



Oponentský posudek na disertační práci

autor disertační práce: Ing. Šárka Čondlová

školicí pracoviště: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta

školicitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

název práce: Diverzita, fylogeneze a biologie kryptosporidií infikujících hlodavce rodu *Apodemus*

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

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

Ing. Čondlová předložila kompilační disertační práci založenou na dvou impaktovaných publikacích, na nichž je první a druhou autorkou. Jedna z těchto prací (Horčíčková et al., 2018) však přímo tematicky neodpovídá názvu disertační práce, která je zaměřena na jiného hostitele. Po formální stránce předložená práce splňuje všechny požadavky na ni kladené. Písemný projev autorky je kultivovaný, bez častějších překlepů, gramatických, či jiných formálních chyb.

Literární přehled poskytuje přehlednou formou základní informace o kryptosporidiích i infekcích, které tyto paraziti vyvolávají a zabývá se i fylogenezí a fylogeografií studovaných hostitelů. Rozsahem, hloubkou zpracování, i počtem použitých literárních zdrojů, autorka prokázala dostatečnou orientaci ve studované problematice. K této části práce mám jen několik drobných připomínek, které nijak výrazně nesnižují úroveň práce. Pro označení šíře druhů, které je parazit schopen využívat jako své hostitele, bych doporučil termín „hostitelská specifita“ namísto použitého označení „specifita“ a pro nestrávené zbytky potravy vylučované savčím organismem termín „výkal“ (či faeces) namísto užitého označení „trus“. V kapitole 3.2 se vyskytly dva nesprávné zoologické termíny – „divokých myši“ a „myši rodu *Apodemus*“. Práce, respektive její obsah, je zbytečně příliš členěný. Doporučil bych členění na maximálně čtyři úrovně. Kladně hodnotím začlenění tabulek a obrázků, které čtenáři umožňují snadnější orientaci v dané problematice.

Po pečlivém prostudování výsledků disertační práce lze konstatovat, že stanovené cíle práce byly splněny.



Pro realizaci stanovených cílů byly použity jak tradiční, tak moderní metody a postupy, které jsou v dané oblasti výzkumu celosvětově akceptované a jsou vhodné k získání relevantních výsledků. Metodologickou částí práce tak studentka prokázala svoji kvalifikaci v daném oboru. Ke kapitole Materiál a metodika mám jen několik drobných připomínek. Není nutné podrobné rozepisování jednotlivých pracovních postupů či složení použitých roztoků, zvláště pokud se jedná o standardně používané a popsané techniky a chemikálie. Postačí uvedení citace příslušné literatury, která se danou problematikou zabývá. V textu jsou několikrát nesprávně použity chemické vzorce (př. Na_2HPO_4 , H_2O) a zkratky (EtOH), chemická látka není dostatečně specifikována (př. alkohol) nebo je použitý již zastaralý název (např. kyselina solná HCl).

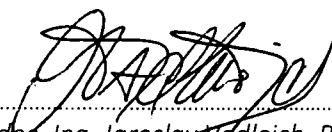
K autorce disertační práce mám následující otázky:

1. Jaké znaky byly použity při druhové determinaci myšic?
2. Čím si vysvětlujete nejvyšší prevalenci kryptosporidií právě u myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*)?
3. Proč jsou kryptosporidie hlodavců úzce druhově specifické a nebyly u nich prokázány korelace s věkem či pohlavím hostitele, zatímco u druhu *Cryptosporidium parvum* je tomu naopak?

Po celkovém zhodnocení předložené disertační práce konstatuji, že Ing. Čondlová prokázala schopnost vědecky uvažovat nad daným problémem, s využitím vhodných metod dosáhnout vytyčených cílů a vlastní výsledky pak kriticky diskutovat s výsledky ostatních autorů. Diskuse je však v některých částech zbytečně podrobná. Kvalitu autorčiny práce dokladuje i její publikační činnost v prestižních impaktovaných časopisech.

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

V Praze, 16. listopadu 2018


doc. Ing. Jaroslav Václavík, Ph.D.

