

Mikrosporidiové infekce *Encephalitozoon cuniculi* genotypem II a III u imunokompetentních a imunodeficientních hostitelů

Zvýšený zájem o studium mikrosporidií jakožto ubikvitárních mikroorganismů má bezpochyby souvislost s nárůstem výskytu lidského onemocnění syndromem získané imunodeficience (AIDS), kdy se oportunní mikrosporidiové infekce s průjmy a systémovým onemocněním pacientů s AIDS dostaly do zorného pole nejen vědy, ale především lidské medicíny. Do té doby byly mikrosporidie známy jen jako běžní paraziti zvířat a hmyzu, kteří se u lidí vyskytují spíše sporadicky. Avšak s érou onemocnění AIDS se postavení mikrosporidií zásadně změnilo. Tyto organismy jsou dnes známy jako původci oportunních infekcí u jedinců s imunodeficiencí.

Vzhledem k tomu, že průběh a závažnost tohoto onemocnění závisí kromě druhu a genotypu parazita zejména na stavu imunitního systému hostitele je zřejmé, že rozvoj léčebných technik, které jsou zaměřené právě na modulaci imunitního systému a to zejména ve smyslu potlačení jeho aktivity např. u pacientů při transplantaci, při léčbě některých autoimunitních onemocnění (nespecifické střevní záněty, roztroušená skleróza) nebo nejen při biologické léčbě maligních onemocnění (leukémie, lymfomy), s sebou přináší riziko ohrožení ne nepodstatně velké skupiny sekundárně imunodeficientních pacientů tímto patogenem.

Informace získané z přirozené i experimentální infekce laboratorních zvířat poskytují základ pro porozumění vztahu hostitel – parazit při mikrosporidiovém onemocnění člověka.

Dr. Kotková ve své práci srovnává průběh mikrosporidiózy u imunokompetentních a imunodeficientních myších hostitelů, zaměřuje se nejen na hostitele, ale také na patogena a jeho schopnost vyvolat závažné onemocnění v závislosti na jeho genotypu. K infekci si vybrala mikrosporidii *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II a III, jakožto oblíbený modelový organismus při studiu mikrosporidiové infekce, který lze úspěšně kultivovat *in vitro*. Mnoho z toho, co je o patogenезi mikrosporidiové infekce známo, je založeno na experimentální infekci laboratorních zvířat právě tímto druhem. V neposlední řadě věnuje pozornost také transplacentárnímu přenosu tohoto patogena.

Předložená práce rozsahu 1055 stran je psána srozumitelným jazykem s minimem

chyb a překlepů. Je klasicky členěna do jednotlivých kapitol pro tuto práci typických – *Úvodní literární přehled, Cíle práce, Shrnutí výsledků a diskuze, Závěry, Publikace, z nichž vychází tato práce a Citovaná literatura.*

V úvodu je čtenář seznámen s tématem dizertační práce. Teoretický přehled poměrně podrobně zpracovává taxonomii, biologii včetně morfologie a životního cyklu mikrosporidií, samostatná kapitola je věnována v práci použitému druhu *E. cuniculi* zejména genotypu III. V kapitole Diagnostika mikrosporidií jsou podrobně popsány metody, jimiž lze přímo či nepřímo diagnostikovat přítomnost mikrosporidií v napadených organismech, od těch základních mikroskopických po molekulární až po stanovení specifických protilátek. V kapitole *Mikrosporidiové infekce vs. imunita* je přehledně zdokumentován recentní pohled na tuto problematiku. Jak je patrné z citované literatury, dr. Kotková se svými spolupracovníky významně přispěli do této mozaiky právě svými publikovanými (i nepublikovanými) výsledky. Závěr této části disertační práce je věnován modelovým organismům jako hostitelům, které byly při studiu použity.

Cíle práce jsou stanoveny jasně a jednoznačně a shodují se s cíli jednotlivých publikací.

