

Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

Jméno studenta: Ing. Šárka ČONDLOVÁ
Narozen(a): 23. 9. 1988 ve Strakonících
Studijní program: Zootechnika
Studijní obor: Zoohygiena a prevence chorob hosp. zvíř.
Forma studia: Prezenční
Školící pracoviště: KZVE ZF JU v Č. Budějovicích
Datum a místo konání zkoušky: 23. 11. 2018, ZF JU v Č. Budějovicích
Zkušební termín č.: 1.

Název disertační práce:

Diverzita, fylogeneze a biologie kryptosporidií infikujících hlodavce rodu *Apodemus*

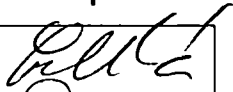
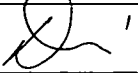
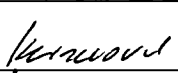
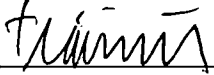
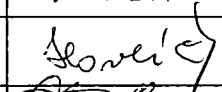
Výsledek obhajoby:

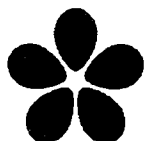
Prospěl (a)

Neprospěl (a)

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	prof. MVDr. Daniela Lukešová, CSc.; ČZU v Praze, FTZ	
Členové:	doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.; PŘF JU v Č. Budějovicích (oponent)	
	doc. Ing. Naděžda Kernerová, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	RNDr. Pavlína Tinavská, Ph.D.; Nemocnice a.s v Č. B.	DM WYENA
	doc. Dr. Ing. Zdeněk Havlíček; Mendelova univer. v Brně, AF	
Oponent:	doc. Ing. Jaroslav Vadlejch, Ph.D.; ČZU v Praze, FAPPZ (oponent)	
	MVDr. Lada Hofmannová, Ph.D.; VFU Brno, FVL	není členkou komise
Školitel:	prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

OBHAJOBA DISERTAČNÍ PRÁCE DSP PROTOKOL O HLASOVÁNÍ

Jméno studenta: Ing. Šárka ČONDLOVÁ
Narozen(a): 23. 9. 1988 ve Strakonících
Studijní program: Zootechnika
Studijní obor: Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat
Forma studia: Prezenční

Výsledek hlasování:

Počet členů komise: 7

počet platných hlasů: 6

počet neplatných hlasů: 0

počet přítomných členů komise: 6

kladných: 6

záporných: 0

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	prof. MVDr. Daniela Lukešová, CSc.; ČZU v Praze, FTZ	
Členové:	doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.; PřF JU v Č. Budějovicích (oponent)	
	doc. Ing. Naděžda Kernerová, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	RNDr. Pavlína Tinavská, Ph.D.; Nemocnice a.s v Č. B.	
	doc. Dr. Ing. Zdeněk Havlíček; Mendelova univer. v Brně, AF	
	doc. Ing. Jaroslav Vadlejch, Ph.D.; ČZU v Praze, FAPPZ (oponent)	

Oponentské otázky doc. Ing. Vadlejš, Ph.D.

1. Jaké znaky byly použity při druhové determinaci myšic?

K determinaci jednotlivých druhů myšic byly použity vnější tělesné znaky a morfometrické znaky, pomocí kterých lze jednotlivé druhy od sebe odlišit. Hůře odlišitelné od sebe jsou druhy *A. flavicollis* a *A. sylvaticus* – pro jejich určení hraje roli odlišnost ve velikosti hrdeční skvrny, velikosti těla, délce zadní tlapy (LTp: AF 23-27 mm x AS 24 mm) a lokalitě výskytu. I tyto dva druhy myšic jsou tedy od sebe s trochou cviku odlišitelné (což vždy neplatí u mláďat). Dále byla u každé myšice odebrána koncová část ocasu/ušního boltce a uchovávána pro pozdější analýzu druhu (z finančních důvodů k této analýze nedošlo). Dále bylo spolupracováno s odborníky: doc. Mgr. Radimem Šumberou, Ph.D. a doc. RNDr. Františkem Sedláčkem, Ph.D., kteří ochotně poskytli své zkušenosti s odchytů jednotlivých druhů a pomohli s určením druhu myšice v případě nejistoty.

2. Čím si vysvětlujete nejnižší prevalenci kryptosporidií právě u myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*)?

Nejnižší prevalence u tohoto druhu bude pravděpodobně způsobena tím, že více než polovina jedinců byla odchycena na jedné lokalitě v ČR během jedné sezóny (z 36 myšic na této lokalitě byla pozitivní pouze 1 myšice). Ostatní jedinci tohoto druhu (17 myšic) byli odchyceni na různých lokalitách Evropy, ale vždy v malém počtu. Na lokalitách v Evropě probíhal odchyt v omezeném časovém úseku (někdy pouze několika dní). Tento počet tedy nemusí odpovídat skutečné prevalenci na dané lokalitě/ prevalenci u tohoto druhu.

3. Proč jsou kryptosporidie hlodavců úzce druhově specifické a nebyly u nich prokázány korelace s věkem či pohlavím hostitele, zatímco u druhu *Cryptosporidium parvum* je tomu naopak?

Pro parazita je méně náročné zaměřit se na jeden druh hostitele než na velké spektrum hostitelů. Tak jako by pro parazita mělo být méně náročné infikovat mláďata s méně vyvinutým imunitním systémem. Na základě tohoto si vysvětlují, že kryptosporidie hlodavců jsou úzce druhově specifické (rolí bude hrát odlišnost hostitelů, jejich způsob života, potrava...). Naopak odlišnost ve věkové specifitě, která nebyla prokázána, si vysvětlují tím, že u většiny experimentálních infekcí zaměřených na hlodavčí kryptosporidie jsou do experimentu zapojena mláďata až po odstavu od matky (tedy většinou ve věku 4-5 týdnů). Myš domácí je např. pohlavně dospělá již zhruba v 6 týdnech života. Což poukazuje na to, že ve skutečnosti jsou do experimentů zapojeny dle mého názoru již jedinci starší – subadultní s více vyvinutou imunitou. Nelze tedy odhadnout jaká by byla skutečná vnímavost k infekci mláďat např. sajících mléko. Ani při odchytu divokých jedinců do pastí není možné odchytit takto malá mláďata a znodnotit tak vliv jejich věku.