Oponentský posudek na disertační práci Ing. Šárky Čondlové

„Diverzita, fylogeneze a biologie kryptosporidií infikujících hlodavce rodu *Apodemus*“

Autorka se ve své disertační práci zabývá otázkou diverzity a biologických odlišností u kryptosporidií vyskytujících se u hlodavců rodu *Apodemus*.

Práce se skládá z několika standardních kapitol (Úvod, Cíl práce, Literární přehled, Materiál a metodika, Výsledky, Diskuze, Závěry, Reference) a dvou publikovaných vědeckých článků, kdy v článku, zabývajícím se kryptosporidiemi u myšic je Šárka Čondlová první autorkou a v článku, který řeší problematiku kryptosporidií u hrabošů je druhou spoluautorkou.

Vlastní disertační práce „Diverzita, fylogeneze a biologie kryptosporidií infikujících hlodavce rodu *Apodemus*“ je po formální stránce odpovídající a celková úprava předložené práce odpovídá požadavkům.

Celkovou úroveň poněkud snižuje v některých částech práce bezpředmětně použitý jiný druh písma, dále překlepy, pravopisné chyby (např. viz je rozkazovací způsob slovesa vidět, proto za ním nepíšeme tečku) a také chybné použití celých rodových názvů např. na straně 35, kde by bylo lépe uvést celé latinské jméno druhu včetně autorů a roku popisu. Ne zcela šťastné je také nesourodé přepsání pracovních postupů v kapitole Materiál a metodika, u kterých byl někdy použit způsob slovesa oznamovací (inkubovat, vylít) a jindy rozkazovací (inkubuj, vylej). Zejména v této části práce je pak ošemetné, opomenout převést číslo na dolní či horní index, viz např. odstavec „Zjištění koncentrace oocyst“ a násobení „koeficientem 104“ či 10^4 , jak mělo být uvedeno správně.

Obsahově se jedná o vhodně zvolené téma disertační práce, jejíž cíl byl zřetelně stanoven a splněn. Autorka vyšetřila bezmála tisíc vzorků od myšic z různých zemí Evropy různými laboratorními postupy, zvládla práci s experimentálními hlodavci, fylogenetické analýzy a podílela se na popisu několika nových druhů kryptosporidií, což dokládají opublikované články.

Celkově se jedná o práci, jejíž výsledky jsou jednoznačným přínosem, proto předloženou **disertační práci doporučuji k obhajobě** s následujícími dotazy:

1. V práci uvádíte na straně 27: „Rizikovou skupinou jsou imunodeficientní jedinci, malé děti a imunokompetentní jedinci.“ Jaký je rozdíl mezi imunosuprimovaným, imunodeficientním a imunokompetentním jedincem? Dají se malé děti zařadit do

některé z těchto kategorií? Jsou opravdu onou rizikovou skupinou shodně imunodeficientní i imunokompetentní jedinci?

2. Ve své práci se v části Úvodu a jedné kapitole Literárního přehledu věnujete problematice léčby kryptosporidiózy. Jak uvádíte „není v současné době k dispozici žádný 100% účinný lék.“ Vzhledem k tomu, že je náplní Vaší práce i studium biologie kryptosporidií, dovoluji si vznést dotaz, zda víte, proč je tak obtížné právě u těchto organismů intenzivně hledaný skutečně účinný lék objevit?
3. Rozsáhlá část Literárního přehledu je věnována fylogeografii jednotlivých druhů myšic, ale výsledky ani diskuze se k tomuto tématu již dále nevztahují, postačila by i jednoduchá mapa Evropy s vyznačením druhů myšic a autorkou detekovaných kryptosporidií ve výsledcích a v diskuzi věta či odstavec o tom, zda migrace a rozšíření myšic a detekovaných kryptosporidií spolu alespoň zdánlivě souvisí či nikoli. Bylo by možné tuto informaci alespoň stručně doplnit v rámci obhajoby?
4. V kapitole Materiál a metodika chybí údaj, kolik bylo experimentálních zvířat v jednotlivých skupinách. Pokud se dá vyčíst správná informace z Obrázků 12, 13, 16 a 17, jedná se pro každý použitý druh kryptosporidií o čtyři a méně jedinců. V případě, že testovaná skupina zahrnovala max. čtyři jedince a ještě k tomu různého pohlaví a věku, nelze na základě těchto výsledků vyvodit závěry viz strana 77 či 83 o vlivu věku či pohlaví. Bohužel v práci chybí i údaje o věku a pohlaví u jednotlivých odchycených druhů myšic a vztahu k negativním/pozitivním nálezům jednotlivých druhů kryptosporidií, takže ani z tohoto pohledu není možné závěr vyvodit. Mohla by autorka v rámci obhajoby doplnit alespoň stručnou přehlednou tabulku odchycených myšic bez ohledu na jejich druhy a původ, čistě souhrnně juvenilové/adulti, samci/samice a počty pozitivních z celkového v dané kategorii?