Z výsledkové části této práce, která je spojena s jejich diskuzí, je patrné, že průběh infekcí způsobených *E. cuniculi* závisí nejen na stavu imunity hostitele, ale také na infekční dávce a genotypu této mikrosporidie, tíže infekce, tedy smrtnost myší však není dána rychlejším nástupem infekce a vyšší pozitivitou napadených orgánů těchto hostitelů. Bylo také prokázáno, že mikrosporidie *E. cuniculi* jsou schopné přežít v orgánech imunokompetentního myšího hostitele v dostatečném množství, takže po imunosupresi, resp. vysazení léčby hostitele jsou mikrosporidie schopny infikovat další orgány, což by při radikálním snížení imunity mohlo vést k rozvoji závažné mikrosporidie u takto imunodeficientního hostitele. Účinek použité léčby byl tedy u imunokompetentních myší jen dočasný, u imunodeficientních pak vede pouze k prodloužení života infikovaných myší o několik týdnů. Jak naznačují výsledky celé řady renomovaných pracovišť i výsledky Dr. Kotkové a spol., jako kritická pro zvládnutí mikrosporidie se jeví buněčná imunita, v tomto případě zastoupená cytotoxickými CD8⁺ T lymfocyty. A v neposlední řadě tato práce spíše prokazuje možný transplacentální přenos parazita u imunokompetentních myší.

Měla bych na autorku 2 dotazy:

- ✓ Mohla byste prosím navrhnout schéma patogeneze infekce *E. cuniculi* na základě dosud známých a potvrzených výsledků studia této problematiky?
- ✓ Myslíte si, že infekční dávka hraje zásadní roli při infekci jak imunokompetentního, tak imunodeficientního hostitele? A je pro mikrosporidie vůbec definována nějaká

minimální infekční dávka?

Předložená disertační práce RNDr. Michaely Kotkové, Dis. je po stránce formální i faktické spis, který splňuje standardní požadavky kladené na dizertační práce na Zemědělské fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Sepsáním této práce a zejména pak předložených publikací v impaktovaných časopisech Dr. Kotková prokázala svou schopnost analytického a vědeckého přístupu ke studiu dané problematiky. Práci jednoznačně doporučuji k obhajobě a po jejím úspěšném absolvování také udělení akademicko - vědeckého titulu Ph.D. (philosophiae doctor).

V Českých Budějovicích, 12.9.2019.



RNDr. Pavlína Tinavská, PhD.



Oponentský posudek na disertační práci

RNDr. Michaely Kotkové DiS.

Mikrosporidiové infekce vyvolané *Encephalitozoon cuniculi* genotypem II a III u imunokompetentních a imunodeficitních hostitelů

Předložená práce je založena především na 5 publikacích, z nichž 4 jsou prvoautorské. Práce jsou publikovány ve kvalitních časopisech (IF 1,719 Exp Parasitol a a 2,755 Parasite Immunol). Kromě těchto prací je uvedena též publikace vzešlá z magisterské práce a přiložen seznam dalších 4 publikací, věnovaných jiným tématům. V souladu s požadavky je práce doplněna komentářem k publikacím, zaujímajícím 44 stran.

Protože jednotlivé práce prošly náročným recenzním procesem, zaměřím se zejména na komentář a závěry. Komentář začíná historií popisu mikrosporidií a jejich charakteristikou a dále se zaměřuje zejména na druhy infikující savce.

Zvláštní pozornost je věnována genotypům mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi*, zejména v 1 z prací studovaným rozdílům průběhu infekce genotypy II a III.

Přehledně je zpracován výčet diagnostických metod pro zjištění mikrosporidiových infekcí. Snad by měla být, vzhledem ke vzrůstajícímu významu, více rozvedena část věnující se molekulární diagnostice.

Další část je věnována přenosu mikrosporidií, obzvláště transplacentárnímu. Na str. 29, v odstavci „Koně a malí přežvýkavci“ jsem našel informace o transplacentárním přenosu mikrosporidií u koní a lam. Upozorňuji, že lamy patří do podřádu Tylopoda (velbloudi) a nikoliv do Ruminantia (přežvýkavci). Skutečnost, že také přežvykují, nehraje v systematickém zařazení roli.