Naopak při experimentálních infekcích druhem *C. parvum* byla u hlodavců prokázána věková specifita. Například větší vnímavost byla prokázána u mláďat laboratorních myši (swiss albino) sajících mléko oproti jedincům starým 5 týdnů u infekce druhem *C. parvum*. U potkanů jsou více vnímavá mláďata sající mléko k infekci druhem *C. parvum*, vnímavost mláďat k infekci se ztrácí v období kolem odstavu. Podobný výsledek byl prokázán u krysy malé (*Mastomys coucha*) - větší vnímavost byla u sajících mláďat k infekcím druhem *C. andersoni* než u starších jedinců.

Oponentské otázky doc. RNDr. Ditrich, CSc.

1. opravdu je zatím málo informací pro aspoň nesmělý pokus porovnat fylogenetické vztahy nalezených hlodavčích kryptosporidií s fylogenezí myšic?

Vyslovení jednoznačných závěrů, zda fylogenetické vztahy nalezených kryptosporidií souvisí spolu s fylogenezí myšic mi připadá velmi odvážné bez podrobnějšího zaměření konkrétně na tuto problematiku. Vzhledem k některým výsledkům práce se domnívám, že tato fakta spolu částečně souvisí.

2. Pokud jde o nález dalších druhů kryptosporidií, které byly u myšic zaznamenány ojediněle, chybí mi v diskusi uvedení možnosti, že všechny pozitivní nálezy nemusejí znamenat infekci, ale že může jít o pasáž. Za pravděpodobné bych to považoval např. u *C. andersoni*, ale možná i u dalších druhů. Mohla by na obhajobě studentka v tomto smyslu své nálezy souhrnně okomentovat?

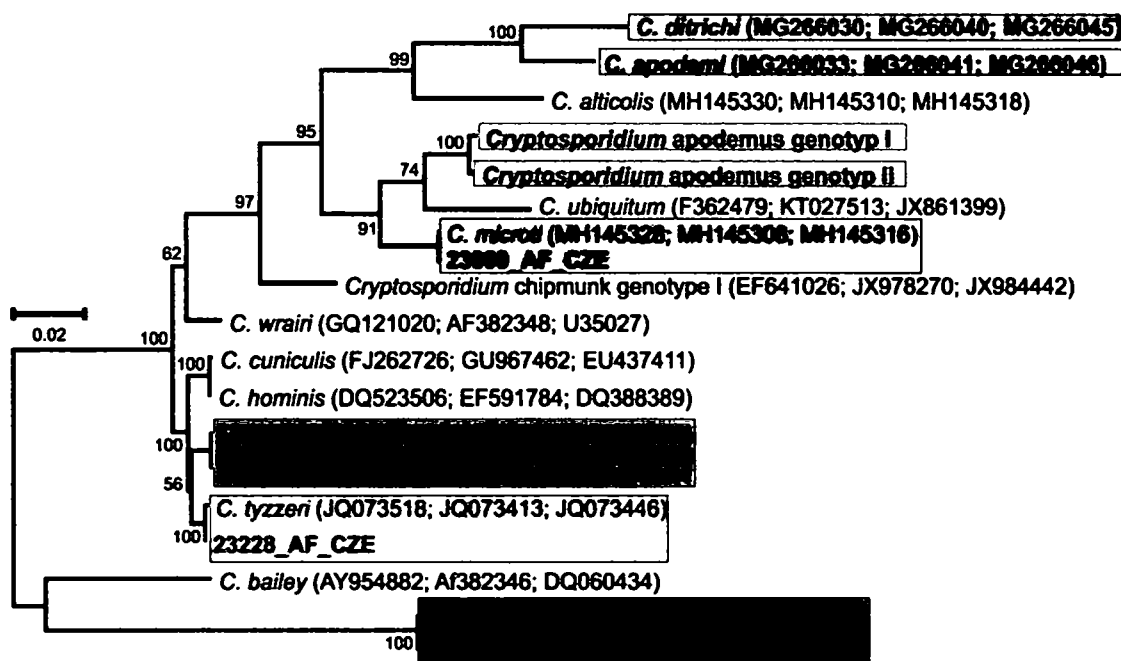
Pouhou detekcí specifické kryptosporidiové DNA ve vzorcích stolice nebo trusu nelze jednoznačně posoudit, zda se jedná o probíhající infekci v hostiteli nebo o pasáž oocyst zažívacím traktem. U hlodavčích hostitelů bylo prokázáno, že pasáž oocyst zažívacím traktem je možné detekovat v rozmezí pouze 6-24 hodin po infekci, a to ne ve všech případech (Munzarová 2012; Tomanová 2017). Na základě tohoto zjištění by bylo k odlišení pasáže/skutečné infekce nutné odchycená volně žijící zvířata chovat minimálně po dobu 24-48 hodin na sterilní podestýlce a krmit/napájet je sterilním krmivem/vodou.

Nálezy hostitelsky nespecifických druhů a genotypů kryptosporidií u různých hostitelů nejsou ojedinělé. Ve většině případů se jednalo převážně o mechanickou pasáž oocyst zažívacím traktem hostitele, které se do hostitele dostaly buď s kontaminovanou vodou a potravou nebo v případě predátorů prostřednictvím přirozeně infikované kořisti. Například bylo prokázáno, že prasata nejsou vnímavá k infekci *C. muris* a *C. tyzzeri*, přestože tyto druhy kryptosporidií, hostitelsky specifických pro hlodavce, byly často detekovány v trusu a kejdlé prasat (Němce et al. 2013). Taktéž hadi nebo draví ptáci krmení hlodavci vylučovali oocysty *C. muris* - užovka červená a černá (*Elaphe guttata*, *Elaphe obsoleta*) a hroznýš královský (*Boa*

constrictor) (Xiao et al. 2004). V těchto případech se jednalo o pouhou pasáž (Xiao et al. 2004) a po změně potravy (hlodavci bez kryptosporidiové infekce) došlo k zastavení vyhlčování.

3. K molekulárním analýzám: chybí mi kritické porovnání stromčeků sestrojených na základě analýz jednotlivých genů: považuje studentka některé geny za vhodnější než jiné, a pokud ano, tak proč? Bylo by možno sestrojit (třeba jen schématický) souhrnný stromček se syntézou příbuznosti jednotlivých zkoumaných druhů a genotypů?