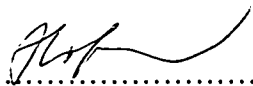
Jsou mezi juvenilními myšicemi mláďata sající mléko nebo pouze nedospělé (subadultní) myšice, které se již živí shodně jako dospělí jedinci?

Znáte nějaké případy u hlodavců, kdy jsou sající mláďata významně vnímavější ke kryptosporidiové infekci než starší mláďata, která jsou již fyziologicky na pevné výživě?

5. V kapitole Výsledky v Tabulce 4 bych doporučila doplnit informaci o počtu pozitivních myšic v jednotlivých státech a to bez ohledu na nízké počty odchycených jedinců. Bez těchto údajů tato tabulka patří do kapitoly Materiál a Metodika. Dovolím si zároveň nesouhlasit s několikrát opakovanou větou, že autorka data neuvádí z důvodů toho, že by nevyrovnané a nízké počty odchycených jedinců zkreslily prevalenci. Pro přehled by stačilo uvést prosté počty i bez prevalence. Samozřejmě souhlasím, že prevalence jsou často nízkými čísly zkreslené, viz Literární přehled Tabulka 2 prevalence 50 % u jedné pozitivní ze dvou odchycených myšic.

6. Ve Výsledcích postrádám informaci o tom, zda byly přítomné i mix infekce více druhů kryptosporidií u jednoho jedince, nebo se vždy jednalo čistě o jednodruhové infekce?
7. V kapitole Diskuze str. 73 není úplně vhodně zvolená část diskutující nenalezení *C. ditrichi*. Opakovaně uvádíte, že v referovaných studiích publikovaných před rokem 2018 „nebylo detekováno *C. ditrichi*“, které však popisujete jako nový druh s vaším týmem až v roce 2018. Můžete objasnit tuto část diskuze lépe a uvést, co tedy bylo v citovaných studiích nalezeno a jak se tento nález lišil od *C. ditrichi*?
8. Dále v Diskuzi uvádíte nález *C. andersoni* u jedné myšice (*A. flavicollis*), podobně i další zřídka detekované druhy *C. hominis*, *C. microti* atd. Je možné odlišit u takovýchto případů pasáž oocyst/DNA od skutečné infekce konkrétního odchyceného volně žijícího jedince? Pokud ano, tak jaký postup byste v ideálním případě k odlišení pasáže/skutečné infekce využila?
9. V Diskuzi na straně 79 uvádíte, že „Kryptosporidiové infekce bývají doprovázeny klinickými příznaky u zvířat jen vzácně,...“. S tímto tvrzením si dovoluji nesouhlasit. Dozajista znáte příklady kryptosporidiových infekcí některých druhů či kategorií zvířat, u kterých jsou klinické příznaky velmi časté, značně typické a nezřídka vedou až k úhynům. Mohla byste nějaké příklady uvést z řad savců, ale i z jiné třídy obratlovců?
10. Můj poslední dotaz se vztahuje k pěkné fotodokumentaci histologických nálezů endogenních stádií kryptosporidií z experimentů. Pokusili jste se o morfometrickou analýzu endogenních stádií jednotlivých druhů kryptosporidií?

V Brně, dne 12.11. 2018



.....

MVDr. Lada Hofmannová, Ph.D.

Ústav patologické morfologie a parazitologie
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno
Tel.: 541 562 264
hofmannoval@vfu.cz
www.vfu.cz

Oponentský posudek na disertační práci ing. Šárky Čondlové

Biodiverzita, fylogeneze a biologie

kryptosporidií infikujících hlodavce rodu *Apodemus*.

