek 16). Procenta infikovaných samic se mezi skupinami statisticky významně nelišila ($P = 0,097$, d.f. = 2, $\chi^2 = 4,85$). Leishmanie se vyskytovaly v endoperitrofickém prostoru (Obrázek 17).

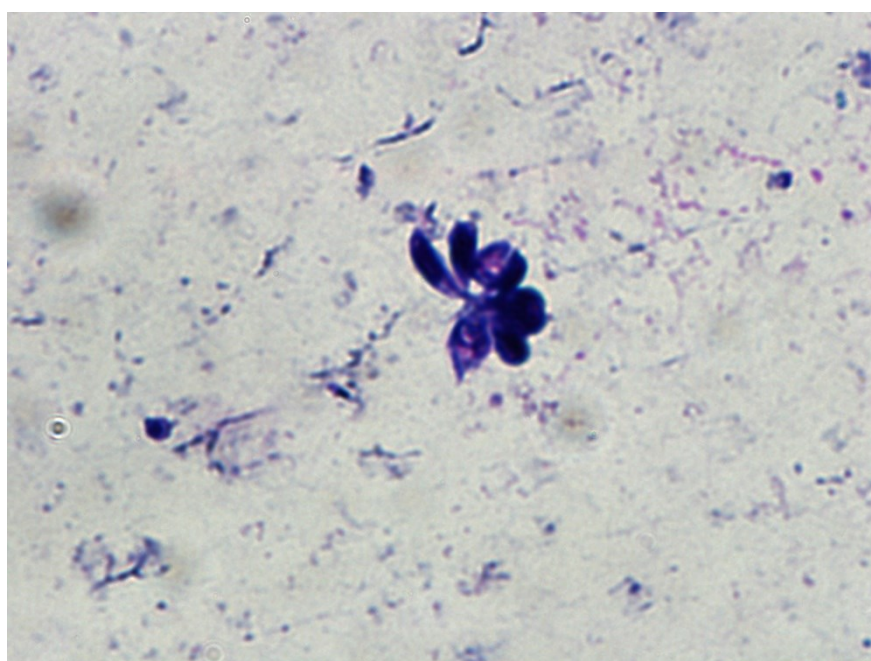
Čtvrtý a desátý den po sání nebyly nalezeny žádné infikované samice ani jedním z kmenů *L. martiniquensis*, zatímco kontrolní *L. infantum* se vyvíjela standardně, tvořila silné infekce a kolonizovala stomodeální valvu (Obrázky 16 a 17). To znamená, že leishmanie nepřežily defekaci a nedokázaly vytvářet zralé infekce, *P. perniciosus* tedy není kompetentním přenašečem *L. martiniquensis*.



Obrázek 16 - Intenzita infekce samic *P. perniciosus* ze 2 pokusů; INF – *L. infantum* (kontrola), CU2 – thajský kmen *L. martiniquensis*, AIG – český kmen *L. martiniquensis*; čísla nad jednotlivými sloupci znázorňují počet pitvaných samic



Obrázek 17 - Lokalizace infekce u samic *P. perniciosus* ze 2 pokusů; INF – *L. infantum* (kontrola), CU2 – thajský kmen *L. martiniquensis*, AIG – český kmen *L. martiniquensis*, EP – endoperitrofitický prostor, AMG – abdominální mezenteron, TMG – thorakální mezenteron, SV – stomodeální valva



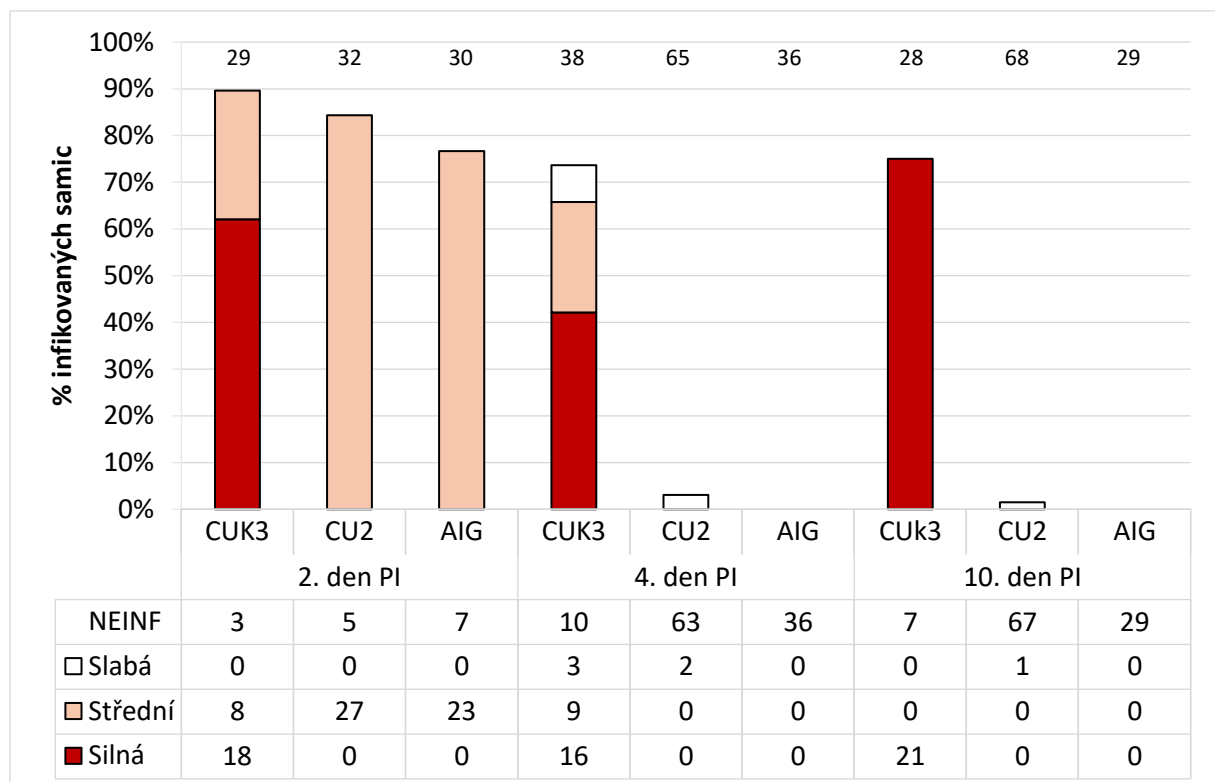
Obrázek 18 – Thajský kmen *L. martiniquensis* (CU2) na roztakovém preparátu ze střeva *P. perniciosus*

4.1.5 Vývoj dvou kmenů *L. martiniquensis* v *P. tobbi*

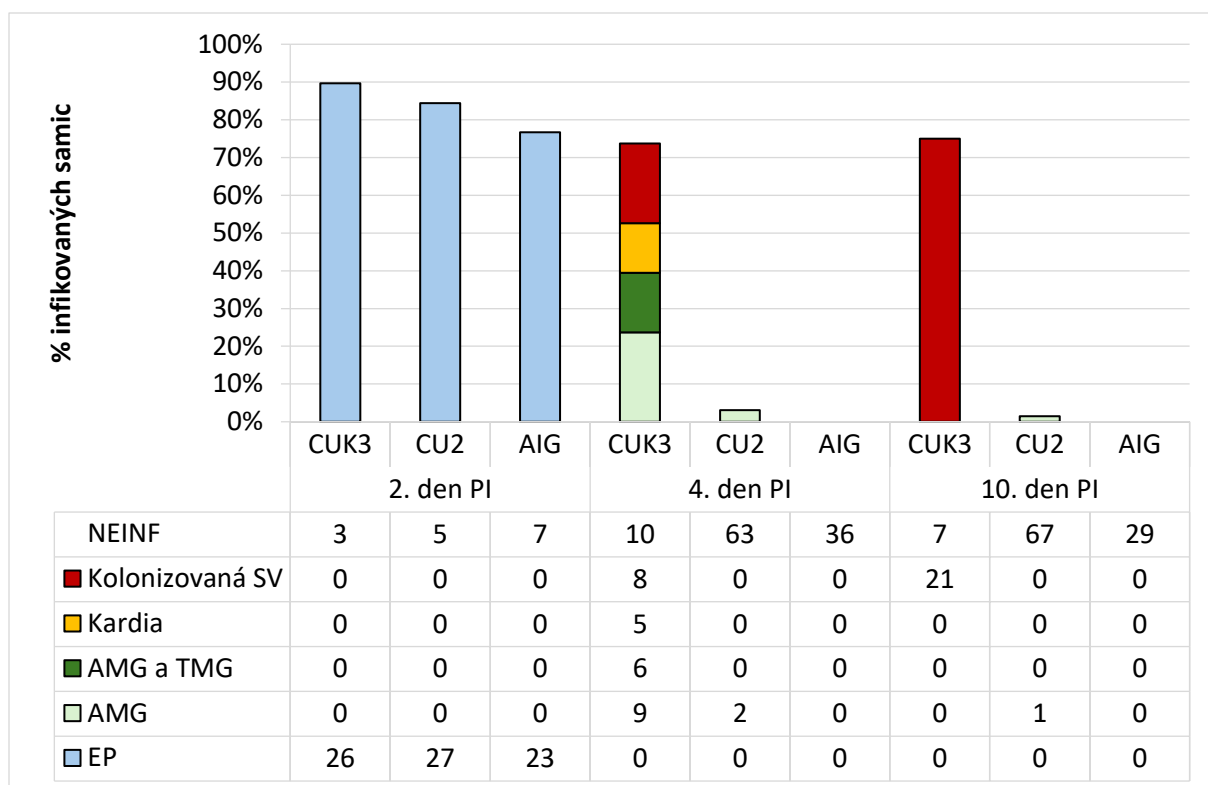
Druhý den po sání bylo 84,4 % samic infikovaných thajským kmenem *L. martiniquensis* a 76,7 % samic infikovaných českým kmenem *L. martiniquensis* (Obrázek 19). Procenta infikovaných samic se mezi sebou statisticky významně nelišila ($P = 0,383$, d.f. = 2, $\chi^2 = 1,833$). Leishmanie se vyskytovaly v endoperitrofickém prostoru (Obrázek 20).

Čtvrtý a desátý den po sání nebyly nalezeny žádné infikované samice českým kmenem *L. martiniquensis*. Slabé infekce thajským kmenem *L. martiniquensis* byly pozorovány u 2 samic čtvrtý den po sání a u jedné samice desátý den po sání (Obrázek 19). Rozdíly v procentech infikovaných samic byly tedy signifikantně nižší oproti kontrolním skupinám s hybridem *L. infantum/L. donovani*, který se vyvíjel standardně ($P < 0,001$, $\chi^2 = 78,184$ čtvrtý den po sání a $P < 0,001$, $\chi^2 = 69,263$ desátý den po sání). Ve všech třech případech se leishmanie vyskytovaly v abdominálním mezenteronu (Obrázek 20) a ve střevech flebotomů byla stále přítomna krev, tudíž ještě nedošlo k defekaci.

P. tobbi tedy není kompetentním přenašečem *L. martiniquensis*, leishmanie nepřežily defekaci a nedokázaly vytvářet zralé infekce. Kontrolní hybrid *L. infantum/L. donovani* se vyvíjel standardně, tvořily se silné infekce a leishmanie kolonizovaly stomodeální valvu (Obrázky 19 a 20).



Obrázek 19 - Intenzita infekce infikovaných samic *P. tobbi* ze 4 pokusů; CUK3 – hybrid *L. infantum/L. donovani* (kontrola), CU2 – thajský kmen *L. martiniquensis*, AIG – český kmen *L. martiniquensis*; čísla nad jednotlivými sloupci znázorňují počet pitvaných samic



Obrázek 20 - Lokalizace infekce infikovaných samic *P. tobbi* ze 4 pokusů; CUK3 – hybrid *L. infantum/L. donovani* (kontrola), CU2 – thajský kmen *L. martiniquensis*, AIG – český kmen *L. martiniquensis*, EP – endoperitrofický prostor, AMG – abdominální mezenteron, TMG – thorakální mezenteron, SV – stomodeální valva

4.1.6 Pokusy se *Sergentomyia minuta*

Původním cílem bylo otestovat vnímavost *S. minuta* k vybraným druhům leishmanií stejně jako u *P. perniciosus* a *P. tobbi*. Nicméně kolonie *S. minuta* založená v naší laboratoři odmítá sát krev za standardních podmínek - na skleněném krmítku s kuřecí kůžičkou - jako ostatní druhy kolonizovaných flebotomů. Rozhodli jsme se tedy, vyzkoušet jiné uspořádání pokusu a obměňovat typy membrán i zdroj krve.

Typ membrány	1. pokus	2. pokus
Kuřecí kůžička	0/100	0/100
Prasečí střevo	0/100	0/100
Umělá membrána	0/100	0/100
Kuřecí kůžička se zaschlou krevní plazmou	0/100	0/100
Umělá membrána se zaschlou krevní plazmou	0/50	0/100

Tabulka 11 – Počty nasátých samic *S. minuta* na jednotlivých typech membrán na skleněném krmítku

Jak je vidět v Tabulce 11, samice *S. minuta* odmítaly sát i na ostatních typech membrán. Pro tyto pokusy byla použita beraní krev.

Úspěšné nebyly ani pokusy s Hemotekem, kde byla použita jako membrána kuřecí kůžička a beraní krev. Ze 160 samic se opět nenasála ani jedna.

Dále jsme také zkoušeli použít jiný zdroj krve. Kolegové z laboratoře dělali pokusy s ptačí a plazí krví a obměnou denní doby, intenzity světla, vlhkosti i teploty i s přidáním exkrementů gekona jako atraktans, které byly neúspěšné (zatím nepublikováno). My jsme se rozhodli zkusit lidskou krev, kdy se ze 450 samic nasála pouze jedna.

4.2 Sběr a analýza tiplíků a dalších vektorů v oblastech výskytu autochtonních leishmanióz u koní v České republice

V roce 2022 a 2023 probíhaly terénní odchyty tiplíků v oblastech výskytu leishmanióz u koní (Slatiňany, Ústí nad Labem), které jsou považovány za autochtonní a kde jako infekční agens byla identifikována *L. martiniquensis* (Jahn, Modrý, Votýpka, zatím nepublikováno). Nachytané samice tiplíků byly roztríděné na nenasáté, nasáté a vykladené. Samice, které už byly v kontaktu s hostitelskou krví (nasáté, vykladené) a tedy i s potenciálními patogeny, byly určeny do druhu a pomocí nested PCR na SSU rRNA a následné sekvenace otestovány na přítomnost leishmanií, popřípadě jiných trypanosomatid. Tiplíci byly podle druhu a lokality rozděleni do poolů po 50 jedincích.

4.2.1 Sběr tiplíků v hřebčínu ve Slatiňanech

První lokalitou, kde probíhaly odchyty v květnu a v září 2022, byl hřebčín ve Slatiňanech. V květnu 2021 byla u klisny plemene starokladrubský kůň diagnostikována leishmanióza způsobená *L. martiniquensis*. Tato klisna se v hřebčínu ve Slatiňanech narodila a 5 let zde byla chována. V říjnu 2020 byla prodána na jižní Slovensko, nicméně u ní už v době prodeje byla zaznamenána alopecie v místě pozdější léze. Předpokládá se tedy, že k nákaze došlo ve Slatiňanech (Jahn, Modrý, Votýpka, zatím nepublikováno).

CDC světelné pasti zde byly umístěné uvnitř dvou velkých stájí. Odchyty v září trvaly dvě noci. Vždy jsme měli rozmístěné čtyři pasti, dvě v jedné stáji a dvě ve druhé. Odchytů v květnu jsem se kvůli bakalářské obhajobě a státnicím nezúčastnila.