Některé geny považuji za vhodnější. Např. gen kódující malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA; Jiang et al. 2005) a gen pro actin (Sulaiman et al. 2000) považuji za „základní“, analýzy genů zachycujících velké spektrum různých druhů/genotypů. I v databázi GenBank patří výsledky těchto analýz mezi nejvíce zastoupené a tím i nejlépe srovnatelné s novými výsledky. Na základě velkého množství dat u těchto genů není problém sestrojit fylogenetickou analýzu jednotlivých druhů/genotypů nebo izolátů. Naopak u genu HSP 70/ TRAP-C1 tato data chybí i u některých platných druhů. Jiné druhy genů např. 60 kDa glykoprotein (GP60; Alves 2003; Li et al. 2014) se využívají k určení konkrétních subtypů daného druhu kryptosporidií. Přikládám výsledek fylogenetické analýzy zkoumaných druhů a genotypů v rámci disertační práce.



Obrázek: Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií detekovaných v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě sekvencí genu: kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU), genu pro actin a *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) vytvořený metodou Maximum likelihood, u platných druhů kryptosporidií jsou uvedena databázová čísla sekvencí použitých k analýze. Číselné hodnoty v uzlech představují procentuální hodnoty bootstrapů s podporou více než 50 %, bootstrap 1000×. Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny, za číselným označením je uvedena zkratka konkrétního druhu myšice (pro *A. flavicollis* a pro juvenilní jedince bez určení druhu *A. spp.*), za ní je uvedena zkratka státu, kde byl příslušný izolát získán Česká republika (CZE), Německo (DEU) a Polsko (POL).

4. Dále mi v diskusi (a vlastně i ve výsledcích) chybí vztahení pozitivních nálezů k věku popř. k pohlaví myšic. V závěrech je sice konstatováno, že nebyl zjištěn rozdíl ve vnímavosti juvenilních/adultních jedinců ani samců/samic u *C. apodemi* a *C. ditrichi*, ale to je výsledek experimentální infekce 4 jedinců u každého druhu (mimořádně, v grafech znázorňujících experimentální infekce není věk ani pohlaví označeno, i když by to bylo snadno možné). Odpovídají tomuto závěru i výsledky zjištěné u myšic z přírody?

Ano, tomuto závěru odpovídají i výsledky zjištěné u myšic z přírody. Přikládám tabulku zahrnující počet samic/samců a subadultních/adultních jedinců bez ohledu na druh myšic. Statistická analýza neprokázala vliv pohlaví ani věku na kryptosporidiové infekce.

Rozdíly v prevalenci kryptosporidií v závislosti na věku a pohlaví byly vyhodnoceny pomocí chí-kvadrát testu o hladině významnosti 0,05. Data byla zpracována v programu Epi Info 7.2.2.6 (CDC).

Nebyl prokázán statisticky významný vztah mezi věkem zvířat a kryptosporidiovými infekcemi ($p=0,11$). Statistická analýza neprokázala ani vliv pohlaví na přítomnost kryptosporidiových infekcí ($p=0,26$).

Tabulka: Vliv věku a pohlaví na přítomnost kryptosporidií.

Kategorie	Vyšetřeno	Pozitivní	Negativní
-----------	-----------	-----------	-----------

Subadultní	299	49	250
Adultní	647	81	566
Suma	946	130	816
Samci	522	67	464
Samice	424	63	352
Suma	946	130	816

5. Další výhradu mám k poslední větě na str. 79. *Cryptosporidium apodemi* bylo v experimentech detekováno jen molekulárně, nelze tedy tvrdit, že vývojová stádia byla v tenkém i tlustém střevě (v colonu mohlo jít o oocysty, které procházejí, ne?).

Molekulární analýza z částí trávicího traktu byla prováděna dle stejné metodiky a stejných postupů u všech vzorků – resp. u všech experimentálních jedinců, tím by měla teoreticky nastat tedy stejná chyba/problém u všech experimentů, což se nestalo. K ověření/vyvrácení domněnky o chybě/detekci procházejících oocyst/nebo vývojových stádiích by bylo nutné experiment opakovat. Mimo to, u druhu *C. microti* u hrabošů byla vývojová stádia v colonu detekována a potvrzena pomocí SEM i histologie (Horčíčková et al. 2018), proč by tedy nemohl stejný případ nastat i u myšic?...

Citace

Alves M., Xiao L., Sulaiman I., Lal A. A., Matos O., Antunes F. 2003. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. J. Clin. Microbiol. 41: 2744-2747.

Horčíková M., Čondlová Š., Holubová N., Sak B., Květoňová D., Hlásková L., Konečný R., Sedláček F., Clark M., Giddings C., McEvoy J., Kváč M. 2018. Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). Parasitology. 17: 1-14.

Jiang J., Alderisio K. A., Xiao L. 2005. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. Appl. Environ. Microbiol. 71: 4446-4454.

Li N., Xiao L., Alderisio K., Elwin K., Cebelinski E., Chalmers R., Santin M., Fayer R., Kváč M., Ryan U., Sak B., Stanko M., Guo Y., Wang L., Zhang L., Cai J., Roelling D., Feng Y. 2014. Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. Emerg. Infect. Dis. 20: 217-224.

Munzarová L. 2012. Detekce kryptosporidií pomocí molekulárních metod v klinických vzorcích: infekce nebo pasáž oocyst zažívacím traktem hostitele? Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Zdravotně sociální fakulta. 58 s.

Němejc K., Sak B., Květoňová D., Kernerová N., Rost M., Cama V. A., Kváč M. 2013. Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices. Parasitol. Res. 112:1143-1154.

Sulaiman I. M., Morgan U. M., Thompson R. C., Lal A. A., Xiao, L. 2000. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2385-2391.

Tomanová V. 2017. Přítomnost specifické DNA a koproantigenu kryptosporidií jako indikátor probíhající infekce. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Zemědělská fakulta. 53 s.

Xiao L., Ryan U. M., Graczyk T. K., Limor J., Li L., Kombert M., Junge R., Sulaiman I. M., Zhou L., Arrowood M. J., Koudela B., Modrý D., Lal A. A. 2004. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. Appl. Environ. Microbiol. 70:891-899.

