

Oponentský posudek

Magisterská práce:

Mikrosporidiové infekce exotických ptáků

Předkládaná práce Denisy Kašíčkové se zabývá sledováním výskytu mikrosporidií u ptáků. Téma práce je v současnosti aktuálně studováno v několika evropských laboratořích a výsledky dosažené v této studii tak pomáhají dotvářet mozaiku o mikrosporidiích jako nezanedbatelných původcích oportunních infekcí člověka.

Členění práce vychází z klasického schématu magisterské práce, zahrnuje 47 stran textu, který je konfrontován s celkem 84 publikacemi.

V úvodu autorka podává ucelený přehled o mikrosporidiích, který se pak logicky zaměřuje na jejich výskyt a význam u ptáků. Během práce bylo vyšetřeno několik stovek vzorků od 146 druhů ptáků. Ve výsledcích bylo identifikováno několik desítek druhů ptáků jako nově poznáných hostitelů mikrosporidií. Tyto mikrosporidie byly následně podrobeny genotypizaci. V diskusi se pak autorka dobře a výstižně zabývá zhodnocením zoonotických genotypů mikrosporidií a posuzuje i správnost výsledků, které byly dosaženy pouze molekulární analýzou. Kladem práce je také důkaz o intermitentním vylučování spór mikrosporidií během důkladného vyšetřování 9 jedinců andulky vlnkované. Všechny vytyčené cíle práce tak byly splněny.

Autorka se nevyhnula několika gramatickým, psaným či terminologickým chybám, kterým se nevyhne prakticky nikdo v podobných pracích, a dovolím si na ně upozornit:

str. 5 – překlep - každém

str. 6 – místo citace Bart et el. má být Muller et al.

str. 7 – překlep - analýza

str. 16 – opakování již uvedené zkratky SSU-r DNA

str. 17/18 – přehození tab. č. 4 a 5

str. 31 – středník místo čárky

str. 38 – překlep – vzdálenosti

str. 44 – překlep – human pathogenic

Chtěl bych také upozornit na správné a jednotné používání termínů exotičtí, volně žijící a v zajetí chovaní ptáci.

V metodické kapitole mi chybí detailnější popis odběru vzorků, zda autorka vzorky odebírala sama či byly odebírány jednotlivými chovateli. Zejména by mě zajímal způsob odběru z výstavy Exota 2007 a zverimexů, jak bylo zajištěno, že nemohlo dojít k odběru vzorku jiného hostitele, např. v důsledku blízkosti klecí s ptáky různých druhů?

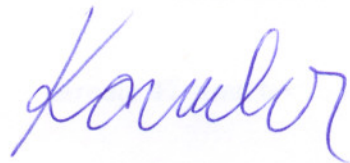
Také mi v metodikách chybí popis a užití statistického testu, jehož výsledky a diskuse se objevují v příslušných kapitolách. Protože se statistickým metodám exaktně nevěnuji, chtěl bych požádat o detailnější vysvětlení a interpretaci výsledků použitého testu.

Dále mi v metodice chybí přesnější zdůraznění, pro které vzorky a proč byla použita metoda RFLP. Na základě výsledků RFLP bych se pak chtěl autorky zeptat, která ze všech užitých metod se jí jeví jako nejlepší pro diagnostiku mikrosporidií v trusu ptáků?

I přes uvedené nejasnosti magisterské práce Denisy Kašíčkové tuto práci doporučuji k obhajobě.

V Brně 23.1. 2009

MVDr. Martin Kamler



Posudek na magisterskou diplomovou práci: „Mikrosporidiové infekce exotických ptáků“ autorky Denisy Kašičkové

Předložená diplomová práce se zabývá výskytem mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon* u ptáků chovaných v zajetí. Práce je podle mne výjimečná velkým množstvím zpracovaných vzorků (336) z různých zdrojů v České republice a jedné zahraniční ZOO, a také širokým spektrem hostitelských ptáků z devíti řádů. Denisa Kašičková se dále ve své práci zabývala genotypizací některých pozitivních nálezů a sledovala také vylučování spor devíti andulkami vlnkovanými po dobu 30 dnů.