Při obou odchytech na této lokalitě byly chyceny pouze dva druhy tiplíků viz tabulka 10. Silně zde dominovali tiplíci z komplexu *Culicoides obsoletus* (98,1 %). Do tohoto komplexu patří čtyři druhy – *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* a *C. chiopterus*, jsou však od sebe morfologicky téměř nerozpoznatelné (Mathieu et al., 2012; Kluiters et al., 2016), a tak jsme se rozhodli tyto tiplíky určit jako *C. obsoletus* komplex. Dalším druhem na této lokalitě byl *C. punctatus*.

Celkem bylo analyzováno 70 poolů a žádný nebyl pozitivní na DNA leishmanií. Z jarního odchyty bylo 13 poolů s tiplíky z komplexu *C. obsoletus* podle algoritmu BLAST a nukleotidové databáze NCBI pozitivních na *Herpetomonas ztiplika* s podobností 97-99 % k izolátům Herp1 a Herp2 (Bernotiené et al., 2020). Z podzimního odchyty byly opět 2 pooly s tiplíky z komplexu *C. obsoletus* pozitivní na *Herpetomonas ztiplika* s podobností 98,39 % a 98,26 % k izolátu Herp1 (Bernotiené et al., 2020).

Druhy nachytaných tiplíků	Květen 2022		Září 2022		Celkem	%	Dominance druhu
	N	V	N	V			
<i>C. (Avaritia) obsoletus</i> komplex	1550	850	668	209	3277	98,1	eudominantní
<i>C. (Culicoides) punctatus</i>	0	30	12	22	64	1,9	recedentní

Tabulka 12 – Přehled druhů nasátých a vykladených samic tiplíků v hřebčínu ve Slatiňanech; N – nasáté samice, V – vykladené samice

4.2.2 Sběr tiplíků v Ústí nad Labem

Druhá lokalita odchyty tiplíků se nacházela v Ústí nad Labem. Jednalo se o ohradu se čtyřmi koňmi s dřevěným přístřeškem. Jeden z koní byl v roce 2023 nakažený leishmaniózou způsobenou *L. martiniquensis* (Jahn, Modrý, Votýpka, zatím nepublikováno). Zde probíhaly jednodenní odchyty, a to dva v květnu a jeden v červenci 2023. Vždy byly pokládány čtyři CDC světelné pasti, hlavně v okolí přístřešku s koňmi.

I přes to, že počty nachytaných tiplíků nebyly tak velké jako ve Slatiňanech, byla zde druhová diverzita pestřejší. Opět bylo nejvíce nachytaných samic z komplexu *Culicoides obsoletus* (74 %), ale objevují se i druhy *C. punctatus*, *C. circumscriptus*, *C. furcillatus*, *Forcipomyia pulchrior* a *F. bipunctata* viz tabulka 11. Konkrétní druhy tiplíků z rodu *Forcipomyia* a *C. furcillatus* byly určeny pomocí jedнокrokové PCR na cytochrom oxidázu a následné sekvenace s podobnostmi 99,5-100 % za použití algoritmu BLAST a nukleotidové databáze NCBI.

Žádný vzorek z 27 testovaných nebyl pozitivní na DNA leishmanií. Jeden pool s vykladenými samicemi z komplexu *C. obsoletus* z červencového odchyty byl podle algoritmu BLAST a nukleotidové databáze NCBI pozitivní na *Trypanosoma* sp. ze skupiny *T. theileri* s podobností 99,64 % k izolátům D1587, D1585, D1707 a D1705 (Brotánková et al., 2022).

Druhy nachytaných tiplíků	Květen 2023		Červenec 2023		Celkem	%	Dominance druhu
	N	V	N	V			
<i>C. (Avaritia) obsoletus</i> komplex	5	8	20	55	88	74	eudominantní
<i>C. (Culicoides) punctatus</i>	1	0	17	5	23	19,3	eudominantní
<i>C. (Oecacta) furcillatus</i>	0	0	2	1	3	2,5	subdominantní
<i>C. (Beltranmyia) circumscriptus</i>	0	0	0	2	2	1,7	recendentní
<i>F. (Forcipomyia) pulchrithorax</i>	0	1	0	1	2	1,7	recendentní
<i>F. (Forcipomyia) bipunctata</i>	0	0	0	1	1	0,8	subrecendentní

Tabulka 13 – Přehled druhů nasátých a vykladených samic tiplíků v Ústí nad Labem; N – nasáté samice, V – vykladené samice

4.2.3 PCR analýza přenašečů nasátých na infikovaném koni

Během jednoho z květnových odchyťů v Ústí nad Labem v roce 2023 byl na koni infikovaném leishmaniózou odchyten i jiný krevsající hmyz než tiplíci, konkrétně 18 nasátých muchniček a 2 nasátá klíšťata. Účelem bylo zjistit, zda se v právě nasáté krvi ještě vyskytují parazité. Z hmyzu byla vyzolovaná DNA, která byla testovaná pomocí jedнокrokové PCR na HSP70 na přítomnost leishmaniální DNA. Všechny vzorky byly negativní.

4.2.4 Izolace *L. martiniquensis* pomocí xenodiagnostiky

Na infikovaném koni v Ústí nad Labem byla v květnu 2023 provedena xenodiagnostika (Obrázek 21), chtěli jsme se tak pomocí sání samic krevsajícího hmyzu pokusit získat další český kmen *L. martiniquensis*. Na xenodiagnostiku byly použity druhy flebotomů *P. duboscqi* a *P. papatasi*. Tyto druhy flebotomů byly vybrány, protože ochotně a rychle sají na hostitelích, a protože dosud nemáme k dispozici přenašeče leishmanií z podrodu *Mundinia*. Tito flebotomové sloužili pouze k získání nasáté krve a za 24 h byli vypitváni a střevo s nasátou krví bylo dáno na kultivaci na krevní agar.

Celkem bylo na kultivaci použito 18 střev z nasátých flebotomů a také 2 střeva z nasátých tiplíků, kteří byli chyceni při sání pomocí exhaustoru na infikovaném koni. Po třech týdnech kultivace střev v krevním agaru nebyla zjištěna přítomnost leishmanií.

Zbýlých 30 nasátých samic flebotomů bylo rozděleno do poolů po 5 a byla z nich vyzolovaná DNA, která byla následně testovaná pomocí jedнокrokové PCR na HSP70 za účelem detekce DNA leishmanií. Všechny vzorky byly negativní.

Negativní výsledky v kapitolách 4.2.3 a 4.2.4 nejspíše naznačují, že v této době již kůň po přeléčení neměl v okolí léze životaschopné leishmanie přístupné sání hmyzu.



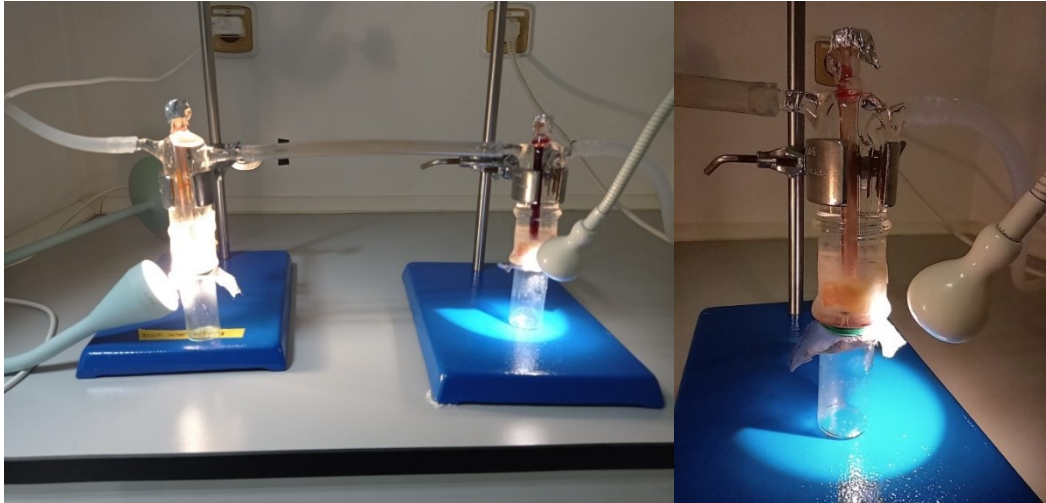
Obrázek 21 – Xenodiagnostika prováděná okolo kožní léze

4.2.5 Experimentální infekce nachytaných tiplíků

S nachytanými nenasátými samicemi tiplíků z odchyty v červenci 2023 v Ústí nad Labem byla dělána dvě pokusná sání (Obrázek 22). Účelem bylo zkusit, zda nachytané samice budou ochotné sát na krmítku za standardních laboratorních podmínek, aby bylo možno testovat jejich kompetenci pro *L. martiniquensis*.

V prvním experimentu bylo k dispozici 167 nenasátých samic tiplíků, 157 z nich patřilo do komplexu *C. obsoletus* a 10 *C. punctatus*. Pro tento experiment byl použit thajský kmen *L. martiniquensis*, ale žádná samice se nenasála.

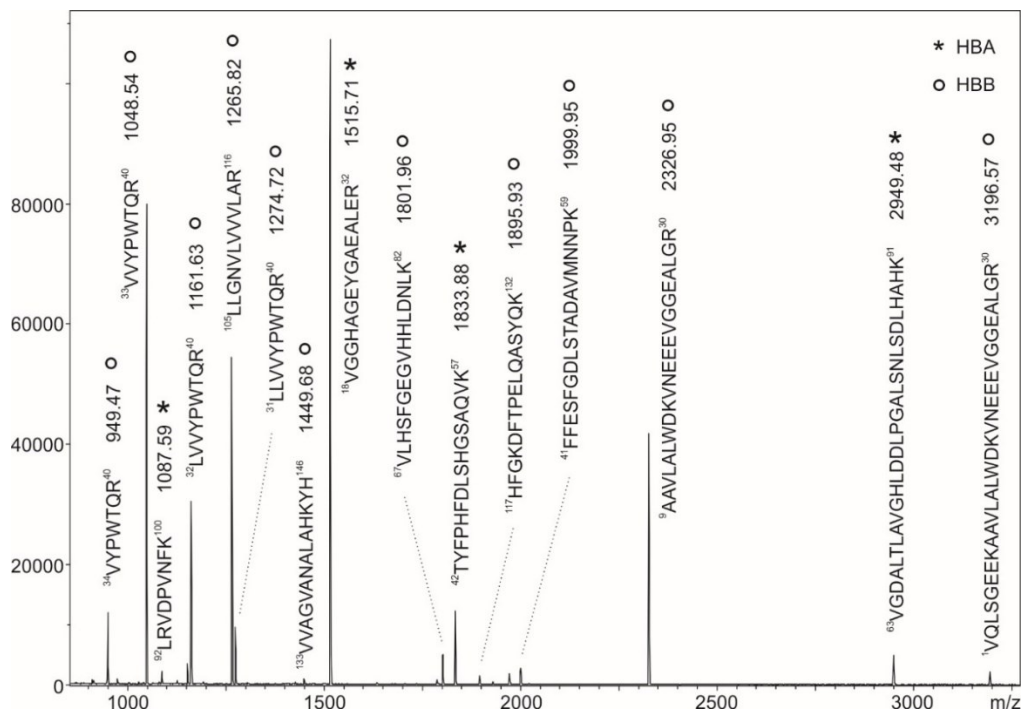
V druhém experimentu bylo k dispozici 170 nenasátých samic, které nebyly určované do druhu. Zde byl použit český kmen *L. martiniquensis*. V tomto pokusu se nasálo 6 samic, ale pouze jedna přežila do 10. dne po sání (leishmanie by už měly vytvářet zralé infekce) a její střevo bylo negativní na přítomnost leishmanií.



Obrázek 22 – Infekční sání s nachytanými tiplíky

4.2.6 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Šest nasátých samic z odchyťů v Ústí nad Labem bylo použito na MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii za účelem zjištění zdroje nasáté krve. Bylo použito 5 nasátých samic z komplexu *C. obsoletus* a jedna *C. furcillatus*. Identifikace zdroje krve se povedla pouze u 3 samic z komplexu *C. obsoletus* a potvrdila, že zdrojem krve byl kůň. Ukazují nám to jednotlivé píky hemoglobinu v získaném proteinovém profilu, které jsou druhově unikátní (Obrázek 23).



Obrázek 23 – MALDI-TOF proteinová mapa homogenizované nasáté samice z komplexu *C. obsoletus* s píky hostitelské alfa (HBA) a beta (HBB) podjednotky hemoglobinu

5 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo otestovat, zda vybrané evropské druhy flebotomů podporují vývoj leishmanií, které se v Evropě začínají objevovat a screening tiplíků nachytaných v oblastech výskytu autochtonních nálezů leishmaniózy. Ještě do nedávna byla leishmanióza nemocí tropických a subtropických oblastí a v jižní Evropě se v mediteránních oblastech endemicky vyskytovala téměř výhradně jen *L. infantum* (Maia et al., 2023), pouze v Řecku byla sporadicky popisována *L. tropica* (Garifallou et al., 1984; Christodoulou et al., 2012; Berriatua et al., 2021). V posledních letech se ale do jižní Evropy začínají šířit další druhy leishmanií a dokonce se začínají objevovat autochtonní případy leishmaniózy i ve střední Evropě. Podle všech predikcí tento trend bude pokračovat, stejně jako u dalších patogenů přenášených hmyzem (shrnutí Caminade et al., 2019; shrnutí v Maia, 2024). Proto je důležité testovat, nakolik druhy flebotomů hojně rozšířené v Evropě budou schopny podporovat vývoj nových druhů leishmanií.

Pro naše pokusy byly vybrány tři druhy flebotomů – *P. perniciosus*, *P. tobbi* a *S. minuta*, jejichž kolonie jsou zavedené v naší laboratoři. Druhy *P. perniciosus* a *P. tobbi* patří oba do podrodu *Larrousius* a jsou důležitými vektory *L. infantum* (Dvořák et al., 2018; Maia et al., 2023). Flebotomové z podrodu *Larrousius* jsou známi svou permisivitou (shrnutí v Dostálová a Volf, 2012), to znamená, že podporují vývoj více druhů leishmanií. V roce 2019 publikovala naše laboratoř studii, která se zabývala vývojem dvou různých kmenů *L. tropica* právě v *P. perniciosus* a *P. tobbi*. Ukázalo se, že oba kmeny se v těchto druzích flebotomů dokázaly úspěšně vyvíjet, 8. den po sání se vytvářely silné zralé infekce, docházelo ke kolonizaci stomodeální valvy a tvořili se metacykličtí promastigoti. Předpokládá se tedy, že by *P. perniciosus* a *P. tobbi* mohly hrát roli v přenosu *L. tropica* v oblastech, kde se nevyskytují její potvrzení přenašeči (Vaselek a Volf, 2019). Podobné výsledky s *P. perniciosus* měl i Bongiorno et al. (2018), tato studie navíc demonstruje i přenos *L. tropica* na hostitele. Tento druh leishmanie tedy již nebyl zahrnut do mé diplomové práce, ale soustředila jsem se na druhy leishmanií, které se v Evropě začínají vyskytovat nově, tzn. *L. major*, *L. donovani* a *L. martiniquensis* (viz úvodní literární přehled). Protože určitá data o vývoji *L. major* a *L. donovani* byla publikovaná ve studii zaměřené na vývoj hybridního kmene *L. infantum/L. donovani* v různých druzích flebotomů (Šeblová et al., 2015a), použili jsme v našich pokusech kmeny z jiných geografických oblastí výskytu těchto druhů leishmanií.