Odpovědi na oponentské otázky

1. V práci uvádíte na straně 27: „Rizikovou skupinou jsou imunodeficientní jedinci, malé děti a imunokompetentní jedinci.“ Jaký je rozdíl mezi imunosuprimovaným, imunodeficientním a imunokompetentním jedincem? Dají se malé děti zařadit do některé z těchto kategorií? Jsou opravdu onou rizikovou skupinou shodně imunodeficientní i imunokompetentní jedinci?

Imunodeficiencie (imunopatologický stav), kdy je snížena celková reaktivita organismu na antigenní a jiné podněty, vyvolávající specifickou nebo nespecifickou imunitní reakci (hlavním klinickým projevem je zvýšená náchylnost k infekcím). Imunodeficiencie jsou buď vrozené nebo získané. Vrozené imunodeficiencie jsou způsobeny poruchou genů, které kódují důležité funkce imunitního systému. Dosud bylo popsáno kolem osmdesáti druhů vrozených imunodeficitů. Mohou se projevovat širokou škálou klinických příznaků vedoucích až k smrti postiženého jedince v útlém věku (těžké kombinované imunodeficity). Závažné formy vrozených imunodeficiencí jsou většinou velmi vzácné. Získané imunodeficiencie jsou naopak časté – mohou být způsobeny poškozením přirozených bariér – kůže, sliznic (např. rozsáhlé popáleniny, polytraumata) nebo jednotlivých složek imunitního systému. V rozvojových zemích je nejčastější příčinou získané imunodeficiencie podvýživa. Další častou příčinou imunodeficiencie ve světě je infekce virem HIV. V našich podmínkách jsou časté imunodeficiencie navozené léčebnými zásahy (transplantace, ozařování, chemoterapie). Dále imunodeficienci způsobují celkové metabolické choroby jako je cukrovka, nevyvážený příjem potravy v důsledku mentální anorexie, jednostranných diet, chorob zažívacího traktu apod. Výrazná imunodeficiencie provází nádorová onemocnění, zejména ta, která postihují přímo imunokompetentní buňky (leukémie, lymfomy). Získané imunodeficiencie se léčí odstraněním příčiny, která vede k imunodeficitu. Vrozené imunodeficiencie se léčí ve specializovaných centrech podle úrovně defektu.

Imunosuprese je stav snížené imunity, kdy je omezena nebo snížena schopnost organismu reagovat na antigenní podnět tvorbou protilátek nebo buněčnou reakcí, obvykle v důsledku imunosupresivní léčby nebo vlivem některých nemocí.

Imunokompetence je schopnost imunitních buněk organismu reagovat na antigen – stav zdravého organismu.

Malé děti by bylo možné zařadit mezi imunokompetentní jedince – pokud by se jednalo o zdravé děti. Ale je nutné zohlednit jejich větší vnímavost k některým infekcím/onemocněním a tím tedy i jejich odlišnost od imunokompetentních dospělých jedinců. Imunodeficientní jedinci patří mezi více rizikové jedince než jedinci imunokompetentní.

2. Ve své práci se v části Úvodu a jedné kapitole Literárního přehledu věnujete problematice léčby kryptosporidiózy. Jak uvádíte „není v současné době k dispozici žádný 100% účinný lék.“ Vzhledem k tomu, že je náplní Vaší práce i studium biologie kryptosporidií, dovoluji si vznést dotaz, zda víte, proč je tak obtížné právě u těchto organismů intenzivně hledaný skutečně účinný lék objevit?

Svou roli v této problematice hraje široká hostitelská škála, určitá odlišnost antigenů u jednotlivých druhů kryptosporidií a rychlý vývojový cyklus. Dalším důvodem je nedostatečná znalost biologie vývoje a hostitelsko - parazitických interakcí kryptosporidií. Pro rozšíření znalostí o kryptosporidiích je nezbytné vyvinutí úspěšného modelu pro dlouhodobou kultivaci tohoto parazita v podmínkách in vitro (Hijawi 2010). Výzkumy in vitro jsou znatelně levnější, etičtější a na rozdíl od in vivo systémů umožňují hodnocení citlivosti a účinnosti léčiv na různá vývojová stadia kryptosporidií. Avšak významným omezením studií in vitro je selhání při dlouhodobém šíření, nízké výnosy oocyst nebo jejich nedostatečná reprodukovatelnost. Snížená proliferace a šíření v buněčné kultuře je z velké části způsobena rychlou smrtí a nadměrným růstem monolayeru buněk infikovaného kryptosporidiemi.

Pro odstranění infekce způsobené kryptosporidiemi z organismu je rozhodující ochrana hostitelského imunitního systému. Po vstupu do hostitelských epitelálních buněk se parazit nachází uvnitř jedinečné intracelulární, ale extracytoplazmatické niky, oddělující parazita od přímé interakce s jinými typy buněk. Proto je kryptosporidium klasifikováno jako "minimálně invazivní" mukózní patogen (Chen et al. 2002). Důkazy studií in vitro a in vivo ukazují, že vrozená a adaptivní imunita se podílí na vyřešení kryptosporidiózy a odolnosti proti další infekci (Chen et al. 2005; Pantenburg et al. 2008). Zdá se však, že kryptosporidium může během počátečního stadia infekce přežít vrozený imunitní útok hostitele (Pantenburg et al. 2008; Zhou et al. 2009). Kompletní eliminace infekce vyžaduje adaptivní imunitní odpovědi, zejména ty, které jsou zprostředkovány CD4 + T-buňkami (Pantenburg et al. 2010). Kvůli "minimálně invazivní" povaze kryptosporidií jsou vrozené imunitní odpovědi epitelálních buněk potřebné

pro obranu hostitele před infekcí. Při infekci epitelální buňky rychle zahajují sérii vrozených imunitních reakcí včetně výroby antimikrobiálních peptidů (např. B-defenzinů) a uvolňování zápalových chemokinů/cytokinů, jako je interleukin-8 (IL-8) (Zhou et al. 2012). Produkce a sekrece antimikrobiálních peptidů (např. B-defenzin 2) a oxidu dusnatého mohou kryptosporidium zabít nebo inhibovat jeho růst (Zhou et al. 2012). Tyto chemokiny/cytokiny mohou mobilizovat a aktivovat imunitní efektorové buňky (např. lymfocyty, makrofágy a neutrofily) na infekční místa (Blikslager et al. 2007).