Práci hodnotím jako velmi kvalitní – podrobný a pečlivě zpracovaný úvod, jasné cíle práce, velmi podrobná metodika, kvalitní a srozumitelně popsání výsledky a čtivá diskuze se spoustou literárních odkazů. Následující uvedené nedostatky považuji za minoritní nebo formální, jejich množství není velké.

Str. 7: je použit termín „ITS rRNA geny“ - ITS nejsou geny ale mezerníky

Str. 16: nejednotné užití zkratky - SSU-rDNA x SSU rDNA

Str. 16: špatné uvedení rychlosti beadbeateru – 6,5 otáček za minutu (rpm)

Str. 18: v seznamu použitých chemikálií pro PCR je uvedeno BSA, přičemž v tabulce 6 „Reakční směs pro PCR“ na následující straně BSA chybí

Str. 19: molekulárnický sleng – „gel obarvený ethidium bromidem“, není to přesný výraz, EtBr se přidává do gelu ne za účelem jeho obarvení, ale z důvodu jeho pozdější vazby na DNA, kterou je pak možno vizualizovat pod UV světlem.

Str. 20: nadpis kapitoly 3.2.7. nemusel být uveden v angličtině, existuje již zažitý český ekvivalent „Polymorfismus v délce restričních fragmentů“

Str. 21: „vzorky byly fixovány ve fixačním roztoku Davitson“. Správnější by bylo napsat „vzorky byly fixovány v Davidsonově fixačním roztoku“ (s d namísto t ve jméně Davidson). Nebo „vzorky byly fixovány ve fixačním roztoku dle Davidsona“

Otázky k metodice: Proč bylo použito pro jednu PCR reakci zrovna 0,63 jednotky Taq polymerázy? Zvykem bývá používat jednu jednotku pro objem 25 μ l. Byla PCR v předpokusech optimalizována ve smyslu optimalizace nasedací teploty primerů, doby nasedání primerů, koncentrace hořčíku atd?

Zásadní metodická potíž v oblasti diagnostiky druhů rodu *Encephalitozoon* je v absenci specifickým primerů pro *E. hellem* a *E. cuniculi*. Sama autorka je si tohoto problému vědoma a správně na něj upozornila v diskuzi, i když poměrně stručně. Tento nedostatek má pravděpodobně za následek ovlivnění výsledné hodnoty prevalence jednotlivých druhů rodu *Encephalitozoon*. A proto uvedené hodnoty prevalence u *E. hellem* a *E. cuniculi* nejsou zcela správné. Nezkoušela autorka navrhnout a otestovat diagnostické primery na *E. hellem* a *E. cuniculi*?

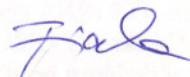
To, že se velmi často vyskytují smíšené infekce *E. hellem* a *E. cuniculi*, jenom potvrzují výsledky pokusu, ve kterém bylo sledováno vylučování spor u devíti andulek v průběhu 30 dnů. Ani v jednom z 59 pozitivních vzorků nemohla být identifikována smíšená infekce, přičemž sedm z devíti andulek vylučovalo jak spory *E. hellem* tak *E. cuniculi*. I tento pokus je tedy ovlivněn metodickou chybou.

Tento metodický nedostatek ale nepovažuji za významný vzhledem k hodnocení magisterské práce, ale je to námět k zamyšlení před tím než se začne sepisovat manuskript z této kvalitní práce. Publikace se zavedeným PCR testem na odlišení těchto dvou mikrosporidií by měla velkou šanci být často citována a byla by skvělým základem pro budoucí rigorózní práci.

Výsledky mohly být doplněny o obrázky gelů z RFLP. V diskuzi autorka zmiňuje právě tuto metodu jako možný způsob odhalení smíšených infekcí různými druhy rodu

Chtěl bych zdůraznit, že práce bezpochyby přispěla k obohacení velmi zajímavé a i aktuální tematiky spojené s mikrosporidiovými infekcemi ptáků. A přes vznesené připomínky práci doporučuji k obhajobě a hodnotím ji známkou 1.

V Českých Budějovicích, 20. 1. 2008



RNDr. Ivan Fiala, PhD.