Nejpodrobněji je pojednána část týkající se vztahu imunitního systému k mikrosporidiovým infekcím a modelovým zvířatům používaným pro studium této problematiky, zejména imunokompetentním a imunodeficientním myším.

V části III jsou shrnuty a diskutovány výsledky přiložených publikací: shrnutí je stručné, věcné a srozumitelné. Výsledky jsou konfrontovány s literárními prameny týkajícími se tématu; velmi mne však udivilo, že schází celý soubor prací pocházejících z laboratoře prof. Marie Anety Lallo z University Sao Paulo. Přitom, řada výsledků získaná tímto kolektivem se s obhajovanými výsledky dost shoduje a konfrontace odlišností by asi napomohly lepšímu pochopení této nejednoduché problematiky. Ani se mi nechce věřit, že by v dnešním digitálním světě a snadného přístupu k databázím mohly následující citace uniknout pozornosti:

Lallo MA, Santos MJ, Bondan EF, 2002: Experimental *Encephalitozoon cuniculi* infection in dexamethasone-immunosuppressed mice. Revista de saúde publica 36 (5), 621-626

Lallo MA, Bondan EF, 2005: Experimental meningoencephalomyelitis by *Encephalitozoon cuniculi* in cyclophosphamide-immunosuppressed mice. Arquivos de neuro-psiquiatria 63 (2A), 246-251

Lallo MA, MPM Hirschfeld, 2012: Encephalitozoonosis in pharmacologically immunosuppressed mice, Experimental parasitology 131 (3), 339-343

Lawlor EM, Moretto MM, Khan IA. 2010: Optimal CD8 T-cell response against *Encephalitozoon cuniculi* is mediated by Toll-like receptor 4 upregulation by dendritic cells. Infect Immun.; 78(7):3097-3102. PMID:20421379

Lallo MA, LFV da Costa, JM de Castro, 2013: Effect of three drugs against *Encephalitozoon cuniculi* infection in immunosuppressed mice. Antimicrobial agents and chemotherapy 57 (7), 3067-3071

da Costa LF, Alvares-Saraiva AM, Dell'Armeline Rocha PR, Spadacci-Morena DD, Perez EC, Mariano M, Lallo MA. 2017: B-1 cell decreases susceptibility to encephalitozoonosis in mice. Immunobiol.: 222(2): 218-227. PMID: 27707513

Moysés, CRS, LFV Da Costa, EC Perez, JG Xavier, DD Spadacci-Morena, 2018: Cyclophosphamide immunosuppressed Xid mice model clarify the protective role of B cells in experimental encephalitozoonosis. BioRxiv, 430256



Na druhou stranu, protože Míšu i jejího školitele znám, nepodezírám je, že by výsledky týmu zabývajícího se podobnou problematikou jako oni, záměrně ignorovali. Věřím, že se to při obhajobě vysvětlí.

Připomínky mám i k následující části IV Závěry. Postrádám tam určitou míru zobecnění. Některé závěry přece mohou být hypotézou, která bude v budoucnu potvrzena či vyvrácena. Lze přece předpokládat, že co se např. prokázalo u myši, bude platit pro aspoň některé další savce apod. Kvůli tomu jsou přece používána modelová zvířata!

Nejdřív jsem začal sám závěry přeformulovávat, začal jsem u posledního: „Experimentálně byl jednoznačně prokázán transplacentární přenos savčích mikrosporidií u imunodeficitních či imunosuprimovaných zvířat.“ (*ostatní informace obsažené v původní formulaci jsou dohledatelné v předchozím textu*). Poté jsem se rozhodl požádat studentku, aby se pokusila podobným způsobem zobecnit i ostatní závěry a zařadila to do prezentace obhajoby.