U druhu *C. parvum* byla zjištěna přirozená rezistence k mnoha léčebným terapiím, která může být zapříčiněna jeho charakteristickým subcelulárním umístěním na apikálním povrchu savčích střevních epitelových buněk a vytvořením tak bariéry k účinnému podání léčiva, což brání lékům dosáhnout terapeutických koncentrací u parazitů (Hulverson et al. 2017).

3. Rozsáhlá část Literárního přehledu je věnována fylogeografii jednotlivých druhů myšic, ale výsledky ani diskuze se k tomuto tématu již dále nevztahují, postačila by i jednoduchá mapa Evropy s vyznačením druhů myšic a autorkou detekovaných kryptosporidií ve výsledcích a v diskuzi věta či odstavec o tom, zda migrace a rozšíření myšic a detekovaných kryptosporidií spolu alespoň zdánlivě souvisí či nikoli. Bylo by možné tuto informaci alespoň stručně doplnit v rámci obhajoby?

Mapa znázorňující druhy myšic s výskytem v Evropě spolu s detekovanými druhy kryptosporidií se mi jeví velmi náročná na vizualizaci vzhledem k překrývání lokalit výskytu jednotlivých druhů myšic a také vzhledem k překrývání několika druhů detekovaných kryptosporidií. Vytvoření mapky se mi zdá více reálné pouze pro jednotlivé druhy myšic nebo pouze pro detekované druhy kryptosporidií v rámci Evropy (o vytvoření mapy s detekovanými druhy kryptosporidií se při dostatku času mohu pokusit a připojit ji do obhajoby).

Vyslovení jednoznačných závěrů, zda migrace a rozšíření myšic souvisí spolu s detekovanými kryptosporidiemi mi připadá velmi odvážné bez podrobnějšího zaměření konkrétně na tuto problematiku. Vzhledem k některým výsledkům práce se domnívám, že tato fakta spolu částečně souvisí.

4. V kapitole Materiál a metodika chybí údaj, kolik bylo experimentálních zvířat v jednotlivých skupinách. Pokud se dá vyčíst správná informace z Obrázků 12, 13, 16 a 17, jedná se pro každý použitý druh kryptosporidií o čtyři a méně jedinců. V případě, že testovaná skupina zahrnovala max. čtyři jedince a ještě k tomu různého pohlaví a věku, nelze na základě těchto výsledků vyvodit závěry viz strana 77 či 83 o vlivu věku či pohlaví. Bohužel v práci chybí i údaje o věku a pohlaví u jednotlivých odchycených druhů myšic a vztahu k negativním/pozitivním nálezům jednotlivých druhů kryptosporidií, takže ani z tohoto pohledu není možné závěr vyvodit. Mohla by autorka v rámci obhajoby doplnit alespoň stručnou přehlednou tabulku odchycených myšic bez ohledu na jejich druhy a původ, čistě souhrnně juvenilové/adulti, samci/samice a počty pozitivních z celkového v dané kategorii?

K experimentálním infekcím byli použiti 4, 4, 2 a 3 jedinci druhu *A. flavicollis* pro *C. apodemi*, *C. ditrichi*, *C. microti* a *C. parvum* (v metodice není uveden počet jedinců z důvodu využití rozdílných počtů jedinců ovlivněných dostupností jedinců v době konkrétního pokusu).

Tabulku, která bude doplněna v obhajobě uvádím níže. Rozdíly v prevalenci kryptosporidií v závislosti na věku a pohlaví byly vyhodnoceny pomocí chí-kvadrát testu o hladině významnosti 0,05. Data byla zpracována v programu Epi Info 7.2.2.6 (CDC).

Nebyl prokázán statisticky významný vztah mezi věkem zvířat a kryptosporidiovými infekcemi ($p=0,11$). Statistická analýza neprokázala ani vliv pohlaví na přítomnost kryptosporidiových infekcí ($p=0,26$).

Tabulka: Vliv věku a pohlaví na přítomnost kryptosporidií.

Kategorie	Vyšetřeno	Pozitivní	Negativní
Subadultní	299	49	250
Adultní	647	81	566
Suma	946	130	816
Samci	522	67	464
Samice	424	63	352
Suma	946	130	816

Jsou mezi juvenilními myšicemi mlád'ata sající mléko nebo pouze nedospělé (subadultní) myšice, které se již žíví shodně jako dospělí jedinci?

Mezi odchycenými mlád'aty nebyla mlád'ata sající mléko.

Znáte nějaké případy u hlodavců, kdy jsou sající mlád'ata významně vnímavější ke kryptosporidiové infekci než starší mlád'ata, která jsou již fyziologicky na pevné výživě?

Například u krysy malé (*Mastomys coucha*) byla prokázána větší vnímavost sajících mlád'at k infekcím druhem *C. andersoni* (Kváč et al. 2007). Větší vnímavost byla prokázána také u mlád'at laboratorních myší (swiss albino) sajících mléko oproti jedincům starým 5 týdnů u infekce druhem *C. parvum* (Yousof et al. 2017). U potkanů jsou více vnímavá mlád'ata sající mléko k infekci druhem *C. parvum*, vnímavost mlád'at k infekci se ztrácí v období kolem odstavu (Akili et Harp 2000).

5. V kapitole Výsledky v Tabulce 4 bych doporučila doplnit informaci o počtu pozitivních myšic v jednotlivých státech a to bez ohledu na nízké počty odchycených jedinců. Bez těchto údajů tato tabulka patří do kapitoly Materiál a Metodika. Dovolím si zároveň nesouhlasit s několikrát opakovanou větou, že autorka data neuvádí z důvodů toho, že by nevyrovnané a nízké počty odchycených jedinců zkreslily prevalenci. Pro přehled by stačilo uvést prosté počty i bez prevalencí. Samozřejmě souhlasím, že prevalence jsou často nízkými čísly zkreslené, viz Literární přehled Tabulka 2 prevalence 50 % u jedné pozitivní ze dvou odchycených myšic.

Přikládám doplněnou tabulku 4.

Tabulka 4: Počty konkrétních druhů myši rodu *Apodemus* odchycených v jednotlivých státech.