Výsledky ukazují, že *P. perniciosus* i *P. tobbi* podporují velice dobře vývoj lybijského kmene *L. major*. V obou druzích se desátý den po sání vyvinuly silné zralé infekce s kolonizací stomodeální valvy a tvořili se metacykličtí promastigoti. U obou druhů bylo desátý den po sání téměř 90 % testovaných samic infikováno a téměř u všech byla kolonizovaná stomodeální valva. Procenta infikovaných samic byla zcela srovnatelná s kontrolní skupinou flebotomů, která byla infikovaná *L. infantum*. Naproti tomu

ve studii (Šeblová et al., 2015a) s izraelským kmenem *L. major* bylo sice sedmý až devátý den po sání infikováno okolo 75 % procent samic *P. tobbi*, ale jen asi ve 20 % infikovaných samicích byly zaznamenané silné infekce a pouze u 11 % došlo ke kolonizaci stomodeální valvy (Šeblová et al., 2015a).

Naše výsledky dále ukazují, že v *P. perniciosus* a *P. tobbi* se dokáže vyvíjet i asijský kmen *L. donovani* z Nepálu. Desátý den po sání byl ale infikován signifikantně nižší počet infikovaných samic než u kontrolní skupiny s *L. infantum*. Nicméně jednalo se o silné infekce, kde leishmanie kolonizovaly stomodeální valvu a tvořily metacyklická stádia. Oproti tomu v již zmiňované studii Šeblové et al. (2015a) tvořily kmeny *L. donovani* z Kypru a Etiopie v *P. perniciosus* silné infekce s kolonizací stomodeální valvy osmý den po sání u více než 80 % samic (Šeblová et al., 2015a).

Nabízela se tedy otázka, zda nepálský kmen je méně kompatibilní s evropským druhem flebotoma, ale ve svém asijském přenašeči by se vyvíjel lépe. Rozhodli jsme se tedy tímto kmenem v rámci stejného pokusu infikovat *P. perniciosus* a *P. argentipes*, který je v jižní Asii prokázaným a dominantním přenašečem tohoto druhu leishmanie. Pro srovnání jsme jednu skupinu *P. argentipes* infikovali také hybridem *L. infantum/L. donovani*, který byl použit jako kontrola při experimentálních infekcích s *P. tobbi*. *Leishmania donovani* se v obou druzích flebotomů vyvíjela srovnatelně, podíl infikovaných samic se desátý den po sání pohyboval okolo 50 %, zatímco u *P. argentipes* infikovaných hybridem *L. infantum/L. donovani* byla procenta infikovaných samic signifikantně vyšší.

Z uvedených dat mimo jiné vyplývá, že různé kmeny leishmanií, které se do Evropy mohou šířit z různých geografických oblastí, se mohou lišit kvalitou infekcí přenašečů, potažmo epidemiologickým významem. Nelze ovšem vyloučit, že nízká procenta infekcí pozorovaná u nepálského kmene v obou druzích flebotomů jsou spojena s historií kmene v laboratořích. I když byl izolován později, než třeba libyjský kmen *L. major*, mohl projít bottle-neckem spojeným se ztrátou některých genů/vlastností. Z metodického hlediska z našich pokusů v každém případě plyne, že pro vyloučení určitého druhu flebotoma jako kompetentního přenašeče určitého druhu leishmanie je optimální otestovat alespoň dva kmeny/izoláty parazita. Rozdílný vývoj kmenů stejného druhu leishmanie v přenašečích už byl popsán dříve. Při pokusech s pěti kmeny *L. major* bylo zaznamenáno, že nevirulentní nebo málo virulentní kmeny se v přenašeči většinou nevyvíjely tak dobře, jako virulentní kmeny, i když toto pravidlo neplatilo stoprocentně, takže faktory ovlivňující vývoj v hostiteli a přenašeči se mohou lišit (Čiháková a Volf, 1997). Nicméně oba námi testované druhy flebotomů z podrodu *Larrousius* – *P. perniciosus* a *P. tobbi* podporují vývoj *L. donovani* i *L. major* a mohly by tedy být potenciálními přenašeči těchto leishmanií v Evropě, ve své budoucí dizertační práci bych tyto hypotézy chtěla definitivně potvrdit přenosovými experimenty na hostitele.

Naopak experimentální infekce s *L. martiniquensis* ukázaly, že tyto dva druhy flebotomů nejsou jejími kompetentními přenašeči. Leishmanie nepřežívaly defekaci a nedokázaly vytvořit silné zralé infekce. *L. martiniquensis* je jedním z šesti druhů v podrodu *Mundinia*. U těchto leishmanií se diskutuje, že jejich přenašeči nejspíš nejsou flebotomové, jako u ostatních podrodů leishmanií, ale tiplíci (Šeblová et al., 2015b; Barratt et al., 2017; Butenko et al., 2019; Chanmol et al., 2019; Bečvář et al., 2021). U *L. macropodum*, která se vyskytuje v Austrálii, byly pozorovány silné infekce u odchycených tiplíků rodu *Forcipomyia* (Dougal et al., 2011) a nasvědčují tomu i experimenty s laboratorně chovanými flebotomy. Například ve studii Chanmol et al. (2019), kde se autoři zabývali vývojem *L. orientalis* ve flebotomech *Lutzomyia longipalpis* a v tiplících *Culicoides soronensis*, leishmanie ve flebotomech nepřežívaly defekaci, stejně jako v našich pokusech. Oproti tomu v tiplících od 3. dne po infekčním sání leishmanie kolonizovaly stomodeální valvu a tvořily infekční metacyklické promastigoty (Chanmol et al., 2019). Podobné výsledky při experimentech s *C. soronensis* měli i kolegové z naší laboratoře, kteří prokázali, že všech pět v té době známých druhů leishmanií z podrodu *Mundinia* se lépe vyvíjí v tiplících než ve flebotomech, a u tří druhů byl dokonce prokázán přenos na hostitele. Pouze u pokusů s *P. argentipes*, ve kterých byli tito flebotomové infikováni *L. martiniquensis* a *L. orientalis*, docházelo u některých samic k tvorbě zralých infekcí a kolonizaci stomodeální valvy (Bečvář et al., 2021). Ani zapojení flebotomů do přenosu leishmanií z podrodu *Mundinia* nelze tedy vyloučit, bylo by třeba ověřit také hostitelskou kompetenci druhů, které ještě nebyly kolonizovány.

Dalším druhem flebotoma, u kterého jsme chtěli testovat jeho vnímavost k leishmaniím byla *Sergentomyia minuta*. Zástupci tohoto rodu jsou obecně považováni za herpetofilní druhy flebotomů (Killick-Kendrick et al., 1986), nicméně u *S. minuta* bylo zaznamenáno i antropofilní chování (Bennai et al., 2018; González et al., 2020; Tichá et al., 2023). Také *S. schwetzi* poměrně ochotně saje na savcích (Lawyer et al., 1990; Polanská et al., 2020) a v našich chovech se k udržování těchto flebotomů používají výhradně myši. Flebotomové z rodu *Sergentomyia* jsou přenašeči leishmanií z podrodu *Sauroleishmania*, které parazitují u plazů (Killick-Kendrick et al., 1986; Lainson a Shaw, 1987). Konkrétně *S. minuta* je potvrzeným přenašečem *L. tarentolae*, což je nepatogenní parazit gekonů (Lewis a Ward, 1987). V jižní Evropě byla ale v *S. minuta* už několikrát detekována DNA *L. infantum* a *L. major* (Campino et al., 2013; Pereira et al., 2017; Latrofa et al., 2018; Abbate et al., 2020). Nicméně samotný nálezn DNA neznamena, že parazit je daným druhem přenášen na hostitele (Šeblová et al., 2014). Kompetence tohoto druhu k leishmaniím nebyla dosud experimentálně testována, a proto naším cílem bylo tyto pokusy provést. Ukázalo se ale, že samice kolonie *S. minuta*, která je nově zavedená v naší laboratoři, odmítají sát beraní krev na skleněném krmítku s kuřecí kůžičkou, což je standardní metoda experimentálních infekcí. Rozhodli jsme se tedy vyzkoušet jiné typy membrán (prasečí střevo a umělá membrána), ale ani to nebylo úspěšné. Kolegové z laboratoře zkoušeli použít

jako membránu i plazí kůži, ale bez úspěchu (zatím nepublikováno). V pokusech s kuřecí kůžičkou a umělou membránou jsme také zkoušeli pokrýt vnější stranu membrány zaschlou krevní plazmou (osobní sdělení Petr Volf), protože při pokusech s jinými druhy flebotomů jsme zaznamenali vyšší počty nasátých samic (zatím nepublikováno), ale ani to nepomohlo. Další variantou bylo místo skleněného krmítka, které je napojené na vodní lázeň, použít Hemotek, kdy se síťka s flebotomy položí na zásobníky naplněné krví s kuřecí kůžičkou a samice tak nemusejí sát vzhůru nohama. Některé studie na tiplících ukazují, že právě tento jev může mít vliv na úspěšnost sání samic (de Beer et al., 2021), ale v našem případě se opět nenasála ani jedna. Poslední variantou v našich pokusech bylo zkusit jiný zdroj krve. Jak už bylo zmíněno výše, pro experimentální sání se v naší laboratoři používá beraní krev. Kolegové z laboratoře zkoušeli ptačí a plazí krev. Bylo provedeno několik pokusů, kdy byly vyzkoušeny i různé podmínky při sání – různá teplota, vlhkost, fáze dne. Ze sedmi pokusů se pouze při jednom nasály 3 samice z celkových 150. Při tomto pokusu byla použita ptačí krev a pokus probíhal v noci při 32 °C a za vysoké vlhkosti (zatím nepublikováno). My jsme v této diplomové práci použili jako další zdroj krve lidskou krev. Z celkem 450 samic, které byly k tomuto pokusu použity, se nasála pouze jedna. Kvůli neochotě samic *S. minuta* sát na různých typech membrán, s různým zdrojem krve a za různých podmínek tedy prozatím není možné experimentálně otestovat, zda tento druh podporuje vývoj leishmanií patogenních pro člověka. Co se týče ostatních druhů z rodu *Sergentomyia*, důkladně byl testován jen druh *S. schwetzi*, který nepodporuje vývoj *L. major* ani *L. donovani* (Lawyer et al., 1990; Kaddu et al., 2011; Sádlová et al., 2013).

Během svého magisterského studia jsem se také zúčastnila odchytů *Phlebotomus mascittii* ve Slovinsku a Rakousku. *P. mascittii* je nejseverněji se vyskytujícím druhem flebotoma v Evropě (Dvořák et al., 2016; Dvořák et al., 2018; Kniha et al., 2021). Kolonie tohoto druhu flebotoma je momentálně zakládána v našich chovech a ve své dizertační práci bych také chtěla otestovat jeho kompetenci k vývoji leishmanií.

Druhou částí této diplomové práce byla analýza tiplíků v oblastech výskytu autochtonních nálezů *L. martiniquensis* v České republice. *L. martiniquensis* byla ve střední Evropě poprvé zaznamenána v roce 2009 v Německu a ve Švýcarsku u koní (Müller et al., 2009). V České republice byly zatím zaznamenány tři takové případy. V prvním případě se jednalo o čtyřletou klisnu plemene achaltekinský kůň v Olomouckém kraji, která byla dva roky před objevením léze importovaná z Ukrajiny do České republiky, a tak není zcela jasné, kde se nakazila. Druhým případem byla šestiletá klisna plemene starokladrubský kůň, která se narodila v hřebčínu ve Slatiňanech a ve svých pěti letech byla prodána na Slovensko. O měsíc později se jí pod pravým okem vytvořila léze a byla jí diagnostikována leishmanióza způsobená *L. martiniquensis*. Nicméně už v době prodeje u ní byla zaznamenána alopecie v místě budoucí léze, a tak se předpokládá, že se nakazila v České republice. Zatím posledním případem

je valach v Ústí nad Labem, který údajně z České republiky nevycestoval (Jahn, Modrý, Votýpka, zatím nepublikováno). Jelikož se v České republice flebotomové zatím nevyskytují, musí být do přenosu zapojen jiný krevsající hmyz. Nejbližší k nám byl zaznamenán výskyt flebotomů u našich sousedů v Německu, Rakousku a Slovensku a jednalo se o *P. mascittii* (Dvořák et al., 2016; Dvořák et al., 2018; Kniha et al., 2021). Jak už bylo zmíněno výše, *L. martiniquensis* patří do podrodu *Mundinia*, u kterého se předpokládá, že je přenášen tiplíky (Šeblová et al., 2015b; Barratt et al., 2017; Butenko et al., 2019; Chanmol et al., 2019; Bečvář et al., 2021). Mým hlavním úkolem v této části diplomové práce tedy byla druhová determinace nachytených tiplíků a jejich screening na přítomnost DNA leishmanií.

Na obou lokalitách byl hmyz chytán pomocí CDC světelných pastí a nachytené samice tiplíků byly roztříděné na nenasáté, nasáté a vykladené a určeny do druhu. Ty samice, které už byly v kontaktu s hostitelskou krví, a tedy i s potenciálními patogeny, byly otestovány na přítomnost DNA leishmanií.

Odchyty v hřebčínu ve Slatiňanech probíhaly v květnu a v září 2022 a celkem bylo analyzováno 3341 samic tiplíků. Na této lokalitě byly chyceny jen dva druhy, dominantně zde byli zastoupeni tiplíci z komplexu *Culicoides obsoletus* – 98,1 %. Druhým chyceným druhem byl *C. punctatus*. Oba tyto druhy se často a ve velkých počtech vyskytují hlavně u koní a jiných hospodářských zvířat (Orzágh, 1980; Rádrová et al., 2016), takže jejich výskyt zde není překvapující. *Culicoides obsoletus* komplex se řadí do podrodu *Avaritia* a zahrnuje čtyři druhy, které jsou od sebe morfologicky téměř nerozeznatelné – *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. chiopterus* a *C. dewulfi* (shrnuto Campbell a Pelham-Clinton, 1960; Mathieu et al., 2012; Kluiters et al., 2016). Proto jsme je také určili jen jako komplex *C. obsoletus*. Jedná se o významné přenašeče nejrůznějších onemocnění. Ve střední Evropě jsou tyto tiplíci zodpovědní za přenos viru BTV (Bluetongue virus), který způsobuje katarální horečku ovcí (Mehlhorn et al., 2007) a pravděpodobně také přenáší SBV (Schmallenberg virus), který může způsobovat potraty nebo narození deformovaných mláďat u hospodářských zvířat (Rasmussen et al., 2012; Larska et al., 2013; Wernike et al., 2015).

Na druhé lokalitě v Ústí nad Labem bylo druhové složení pestřejší i přes to, že analyzovaný vzorek byl významně menší (119 samic). Odchyty probíhaly v květnu a červenci 2023. Nejdominantnějším druhem zde byli opět tiplíci z komplexu *C. obsoletus* (74 %). Dalšími chycenými druhy byly *C. punctatus*, *C. furcillatus*, *C. circumscriptus*, *Forcipomyia pulchrithorax* a *F. bipunctata*. Jak už bylo zmíněno, tiplíci z komplexu *C. obsoletus* a *C. punctatus* jsou mamaliofilní a jejich masový výskyt je typický v okolí hospodářských zvířat (Orzágh, 1980; Rádrová et al., 2016). U třech nasátých samic z komplexu *C. obsoletus* jsme si zdroj nasáté krve ověřili pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie, která nám potvrdila, že tyto samice tiplíků opravdu sáli na koních. *C. furcillatus* také bývá chytaný v okolí dobytka a analýzy nasátých samic potvrzují, že na těchto zvířatech i saje (Lassen

et al., 2012; Vasić et al., 2019; Kasičová et al., 2021). Naopak u *C. circumscriptus* se předpokládá, že je to nejspíš ornitofilní druh (Bobeva et al., 2015). Hostitelské preference *F. bipunctata* a *F. pulchrithorax* zatím nebyly v žádné studii analyzovány. Různé druhy rodu *Forcipomyia* preferují různé potravní zdroje, například *F. taiwana* je antropofilní a její kousnutí může způsobovat alergické reakce (Lien, 1991), *F. velox* zase preferuje obojživelníky (Desportes, 1942) a například *F. paludis* saje hemolymfu jiným druhům hmyzu (Macfie, 1936). Odchyt druhů tiplíků, jejichž preferovanými hostiteli nejsou koně, hospodářská zvířata nebo lidé, může být spíše náhodný. Na rozdíl od Slatiňan, kde byly pasti pokládány uvnitř stájí, byly ty v Ústí nad Labem nastražovány spíše venku v okolí dřevěného přístřešku pro koně. Navíc hned vedle ohrady je les, ve kterém žijí ptáci a další zvířata, která mohou sloužit jako hostitelé pro tyto druhy tiplíků.