Dotazy:

1. Nenapadlo vás s odstupem času nějaké logické vysvětlení skutečnosi, že ačkoliv genotyp II *E. c.* infikuje méně orgánů s menší intenzitou než genotyp III, přesto hostitele zabíjí dříve? Nemá třeba afinitu k nějaké životně důležité tkáni?
2. Přestože bylo v této práci i v řadě dalších experimentů a pozorování prokázáno, že *Encephalitozoon* může infikovat (a infikuje!) imunokompetentní hostile bez vyvolání patologických změn, existují případy klinicky zjevných infekcí imunokompetentních jedinců. U lidských případů se to vysvětluje koinfekcí jiným agens či podobnou příčinou (zánět po transplantaci) – jde ovšem o ojedinělé případy. Jak si vysvětlit někdy hromadné klinicky manifestní mikrosporidie zviřat (konkrétně encefalitozoonózy polárních lišek v kožešinových chovech či infekce králíků)?
3. Na str. 43 je fumagilin označen kvůli malé citlivosti mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* k albendazolu za „lék první volby“. Vzápětí je však zmíněna jeho toxicita. Jak tedy máme tomu označení rozumět? Opírá se to o nějakou studii, kdy byl fumagilin proti encefalitozoonóze úspěšně nasazen? (pokud ano, chybí citace). Domnívám se, že právě z výsledků obhajované práce vyplývá, že lékem první volby má zůstat albendazol. Praxe, kdy je používán, dokazuje, že k léčebnému efektu není třeba eradikace infekce, že stačí snížení intenzity. Vyplývá to i z výše popisovaných experimentů, ne?

Přes moje drobné výtky práci hodnotím kladně. Nemohu si však odpustit připomínku, že kvalitnímu obsahu má odpovídat i kvalitní forma: v tomto případě nebyla věnována dostatečná péče jazykové stránce. Nalezl jsem řadu překlepů i mluvnických chyb, některé z nich se opakují. Už v samotné anotaci, která by měla být psána s obzvláštní péčí, se setkáváme s chybným tvarem zájmena „jenž“ (první řádek) a s anakolutem (poslední věta 1. odstavce). Naopak, pouze v anotaci je použito správné zájmeno „transplacentární“, kdežto v dalším textu je (bohužel mnohokrát!) používáno nesprávné „tranplacentální“ (skutečnost, že stejnou chybu udělali mnozí jiní, není argumentem, stačí si vyhledat slovo „placenta“ s odvozeninami ve slovníku cizích slov. Pokud jde o nezvládnutí skloňování „jenž“ (časté v dalším textu), jednoduchá rada zní: používat raději jednodušší zájmeno „který“. Pokud jde o shodu podmětu s přísudkem, tam lze doporučit více pozornosti při kontrole.



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

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

Závěrem konstatuji, že předložená práce bezesporu splňuje všechny požadavky kladené na disertační práci studijním řádem ZF a souhlasím, aby po její obhajobě byl Michaele Kotkové udělen titul Ph.D.

České Budějovice 13.9. 2019

Doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc



Oponentský posudek na disertační práci

autor disertační práce: **RNDr. Michaela Kotková, DiS.**

školící pracoviště: **Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta**

školicel: **prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.**

název práce: **Mikrosporidiové infekce vyvolané *Encephalitozoon cuniculi* genotypem II a III u
imunokompetentních a imunodeficientních hostitelů**

oponent: **doc. Ing. Jaroslav Vadlejch, Ph.D.**

pracoviště: **Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních
zdrojů, katedra zoologie a rybářství**

Dr. Kotková předložila disertační práci založenou na čtyřech vědeckých publikacích, u třech z nich je hlavní autorkou a u jedné je druhou autorkou. Splnila tak požadavek na vytvoření kompilační práce.

Na základě zkušeností s disertačními pracemi kompilačního typu z českých, či zahraničních univerzit, mám obecné doporučení k členění tohoto typu závěrečných prací. Publikované práce by měly logicky předcházet kapitole Shrnutí výsledků, aby si je čtenář mohl prostudovat ještě před jejich zhodnocením autorem disertace.

