

## Věková specifita kryptosporidií infikujících prasata

Martina se ve své práci zabývala určením věkové specifiity kryptosporidií u prasat a to zejména s využitím molekulárně biologických metod. Věnovala se ale i morfologickému porovnání dvou nejčastějších prasečích kryptosporidií a také určením lokalizace vývojového cyklu v hostiteli.

Práce je po formální a zejména po věcné stránce velmi zdařilá. Úvod práce je rozsáhlou literární rešerší, která přesahuje rámec zadání magisterské práce. Diplomantka získala velké množství dat, které dokázala správně analyzovat. Metodicky je práce také velmi obsáhlá. Na práci nejvíce cením zjištění, že *Cryptosporidium suis* je infekční pro všechny věkové kategorie a důkaz nespolehlivosti PCR-RFLP metody.

K práci mám jen několik dotazů a připomínek:

- 1) Jak jsem předeslal výše, úvod je velmi kvalitní literární rešerší. Nicméně na jeho konci jsem očekával určitý nástin toho, co bude náplní řešeného problému, k čemu práce směřuje. Poslední věta sice formálně takovýto smysl má, ale práce se nevěnuje experimentálním infekcím, jak by mohlo být z této věty patrné.
- 2) Prokázala jste nespolehlivost diagnostiky pomocí RFLP u druhu, který je přítomen ve smíšené infekci a v nízké intenzitě. Je možné odhalit tento druh pomocí mikroskopického vyšetření (udáváte, že rozměrově je *C. suis* od *Cryptosporidium pig* genotype II možné odlišit)?
- 3) Podobná je i následující otázka: Od 9. do 12. týdne je prokázána nízká intenzita infekce; lze mikroskopicky odhadnout při smíšené infekci míru intenzity obou druhů, které se rozměrově nepatrně liší?
- 4) Lze nějak vysvětlit zajímavý časový průběh infekce *C. suis*, který jste v práci odhalila, tj. nástup a pokles *C. suis* a od 7. týdne znovu nástup tohoto druhu, kdy ve sledované skupině prasat byla prevalence ve 12. (posledním) týdnu více než 50%? V diskuzi jsem vysvětlení tohoto fenoménu trochu postrádal.
- 5) Prevalence obou druhů stoupaly až do 12. posledního sledovaného týdne stáří prasat. Máte nějaké další údaje jaký je průběh infekce po 12 týdnu? (Pozn.: otázka je spíše ze zvědavosti mimo rámec magisterské práce).
- 6) U designu druhově specifických primerů by bylo vhodné znázornit výsek alignmentu nebo alespoň uvést v kolika bazích se liší od ostatních známých druhů kryptosporidií, tzn. jak moc jsou specifické. Takovýto údaj je vhodný, i když výsledky ukázaly jednoznačnou specifitu pro dva zkoumané druhy.
- 7) Nástup infekce je zde zmiňován v souvislosti s detekcí oocyst v trusu. Toto působí dojmem, že do 7. dne nebyla selata infikovaná, přičemž v nich již musel probíhat vývoj kryptosporidií.
- 8) Na závěr si neodpustím již klasickou výtku k diplomovým pracím: sekvenovat SSU rDNA neznamena sekvenovat malou ribosomální podjednotku, ale gen pro RNA malé ribosomální podjednotky.

Práci přes vznesené připomínky vřele doporučuji k obhajobě a hodnotím známkou výborně.



Ivan Fiala

## Oponentský posudek k diplomové práci Bc. Marty Jeníkové

### „Věková specifita kryptosporidií infikujících prasata“

Bc. Martina Jeníková se ve své práci podrobně věnuje především dvěma nejběžnějším druhům / genotypům kryptosporidií u prasat, zejména se zabývá jejich přítomností u selat v závislosti na jejich věku. Problematice se věnuje důkladně, její výsledky mimo jiné potvrzují, že věk selat má skutečně významný vliv na parazitaci různými kryptosporidii a ukazuje, že mezi různými prasečími kryptosporidii existují morfologické rozdíly. Za velmi užitečnou součást práce považuji srovnání několika různých diagnostických metod – autorka prokázala, že zejména v případě koinfekcí jsou metody založené na druhově / genotypově specifických primerech mnohem spolehlivější než metody založené na RFLP, a že v případě málo intenzivních infekcí jsou obě výše zmíněné metody spolehlivější než mikroskopie.

Z formálního hlediska splňuje práce všechny nároky na diplomovou práci, tj. je přehledně členěna do kapitol, literární přehled čtenáře dostatečně uvádí do problematiky, text je vhodným způsobem doplněn obrazovou dokumentací, tabulkami, grafy, výsledky jsou podány jasně a v diskusi jsou srovnány s dalšími relevantními pracemi, citované práce jsou uvedeny v přehledu literatury, atd.

Jako snad v každé práci podobného rozsahu, i zde lze nalézt několik překlepů a chybek (např. „hostitelské specifiky“ místo „specifity“, str. 8, „duong“ místo „dugong“, str. 14, „byly pozorovány ... stadia“ místo „byla pozorována“). V jednom případě („osmi denních selat“ místo, jak se alespoň domnívám, „osmidenních selat“, str. 38) ona mezera navíc mění význam sdělení. Použitý fotoaparát asi neměl rozlišení „5,1 pixelů“ (str. 21), ale spíše asi milionkrát větší. Kromě těchto detailů bych autorku upozornil, že vzhledem ke komplexní stavbě ribosomálních podjednotek je vhodnější používat přesné označení „gen pro rRNA malé ribosomální podjednotky“ místo „gen pro malou ribosomální podjednotku“ a raději bych tento termín zkracoval jako „sekvence SSU rDNA“ místo dosti neformálního „sekvence malé ribosomální podjednotky“. A poslední kritická poznámka: i v případě použití specializovaného software (zde ClustalX) se sluší uvést jeho autory.

Z ostatních hledisek nemám k práci další výhrady, pokusy byly pečlivě naplánovány včetně různých typů kontrol a byly správně vyhodnoceny. Proto tuto práci **doporučuji k obhajobě** a doporučuji ji hodnotit známkou „výborně“.

Na autorku bych měl dva dotazy týkající se její práce:

1. V kapitole 5.3. uvádí, že intenzitu infekce stanovovala počítáním oocyst ve 30 zorných polích. Z celkového počtu zorných polí na sklíčko a známé hmotnosti vzorku natřeného na sklíčko pak stanovila OPG. Zajímalo by mne, jak zjišťovala počet zorných polí na sklíčko – pokrytí víceméně obdélníkové plochy preparátu kruhovými zornými poli beze zbytku není úplně triviální.
2. Z výsledků autorky vyplývá, že u starších selat, řekněme od desátého týdne věku, se víceméně ustaluje určitá, poměrně vysoká, prevalence obou zkoumaných kryptosporidií (viz např. graf 3). Má autorka nějaké, byť předběžné, údaje o situaci u dospělých prasat? Zejména co se týče výskytu *C. suis*, jež se u starších selat vyskytuje v koinfekci s pig genotype II?