Jak už bylo zmíněno výše, nasáté a vykladené samice byly analyzovány na přítomnost DNA leishmanií. Nejprve byla na tyto analýzy použita jednokroková PCR na HSP 70, kdy bylo testováno 8 poolů a 4 z nich vyšly pozitivně. Výsledky sekvenace se ale neshodovaly s žádným druhem leishmanie a tak byla pro další analýzy používána nested PCR na SSU rRNA. Celkem bylo analyzováno 97 poolů a ani jeden nevyšel pozitivně na DNA leishmanií. 15 poolů s tiplíky z komplexu *C. obsoletus* z odchytů ve Slatiňanech bylo pozitivních na DNA *Herpetomonas ztiplika* a jeden vzorek s tiplíky z komplexu *C. obsoletus* z odchytů v Ústí nad Labem byl pozitivní na DNA *Trypanosoma* sp. ze skupiny *T. theileri*. *Herpetomonas ztiplika* je jedním z druhů jednohostitelských kinetoplastid, pro které jsou tiplíci hostiteli (Podlipaev et al., 2004b). Dalšími druhy jsou *H. trimorpha*, *Sergia podlipaevi* a *Crithidia* sp. (Svobodová et al., 2007; Zídková et al., 2010; Bernotiené et al., 2020). Zástupci z rodu *Herpetomonas* jsou považováni za parazity dvoukřídlého hmyzu, nicméně jejich výskyt byl zaznamenán například i u polokřídlých, blanokřídlých, švábů, blech nebo dokonce i u rostlin, krys a lidí se sníženou imunitou (Roitman et al., 1976; Fiorini et al., 2001; Podlipaev et al., 2004a; Marín et al., 2007; Morio et al., 2008; Yurchenko et al., 2016; shrnuto ve Frolov et al., 2021). Mezi trypanosomy ze skupiny *T. theileri* se řadí několik druhů – *T. theileri*, *T. cervi*, *T. melophagium* a *T. trinaperronei* a jedná se o parazity hospodářských zvířat a jelenovitých (Hoare, 1972; Kingston a Morton et al., 1975; Rodrigues et al., 2003; Garcia et al., 2020). Za přenašeče těchto druhů trypanosom se považují kloši nebo ovádi (Molyneux, 1975; Böse et al., 1987; Garcia et al., 2020). U *C. obsoletus*, *C. pulicaris* a *C. punctatus* zaznamenala DNA těchto trypanosom Zdeňka Galková (2010) ve své diplomové práci, ale není jasné, zda tiplíci podporují vývoj těchto trypanosom a jsou schopni jejich přenosu. Předpokládá se ale, že tiplíci jsou přenašeči ptačích trypanosom. Nasvědčují tomu nálezy přirozených infekcí *T. bennetti* v *C. alazanicus*, *C. pictipennis*, *C. festivipennis* a *C. clastrieri* (Svobodová et al., 2017) a experimentální infekce *C. nubeculosus* a *C. impunctatus* s *T. everetti*, kdy byly trypanosomy schopné vývoje a vytvářely metacyklická stádia v obou testovaných druzích tiplíků (Bernotiené et al., 2020).

Negativní výsledky analyzovaných tiplíků na DNA leishmanií ze Slatiňan může vysvětlovat fakt, že odchyty hmyzu probíhaly v době, kdy už zde nakažený kůň dva roky nebyl ustájený a u žádného jiného koně se léze neobjevily. U analyzovaných tiplíků z Ústí nad Labem zase mohly hrát roli poměrně nízké počty nachytaných samic. Navíc majitelka s tímto koněm jezdí po celé republice na závody, a tak není vyloučeno, že se nakazil v jiné části republiky.

Nakažený kůň v Ústí nad Labem měl v době odchytů na hlavě stále ještě viditelnou lézi, a tak jsme se rozhodli provést xenodiagnostiku za účelem izolace dalšího českého kmene *L. martiniquensis*. Jelikož přenašeči těchto leishmanií nejsou známi, použili jsme flebotomy z našich kolonií, konkrétně *P. duboscqi* a *P. papatasi* a střevní obsah byl přenášen do média předtím, než samičky dokončily trávení krve, aby nebyla případná infekce ztracena s defekací. Na kultivaci na krevním agaru bylo použito 18 střev z nasátých samic flebotomů a také střeva dvou nasátých tiplíků, kteří byli chyceni exhaustorem během sání na infikovaném koni, ale přítomnost leishmanií nebyla zjištěna. Zbytek nasátých flebotomů byl otestován pomocí PCR na DNA leishmanií, ale všechny vzorky byly negativní. Na tomto koni byl odchycený i jiný nasátý hmyz (muchničky a klíšťata), který byl také otestován na DNA leishmanií, ale opět byly všechny vzorky negativní. Tyto výsledky ukazují, že v této době byl kůň natolik přeléčený, že v okolí léze nebyly zřejmě životaschopné leishmanie, které by mohl hmyz nasát.

Nenasáté samice tiplíků z červencového odchytu v Ústí nad Labem jsme se rozhodli zkoušet infikovat *L. martiniquensis*. Zajímalo nás mimo jiné, zda jsou nachytané samice tiplíků vůbec ochotné sát na krmítku, protože plánujeme v naší laboratoři založit kolonii *C. obsoletus*. Byly provedeny dvě infekční sání, kdy se pouze při druhém pokusu nasálo 6 samic. Pitvy proběhly desátý den po sání, to už by leishmanie měly vytvářet zralé infekce. Ze zmiňovaných šesti nasátých samic přežila jen jedna a v jejím střevu nebyly nalezeny žádné leishmanie. O kompetenci našich druhů tiplíků jako přenašečů *L. martiniquensis* tedy zatím nelze dělat závěry. Ve své dizertační práci bych chtěla na tyto pokusy navázat. Naším plánem je kolonizovat tiplíky druhu *C. obsoletus* v naší laboratoři a následně testovat jejich vnímavost k leishmaniím.

6 Závěr

1. Testování vnímavosti vybraných evropských druhů flebotomů k *L. major*, *L. donovani* a *L. martiniquensis*

Celkem bylo provedeno 15 experimentálních infekcí a analyzováno 1601 samic flebotomů. Výsledky lze shrnout do následujících bodů:

- ***Phlebotomus perniciosus* i *P. tobbi* podporují vývoj *L. donovani*.** Ačkoliv použitý nepálský kmen infikoval nižší procenta samic než kontrolní skupina, desátý den po infekci byly pozorovány silné zralé infekce s kolonizací stomodeální valvy a tvorba metacyklických stádií. Nízké procento infikovaných samic je zřejmě dáno použitým kmenem, který se vyvíjel stejně i ve svém prokázaném asijském přenašeči *P. argentipes*.
- ***Phlebotomus perniciosus* i *P. tobbi* podporují vývoj *L. major*.** Severoafrický kmen *L. major* tvořil v obou evropských druzích flebotomů infekce po všech stránkách srovnatelné s kontrolní *L. infantum*. Leishmanie byly desátý den po infekci vždy přítomné ve vysokém procentu samic, tvořily silné infekce s kolonizací stomodeální valvy a přítomností infekčních metacyklických stádií.
- ***Phlebotomus perniciosus* ani *P. tobbi* nepodporují vývoj *L. martiniquensis*.** Český ani thajský kmen nepřezívaly defekaci samic těchto evropských druhů a nedokázaly v nich vytvářet zralé infekce.
- **O kompetenci *Sergentomyia minuta* podporovat vývoj leishmanií není možné dělat závěry,** protože samice laboratorní kolonie odmítají sát na krmítku, přestože bylo testováno několik typů membrán, krve a experimentálních podmínek.
- Z metodického hlediska naše výsledky poukazují na význam výběru testovaného kmene leishmanií, pro vyloučení kompetence přenašeče je optimální pracovat alespoň se dvěma kmeny.

2. Analýza tiplíků v oblastech výskytu autochtonních nálezů *L. martiniquensis* v České republice

- Celkem bylo analyzováno 3341 nasátých a vykladených samic tiplíků ze Slatiňan a 119 z Ústí nad Labem.
- **Na obou lokalitách byl eudominantní druhový komplex *Culicoides obsoletus*** (98,1 % ve Slatiňanech, 74 % v Ústí nad Labem). Ve Slatiňanech byl dále detekován jen recedentní *C. punctatus* (1,9 %), zatímco v Ústí nad Labem byla druhová diverzita pestřejší: eudominantní *C. punctatus* (19,3 %), subdominantní *C. furcillatus* (2,5 %), recedentní *C. circumscriptus* (1,7 %) a *Forcipomyia pulchrithorax* (1,7 %) a subrecedentní *F. bipunctata* (0,8 %).

- Na přítomnost DNA leishmanií bylo otestováno 97 poolů po maximálně 50 samicích a **žádný pool nebyl pozitivní na DNA leishmanií**. Ve Slatiňanech bylo 15 poolů komplexu *C. obsoletus* pozitivních na DNA jednohostitelských kinetoplastid *Herpetomonas ztiplika*, v Ústí nad Labem obsahoval jeden pool se samicemi z *C. obsoletus* komplexu DNA *Trypanosoma* sp. ze skupiny *T. theileri*.
- DNA leishmanií nebyla detekována ani u nasátých klíšťat a muchničků, které sály na koni infikovaném leishmaniózou, a pokus o izolaci *L. martiniquensis* pomocí xenodiagnostiky na tomto koni byl neúspěšný, po přeléčení už pravděpodobně leishmanie na místě přístupném sání hmyzu v okolí léze nepřeživaly.
- Pokus o experimentální infekci nenasátých samic tiplíků odchycených v přírodě ukázal, že samice jsou jednak velmi málo ochotné sát za standardních podmínek na krmítku, jednak mají velkou mortalitu po sání.
- Analýza krve u 3 nasátých samic z komplexu *C. obsoletus* pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie potvrdila, že zdrojem krve byl kůň.

Na výsledky své diplomové práce bych chtěla navázat ve svém dizertačním projektu, ve kterém plánuji ověřit kompetenci *P. perniciosus* a *P. tobbi* k *L. major* a *L. donovani* pomocí experimentálních přenosů na hostitele. Dále také plánuji ověřit kompetenci *P. mascittii* k leishmaniím pomocí experimentálních infekcí a přenosů na hostitele. Kolonizace tohoto druhu právě probíhá v naší laboratoři. Plánujeme také kolonizaci *C. obsoletus* a ověření jeho kompetence k *L. martiniquensis*. Jak ukázaly výsledky mé diplomové práce, tiplíci z druhového komplexu *C. obsoletus* jsou nejhojněji se vyskytujícími druhy v oblastech výskytu autochtonních případů leishmanióz v České republice.

7 Finanční zdroje

Část této diplomové práce byla financována mezinárodním projektem CLIMOS (Horizon –HLTH-2021, No. 101057690) – Climate Monitoring and Decision Support Framework for Sand Fly-borne Diseases Detection and Mitigation <https://climos-project.eu/>. Tento projekt se zabývá monitorováním flebotomů a patogenů, které přenášejí, v souvislosti se současnými klimatickými a enviromentálními změnami v Evropě.

8 Použitá literatura

Abbate, J. M., Maia, C., Pereira, A., Arfuso, F., Gaglio, G., Rizzo, M., Caracappa, G., Marino, G., Pollmeier, M., Giannetto, S., & Brianti, E. (2020). Identification of trypanosomatids and blood feeding preferences of phlebotomine sand fly species common in Sicily, Southern Italy. *PLoS one*, *15*(3), e0229536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229536>

Afonso, M. O., Campino, L., Cortes, S., & Alves-Pires, C. (2005). The phlebotomine sandflies of Portugal. XIII--Occurrence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 in the Arrabida leishmaniasis focus. *Parasite (Paris, France)*, *12*(1), 69–72. <https://doi.org/10.1051/parasite/2005121069>

Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., Gradoni, L., & Sereno, D. (2017). Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular aspects of medicine*, *57*, 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>

Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*, *10*(3), e0004349. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>

Akilov, O. E., Khachemoune, A., & Hasan, T. (2007). Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. *International journal of dermatology*, *46*(2), 132–142. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2007.03154.x>

Alam, M. Z., Rahman, M. M., Akter, S., Talukder, M. H., & Dey, A. R. (2018). An investigation about the possible role of cattle and goats as reservoir hosts for *Leishmania donovani* in Bangladesh. *Journal of vector borne diseases*, *55*(3), 242–244. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.249484>

Alkan, C., Bichaud, L., de Lamballerie, X., Alten, B., Gould, E. A., & Charrel, R. N. (2013). Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral research*, *100*(1), 54–74. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.005>

Al-Salem, W. S., Pigott, D. M., Subramaniam, K., Haines, L. R., Kelly-Hope, L., Molyneux, D. H., Hay, S. I., & Acosta-Serrano, A. (2016). Cutaneous Leishmaniasis and Conflict in Syria. *Emerging infectious diseases*, *22*(5), 931–933. <https://doi.org/10.3201/eid2205.160042>

Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., & WHO Leishmaniasis Control Team (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS one*, 7(5), e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>

Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvořák, V., & Volf, P. (2013). The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 18(30), 20540. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.30.20540>

Antoniou, M., Haralambous, C., Mazeris, A., Pratloug, F., Dedet, J. P., & Soteriadou, K. (2008). *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. *The Lancet. Infectious diseases*, 8(1), 6–7. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70297-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70297-9)

Anugulruengkitt, S., Songtaweessin, W. N., Thepnarong, N., Tangthanapalakul, A., Sitthisan, M., Chatproedprai, S., Wititsuwannakul, J., Likitnukul, S., Jariyapan, N., Weedall, G. D., Siriyasatien, P., & Preativatanyou, K. (2022). Case Report: Simple Nodular Cutaneous Leishmaniasis Caused by Autochthonous *Leishmania (Mundinia) orientalis* in an 18-Month-Old Girl: The First Pediatric Case in Thailand and Literature Review. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 108(1), 44–50. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.22-0385>

Barratt, J., Kaufer, A., Peters, B., Craig, D., Lawrence, A., Roberts, T., Lee, R., McAuliffe, G., Stark, D., & Ellis, J. (2017). Isolation of Novel Trypanosomatid, *Zelonia australiensis* sp. nov. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) Provides Support for a Gondwanan Origin of Dixerous Parasitism in the Leishmaniinae. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(1), e0005215. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005215>

Bates P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International journal for parasitology*, 37(10), 1097–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>

Bečvář, T., Siriyasatien, P., Bates, P., Volf, P., & Sádlová, J. (2020). Development of *Leishmania (Mundinia)* in guinea pigs. *Parasites & vectors*, 13(1), 181. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04039-9>