Stát	Počet lokalit	Odchycené druhy myšic			Bez určení druhu*	Počet pozitivních
		<i>A. agrarius</i>	<i>A. flavicollis</i>	<i>A. sylvaticus</i>		
Belgie	1	–	–	–	2	1
Bosna a Hercegovina	1	–	1	–	–	0
Bulharsko	4	5	2	2	1	0
Česká republika	46	–	301	36	33	58
Finsko	2	–	2	–	–	1
Francie	9	–	15	4	1	4
Litva	1	3	–	–	–	1
Lotyšsko	2	11	–	–	–	3
Maďarsko	2	2	–	–	2	0
Německo	7	–	–	–	10	3
Nizozemí	3	–	–	–	6	1
Polsko	7	2	83	–	–	10
Rakousko	4	–	2	3	3	0
Rumunsko	2	2	1	1	–	2
Slovensko	21	132	253	4	–	40
Srbsko	4	4	14	3	–	6
Celkem	116	161	674	53	58	130

6. Ve Výsledcích postrádám informaci o tom, zda byly přítomné i mix infekce více druhů kryptosporidií u jednoho jedince, nebo se vždy jednalo čistě o jednodruhové infekce?

Mix infekce více druhů kryptosporidií nebyly detekovány.

7. V kapitole Diskuze str. 73 není úplně vhodně zvolená část diskutující nenalezení *C. ditrichi*. Opakovaně uvádíte, že v referovaných studiích publikovaných před rokem 2018 „nebylo detekováno *C. ditrichi*“, které však popisujete jako nový druh s vaším týmem až v roce 2018. Můžete objasnit tuto část diskuze lépe a uvést, co tedy bylo v citovaných studiích nalezeno a jak se tento nález lišil od *C. ditrichi*?

Cryptosporidium ditrichi resp. *Cryptosporidium* o shodné sekvenci DNA u myšic do roku 2018 bylo detekováno pouze ve studii Čondlové 2013. Chalmers et al. (2010)

Cryptosporidium o shodné sekvenci DNA (v rámci genu SSU) detekovali v odpadní vodě ve Velké Británii (GQ183527). Srovnání získaných sekvencí ze vzorků myšic (*C. ditrichi*) se vzorky uloženými v databázi GenBank odhalilo, že k detekci shodné DNA *Cryptosporidium* (popsaného později jako *C. ditrichi*) došlo již před jeho popisem u člověka ve Švédsku (Swec449 isolate; KU892562; podrobná data k této infekci nebyla autory do dnešního dne publikována) a i v přirozených vodních zdrojích v Norsku (KU892579; taktéž do dnešního dne nepublikovaná data) (na doporučení školitele jsou tato data uvedena až v podkapitole 6.6. Zoonotický potenciál). Diskutovat tato data je obtížné vzhledem k chybějícím podrobným informacím. Nálezy kryptosporidií v ostatních pracích se odlišují sekvencemi DNA.

8. Dále v Diskuzi uvádíte nález *C. andersoni* u jedné myšice (*A. flavicollis*), podobně i další zřídka detekované druhy *C. hominis*, *C. microti* atd. Je možné odlišit u takovýchto případů pasáž oocyst/DNA od skutečné infekce konkrétního odchyceného volně žijícího jedince? Pokud ano, tak jaký postup byste v ideálním případě k odlišení pasáže/skutečné infekce využila?

Nálezy hostitelsky nespecifických druhů a genotypů kryptosporidií u různých hostitelů nejsou ojedinělé. Ve většině případů se jednalo převážně o mechanickou pasáž oocyst zažívacím traktem hostitele, které se do hostitele dostaly buď s kontaminovanou vodou a potravou nebo v případě predátorů prostřednictvím přirozeně infikované kořisti. Například bylo prokázáno, že prasata nejsou vnímavá k infekci *C. muris* a *C. tyzzeri*, přestože tyto druhy kryptosporidií, hostitelsky specifických pro hlodavce, byly často detekovány v trusu a kejďe prasat (Němejc et al. 2013). Taktéž hadi nebo draví ptáci krmení hlodavci vylučovali oocysty *C. muris* - užovka červená a černá (*Elaphe guttata*, *Elaphe obsoleta*) a hroznýš královský (*Boa constrictor*) (Xiao et al. 2004). V těchto případech se jednalo o pouhou pasáž (Xiao et al. 2004) a po změně potravy (hlodavci bez kryptosporidiové infekce) došlo k zastavení vylučování.

Pouhou detekci specifické kryptosporidiové DNA ve vzorcích stolice nebo trusu nelze tedy jednoznačně posoudit, zda se jedná o probíhající infekci v hostiteli nebo o pasáž oocyst zažívacím traktem. U hlodavčích hostitelů bylo prokázáno, že pasáž oocyst zažívacím traktem je možné detekovat v rozmezí pouze 6-24 hodin po infekci, a to ne ve všech případech (Munzarová 2012; Tomanová 2017). Na základě tohoto zjištění by bylo k odlišení

pasáže/skutečné infekce nutné odchycená volně žijící zvířata chovat minimálně po dobu 24-48 hodin na sterilní podestýlce a krmit/napájet je sterilním krmivem/vodou.

9. V Diskuzi na straně 79 uvádíte, že „Kryptosporidiové infekce bývají doprovázeny klinickými příznaky u zvířat jen vzácně,...“. S tímto tvrzením si dovoluji nesouhlasit. Dozajista znáte příklady kryptosporidiových infekcí některých druhů či kategorií zvířat, u kterých jsou klinické příznaky velmi časté, značně typické a nezdědka vedou až k úhynům. Mohla byste nějaké příklady uvést z řad savců, ale i z jiné třídy obratlovců?

Obratlovci

Ptáci

kuřata a krůty – respirační potíže, průjem až smrt u infekcí druhem *C. baileyi* (Fletcher et al. 1975; Taylor et al. 1994), infekce druhem *C. meleagridis* je spojena s průjmem a mortalitou u kuřat (Baroudi et al. 2013).

Plazi

hadi – otok uprostřed těla, ale ne všechny případy jsou symptomatické (Brownstein et al. 1977; Cranfield a Graczyk 1994).

Savci

králíci – infekce u králíků před odstavem bývají spojeny s průjmem a vysokou úmrtností (Mosier et al. 1997; Pavlásek et al. 1996; Robinson and Chalmers 2010).

ovce a kozy – vysoká nemocnost a úmrtnost jehňat a kůzlat (Caccio et al. 2013; Giadinis et al. 2012; Johnson et al. 1999; Munoz et al. 1996; Paraud et al. 2011).

