



Oponentský posudek na magisterskou práci

Autorka: **Bc. Jana Ježková**

Název práce: **Diverzita kryptosporidií volně žijících hlodavců rodu *Rattus***

Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem kryptosporidií hlodavců a vyhodnocuje potenciální riziko přenosu infekce z těchto živočichů na člověka. Práce má celkem 60 stran a je členěna na kapitoly: Úvod, Literární přehled, Cíle práce, Materiál a metodika, Výsledky, Diskuze, Závěry a Literatura. V těchto oddílech autorka popisuje a diskutuje získaná data formou vědeckého sdělení. Práce je sepsána kvalitně, literární přehled obsahuje adekvátní informace. Autorka v rámci experimentální práce využila celou řadu metod zahrnujících purifikaci oocyst, jejich specifické barvení a genotypizaci molekulárními metodami, fylogenetické analýzy, experimenty se zvířaty, přípravu preparátů pro histologii a elektronovou mikroskopii. Během výzkumu autorka dospěla k celé řadě nových zjištění. Získaná data jistě poslouží jako podklad pro vytvoření vědecké publikace.

K práci mám následující připomínky a *dotazy*:

str. 17 a 26: Text a tabulky mohly být editovány jiným způsobem tak, aby nevznikalo prázdné místo.

str. 29: ... **zvířata byla odebírána** ... (vzorky byly odebírány)

str. 29 (druhý odstavec): editace mezer

str. 43: Anglický termín self-cure by mohl být uveden česky.

Str. 29 a 39: V práci jsem nenalezl informaci, kdy po infekci byly odebírány vzorky tkání pro histologické zpracování?

Str. 37: Autorce se podařilo detekovat kryptosporidie u experimentálně infikovaných zvířat pouze pomocí PCR, nikoli mikroskopicky. Je možné vyloučit pouhé opakované pasážování neživotaschopných parazitů nebo jejich DNA přes zažívací trakt zvířat? Byl někdy proveden experiment, kdy by se zvířatům podaly usmrcené kryptosporidie a následně by se vyšetřovala přítomnost parazita pomocí PCR? Jak dlouho by v takovém případě bylo možné DNA zachytit?

Str. 37 (Obr. 7): Množství záchytů specifické DNA se zdá být častější u rat genotypu I než u genotypu IV. Byl tento rozdíl nějak statisticky vyhodnocen? Má tento rozdíl nějaký biologický podklad v odlišnosti mezi oběma genotypy?

Str. 44. Autorka uvádí, že potkani a krysy jsou ideálními pasivními přenašeči pro šíření kryptosporidií, uvedena je však citace týkající se ptáků (Graczyk a kol. 1996). Byl fenomén možného pasivního přenosu potvrzen i pro hlodavce rodu *Rattus*? Pro jaké druhy kryptosporidií?

Autorka se při vlastní experimentální práci seznámila s celou řadou laboratorních metod. Sepsáním kvalitní diplomové práce prokázala schopnost samostatné práce s vědeckou literaturou.

Práci vnímám jako nadstandardní, **doporučuji ji k obhajobě** a hodnotím stupněm **výborně**.

V Brně 15. 5. 2017

RNDr. Jiří Salát, Ph.D.

Oponentský posudek na diplomovou práci **Jany Ježkové** „Diverzita kryptosporidií volně žijících hlodavců rodu *Rattus*“

Ve své magisterské práci se Jana Ježková zabývala diverzitou kryptosporidií u potkanů. Ve studii využila řadu laboratorních metod od purifikace oocyst, světelnou mikroskopii, skanovací elektronovou mikroskopii, histologii, experimentální infekce až po zásadní metodu getotipizace pomocí dvou molekulárních markerů SSU rDNA a genu pro aktin. Jana zpracovala obrovské množství vzorků (788) z různých geografických oblastí. Je obdivuhodné, že byla autorka schopna zadané téma při tak velkém množství metod a materiálu zvládnout během poměrně krátkého magisterského studia.

Práci považuji za velmi zdařilou jak po formální stránce tak hlavně po obsahové. Úvod je velmi pečlivou literární rešerší daného tématu, čímž autorka splňuje první bod ze čtyř cílů, které si klade splnit. Materiál a metody jsou velmi podrobné, místy na můj vkus až příliš. Např. popis gelové elektroforézy je jakoby opsaný laboratorní manuál („Zapnout zdroj a nastavit napětí...“). Nicméně to nepovažuji za nedostatek, určitě podle takto podrobných metod bude schopen začínající student zvládnout samostatně laboratorní práci. Výsledky jsou srozumitelně sumarizovány, vhodně doplněny o několik tabulek, obrazových tabulí a fylogenetických stromů. Musím pochválit i diskuzi, která pečlivě shrnuje a porovnává dosažené výsledky s publikovými daty.

K práci mám několik poznámek/připomínek a dotazů.

- 1) Z metodiky práce vyplývá, že všechny vzorky studentka získala sama. Bylo tomu tak? Pokud ne (což předpokládám, to by asi opravdu nešlo zvládnout), které vzorky sama autorka získala?
- 2) Z metodiky také není jasné jestli byla sekvenace prováděna v laboratoři nebo externí firmou.
- 3) Proč byly sekvence porovnány v Clastalu X a Bioeditu se sekvencemi z genové banky, když vlastní alignment byl proveden pomocí programu MAFFT?
- 4) Byla analýza (konstrukce stromů) genu pro aktin provedena na základě nukleotidových dat nebo aminokyselin?
- 5) Jaká byla délka amplifikovaného úseku SSU rDNA? Možná jsem tento údaj přehlédl, ale neměl by v práci určitě chybět, protože dává také představu o věrohodnosti analýzy.
- 6) Pro SSU rDNA byla na str. 26 zavedena zkratka SSU, ale po většinu práce je uváděna 18S rDNA.
- 7) Čím si vysvětlujete, že *C. avium* a *C. baileyi* klastruje s vysokou podporou v SSU rDNA ke skupině obsahující *C. rat* genotype a v analýze genu pro aktin s poměrně vysokou podporou ke skupině s *C. muris*? A co na to publikovaná data, souhlasí tento výsledek?

8) Asi jeden z nejzajímavějších výstupů je problematika odlišení *C. rat* genotype II a III, která je komplikovaná díky diskutované problematice vnitrodruhové variability SSU rDNA. Nicméně bych měl dotaz spíše ke genu pro aktin a tvrzení, že získaná sekvence (genu pro aktin) dokládá přítomnost *C. rat* genotype III ve vzorku. Z fylogenetického stromu nelze ale takto rozhodnout, protože sekvence *C. rat* genotype III je sesterská ke skupince sekvencí genotypu II a III. Je i jiný důvod se domnívat, že tento vzorek obsahuje *C. rat* genotype III?

Přes vznesené připomínky, které jsou opravdu jen málo významné, považuji práci za vynikající a doporučuji vřele k obhajobě.

V Českých Budějovicích, 19. 5. 2017



RNDr. Ivan Fiala, Ph.D.