Bečvář, T., Vojtková, B., Pacáková, L., Vomáčková Kykalová, B., Tichá, L., Volf, P., & Sádlová, J. (2024). Steppe lemmings and Chinese hamsters as new potential animal models for the study of the leishmania subgenus *Mundinia* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). PREPRINT in *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2024.01.02.573987>

- Bečvář, T., Vojtková, B., Siriyasatien, P., Votýpka, J., Modrý, D., Jahn, P., Bates, P., Carpenter, S., Volf, P., & Sádlová, J.** (2021). Experimental transmission of *Leishmania (Mundinia)* parasites by biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *PLoS pathogens*, *17*(6), e1009654. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009654>
- de Beer, C. J., Boikanyo, S. N. B., & Venter, G. J.** (2021). Assessment of the Hemotek® system for the in vitro feeding of field-collected *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in South Africa. *Medical and veterinary entomology*, *35*(2), 177–186. <https://doi.org/10.1111/mve.12484>
- Belehu, A., & Turk, J. L.** (1976). Establishment of cutaneous *Leishmania enriettii* infection in hamsters. *Infection and immunity*, *13*(4), 1235–1241. <https://doi.org/10.1128/iai.13.4.1235-1241.1976>
- Bennai, K., Tahir, D., Lafri, I., Bendjaballah-Laliam, A., Bitam, I., & Parola, P.** (2018). Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA and host blood meal identification in *Phlebotomus* in a hypoendemic focus of human leishmaniasis in northern Algeria. *PLoS neglected tropical diseases*, *12*(6), e0006513. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006513>
- Bennis, I., Thys, S., Filali, H., De Brouwere, V., Sahibi, H., & Boelaert, M.** (2017). Psychosocial impact of scars due to cutaneous leishmaniasis on high school students in Errachidia province, Morocco. *Infectious diseases of poverty*, *6*(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0267-5>
- Bernotienė, R., Iezhova, T. A., Bukauskaitė, D., Chagas, C. R. F., Kazak, M., & Valkiūnas, G.** (2020). Development of *Trypanosoma everetti* in *Culicoides* biting midges. *Acta tropica*, *210*, 105555. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105555>
- Berriatua, E., Maia, C., Conceição, C., Özbel, Y., Töz, S., Baneth, G., Pérez-Cutillas, P., Ortuño, M., Muñoz, C., Jumakanova, Z., Pereira, A., Rocha, R., Monge-Maillo, B., Gasimov, E., Van der Stede, Y., Torres, G., & Gossner, C. M.** (2021). Leishmaniasis in the European Union and Neighboring Countries. *Emerging infectious diseases*, *27*(6), 1723–1727. <https://doi.org/10.3201/eid2706.210239>
- Berry, I., & Berrang-Ford, L.** (2016). Leishmaniasis, conflict, and political terror: A spatio-temporal analysis. *Social science & medicine* (1982), *167*, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2016.04.038>
- Bobeva, A., Zehindjiev, P., Ilieva, M., Dimitrov, D., Mathis, A., & Bensch, S.** (2015). Host preferences of ornithophilic biting midges of the genus *Culicoides* in the Eastern Balkans. *Medical and veterinary entomology*, *29*(3), 290–296. <https://doi.org/10.1111/mve.12108>

Bogdan, C., Schönian, G., Bañuls, A. L., Hide, M., Pratlong, F., Lorenz, E., Röllinghoff, M., & Mertens, R. (2001). Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32(2), 302–306. <https://doi.org/10.1086/318476>

Boggild, A. K., Caumes, E., Grobusch, M. P., Schwartz, E., Hynes, N. A., Libman, M., Connor, B. A., Chakrabarti, S., Parola, P., Keystone, J. S., Nash, T., Showler, A. J., Schunk, M., Asgeirsson, H., Hamer, D. H., Kain, K. C., & GeoSentinel Surveillance Network (2019). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in travellers and migrants: a 20-year GeoSentinel Surveillance Network analysis. *Journal of travel medicine*, 26(8), taz055. <https://doi.org/10.1093/jtm/taz055>

Bongiorno, G., Di Muccio, T., Bianchi, R., Gramiccia, M., & Gradoni, L. (2019). Laboratory transmission of an Asian strain of *Leishmania tropica* by the bite of the southern European sand fly *Phlebotomus perniciosus*. *International journal for parasitology*, 49(6), 417–421. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.12.009>

Borkent, A., & Dominiak, P. (2020). Catalog of the Biting Midges of the World (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa*, 4787(1), zootaxa.4787.1.1. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4787.1.1>

Borkent, A. (2005). The biting midges, the Ceratopogonidae (Diptera). In: Marquardt W H (ed), *Biology of Disease Vectors*. Elsevier Academic Press, Burlington, Massachusetts: 113-126.

Böse, R., Friedhoff, K. T., & Olbrich, S. (1987). Transmission of *Megatrypanum* trypanosomes to *Cervus dama* by Tabanidae. *The Journal of protozoology*, 34(1), 110–113. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1987.tb03143.x>

Brotánková, A., Fialová, M., Čepička, I., Brzoňová, J., & Svobodová, M. (2022). Trypanosomes of the *Trypanosoma theileri* Group: Phylogeny and New Potential Vectors. *Microorganisms*, 10(2), 294. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020294>

Bruschi, F., & Gradoni, L. (2018). The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0>

Bualert, L., Charungkiattikul, W., Thongsuksai, P., Mungthin, M., Siripattanapipong, S., Khositnithikul, R., Naaglor, T., Ravel, C., El Baidouri, F., & Leelayoova, S. (2012). Autochthonous disseminated dermal and visceral leishmaniasis in an AIDS patient, southern Thailand, caused by *Leishmania siamensis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 86(5), 821–824. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0707>

- Burgess, G. W., & Spradbrow, P. B.** (1977). Studies on the pathogenesis of bovine ephemeral fever. *Australian veterinary journal*, 53(8), 363–368. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1977.tb07952.x>
- Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M.** (2018). Leishmaniasis. *Lancet (London, England)*, 392(10151), 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- Butenko, A., Kostygov, A. Y., Sádlová, J., Kleschenko, Y., Bečvář, T., Podešvová, L., Macedo, D. H., Žihala, D., Lukeš, J., Bates, P. A., Volf, P., Opperdoes, F. R., & Yurchenko, V.** (2019). Comparative genomics of *Leishmania (Mundinia)*. *BMC genomics*, 20(1), 726. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6126-y>
- Caminade, C., McIntyre, K. M., & Jones, A. E.** (2019). Impact of recent and future climate change on vector-borne diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1436(1), 157–173. <https://doi.org/10.1111/nyas.13950>
- Campbell, J. A., & Pelham-Clinton, E. C.** (1960). X.—A Taxonomic Review of the British Species of *Culicoides* Latreille (Diptera, Ceratopogonidæ). *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B. Biology*, 67(3), 181–302. <https://doi.org/10.1017/S0080455X00000758>
- Campino, L., Cortes, S., Dionísio, L., Neto, L., Afonso, M. O., & Maia, C.** (2013). The first detection of *Leishmania major* in naturally infected *Sergentomyia minuta* in Portugal. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(4), 516–518. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000400020>
- Cardoso, L., Schallig, H., Persichetti, M. F., & Pennisi, M. G.** (2021). New Epidemiological Aspects of Animal Leishmaniosis in Europe: The Role of Vertebrate Hosts Other Than Dogs. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(3), 307. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030307>
- Catta-Preta, C., Ghosh, K., Sacks, D., & Ferreira, T.** (2024). Single-cell atlas of *Leishmania major* development in the sandfly vector reveals the heterogeneity of transmitted parasites and their role in infection, PREPRINT (Version 1) available at Research Square <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4022188/v1>
- Chanmol, W., Jariyapan, N., Somboon, P., Bates, M. D., & Bates, P. A.** (2019). Development of *Leishmania orientalis* in the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and the biting midge *Culicoides soronensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Acta tropica*, 199, 105157. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105157>

Christodoulou, V., Antoniou, M., Ntais, P., Messaritakis, I., Ivovic, V., Dedet, J. P., Pralong, F., Dvořák, V., & Tselentis, Y. (2012). Re-emergence of visceral and cutaneous leishmaniasis in the Greek Island of Crete. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, *12*(3), 214–222. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0004>

Chusri, S., Thammapalo, S., Silpapojakul, K., & Siriyasatien, P. (2014). Animal reservoirs and potential vectors of *Leishmania siamensis* in southern Thailand. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, *45*(1), 13–19.

Chvála, M. (1980). *Fauna ČSSR*. Svazek 22, Krevsající mouchy a střečci - Diptera. Praha: Academia. Fauna ČSSR, Sv. 22.

Čiháková, J., & Volf, P. (1997). Development of different *Leishmania major* strains in the vector sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi*. *Annals of tropical medicine and parasitology*, *91*(3), 267–279. <https://doi.org/10.1080/00034989761120>

Cohen, A., & Azas, N. (2021). Challenges and Tools for In Vitro *Leishmania* Exploratory Screening in the Drug Development Process: An Updated Review. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *10*(12), 1608. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121608>

Crewe, W. (2001). Mansonelliasis. In: Service M W (ed), *The Encyclopedia of Arthropod-transmitted Infections*. CABI Publishing, Wallingford, UK: 327-333.

Darpe, K. E., Batten, C. A., Veronesi, E., Shaw, A. E., Anthony, S., Bachanek-Bankowska, K., Kgosana, L., bin-Tarif, A., Carpenter, S., Müller-Doblies, U. U., Takamatsu, H. H., Mellor, P. S., Mertens, P. P., & Oura, C. A. (2007). Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe. *The Veterinary record*, *161*(8), 253–261. <https://doi.org/10.1136/vr.161.8.253>

Dedet, J. P., Roche, B., Pralong, F., Cales-Quist, D., Jouannelle, J., Benichou, J. C., & Huerre, 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)

Depaquit, J., Ferté, H., Léger, N., Lefranc, F., Alves-Pires, C., Hanafi, H., Maroli, M., Morillas-Marquez, F., Rioux, J. A., Svobodová, M., & Volf, P. (2002). ITS 2 sequences heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus similis* (Diptera, Psychodidae): possible consequences in their ability to transmit *Leishmania tropica*. *International journal for parasitology*, *32*(9), 1123–1131. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00088-7](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00088-7)

Depaquit, J., & Léger, N. (2017). Chapitre 12. Les phlébotomes (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). In Duvallet G., Fontenille, D., & Robert, V. (Eds.), *Entomologie médicale et vétérinaire*. IRD Éditions. doi: 10.4000/books.irdeditions.2204

Depaquit, J., Léger, N., Ferté, H., Rioux, J. A., Gantier, J. C., Michaelides, A., & Economides, P. (2001). Les phlébotomes de l'île de Chypre. III--Inventaire faunistique [Phlebotomines of the Isle of Cyprus. III. Species inventory]. *Parasite (Paris, France)*, 8(1), 11–20. <https://doi.org/10.1051/parasite/2001081011>

Desportes, C. (1942) *Forcipomyia velox* Winn et *Sycorax silacea* Curtis, vecteurs d'*Icosiella neglecta* (Diesing, 1850) filaire commune de la grenouille verte. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 19, 53–68.

Di Muccio, T., Scalone, A., Bruno, A., Marangi, M., Grande, R., Armignacco, O., Gradoni, L., & Gramiccia, M. (2015). Epidemiology of Imported Leishmaniasis in Italy: Implications for a European Endemic Country. *PloS one*, 10(6), e0129418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129418>

Dionísio, M. T., Dias, A., Rodrigues, F., Félix, M., & Estêvão, M. H. (2011). Leishmaniose visceral: experiência de um centro pediátrico de referência 1990-2009 [Paediatric visceral leishmaniasis: experience of a paediatric referral center 1990-2009]. *Acta medica portuguesa*, 24(3), 399–404.

Dostálová, A., & Volf, P. (2012). Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & vectors*, 5, 276. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>

Dougall, A. M., Alexander, B., Holt, D. C., Harris, T., Sultan, A. H., Bates, P. A., Rose, K., & Walton, S. F. (2011). Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *International journal for parasitology*, 41(5), 571–579. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.12.008>

Dougall, A., Shilton, C., Low Choy, J., Alexander, B., & Walton, S. (2009). New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in Northern Australian macropods. *Epidemiology and infection*, 137(10), 1516–1520. <https://doi.org/10.1017/S0950268809002313>

Du, R., Hotez, P. J., Al-Salem, W. S., & Acosta-Serrano, A. (2016). Old World Cutaneous Leishmaniasis and Refugee Crises in the Middle East and North Africa. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(5), e0004545. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004545>

- Dujardin, J. C., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbek, Y., & Boelaert, M.** (2008). Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging infectious diseases*, 14(7), 1013–1018. <https://doi.org/10.3201/eid1407.071589>
- Duthie, M. S., Lison, A., & Courtenay, O.** (2018). Advances toward Diagnostic Tools for Managing Zoonotic Visceral Leishmaniasis. *Trends in parasitology*, 34(10), 881–890. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.07.012>
- Dvořák, V., Hlavačková, K., Kočíšová, A., & Volf, P.** (2016). First record of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* in Slovakia. Première mention de *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* en Slovaquie. *Parasite (Paris, France)*, 23, 48. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016061>
- Dvořák, V., Shaw, J., & Volf, P.** (2018). Parasite biology: the vectors. In: Bruschi F, Gradoni L, editors. The leishmaniasis: old neglected tropical diseases. Cham: Springer; p. 31e77 <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0>
- Espinosa, O. A., Serrano, M. G., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. G., & Shaw, J. J.** (2018). An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*, 145(4), 430–442. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002092>
- Faiman, R., Abbasi, I., Jaffe, C., Motro, Y., Nasereddin, A., Schnur, L. F., Torem, M., Pratlong, F., Dedet, J. P., & Warburg, A.** (2013). A newly emerged cutaneous leishmaniasis focus in northern Israel and two new reservoir hosts of *Leishmania major*. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(2), e2058. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002058>
- Fallis, A. M., & Bennett, G. F.** (1961). Ceratopogonidae as intermediate hosts for *Haemophysalis* and other parasites. *Mosquito News*, 21: 21-28.
- Faye, B., Bañuls, A. L., Bucheton, B., Dione, M. M., Bassanganam, O., Hide, M., Dereure, J., Choisy, M., Ndiaye, J. L., Konaté, O., Claire, M., Senghor, M. W., Faye, M. N., Sy, I., Niang, A. A., Molez, J. F., Victoir, K., Marty, P., Delaunay, P., Knecht, R., ... Gaye, O.** (2010). Canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Senegal: risk of emergence in humans?. *Microbes and infection*, 12(14-15), 1219–1225. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.003>
- Fiorini, J. E., Takata, C. S., Teófilo, V. M., Nascimento, L. C., Faria-e-Silva, P. M., Soares, M. J., Teixeira, M. M., & De Souza, W.** (2001). Morphological, biochemical and molecular characterization of *Herpetomonas samuelpeessoai camargoi* n. subsp., a trypanosomatid isolated from the flower of the squash *Cucurbita moschata*. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 48(1), 62–69. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00416.x>

- Foil, L., & Foil, C.** (1988). Dipteran Parasites of Horses. *Equine practice*, 10: 21-38.
- Foxi, C., Delrio, G., Falchi, G., Marche, M. G., Satta, G., & Ruiu, L.** (2016). Role of different *Culicoides* vectors (Diptera: Ceratopogonidae) in bluetongue virus transmission and overwintering in Sardinia (Italy). *Parasites & vectors*, 9(1), 440. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1733-9>
- Foxi, C., Meloni, G., Puggioni, G., Manunta, D., Rocchigiani, A., Vento, L., Cabras, P., & Satta, G.** (2019). Bluetongue virus detection in new *Culicoides* species in Sardinia, Italy. *The Veterinary record*, 184(20), 621. <https://doi.org/10.1136/vr.105118>
- Frolov, A. O., Kostygov, A. Y., & Yurchenko, V.** (2021). Development of Monoxenous Trypanosomatids and Phytomonads in Insects. *Trends in parasitology*, 37(6), 538–551. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.02.004>
- Galková, Z.** (2010). Tiplíci jako přenašeči infekčních onemocnění a jejich výskyt na území ČR. Diplomová práce, Praha, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra parazitologie.
- Garcia, H. A., Blanco, P. A., Rodrigues, A. C., Rodrigues, C. M. F., Takata, C. S. A., Campaner, M., Camargo, E. P., & Teixeira, M. M. G.** (2020). Pan-American *Trypanosoma (Megatrypanum) trinaperronei* n. sp. in the white-tailed deer *Odocoileus virginianus* Zimmermann and its deer ked *Lipoptena mazamae* Rondani, 1878: morphological, developmental and phylogeographical characterisation. *Parasites & vectors*, 13(1), 308. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04169-0>
- Garifallou, A., Schnur, L. F., Stratigos, J. D., Hadziandoniou, M., Savigos, M., Stavrianeas, N., & Sérié, C.** (1984). Leishmaniasis in Greece II. Isolation and identification of the parasite causing cutaneous leishmaniasis in man. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 78(4), 369–375. <https://doi.org/10.1080/00034983.1984.11811834>
- GBD 2016 Causes of Death Collaborators** (2017). Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet (London, England)*, 390(10100), 1151–1210. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32152-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32152-9)
- Goffredo, M., & Meiswinkel, R.** (2004). Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. *Veterinaria italiana*, 40(3), 260–265.