V práci se vyskytují formální nedostatky ve formě překlepů (např. str. 30 „....mikroskopicky rozlišitelné...“, „...případ poptratu“, str. 34 „...přímá citotixicita...“), nespisovné výrazy (např. str. 34 „...CD4+ hrajou...“, str. 36 „...s monoklonárními a polyklonárními protilátkami...“), či nedodržení standardních pravidel pro úpravu dokumentů (za číslicí u názvu kapitoly se již neuvádí tečka a každá kapitola v práci musí být číslována – není dodrženo v kapitole 1.5.1 a není tudíž ani uvedeno v automaticky vygenerovaném obsahu práce). Formální nedostatky se objevují i v seznamu citované literatury (např. chybné abecední řazení autorů – Salát by měl následovat až po Sakovi, překlepy např. str. 91 „Frazen, 2004 Trends Patasitol“, str. 101 Šterzl ... nesrozumitelná citace, apod.), po jehož prostudování je zřejmé, že autorka jednotlivé práce vkládala ručně. Aby se předešlo takovému



zbytečných chybám, doporučuji k tomuto účelu použít odpovídající software (např. EndNote). Výše jmenované nedostatky spíše kazí dojem, než aby snižovaly kvalitu disertační práce.

Vlastní disertace začíná kapitolou Úvodní literární přehled, která poskytuje informace o biologii, diagnostice, přenosu mikrosporidií a imunologii mikrosporidiosis. Doporučil bych však spíše tradiční členění na kapitoly Úvod a Literární přehled. Tematické okruhy, kterými se tato část disertace zabývá, nejsou, dle mého názoru, dostatečně zpracované. Většinou jsou zbytečně úzce zaměřené a chybí jim určitý nadhled a obecné shrnutí, které jsou právě pro tento typ závěrečné práce podstatné. Zcela chybí např. jakákoliv zmínka o patogenním působení parazita nebo symptomatologii onemocnění. S většinou těchto informací potřebných k řádnému pochopení problematiky se čtenář seznámí až po prostudování přiložených publikovaných článků.

Po prostudování výsledků disertační práce lze konstatovat, že stanovené cíle práce byly splněny. Pro realizaci cílů studentka využila řadu metodických přístupů, od tradičních metod experimentální parazitologie až po moderní molekulárně biologické techniky. Oceňuji především značně náročné postupy spojené s transplacentárním přenosem. Použité metodiky jsou v dané oblasti výzkumu celosvětově akceptované a jsou vhodné k dosažení relevantních výsledků. K odborné části práce nemám připomínky.

K autorce disertační práce mám následující otázky:

1. Jaké metody se standardně používají pro diagnostiku encefalitozoonózy / mikrosporidiosis v humánních laboratořích a jaká je jejich prevalence v České republice?
2. Jsou některé druhy/skupiny živočichů vnímavější k mikrosporidiosis a proč?
3. Jaká je rezistence sporů *E. cuniculi* / mikrosporidií vůči environmentálním vlivům a existuje účinná prevence infekcí vyvolaných těmito parazity?

Po celkovém zhodnocení a přes výše uvedené formální nedostatky předložené disertační práce konstatuji, že studentka prokázala schopnost vědecky uvažovat nad daným problémem, s využitím vhodných metod dosáhnout vytyčených cílů a vlastní výsledky kriticky diskutovat s výsledky ostatních autorů. Dr. Kotková získala a publikovala velmi zajímavá data, díky kterým bude možné lépe pochopit



Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

katedra zoologie a rybářství

Česká zemědělská univerzita v Praze
Kamýcká 129, 165 00 Praha – Suchbát

Česká republika

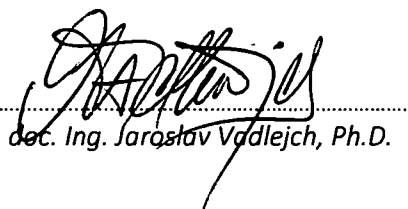
Tel.: +420 224 383 061

e-mail: malal@af.czu.cz

biologii mikroskopiridií i infekcí, které tyto paraziti vyvolávají. Význam její práce nespočívá pouze ve vědecké rovině, ale přesahuje i do praxe.

Doporučuji disertační práci podstoupit obhajobě a po zodpovězení výše uvedených otázek a připomínek dr. Michaela Kotkové udělit akademicko-vědecký titul philosophiae doctor (Ph.D.).

V Praze, 4. září 2019



doc. Ing. Jaroslav Vadlejch, Ph.D.