Oponovaná práce je založena na dvou publikacích uveřejněných v kvalitních časopisech a na rozáhlém doplňujícím textu (přes 80 stránek), který nejen opakuje již publikované údaje, ale snaží se je rozšířit a doplnit. Polovinu z tohoto textu zaujímá úvod a literární přehled, zabývající se jednak kryptosporidiemi, jednak myšicemi. Trochu mne zarazilo, že se autorka českému názvu myšice skoro vyhýbá, v nadpisech a místy i v textu hovoří o “hlodavcích rodu *Apodemus*”, v tabulkách 4 a 5 dokonce o “myších rodu *Apodemus*”. To první jistě věcně vyloženě nesprávné není, ale jak by se líbilo čtenářům psát o kravách jako o “sudokopytnících rodu *Bos*”? Dále je v přehledu často používané sousloví “konkrétní druh”. Co je tím myšleno, jsou taky nějaké abstraktní či nekonkrétní druhy? Nebylo by lepší hovořit o jednotlivých druzích?

Velmi podrobně je pojednáno o fylogeografii myšic: autorka prostudovala řadu publikací a zhotovila originální mapky znázorňující šíření jednotlivých druhů myšic a jejich linií po Evropě. Nejsem kompetentní posoudit úplnost textu i mapek, ale velmi se mi tato část práce líbí a myslím, že by měla autorka uvažovat o samostatném minireview na toto téma. Zároveň však každého musí napadnout, že nejde o samoučelný text, ale přípravu na studii koevoluce myšic s kryptosporidiemi. Ta však v práci není (tedy “očekávání – zklamání”). Ale vážně: **opravdu je zatím málo informací pro aspoň nesmělý pokus porovnat fylogenetické vztahy nalezených hlodavčích kryptosporidií s fylogenezí myšic?**

Zatímco část věnovaná fylogeografii je podrobná, nikde není zmíněna bionomie myšic, jejich typické habitaty, potravní preference, rychlost rozmnožování apod.: jde vesměs o faktory, které mohou ovlivnit nejen druhové složení parazitů, ale i prevalence apod. Přitom jsem si téměř jistý, že studentka o biologii myšic znalosti má, ale v textu je neuplatnila.

Kapitola 4.1. Materiál je velmi odbyta a směštnána do jediného odstavce. Chybějí charakteristiky lokalit, informace o tom, co se do pastí chytalo kromě myšic, informace o sezóně apod. Domnívám se, že i u materiálu, který studentka nesbírala sama, bylo možné tyto informace buď vyčíst z protokolů nebo zjistit od kolegů, kteří materiál poskytli. Opět jde o údaje ovlivňující druhové složení parazitů i jejich prevalenci.

Naopak, kapitola 4.2. Metodika je zpracována podrobně a přehledně. Tady bych mírně vytknul jen jazykovou úroveň (v pracovních postupech nesjednoceno používání infinitivů a imperativů, uváděny názvy z laboratorního slangu či anglické výrazy u věcí s plnohodnotným českým ekvivalentem!).

V kapitole 5. Výsledky jsou uvedeny cenné a prioritní informace o výskytu kryptosporidií u myšic především ve střední Evropě, o genetické variabilitě těchto kryptosporidií získané analýzou 4 různých genů, jsou popsány 2 nové druhy *Cryptosporidium apodemi* a *C. ditrichi* a popsány experimentální infekce těmito novými druhy, hraboši

kryptosporidií *C. microti* a druhem se širokým spektrem hostitelů *C. parvum*. Tato kapitola je doplněna zdařilou fotodokumentací. Mám jen připomínku k měřítkům u snímků ze skenovacího elektronového mikroskopu. Už jen při letném porovnání úseček s oocystami vychází, že tyto mají přes 10 μm , což je nepravděpodobné a neodpovídá to ani údajům uvedeným v textu ani fotografiím ze světelného mikroskopu. Bohužel, tatáž chyba ušla pozornosti recenzentů i v již vyšlých publikacích. Měřítka, která skenovací mikroskop k fotkám může přidat, jsou pouze orientační, závislá na mnoha parametrech nastavení a pokud je fotka vybrána k publikaci, musí se měřítko přepočítat. Dále připomínám, že zkratka sp.nov. se smí používat výhradně při deskripci nového druhu (správně je to tedy v příložené publikaci); v dalším textu už musí být např. *C. apodemi* Čondlová et al, 2018. Nejde o samoučelné pravidlo: předchází se tím zmatkům např. při rozhodování o prioritě apod.