– infekce druhem *C. parvum* – snížená míra růstu a snížení hmotnosti jatečně upravených těl (Sweeny et al. 2011).

– infekce druhem *C. xiaoi* – mírný až těžký průjem a úmrtnost (Diaz et al. 2010; Rieux et al. 2013).

Skot – telata – infekce druhem *C. parvum* – průjem, letargie, nechutenství, horečka (Blanchard 2012; Radostits et al. 2007).

– **dospělý skot** – *C. andersoni* infekce byly spojeny s maldigescí, snížení produkce mléka u krav (Anderson 1998; Lindsay et al. 2000).

10. Můj poslední dotaz se vztahuje k pěkné fotodokumentaci histologických nálezů endogenních stádií kryptosporidií z experimentů. Pokusili jste se o morfometrickou analýzu endogenních stádií jednotlivých druhů kryptosporidií?

Morfometrická analýza endogenních stádií jednotlivých druhů nebyla prováděna. U většiny izolátů bylo komplikované v danou chvíli zajistit dostatečné množství izolátu potřebné k prováděným experimentálním infekcím popsaným v práci. Ještě více komplikované bylo zajistit pokusná zvířata rodu *Apodemus* potřebná k experimentálním infekcím a potřebná k případnému pomnožení daných izolátů.

Zdroje

Akili D., Harp J. A. 2000. A factor derived from adult rat and cow small intestine reduces *Cryptosporidium parvum* infection in infant rats. J. Parasitol. 86:979-82.

Anderson B. C. 1998. Cryptosporidiosis in bovine and human health. J. Dairy. Sci. 81:3036-304.

Baroudi D., Khelef D., Goucem R., Adjou K. T., Adamu H., Zhang H., Xiao L. 2013. Common occurrence of zoonotic pathogen *Cryptosporidium meleagridis* in broiler chickens and turkeys in Algeria. Vet. Parasitol. 196:334-340.

Blanchard P. C. 2012. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract. 28:443-464.

Blikslager A. T., Moeser A. J., Gookin J. L. 2007. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. Physiol. Rev. 87:545-564.

Brownstein D. G., Strandberg J. D., Montali R. J., Bush M., Fortner J. 1977. *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. Vet. Pathol. 14:606-617.

Caccio S. M., Sannella A. R., Mariano V., Valentini S., Berti F., Tosini F., Pozio E. 2013. A rare *Cryptosporidium parvum* genotype associated with infection of lambs and zoonotic transmission in Italy. Vet. Parasitol. 191:128-131.

Cranfield M. R., Graczyk T. K. 1994. Experimental infection of elapid snakes with *Cryptosporidium serpentis* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). J. Parasitol. 80:823-826.

Čondlová Š. 2013. Diverzita kryptosporidií infikujících hlodavce rodu Apodemus v České republice. Diplomová práce. České Budějovice. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Zemědělská fakulta. 47 s.

Diaz P., Quilez J., Robinson G., Chalmers R. M., Diez-Banos P., Morrondo P. 2010. Identification of *Cryptosporidium xiaoi* in diarrhoeic goat kids (*Capra hircus*) in Spain. Vet. Parasitol. 172:132-134.

Fletcher O. J., Munnell J. F., Page R. K. 1975. *Cryptosporidiosis* of the bursa of Fabricius of chickens. Avian. Dis. 19:630-639.

- Giadinis N. D., Symeoudakis S., Papadopoulos E., Lafi S. Q., Karatzias H.** 2012. Comparison of two techniques for diagnosis of cryptosporidiosis in diarrhoeic goat kids and lambs in Cyprus. *Trop. Anim. Health. Prod.* 44:1561-1565.
- Hijawi N., Estcourt A., Yang R., Monis P., Ryan U.** 2010. Complete development and multiplication of *Cryptosporidium hominis* in cell-free culture. *Vet. Parasitol.* 169:29-36.
- Hulverson M. A., Vinayak S., Choi R., Schaefer D. A., Castellanos-Gonzalez A., Vidadala R. S. R., Brooks C. F., Herbert G. T., Betzer D. P., Whitman G. R., Sparks H. N., Arnold S. L. M., Rivas K. L., Barrett L. K., White A. C., Maly D. J., Riggs M. W., Striepen B., Van Voorhis W. C., Ojo K. K.** 2017. Bumped-Kinase Inhibitors for Cryptosporidiosis Therapy. *J. Infect. Dis.* 215:1275-1284.
- Chalmers R. M., Robinson G., Elwin K., Hadfield S. J., Thomas E., Watkins J., Casemore D., Kay D.** 2010. Detection of *Cryptosporidium* species and sources of contamination with *Cryptosporidium hominis* during a waterborne outbreak in north west Wales. *J. Water. Health.* 8:311-325.
- Chen X. M., Keithly J. S., Paya C. V.** 2002. Cryptosporidiosis. *Engl. J. Med.* 346:1723-1731.
- Chen X. M., O'Hara S. P., Nelson J. B.** 2005. Multiple TLRs are expressed in human cholangiocytes and mediate host epithelial defense responses to *Cryptosporidium parvum* via activation of NF-kappaB. *J. Immunol.* 175:7447-7456.
- Johnson E. H., Muirhead D. E., Windsor J. J., King G. J., Al-Busaidy R., Cornelius R.** 1999. Atypical outbreak of caprine cryptosporidiosis in the Sultanate of Oman. *Vet. Rec.* 145:521-524.
- Kváč M., Ondráčková Z., Květoňová D., Sak B., Vítovec J.** 2007. Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Vet. Parasitol.* 143:229-233.
- Lindsay D. S., Upton S. J., Owens D. S., Morgan U. M., Mead J. R., Blagburn B. L.** 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J. Eucaryot. Microbiol.* 47:91-95.
- Mosier D. A., Cimon K. Y., Kuhls T. L., Oberst R. D., Simons K. R.** 1997. Experimental cryptosporidiosis in adult and neonatal rabbits. *Vet. Parasitol.* 69:163-169.

Munoz M., Alvarez M., Lanza I., Carmenes P. 1996. Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. *Epidemiol. Infect.* 117:203-211.

Munzarová L. 2012. Detekce kryptosporidií pomocí molekulárních metod v klinických vzorcích: infekce nebo pasáž oocyst zaživacím traktem hostitele? Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Zdravotně sociální fakulta. 58 s.

Němejc K., Sak B., Květoňová D., Kernerová N., Rost M., Cama V. A., Kváč M. 2013. Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices. *Parasitol. Res.* 112:1143-1154.

Pantenburg B., Castellanos-Gonzalez A., Dann S. M. 2010. Human CD8(+) T cells clear *Cryptosporidium parvum* from infected intestinal epithelial cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82:600-607.

Pantenburg B., Dann S. M., Wang H. C. 2008. Intestinal immune response to human *Cryptosporidium* sp. infection. *Infect. Immun.* 76:23-29.

Paraud C., Pors I., Journal J. P., Besnier P., Reisdorffer L., Chartier C. 2011. Control of cryptosporidiosis in neonatal goat kids: efficacy of a product containing activated charcoal and wood vinegar liquid (Obioneck) in field conditions. *Vet. Parasitol.* 180:354-357.

Pavlásek I., Lávicke M., Tumová E., Skrivan M. 1996. Spontaneous *Cryptosporidium* infection in weaned rabbits (Article in Czech). *Vet. Med. (Praha)* 41:361-366.

Radostits O. M., Gay C. C., Hinchcliff K. W., Constable P. D. 2007. Diseases of the newborn. In: *Veterinary medicine*. 10th edn. WB Saunders Company Ltd. London. s 127-160.

Rieux A., Paraud C., Pors I., Chartier C. 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned kids in a dairy goat farm in western France. *Vet. Parasitol.* 192:268-272.

Robinson G., Chalmers R. M. 2010. The European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), a source of zoonotic cryptosporidiosis. *Zoonoses. Publ. Health.* 57:1-13.

Sweeny J. P., Ryan U. M., Robertson I. D., Jacobson C. 2011. *Cryptosporidium* and *Giardia* associated with reduced lamb carcase productivity. *Vet. Parasitol.* 182:127-139.

Taylor M. A., Catchpole J., Norton C. C., Green J. A. 1994. Variations in oocyst output associated with *Cryptosporidium baileyi* infections in chickens. *Vet. Parasitol.* 53:7-14.

Tomanová V. 2017. Přítomnost specifické DNA a koproantigenu kryptosporidií jako indikátor probíhající infekce. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Zemědělská fakulta. 53 s.

Xiao L., Ryan U. M., Graczyk T. K., Limor J., Li L., Kombert M., Junge R., Sulaiman I. M., Zhou L., Arrowood M. J., Koudela B., Modrý D., Lal A. A. 2004. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:891-899.

Yousof H. S., Khater M. M., El-Sayed S. H., El-Badry A. A. 2017. Diagnostic biomarkers in murine *Cryptosporidiosis*: dose- and age-related infection. *J. Parasit. Dis.* 41: 831-836.

Zhou R., Gong A. Y., Eischeid A. N. 2012. miR-27b targets KSRP to coordinate TLR4-mediated epithelial defense against *Cryptosporidium parvum* infection. *PLoS Pathog.* 8:e1002702.

Zhou R., Hu G., Liu J. 2009. NF-kappaB p65-dependent transactivation of miRNA genes following *Cryptosporidium parvum* infection stimulates epithelial cell immune responses. *PLoS Pathog.* 5:e1000681.

Diverzita, fylogeneze a biologie kryptosporidií infikujících hlodavce rodu *Apodemus*

Autorka: Ing. Šárka Čondlová

23. 11. 2018

Vědecká rozprava

prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

*Je zřejmé, že znalosti týkající se diverzity a biologických vlastností parazitů rodu *Cryptosporidium* se budou i u dalších druhů zvířat stále rozšiřovat a tak přibývat. Jaký to bude mít praktický dopad?*

- Tyto informace by mohly napomoci k nalezení léčebného přípravku proti kryptosporidióze.
- Předpokladem k tomu je znalost jednotlivých vývojových stadií kryptosporidií.

Při obhajobě jste zmínila, že kryptosporidie mohou vyvolávat chronické infekce. Mohou způsobit i infekce jiné?

- U akutních případů dochází u imunokompetentních jedinců po 1 týdnu k samovyléčení. U HIV pozitivních jedinců dochází k silným a úporným průjmům a následné dehydrataci.

prof. MVDr. Daniela Lukešová, CSc.

Jakým způsobem je možné zajistit biologickou bezpečnost vody?

- Například pomocí ultrafialového záření nebo ionizace.

doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

Vyjádřil se ke stanovení školitele. Konstatoval, že vystihuje vysoké nároky prof. Ing. Martina Kváče, Ph.D. na disertační práce.

prof. MVDr. Daniela Lukešová, CSc.

Shledala, že jí v disertační práci i při obhajobě chybělo stanovení hypotéz, a konstatování, zda byly hypotézy potvrzeny nebo vyvráceny.

doc. Dr. Ing. Zdeněk Havlíček

U telat se často vyskytují zdravotní problémy v souvislosti s výskytem kryptosporidií. Jaké možnosti dezinfekce byste u nich volila?

- Pro telata je z hlediska zdravotního stavu nejlepší individuální venkovní ustájení. Dezinfekce se může provádět např. parou nebo plamenem.

prof. MVDr. Daniela Lukešová, CSc.

Mohla byste vysvětlit termíny „prepatentní perioda“ a „inkubační doba“?

- Prepatentní perioda je doba od vstupu infekčního stadia do organismu hostitele až do prvních příznaků infekce.
- Inkubační doba představuje období mezi vstupem nákazy do organismu a vypuknutím nemoci.

doc. Ing. Naděžda Kernerová, Ph.D.

*V disertační práci zmiňujete, že v případě *C. parvum* lze na základě výsledků experimentální infekce konstatovat, že hlodavci rodu *Apodemus* nejsou primárními hostiteli tohoto druhu, nicméně že za určitých podmínek mohou být k infekci tímto druhem vnímaví. Jaké konkrétní podmínky to jsou?*

- K infekci může docházet především při snížené imunitě jedince, když je jedinec vystaven stresu a při vystavení dalších nepříznivých podmínek.



Zapsala: doc. Ing. Naděžda Kernerová, Ph.D.