- González, E., Molina, R., Aldea, I., Iriso, A., Tello, A., & Jiménez, M.** (2020). *Leishmania* sp. detection and blood-feeding behaviour of *Sergentomyia minuta* collected in the human leishmaniasis focus of southwestern Madrid, Spain (2012-2017). *Transboundary and emerging diseases*, 67(3), 1393–1400. <https://doi.org/10.1111/tbed.13464>
- Gossage, S. M., Rogers, M. E., & Bates, P. A.** (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International journal for parasitology*, 33(10), 1027–1034. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(03\)00142-5](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(03)00142-5)
- Gradoni, L., López-Vélez, R., & Mokni, M.** (2017). Manual on case management and surveillance of the leishmaniasis in the WHO European region. Copenhagen, Denmark: WHO Regional Office for Europe. doi: 10.2900/823484
- Greiner, E. C., & Bennett, G. F.** (1977). *Culicoides* as vectors of Haemosporida. *Mosquito News*, 37: 286.
- Guery, R., Walker, S. L., Harms, G., Neumayr, A., Van Thiel, P., Gangneux, J. P., Clerinx, J., Söbirk, S. K., Visser, L., Lachaud, L., Bailey, M., Bart, A., Ravel, C., Van der Auwera, G., Blum, J., Lockwood, D. N., Buffet, P., & LeishMan Network and the French Cutaneous Leishmaniasis Study group** (2021). Clinical diversity and treatment results in Tegumentary Leishmaniasis: A European clinical report in 459 patients. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(10), e0009863. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009863>
- Halouzka, J., & Hubálek, Z.** (1996). Biting midges (Ceratopogonidae) of medical and veterinary importance (a review). *Acta Scientiarum Naturalium Academia Scientiarum Bohemicae, Brno*, 30: 56 pp.
- Handler, M. Z., Patel, P. A., Kapila, R., Al-Qubati, Y., & Schwartz, R. A.** (2015). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73(6), 911–928. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.09.014>
- Hide, M., & Bañuls, A. L.** (2006). Species-specific PCR assay for *L. infantum*/*L. donovani* discrimination. *Acta tropica*, 100(3), 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.10.012>
- Hlavačková, K., Dvořák, V., Chaskopoulou, A., Volf, P., & Halada, P.** (2019). A novel MALDI-TOF MS-based method for blood meal identification in insect vectors: A proof of concept study on phlebotomine sand flies. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(9), e0007669. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007669>

Hoare, C. A. (1972). *The Trypanosomes of Mammals: Zoological Monograph*; Blackwell Scientific Publications: Oxford, UK.

Howell, B. A., Azar, M. M., Landry, M. L., & Shaw, A. C. (2015). Toscana virus encephalitis in a traveler returning to the United States. *Journal of clinical microbiology*, 53(4), 1445–1447. <https://doi.org/10.1128/JCM.03498-14>

Howell, P. G. (1960) The 1960 epizootic of African horse sickness in the Middle East and SW Asia. *Journal of the South African Veterinary Association*. 31(3), s.329–334.

Intakhan, N., Chanmol, W., Kongkaew, A., Somboon, P., Bates, M. D., Bates, P. A., & Jariyapan, N. (2020). Experimental infection of *Leishmania (Mundinia) martiniquensis* in BALB/c mice and Syrian golden hamsters. *Parasitology research*, 119(9), 3041–3051. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06842-w>

Jariyapan, N., Daroontum, T., Jaiwong, K., Chanmol, W., Intakhan, N., Sor-Suwan, S., Siriyasatien, P., Somboon, P., Bates, M. D., & Bates, P. A. (2018). *Leishmania (Mundinia) orientalis* n. sp. (Trypanosomatidae), a parasite from Thailand responsible for localised cutaneous leishmaniasis. *Parasites & vectors*, 11(1), 351. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2908-3>

Kaddu, J. B., Mutinga, M. J., & Nyamori, M. P. (1986). *Leishmania* in kenyan phlebotomine sandflies—IV: Artificial feeding and attempts to infect six species of laboratory-reared sandflies with *Leishmania donovani*. *International Journal of Tropical Insect Science*, 7(6), 731–735. <https://doi.org/10.1017/S1742758400011802>

Kaewmee, S., Mano, C., Phanitchakun, T., Ampol, R., Yasanga, T., Pattanawong, U., Junkum, A., Siriyasatien, P., Bates, P. A., & Jariyapan, N. (2023). Natural infection with *Leishmania (Mundinia) martiniquensis* supports *Culicoides peregrinus* (Diptera: Ceratopogonidae) as a potential vector of leishmaniasis and characterization of a *Crithidia* sp. isolated from the midges. *Frontiers in microbiology*, 14, 1235254. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1235254>

Kamhawi, S., Modi, G. B., Pimenta, P. F., Rowton, E., & Sacks, D. L. (2000). The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology*, 121 (Pt 1), 25–33. <https://doi.org/10.1017/s0031182099006125>

Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?. *Trends in parasitology*, 22(9), 439–445. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.06.012>

el-Kammah, K. M. (1973). Studies of autogeny in *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*, 10(3), 261–263. <https://doi.org/10.1093/jmedent/10.3.261>

Kanani, K., Amr, Z. S., Shadfan, B., Khorma, R., Rø, G., Abid, M., Gabrielli, A. F., & Haskew, J. (2019). Cutaneous leishmaniasis among Syrian refugees in Jordan. *Acta tropica*, 194, 169–171. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.04.005>

Kanjanopas, K., Siripattanapipong, S., Ninsaeng, U., Hitakarun, A., Jitkaew, S., Kaewtaphaya, P., Tanariya, P., Mungthin, M., Charoenwong, C., & Leelayoova, S. (2013). *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *gemmea*, a potential vector of *Leishmania siamensis* in southern Thailand. *BMC infectious diseases*, 13, 333. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-333>

Karakuş, M., Öktem, M. A., Sözen, M., Matur, F., Çolak, F., Nalçacı, M., Özbel, Y., & Töz, S. (2020). First molecular detection and identification of *Leishmania* species in small wild rodents from Turkey. *Parasitology*, 147(10), 1088–1093. <https://doi.org/10.1017/S0031182020000803>

Kasičová, Z., Schreiberová, A., Kimáková, A., & Kočíšová, A. (2021). Blood meal analysis: host-feeding patterns of biting midges (Diptera, Ceratopogonidae, *Culicoides* Latreille) in Slovakia. Analyse des repas sanguins : modes d'alimentation des hôtes des ceratopogonidés (Diptera, Ceratopogonidae, *Culicoides* Latreille) en Slovaquie. *Parasite (Paris, France)*, 28, 58. <https://doi.org/10.1051/parasite/2021058>

Kassahun, A., Sádlová, J., Dvořák, V., Košťálová, T., Rohoušová, I., Frynta, D., Aghova, T., Yasur-Landau, D., Lemma, W., Hailu, A., Baneth, G., Warburg, A., Volf, P., & Votýpka, J. (2015). Detection of *Leishmania donovani* and *L. tropica* in Ethiopian wild rodents. *Acta tropica*, 145, 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.02.006>

Kevric, I., Cappel, M. A., & Keeling, J. H. (2015). New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. *Dermatologic clinics*, 33(3), 579–593. <https://doi.org/10.1016/j.det.2015.03.018>

Kholoud, K., Denis, S., Lahouari, B., El Hidan, M. A., & Souad, B. (2018). Management of Leishmaniasis in the Era of Climate Change in Morocco. *International journal of environmental research and public health*, 15(7), 1542. <https://doi.org/10.3390/ijerph15071542>

Killick-Kendrick, R., Lainson, R., Rioux, J.A., & Sarjanova, V.M. (1986). The taxonomy of *Leishmania*-like parasites of reptiles.

Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and veterinary entomology*, 4(1), 1–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1990.tb00255.x>

- Killick-Kendrick, R.** (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in dermatology*, 17(3), 279–289. [https://doi.org/10.1016/s0738-081x\(99\)00046-2](https://doi.org/10.1016/s0738-081x(99)00046-2)
- Killick-Kendrick, R.** (2001). World Class Parasites: Leishmania (ed Farrell, J. P.), *Springer*
- Kingston, N., & Morton, J. K.** (1975). *Trypanosoma cervi* sp. n. from elk (*Cervus canadensis*) in Wyoming. *The Journal of parasitology*, 61(1), 17–23. <https://doi.org/10.2307/3279099>
- Kluiters, G., Pagès, N., Carpenter, S., Gardès, L., Guis, H., Baylis, M., & Garros, C.** (2016). Morphometric discrimination of two sympatric sibling species in the Palaearctic region, *Culicoides obsoletus* Meigen and *C. scoticus* Downes & Kettle (Diptera: Ceratopogonidae), vectors of bluetongue and Schmallenberg viruses. *Parasites & vectors*, 9, 262. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1520-7>
- Kniha, E., Dvořák, V., Milchram, M., Obwaller, A. G., Köhler, M., Poepl, W., Antoniou, M., Chaskopoulou, A., Paronyan, L., Stefanovski, J., Mooseder, G., Volf, P., & Walochnik, J.** (2021). *Phlebotomus (Adlerius) simici* NITZULESCU, 1931: first record in Austria and phylogenetic relationship with other *Adlerius* species. *Parasites & vectors*, 14(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04482-8>
- Koehler, K., Stechele, M., Hetzel, U., Domingo, M., Schönian, G., Zahner, H., & Burkhardt, E.** (2002). Cutaneous leishmaniasis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Veterinary parasitology*, 109(1-2), 9–17. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00246-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00246-7)
- Koliou, M. G., Antoniou, Y., Antoniou, M., Christodoulou, V., Mazeris, A., & Soteriades, E. S.** (2014). A cluster of four cases of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania donovani* in Cyprus: a case series. *Journal of medical case reports*, 8, 354. <https://doi.org/10.1186/1752-1947-8-354>
- Koltas, I. S., Eroglu, F., Alabaz, D., & Uzun, S.** (2014). The emergence of *Leishmania major* and *Leishmania donovani* in southern Turkey. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 108(3), 154–158. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trt119>
- Konno, H., Yokoyama, N., Tamura, Y., Aoshima, K., Nakao, R., Takiguchi, M., & Katakura, K.** (2022). An experimental challenge model for *Leishmania donovani* in beagle dogs, showing a similar pattern of parasite burden in the peripheral blood and liver. *Parasitology research*, 121(12), 3569–3579. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07681-7>

Kwakye-Nuako, G., Mosore, M. T., Boakye, D., & Bates, P. A. (2023). DESCRIPTION, BIOLOGY, AND MEDICAL SIGNIFICANCE OF *LEISHMANIA (MUNDINIA) CHANCEI* N. SP. (KINETOPLASTEA: TRYPANOSOMATIDAE) FROM GHANA AND *LEISHMANIA (MUNDINIA) PROCAVIENSIS* N. SP. (KINETOPLASTEA: TRYPANOSOMATIDAE) FROM NAMIBIA. *The Journal of parasitology*, 109(1), 43–50. <https://doi.org/10.1645/22-53>

Kwakye-Nuako, G., Mosore, M. T., Duplessis, C., Bates, M. D., Pupilampu, N., Mensah-Attipoe, I., Desewu, K., Afegbe, G., Asmah, R. H., Jamjoom, M. B., Ayeh-Kumi, P. F., Boakye, D. A., & Bates, P. A. (2015). First isolation of a new species of *Leishmania* responsible for human cutaneous leishmaniasis in Ghana and classification in the *Leishmania enriettii* complex. *International journal for parasitology*, 45(11), 679–684. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.05.001>

Lainson, R. (1997). On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the Neotropics. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92(3), 377–387. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761997000300014>

Lainson, R., Shaw, J. J., Peters, W., & Killick-Kendrick, R. (1987). Evolution, classification and geographical distribution.

Lane, R. P. (1993). *Medical Insects and Arachnids*, Springer.

Larska, M., Krzysiak, M., Smreczak, M., Polak, M. P., & Zmudziński, J. F. (2013). First detection of Schmallenberg virus in elk (*Alces alces*) indicating infection of wildlife in Białowieża National Park in Poland. *Veterinary journal (London, England: 1997)*, 198(1), 279–281. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.013>

Lassen, S. B., Nielsen, S. A., & Kristensen, M. (2012). Identity and diversity of blood meal hosts of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides* Latreille) in Denmark. *Parasites & vectors*, 5, 143. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-143>

Latrofa, M. S., Iatta, R., Dantas-Torres, F., Annoscia, G., Gabrielli, S., Pombi, M., Gradoni, L., & Otranto, D. (2018). Detection of *Leishmania infantum* DNA in phlebotomine sand flies from an area where canine leishmaniasis is endemic in southern Italy. *Veterinary parasitology*, 253, 39–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.006>

Lawyer, P., Killick-Kendrick, M., Rowland, T., Rowton, E., & Volf, P. (2017). Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae). Établissement de colonies de laboratoire et élevage de masse des phlébotomes (Diptera, Psychodidae). *Parasite (Paris, France)*, 24, 42. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017041>

Lawyer, P. G., Ngumbi, P. M., Anjili, C. O., Odongo, S. O., Mebrahtu, Y. B., Githure, J. I., Koech, D. K., & Roberts, C. R. (1990). Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 43(1), 31–43. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.43.31>

Lehane, M. J. (1997). Peritrophic matrix structure and function. *Annual review of entomology*, 42, 525–550. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.525>

Lewis, D. J., & Ward, R. D. (1987). Transmission and vectors. In *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Volume 1: Biology and Epidemiology. Edited by Peters W, Killick-Kendrick R. Academic Press; 235–261.

Lien, J. C. (1991). Seven new species and four new records of *Forcipomyia* subgenus *Lasiohelea* from Taiwan (Diptera: Ceratopogonidae). *J. Taiwan Mus.* 44, 83–116.