Diskuse by měla být v tomto případě, kdy většina výsledků je již publikována, nejdůležitější část disertace. Bylo v ní možno podívat se na problematiku “z nadhledu”, vyslovit i odvážnější hypotézy, které není rozumné psát přímo do publikací apod. Bohužel, studentka se držela velmi “při zemi” a zdaleka nevytěžila vše ze spousty výsledků, které získala. K 6.1.: Je správné, že studentka nepočítala prevalence u zemí s malým počtem vyšetřených myšic. Také správně upozornila na vliv metodiky. Ale je dobré si uvědomit, že i tam, kde byl vyšetřen “dostatečný” počet jedinců, jsou počty vyšetřených na lokalitách nízké na to, aby z toho bylo možno přesná čísla spočítat. Navíc, prevalence mohou být ovlivněny sezónou a tedy i věkem infikovaných myšic, typem lokality a mnoha dalšími fakty. Z tohoto hlediska jsou prevalence zjištěné u *A. flavicolis* a *A. sylvaticus*, v Čechách i na Slovensku víceméně stejné (zdánlivě vysoká prevalence slovenských *A. sylvaticus* 50% se přestane jevit jako významná, když si uvědomíme, že šlo o 2 pozitivní kusy ze 4 vyšetřených). I při srovnání s jinými zeměmi tedy podstatné rozdíly nejsou.

K 6.2: Nejjednodušší vysvětlení, proč se na víceméně stejných lokalitách autorce na rozdíl od slovenských kolegů podařilo najít *C. ditrichi* je skutečnost, že pracovala kvalitněji.

Pokud jde o nález dalších druhů kryptosporidií, které byly u myšic zaznamenány ojediněle, chybí mi v diskusi uvedení možnosti, že všechny pozitivní nálezy nemusejí znamenat infekci, ale že může jít o pasáž. Za pravděpodobné bych to považoval např. u *C. andersoni*, ale možná i u dalších druhů. **Mohla by na obhajobě studentka v tomto smyslu své nálezy souhrnně okomentovat?**

K molekulárním analýzám: chybí mi kritické porovnání stromečků sestrojených na základě analýz jednotlivých genů: **považuje studentka některé geny za vhodnější než jiné, a pokud ano, tak proč?** Bylo by možno sestroit (třeba jen schématický) souhrnný stromeček stromeček se syntézou příbuznosti jednotlivých zkoumaných druhů a genotypů?

Dále mi v diskusi (a vlastně i ve výsledcích) chybí vztažení pozitivních nálezů k věku popř. k pohlaví myšic. V závěrech je sice konstatováno, že nebyl zjištěn rozdíl ve vnímavosti juvenilních/adultních jedinců ani samců/samic u *C. apodemi* a *C. ditrichi*, ale to je výsledek experimentální infekce 4 jedinců u každého druhu (mimořádně, v grafech znázorňujících

experimentální infekce není věk ani pohlaví označeno, i když by to bylo snadno možné).
Odpovídají tomuto závěru i výsledky zjištěné u myšic z přírody?

Další výhradu mám k poslední větě na str. 79. *Cryptosporidium apodemi* bylo v experimentech detekováno jen molekulárně, nelze tedy tvrdit, že vývojová stádia byla v tenkém i tlustém střevě (v colonu mohlo jít o oocysty, které procházejí, ne?).

Závěrem musím bohužel konstatovat, že předložená práce nedosahuje úrovně, na kterou jsme u prací vzniklých v laboratoři prof. Kváče zvyklí. Na druhou stranu, vytčené cíle byly splněny a práce splňuje požadavky kladené na disertační práce na ZF JU v Českých Budějovicích. Proto práci doporučuji k obhajobě.



V Českých Budějovicích 16. 11. 2018

Doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc