



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: RNDr. Michaela KOTKOVÁ
Narozen(a): 3. 3. 1983 Český Krumlově
Studijní program: Zootechnika
Studijní obor: Zoohygiena a prevence chorob hosp. zvířat
Forma studia: Kombinovaná
Školící pracoviště: KZVE ZF JU v Č. Budějovicích
Datum a místo konání zkoušky: 20. 9. 2019, ZF JU v Č. Budějovicích
Zkušební termín č.: 1.

Název disertační práce:

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

Výsledek obhajoby:

Prospěl (a)

Neprospěl (a)

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	doc. Dr. Ing. Zdeněk Havlíček; Mendelova univerzita v Brně, AF	
Členové:	doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.; PřF JU v Č. Budějovicích (oponent)	
	RNDr. Pavlína Tínavská, Ph.D.; Nemocnice a.s v Č. Budějovicích (oponent)	
	doc. Ing. Naděžda Kernerová, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	doc. Ing. Jaroslav Vadlejš, Ph.D.; ČZU v Praze, FAPPZ (oponent)	
	prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	MVDr. Lada Hofmannová, Ph.D.; VFU Brno	
	doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
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: RNDr. Michaela KOTKOVÁ
Narozen(a): 3. 3. 1983 v Českém Krumlově

Studijní program: Zootechnika
Studijní obor: Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat
Forma studia: Kombinovaná

Výsledek hlasování:

Počet členů komise: 8

počet platných hlasů: 7

počet neplatných hlasů: 0

počet přítomných členů komise: 7

kladných: 7

záporných: 0

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	doc. Dr. Ing. Zdeněk Havlíček; Mendelova univerzita v Brně, AF	
Členové:	doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.; PřF JU v Č. Budějovicích (oponent)	
	RNDr. Pavlína Tinavská, Ph.D.; Nemocnice a.s v Č. Budějovicích (oponent)	
	doc. Ing. Naděžda Kernerová, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	doc. Ing. Jaroslav Vadlejš, Ph.D.; ČZU v Praze, FAPPZ (oponent)	
	prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	MVDr. Lada Hofmannová, Ph.D.; VFU Brno	
	doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	

Obhajoba disertační práce RNDr. Michaely KOTKOVÉ, DiS. (20. září 2019, ZPCHHZ)

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

(čas: 10.00 hod., místnost Vědecké rady ZF JU, pavilon M)

Otázky opomentů:

RNDr. Pavlína Tinavská, PhD.

✓ Mohla byste prosím navrhnout schéma patogeneze infekce *E. cuniculi* na základě dosud známých a potvrzených výsledků studia této problematiky?

- inhalace, ingesce, přes placentu
- přenos makrofágy, krví, infekce buněk v bezprostředním okolí
- infekce makrofágů – aktivace TH1 imunitní odpovědi
- vzájemná interakce NK buněk, makrofágů a lymfocytů

✓ Myslíte si, že infekční dávka hraje zásadní roli při infekci jak imunokompetentního, tak imunodeficientního hostitele? A je pro mikrosporidiózu vůbec definována nějaká minimální infekční dávka?

- Ano. Čím nižší infekční dávka, tím je pomalejší nástup infekce.

Z nepublikovaných výsledků naší laboratoře vyplynulo, že již 1 infekceschopná spora může být pro imunodeficientního jedince infekční. Imunokompetentní hostitel si s infekcí velmi dobře a rychle poradí.

1. otázka – bez dotazů

2. otázka – bez dotazů

doc. Ing. Jaroslav Vadlejch

✓ Jaké metody se standardně používají pro diagnostiku encephalitozoonózy / mikrosporidiózy v humánních laboratořích a jaká je jejich prevalence v ČR?

- v humánní medicíně není diagnostika zavedena, většinou spolupráce s odbornými pracovišti
(Státní veterinární ústav v Praze, Veterinární laboratoř VLAB v Brně)

- vyšetření serologické, případně PCR, elektronová mikroskopie
- na to existuje jediná publikace, jejímž autorem je můj kolega ...kdy bylo molekulárně vyšetřeno 400 vzorků stolice a výsledek byl, že cca 40% populace ČR je pozitivní na mikrosporidie

✓ Jsou některé druhy / skupiny živočichů vnímavější k mikrosporidiosis a proč?

Na tuto otázku je možné nahlížet z mnoha hledisek. Za prvé

- na základě rozdílů v ITS sekvenci jsou rozlišovány 4 různé genotypy *E. cuniculi* mající jistou hostitelskou preferenci, ale tato specifická není striktní

Genotyp I je převážně nalézán u králíků, ale byl nalezen například i u člověka. Genotyp II, označován jako myší, je nejčastější genotyp nalézán u teplokrevných živočichů včetně člověka. Genotyp III způsobuje vysokou mortalitu u opic, pestrušek písečných a psů. A relativně nedávno (2010) objevený genotyp IV byl dosud nalezen u člověka, koček a psů.

Za druhé, obecně vnímavější jsou k infekcím způsobeným mikrosporidii lidé se sníženou imunitou, pacienti po transplantaci, pacienti s AIDS, oslabení nebo staří lidé, a cestovatelé.

za třetí, z hlediska kmene Mikrosporidia rozlišujeme několik druhů. Některé druhy jsou významnými hospodářskými parazity (např. *Nosema bombycis* je původce pébriny bource morušového, *Nosema apis* způsobuje úplavici včel, druhy rodu *Pleistophora* jsou původci mnoha infekcí ryb.

Například *Encephalitozoon hellem*, je mikrosporidií především u ptáků, hlavně papoušků, pštrosů, kolibříků a holubů, i když byl nalezen i u lidí s imunodeficiencí.

✓ Jaká je rezistence spor *E. cuniculi* / mikrosporidií vůči environmentálním vlivům a existuje účinná prevence infekcí vyvolaných těmito parazity?

- mikrosporidie jsou odolné v širokém rozmezí teplot; zvyšování nebo snižování teploty je devitalizují a snižují infektivitu spor. Dokáží přežít i technologické postupy při zpracování potravin

- jediná účinná prevence je vyšší teplota po delší dobu

1. otázka – bez dotazů

2. otázka – bez dotazů

3. otázka – doplňující otázky o technologických postupech při zpracování potravin

doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

✓ Nenapadlo vás s odstupem času nějaké logické vysvětlení skutečnosti, 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?

- Z grafů o parazitární zátěži bylo patrné, že *E. cuniculi* genotyp II se postupně přesouvá do orgánů mimo gastrointestinální trakt, zatímco EC III má více méně vyvážené rozložení, ale bohužel nejsme schopni posoudit, jestli to má vliv na přežívání myší

✓ 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)?

- tyto hromadné manifestní mikrosporidie bývají v uzavřených chovech zviřat. Hrají zde roli vnitřních a vnějších faktorů. Z vnitřních faktorů je třeba uvést genetická struktura populace, kdy většinou dochází k vzájemnému křížení zviřat. Z vnějších faktorů to bývá již zmíněná koinfekce s jinými patogeny (např. kokcidióza), stres zviřat, nevyvážená strava

Dobrym příkladem takové hromadné manifestní mikrosporidie, kdy došlo k postupnému úhynu celé skupiny pestrušek pisečných jedné chovatelky. Jako příčina byla nalezena mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* genotyp III. Ostatní skupiny byly na parazita negativní (Hofmannová a kol., 014).

✓ 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?

- jedná se o nedorozumění, na straně 43 je skutečně uvedeno, že albendazol je lékem první volby v případě infekcí způsobených mikrosporidii rodu *Encephalitozoon*. V případě léčby infekcí způsobených *Enterocytozoonem bieneusi* je používán fumagilin.

1. otázka – bez dotazů

2. otázka – Ditrich: problém u králíků, často je mikrosporidie milně diagnostikována (dodaly ledviny z údajně pozitivního králíka na mikrosporidie, ale přítomnost parazita se neprokázala.

Kvác: u pestrušek se jednalo o kmen EC III, který byl následně v laboratoři používán k experimentům. Pouze 1 skupina z několika dalších skupin pestrušek byla na mikrosporidie pozitivní.

3. otázka – Kotková vyvrátila tento dotaz.

Ditrich: Používá se u *Enterocytozoonu* Fumagill? Kotková: ano. Příklad studie u lidí, kde se tento lék používal. Bylo zaznamenáno mnoho nežádoucích účinků, a i přesto se v léčbě pokračovalo. Dodání citace.

Tinavská: Z jaké země se tato citace pochází? Kotková: nevím.

Kvác jako příklad popisuje studii v Bostonu na dobrovolnících.

Kotková obhajuje správnost psaní transplacentární X transplacentální – oba pojmy jsou přípustné.
Ditrich: mělo by to tedy být v práci sjednocené.

Ditrich: citace z univerzity v San Paulo vymizely. Kotková se omluvila, že to nebyl úmysl.

Diskuze:

RNDr. Pavlína Tinavská, PhD.

Jak si máme vysvětlit u HIV pacientů rozvoj oportunní infekce? Je to problém na straně imunitního systému u CD4 a CD8 – imunita je komplex a problém nastává, pokud nebude správně fungovat, například nastane zánět.

doc. Ing. Jaroslav Vadlejš

1. Jaká je citlivost molekulárních metod, jak moc jsou schopny odhalit intenzitu infekce. Kotková: PCR 100 oocyst na gram tkáně či trusu, RT 10 oocyst na gram tkáně

2. Je možné, že molekulární metody nejsou schopny detekovat mikrosporidie? Jsou opravdu myši před zahájením experimentu negativní? Kotková odpovídá příkladem u EC II u Balb/c vs. Léčba (DOPIŠ SI TO PROSÍM). Kváč: Během experimentu byly vždy zabity v týdenním intervalu i negativní myši a nikdy se v nich neprokázala mikrosporidiová infekce. Navíc myši jsou chovány v izolátorech.

3. Jaká je přirozená infekce mikrosporidii u zvířat v přírodě?

Kváč: ptáci 50-60 %, skot: do 10%, u hlodavců to nikdo nesledoval, prasata 50% v závislosti na typu chovu

4. Dojde při léčbě ke snížení infekce napří pomocí methanolových extraktů? Kotková: byly na to prováděny studie IN VITRO. Sak: I studie IN VIVO pomocí methanolových (nejúčinnější) a vodných extraktů.

Prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

U králíků diagnostikovali mikrosporidiozu na základě neurologických příznaků. Byly zjevné příznaky i u sledovaných myši? Kotková: u EC II byly u SCIDů sledovány průjmy, zjevení srsti, u Ec III nebyly žádné příznaky

U králíků jsou běžné transplacentální přenosy mikrosporidií. Sak: Otázka je, jestli jde o transplacentální přenos, nikdo to u králíků nezkoumal. Mláďata se mohla nakazit od matky. Proto jsme provedli experimenty na transplacentální přenos (císařské řezy, přikládání mláďat od pozitivní matky k negativní).