Lobsiger, L., Müller, N., Schweizer, T., Frey, C. F., Wiederkehr, D., Zumkehr, B., & Gottstein, B. (2010). An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Veterinary parasitology*, 169(3-4), 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.022>

Lopes, A. P., Sousa, S., Dubey, J. P., Ribeiro, A. J., Silvestre, R., Cotovio, M., Schallig, H. D., Cardoso, L., & Cordeiro-da-Silva, A. (2013). Prevalence of antibodies to *Leishmania infantum* and *Toxoplasma gondii* in horses from the north of Portugal. *Parasites & vectors*, 6, 178. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-178>

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.

Macfie, J. W. S. (1936). Two new species of Ceratopogonidae (Diptera) from the wings of dragonflies. *Proc Roy Entomol Soc B* 5:62–64

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*, 109 (Pt 2), 135–138. <https://doi.org/10.1017/s0031182000076241>

Maia, C., Conceição, C., Pereira, A., Rocha, R., Ortuño, M., Muñoz, C., Jumakanova, Z., Pérez-Cutillas, P., Özbek, Y., Töz, S., Baneth, G., Monge-Maillo, B., Gasimov, E., Van der Stede, Y., Torres, G., Gossner, C. M., & Berriatua, E. (2023). The estimated distribution of autochthonous leishmaniasis by *Leishmania infantum* in Europe in 2005-2020. *PLoS neglected tropical diseases*, 17(7), e0011497. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011497>

- Maia, C.** (2024). Sand fly-borne diseases in Europe: epidemiological overview and potential triggers for their emergence and re-emergence. *Journal of comparative pathology*, 209, 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2024.01.001>
- Marín, C., Fabre, S., Sánchez-Moreno, M., & Dollet, M.** (2007). *Herpetomonas* spp. isolated from tomato fruits (*Lycopersicon esculentum*) in southern Spain. *Experimental parasitology*, 116(1), 88–90. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.11.003>
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., & Gradoni, L.** (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and veterinary entomology*, 27(2), 123–147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglio, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., & Gradoni, L.** (2008). The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical medicine & international health: TM & IH*, 13(2), 256–264. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01998.x>
- Martínez-de la Puente, J., Figuerola, J., & Soriguer, R.** (2015). Fur or feather? Feeding preferences of species of *Culicoides* biting midges in Europe. *Trends in parasitology*, 31(1), 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.11.002>
- Maslov, D. A., Lukeš, J., Jirků, M., & Simpson, L.** (1996). Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. *Molecular and biochemical parasitology*, 75(2), 197–205. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)02526-x](https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)02526-x)
- Mathieu, B., Cêtre-Sossah, C., Garros, C., Chavernac, D., Balenghien, T., Carpenter, S., Setier-Rio, M. L., Vignes-Lebbe, R., Ung, V., Candolfi, E., & Delécolle, J. C.** (2012). Development and validation of IIKC: an interactive identification key for *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) females from the Western Palearctic region. *Parasites & vectors*, 5, 137. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-137>
- McGwire, B. S., & Satoskar, A. R.** (2014). Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*, 107(1), 7–14. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hct116>
- Mebrahtu, Y., Lawyer, P., Githure, J., Were, J. B., Muigai, R., Hendricks, L., Leeuwenburg, J., Koech, D., & Roberts, C.** (1989). Visceral leishmaniasis unresponsive to pentostam caused by *Leishmania tropica* in Kenya. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 41(3), 289–294. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.41.289>

- Mehlhorn, H., Walldorf, V., Klimpel, S., Jahn, B., Jaeger, F., Eschweiler, J., Hoffmann, B., & Beer, M.** (2007). First occurrence of *Culicoides obsoletus*-transmitted Bluetongue virus epidemic in Central Europe. *Parasitology research*, *101*(1), 219–228. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0519-6>
- Mellor, P. S.** (2001a). Bluetongue virus. In: Service M W (ed), *The Encyclopedia of Arthropodtransmitted Infections*. CABI Publishing, Wallingford, UK: 78-83.
- Mellor, P. S.** (2001b). Oropouche virus. In: Service M W (ed), *The Encyclopedia of Arthropodtransmitted Infections*. CABI Publishing, Wallingford, UK: 391-393.
- Mellor, P. S.** (2000). Replication of arboviruses in insect vectors. *Journal of comparative pathology*, *123*(4), 231–247. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2000.0434>
- Mellor, P. S., Boorman, J., & Baylis, M.** (2000). *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annual review of entomology*, *45*, 307–340. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.307>
- Mendes Junior, A. A. V., Filgueira, C. P. B., Miranda, L. F. C., de Almeida, A. B., Cantanhêde, L. M., Fagundes, A., Pereira, S. A., Menezes, R. C., & Cupolillo, E.** (2023). First report of *Leishmania (Mundinia) martiniquensis* in South American territory and confirmation of Leishbunyavirus infecting this parasite in a mare. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *118*, e220220. <https://doi.org/10.1590/0074-02760220220>
- Menezes, R. C., Campos, M. P., Popielarczyk, M., & Kiupel, M.** (2019). Cutaneous Leishmaniosis caused by *Leishmania martiniquensis* in a Horse in Florida. *Journal of comparative pathology*, *173*, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2019.09.011>
- Michel, G., Pomares, C., Ferrua, B., & Marty, P.** (2011). Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. *Acta tropica*, *119*(2-3), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.05.012>
- Minnick, M. F., Anderson, B. E., Lima, A., Battisti, J. M., Lawyer, P. G., & Birtles, R. J.** (2014). Oroya fever and verruga peruana: bartonellosis unique to South America. *PLoS neglected tropical diseases*, *8*(7), e2919. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002919>
- Mircean, V., Dumitrache, M. O., Mircean, M., Bolfa, P., Györke, A., & Mihalca, A. D.** (2014). Autochthonous canine leishmaniasis in Romania: neglected or (re)emerging?. *Parasites & vectors*, *7*, 135. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-135>

- Miró, G., & López-Vélez, R.** (2018). Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting "One Health" principles into practice. *Veterinary parasitology*, 254, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.002>
- Mockenhaupt, F. P., Barbre, K. A., Jensenius, M., Larsen, C. S., Barnett, E. D., Stauffer, W., Rothe, C., Asgeirsson, H., Hamer, D. H., Esposito, D. H., Gautret, P., & Schlagenhauf, P.** (2016). Profile of illness in Syrian refugees: A GeoSentinel analysis, 2013 to 2015. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 21(10), 30160. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.10.30160>
- Moignoux, J. B.** (1951). *Culicoïdes nubeculosus* Meig (Diptère cératopogonide), hôte intermédiaire possible de la Filiaire *Onchocerca reticulata* Dies, en Camargue [*Culicoides nubeculosus* Meig (Diptera Ceratopogonida), possible intermediary host of the filaria *Onchocerca reticulata* Dies. in Camargue]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences*, 233(1), 102–103.
- Molyneux, D. H.** (1975). *Trypanosoma (Megatrypanum) melophagium*: modes of attachment of parasites to mid-gut, hindgut and rectum of the sheep ked, *Melophagus ovinus*. *Acta tropica*, 32(1), 65–74. <https://doi.org/10.5169/seals-312075>
- Moriconi, M., Rugna, G., Calzolari, M., Bellini, R., Albieri, A., Angelini, P., Cagarelli, R., Landini, M. P., Charrel, R. N., & Varani, S.** (2017). Phlebotomine sand fly-borne pathogens in the Mediterranean Basin: Human leishmaniasis and phlebovirus infections. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(8), e0005660. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005660>
- Morio, F., Reynes, J., Dollet, M., Pratlong, F., Dedet, J. P., & Ravel, C.** (2008). Isolation of a protozoan parasite genetically related to the insect trypanosomatid *Herpetomonas samuelpeessoai* from a human immunodeficiency virus-positive patient. *Journal of clinical microbiology*, 46(11), 3845–3847. <https://doi.org/10.1128/JCM.01098-08>
- Müller, N., Welle, M., Lobsiger, L., Stoffel, M. H., Bogenbor, K. K., Hilbe, M., Gottstein, B., Frey, C. F., Geyer, C., & von Bomhard, W.** (2009). Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. *Veterinary parasitology*, 166(3-4), 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.001>
- Muniz, J., & Medina, H.** (1948). Leishmaniose tegumentar do cobaio, *Leishmania enriettii* n. sp [Cutaneous leishmaniasis of the guinea pig, *Leishmania enriettii* n. sp]. *Hospital (Rio de Janeiro, Brazil)*, 33(1), 7–25.

- Myšková, J., Dostálová, A., Pěničková, L., Halada, P., Bates, P. A., & Volf, P.** (2016). Characterization of a midgut mucin-like glycoconjugate of *Lutzomyia longipalpis* with a potential role in *Leishmania* attachment. *Parasites & vectors*, *9*(1), 413. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1695-y>
- Myšková, J., Svobodová, M., Beverley, S. M., & Volf, P.** (2007). A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes and infection*, *9*(3), 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.12.010>
- Myšková, J., Votýpka, J., & Volf, P.** (2008). *Leishmania* in sand flies: comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. *Journal of medical entomology*, *45*(1), 133–138. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[133:lifco\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[133:lifco]2.0.co;2)
- Naucke, T. J., Lorentz, S., Rauchenwald, F., & Aspöck, H.** (2011). *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908, in Carinthia: first record of the occurrence of sandflies in Austria (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Parasitology research*, *109*(4), 1161–1164. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2361-0>
- Naucke, T. J., Menn, B., Massberg, D., & Lorentz, S.** (2008). Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitology research*, *103 Suppl 1*, S65–S68. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1052-y>
- Naucke, T. J., & Pesson, B.** (2000). Presence of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908 (Diptera: Psychodidae) in Germany. *Parasitology research*, *86*(4), 335–336. <https://doi.org/10.1007/s004360050053>
- Naucke, T. J., & Schmitt, C.** (2004). Is leishmaniasis becoming endemic in Germany?. *International journal of medical microbiology: IJMM*, *293 Suppl 37*, 179–181. [https://doi.org/10.1016/s1433-1128\(04\)80036-6](https://doi.org/10.1016/s1433-1128(04)80036-6)
- Nieves, E., & Pimenta, P. F.** (2000). Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*, *37*(1), 134–140. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-37.1.134>
- Ntais, P., Sifaki-Pistola, D., Christodoulou, V., Messaritakis, I., Pralong, F., Poupalos, G., & Antoniou, M.** (2013). Leishmaniasis in Greece. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *89*(5), 906–915. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0070>
- Oren, R., Schnur, L. F., Ben Yehuda, D., Mayner, V., Okon, E., & Rachmilewitz, E. A.** (1991). Visceral leishmaniasis: a difficult diagnosis and unusual causative agent. *The Journal of infectious diseases*, *164*(4), 746–749. <https://doi.org/10.1093/infdis/164.4.746>

Országh, I. (1980). Ceratopogonidae. In: Chvála M (ed), Krevsající mouchy a střečci – Diptera. Fauna ČSSR 22, Academia, Praha, pp. 20-144.

Oryan, A., & Akbari, M. (2016). Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 9(10), 925–932. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.06.021>

Özbilgin, A., Çulha, G., Uzun, S., Harman, M., Topal, S. G., Okudan, F., Zeyrek, F., Gündüz, C., Östan, İ., Karakuş, M., Töz, S., Kurt, Ö., Akyar, I., Erat, A., Güngör, D., Kayabaşı, Ç., Çavuş, İ., Bastien, P., Pratlong, F., Kocagöz, T., ... Özbel, Y. (2016). Leishmaniasis in Turkey: first clinical isolation of *Leishmania major* from 18 autochthonous cases of cutaneous leishmaniasis in four geographical regions. *Tropical medicine & international health: TM & IH*, 21(6), 783–791. <https://doi.org/10.1111/tmi.12698>

Özbel, Y., Töz, S., Muñoz, C., Ortuño, M., Jumakanova, Z., Pérez-Cutillas, P., Maia, C., Conceição, C., Baneth, G., Pereira, A., Van der Stede, Y., Gossner, C. M., & Berriatua, E. (2022). The current epidemiology of leishmaniasis in Turkey, Azerbaijan and Georgia and implications for disease emergence in European countries. *Zoonoses and public health*, 69(5), 395–407. <https://doi.org/10.1111/zph.12977>

Özbilgin, A., Tunalı, V., Akar, Ş. Ş., Yıldırım, A., Şen, S., Çavuş, I., Zorbozan, O., Gündüz, C., Turgay, N., & İnanır, I. (2022). Autochthonous transmission of *Leishmania donovani* and *Leishmania major* with all the components of infection cycle at Europe's doorstep. *Acta tropica*, 230, 106385. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106385>

Pace, D. (2014). Leishmaniasis. *The Journal of infection*, 69 Suppl 1, S10–S18. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>

Panahi, E., Stanistic, D. I., Skinner, E. B., Faddy, H. M., Young, M. K., & Herrero, L. J. (2023). Detection of *Leishmania (Mundinia) macropodum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and heterologous *Leishmania* species antibodies among blood donors in a region of Australia with marsupial *Leishmania* endemicity. *International journal of infectious diseases: IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 130, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.10.006>

Paranaíba, L. F., Pinheiro, L. J., Macedo, D. H., Menezes-Neto, A., Torrecilhas, A. C., Tafuri, W. L., & Soares, R. P. (2018). An overview on *Leishmania (Mundinia) enriettii*: biology, immunopathology, LRV and extracellular vesicles during the host-parasite interaction. *Parasitology*, 145(10), 1265–1273. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001810>

Pavli, A., & Maltezou, H. C. (2010). Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *International journal of infectious diseases: IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 14(12), e1032–e1039. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.06.019>

Pereira, A., Parreira, R., Cristóvão, J. M., Castelli, G., Bruno, F., Vitale, F., Campino, L., & Maia, C. (2020). Phylogenetic insights on *Leishmania* detected in cats as revealed by nucleotide sequence analysis of multiple genetic markers. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 77, 104069. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104069>

Pereira, S., Pita-Pereira, D., Araujo-Pereira, T., Britto, C., Costa-Rego, T., Ferrolho, J., Vilhena, M., Rangel, E. F., Vilela, M. L., & Afonso, M. O. (2017). First molecular detection of *Leishmania infantum* in *Sergentomyia minuta* (Diptera, Psychodidae) in Alentejo, southern Portugal. *Acta tropica*, 174, 45–48. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.020>

Peyrefitte, C. N., Devetakov, I., Pastorino, B., Villeneuve, L., Bessaud, M., Stolidi, P., Depaquit, J., Segura, L., Gravier, P., Tock, F., Durand, F., Vagneur, J. P., Tolou, H. J., & Grandadam, M. (2005). Toscana virus and acute meningitis, France. *Emerging infectious diseases*, 11(5), 778–780. <https://doi.org/10.3201/eid1105.041122>

Pimenta, P. F., Saraiva, E. M., Rowton, E., Modi, G. B., Garraway, L. A., Beverley, S. M., Turco, S. J., & Sacks, D. L. (1994). Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19), 9155–9159. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.19.9155>

Pinheiro, F. P., Travassos da Rosa, A. P., Gomes, M. L., LeDuc, J. W., & Hoch, A. L. (1982). Transmission of Oropouche virus from man to hamster by the midge *Culicoides paraensis*. *Science (New York, N.Y.)*, 215(4537), 1251–1253. <https://doi.org/10.1126/science.6800036>

Podlipaev, S. A., Sturm, N. R., Fiala, I., Fernandes, O., Westenberger, S. J., Dollet, M., Campbell, D. A., & Lukes, J. (2004a). Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leader RNA and 5S rRNA genes and intergenic regions. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 51(3), 283–290. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00568.x>

Podlipaev, S., Votýpka, J., Jirků, M., Svobodová, M., & Lukeš, J. (2004b). *Herpetomonas ztiplika* n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): a parasite of the blood-sucking biting midge *Culicoides kibunensis* Tokunaga, 1937 (Diptera: Ceratopogonidae). *The Journal of parasitology*, *90*(2), 342–347. <https://doi.org/10.1645/GE-156R>

Polanská, N., Ishemgulova, A., Volfová, V., Flegontov, P., Votýpka, J., Yurchenko, V., & Volf, P. (2020). *Sergentomyia schwetzi*: Salivary gland transcriptome, proteome and enzymatic activities in two lineages adapted to different blood sources. *PloS one*, *15*(3), e0230537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230537>

Pons, M. J., Gomes, C., Del Valle-Mendoza, J., & Ruiz, J. (2016). Carrion's Disease: More Than a Sand Fly-Vectored Illness. *PLoS pathogens*, *12*(10), e1005863. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005863>

Pothirat, T., Tantiworawit, A., Chaiwarith, R., Jariyapan, N., Wannasan, A., Siriyasatien, P., Supparatpinyo, K., Bates, M. D., Kwakye-Nuako, G., & Bates, P. A. (2014). First isolation of *Leishmania* from Northern Thailand: case report, identification as *Leishmania martiniquensis* and phylogenetic position within the *Leishmania enriettii* complex. *PLoS neglected tropical diseases*, *8*(12), e3339. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003339>

Purse, B. V., Carpenter, S., Venter, G. J., Bellis, G., & Mullens, B. A. (2015). Bionomics of temperate and tropical *Culicoides* midges: knowledge gaps and consequences for transmission of *Culicoides*-borne viruses. *Annual review of entomology*, *60*, 373–392. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020614>

Quinnell, R. J., & Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, *136*(14), 1915–1934. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991156>

Rádrová, J., Mračková, M., Galková, Z., Lamka, J., Račka, K., Barták, P., & Votýpka, J. (2016). Seasonal Dynamics, Parity Rate, and Composition of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) Occurring in the Vicinity of Wild and Domestic Ruminants in the Czech Republic. *Journal of medical entomology*, *53*(2), 416–424. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv197>

Ramalho-Ortigao, M., Saraiva, E. M., & Traub-Csekö, Y. M. (2010). Sand fly-*Leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy. *The open parasitology journal*, *4*, 195–204. <https://doi.org/10.2174/1874421401004010195>

- Rasmussen, L. D., Kristensen, B., Kirkeby, C., Rasmussen, T. B., Belsham, G. J., Bødker, R., & Bøtner, A.** (2012). *Culicoides* as vectors of Schmallenberg virus. *Emerging infectious diseases*, 18(7), 1204–1206. <https://doi.org/10.3201/eid1807.120385>
- Ravel, C., Cortes, S., Pratlong, F., Morio, F., Dedet, J. P., & Campino, L.** (2006). First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *International journal for parasitology*, 36(13), 1383–1388. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.06.019>
- Ready, P. D.** (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual review of entomology*, 58, 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557>
- Ready, P. D.** (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 15(10), 19505.
- Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S.** (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet. Infectious diseases*, 7(9), 581–596. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8)
- Reuss, S. M., Dunbar, M. D., Calderwood Mays, M. B., Owen, J. L., Mallicote, M. F., Archer, L. L., & Wellehan, J. F., Jr** (2012). Autochthonous *Leishmania siamensis* in horse, Florida, USA. *Emerging infectious diseases*, 18(9), 1545–1547. <https://doi.org/10.3201/eid1809.120184>
- Rodrigues, A. C., Campaner, M., Takata, C. S., Dell' Porto, A., Milder, R. V., Takeda, G. F., & Teixeira, M. M.** (2003). Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. *Veterinary parasitology*, 116(3), 185–207. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(03\)00236-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(03)00236-x)
- Rocha, R., Pereira, A., & Maia, C.** (2022). Non-Endemic Leishmaniases Reported Globally in Humans between 2000 and 2021-A Comprehensive Review. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(8), 921. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080921>
- Rogers, M. E., Chance, M. L., & Bates, P. A.** (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, 124(Pt 5), 495–507. <https://doi.org/10.1017/s0031182002001439>

- Rogers, M. E., Hajmová, M., Joshi, M. B., Sádlová, J., Dwyer, D. M., Volf, P., & Bates, P. A.** (2008). *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cellular microbiology*, 10(6), 1363–1372. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01132.x>
- Roitman, I., Brener, Z., Roitman, C., & Kitajima, E. W.** (1976). Demonstration that *Leptomonas pessoai* Galvão, Oliveira, Carvalho & Veiga, 1970, is a *Herpetomonas*. *The Journal of protozoology*, 23(2), 291–293. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1976.tb03773.x>
- Rose, K., Curtis, J., Baldwin, T., Mathis, A., Kumar, B., Sakthianandeswaren, A., Spurck, T., Low Choy, J., & Handman, E.** (2004). Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. *International journal for parasitology*, 34(6), 655–664. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.03.001>
- Ruiz-Postigo, J. A., Jain, S., Mikhailov, A., Maia-Elkhoury, A. N., Valadas, S., Warusavithana, S., Osman, M., Lin, Z., Beshah, A., Yajima, A., et al.** (2021). Global Leishmaniasis Surveillance: 2019–2020, a Baseline for the 2030 Roadmap. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 35, 401–419.
- Rutledge, L. C. & Gupta, R. K.** (2002). *Medical and Veterinary Entomology* (eds Mullen, G. & Durden, L.), *Academic Press*.
- Sádlová, J., Dvořák, V., Šeblová, V., Warburg, A., Votýpka, J., & Volf, P.** (2013). *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to humans. *Parasites & vectors*, 6(1), 186. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-186>
- Sádlová, J., Price, H. P., Smith, B. A., Votýpka, J., Volf, P., & Smith, D. F.** (2010). The stage-regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*. *Cellular microbiology*, 12(12), 1765–1779. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01507.x>
- Sasidharan, S., & Saudagar, P.** (2021). Leishmaniasis: where are we and where are we heading?. *Parasitology research*, 120(5), 1541–1554. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07139-2>
- Savini, G., Goffredo, M., Monaco, F., Di Gennaro, A., Cafiero, M. A., Baldi, L., de Santis, P., Meiswinkel, R., & Caporale, V.** (2005). Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (Culicoides, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *The Veterinary record*, 157(5), 133–139. <https://doi.org/10.1136/vr.157.5.133>

- Schlein, Y., Jacobson, R. L., & Messer, G.** (1992). Leishmania infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(20), 9944–9948. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.20.9944>
- Schnur, L.F.** (1989). On the Clinical Manifestations and Parasites of Old World Leishmaniasis and Leishmania Tropica Causing Visceral Leishmaniasis. In: Hart, D.T. (eds) Leishmaniasis. NATO ASI Series, vol 171. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1575-9_119
- Šeblová, V., Myšková, J., Hlaváčová, J., Votýpka, J., Antoniou, M., & Volf, P.** (2015a). Natural hybrid of *Leishmania infantum*/*L. donovani*: development in *Phlebotomus tobbi*, *P. perniciosus* and *Lutzomyia longipalpis* and comparison with non-hybrid strains differing in tissue tropism. *Parasites & vectors*, *8*, 605. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1217-3>
- Šeblová, V., Sádlová, J., Carpenter, S., & Volf, P.** (2014). Speculations on biting midges and other bloodsucking arthropods as alternative vectors of *Leishmania*. *Parasites & vectors*, *7*, 222. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-222>
- Šeblová, V., Sádlová, J., Vojtková, B., Votýpka, J., Carpenter, S., Bates, P. A., & Volf, P.** (2015b). The Biting Midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) Is Capable of Developing Late Stage Infections of *Leishmania enriettii*. *PLoS neglected tropical diseases*, *9*(9), e0004060. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004060>
- Service, M. W.** (2001). Biting midges (Ceratopogonidae). In: Service M W (ed), *The Encyclopedia of Arthropod-transmitted Infections*. CABI Publishing, Wallingford, UK: 74-76.
- Service, M.** (2012). *Medical Entomology for Students*, Cambridge University Press.
- Siripattanapipong, S., Leelayoova, S., Ninsaeng, U., & Mungthin, M.** (2018). Detection of DNA of *Leishmania siamensis* in *Sergentomyia (Neophlebotomus) iyengari* (Diptera: Psychodidae) and Molecular Identification of Blood Meals of Sand Flies in an Affected Area, Southern Thailand. *Journal of medical entomology*, *55*(5), 1277–1283. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy069>
- Söbirk, S. K., Inghammar, M., Collin, M., & Davidsson, L.** (2018). Imported leishmaniasis in Sweden 1993-2016. *Epidemiology and Infection*, *146*(10), 1267–1274. <https://doi.org/10.1017/S0950268818001309>

Songumpai, N., Promrangsee, C., Noopetch, P., Siriyasatien, P., & Preativatanyou, K. (2022). First Evidence of Co-Circulation of Emerging *Leishmania martiniquensis*, *Leishmania orientalis*, and *Crithidia* sp. in *Culicoides* Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae), the Putative Vectors for Autochthonous Transmission in Southern Thailand. *Tropical medicine and infectious disease*, 7(11), 379. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7110379>

Srivarasat, S., Brownell, N., Siriyasatien, P., Noppakun, N., Asawanonda, P., Rattanakorn, K., Preativatanyou, K., & Kumtornrut, C. (2022). Case Report: Autochthonous Disseminated Cutaneous, Mucocutaneous, and Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania martiniquensis* in a Patient with HIV/AIDS from Northern Thailand and Literature Review. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 107(6), 1196–1202. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.22-0108>

Sunantaraporn, S., Hortiwakul, T., Kraivichian, K., Siriyasatien, P., & Brownell, N. (2022). Molecular Identification of Host Blood Meals and Detection of Blood Parasites in *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) Collected from Phatthalung Province, Southern Thailand. *Insects*, 13(10), 912. <https://doi.org/10.3390/insects13100912>

Sunter, J., & Gull, K. (2017). Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open biology*, 7(9), 170165. <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>

Suprsisunjai, C., Kootiratrakarn, T., Puangpet, P., Bunnag, T., Chaowalit, P., & Wessagowit, V. (2017). Disseminated Autochthonous Dermal Leishmaniasis Caused by *Leishmania siamensis* (PCM2 Trang) in a Patient from Central Thailand Infected with Human Immunodeficiency Virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 96(5), 1160–1163. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0472>

Svárovská, A., Ant, T. H., Seblová, V., Jecná, L., Beverley, S. M., & Volf, P. (2010). *Leishmania major* glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2-) but not lipophosphoglycan (lpg1-) for survival in permissive sand fly vectors. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(1), e580. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000580>

Svobodová, M., Dolnik, O. V., Čepička, I., & Rádrová, J. (2017). Biting midges (Ceratopogonidae) as vectors of avian trypanosomes. *Parasites & vectors*, 10(1), 224. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2158-9>

Svobodová, M., Zídková, L., Čepička, I., Oborník, M., Lukeš, J., & Votýpka, J. (2007). *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(Pt 2), 423–432. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64557-0>

Szadziewski, R., Borkent, A., & Dominiak, P. (2013). Fauna Europaea: *Culicoides*. *Fauna Europaea*. <https://fauna-eu.org>

Tichá, L., Volfová, V., Mendoza-Roldan, J. A., Bezerra-Santos, M. A., Maia, C., Sádlová, J., Otranto, D., & Volf, P. (2023). Experimental feeding of *Sergentomyia minuta* on reptiles and mammals: comparison with *Phlebotomus papatasi*. *Parasites & vectors*, 16(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05758-5>

Tomás-Pérez, M., Khaldi, M., Riera, C., Mozo-León, D., Ribas, A., Hide, M., Barech, G., Benyettou, M., Seghiri, K., Doudou, S., & Fisa, R. (2014). First report of natural infection in hedgehogs with *Leishmania major*, a possible reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Algeria. *Acta tropica*, 135, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.03.018>

Tóthová, A., & Knoz, J. (2009). Ceratopogonidae Newman, 1834. In *Jedlička L., Kúdela M. & Stloukalová V. (eds): Checklist of Diptera of the Czech Republic and Slovakia*.

Van der Auwera, G., Davidsson, L., Buffet, P., Ruf, M. T., Gramiccia, M., Varani, S., Chicharro, C., Bart, A., Harms, G., Chiodini, P. L., Brekke, H., Robert-Gangneux, F., Cortes, S., Verweij, J. J., Scarabello, A., Karlsson Söbirk, S., Guéry, R., van Henten, S., Di Muccio, T., Carra, E., ... LeishMan Surveillance Network members who contributed to this article (in addition to authors above) (2022). Surveillance of leishmaniasis cases from 15 European centres, 2014 to 2019: a retrospective analysis. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 27(4), 2002028. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.4.2002028>

Vaselek, S., & Volf, P. (2019). Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus tobbi* with different *Leishmania tropica* strains. *International journal for parasitology*, 49(11), 831–835. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.05.009>

Vasić, A., Zdravković, N., Aniță, D., Bojkovski, J., Marinov, M., Mathis, A., Niculau, M., Oşlobanu, E. L., Pavlović, I., Petrić, D., Pflüger, V., Pudar, D., Savuța, G., Simeunović, P., Veronesi, E., Silaghi, C., & SCOPES AMSAR training group (2019). Species diversity, host preference and arbovirus detection of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in south-eastern Serbia. *Parasites & vectors*, 12(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3292-3>

- Volf, P., Benková, I., Myšková, J., Sádlová, J., Campino, L., & Ravel, C.** (2007). Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids. *International journal for parasitology*, 37(6), 589–593. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.02.002>
- Volf, P., Hajmová, M., Sádlová, J., & Votýpka, J.** (2004). Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International journal for parasitology*, 34(11), 1221–1227. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.07.010>
- Volf, P., & Myšková, J.** (2007). Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends in parasitology*, 23(3), 91–92. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.12.010>
- Volf, P., & Volfová, V.** (2011). Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology*, 36 Suppl 1, S1–S9. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00106.x>
- Votýpka, J., Rádlová, J., Skalický, T., Jirků, M., Jirsová, D., Mihalca, A. D., D'Amico, G., Petrželková, K. J., Modrý, D., & Lukeš, J.** (2015). A tsetse and tabanid fly survey of African great apes habitats reveals the presence of a novel trypanosome lineage but the absence of *Trypanosoma brucei*. *International journal for parasitology*, 45(12), 741–748. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.06.005>
- de Waal, T., Liebenberg, D., Venter, G. J., Mienie, C. M., & van Hamburg, H.** (2016). Detection of African horse sickness virus in *Culicoides imicola* pools using RT-qPCR. *Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology*, 41(1), 179–185. <https://doi.org/10.1111/jvec.12210>
- Weinburgh, H. B. & Pratt, H. D.** (1962). *Culicoides*. Public health importance. Biology, survey and control. U. S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Georgia, Atlanta, 17 pp
- Wernike, K., Elbers, A., & Beer, M.** (2015). Schmallenberg virus infection. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 34(2), 363–373. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2363>
- World Health Organization** (2024). *Leishmaniasis*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Yurchenko, V., Kostygov, A., Havlová, J., Grybchuk-Ieremenko, A., Ševčíková, T., Lukeš, J., Ševčík, J., & Votýpka, J.** (2016). Diversity of Trypanosomatids in Cockroaches and the Description of *Herpetomonas tarakana* sp. n. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 63(2), 198–209. <https://doi.org/10.1111/jeu.12268>

Zídková, L., Čepička, I., Votýpka, J., & Svobodová, M. (2010). *Herpetomonas trimorpha* sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of the biting midge *Culicoides truncorum* (Ceratopogonidae, Diptera). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(Pt 9), 2236–2246. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.014555-0>