

Oponentský posudek na disertační práci Ing. Nikoly Holubové

Kryptosporidie a kryptosporidióza ptáků

Posuzovaná práce ing. Holubové patří mezi ty velmi kvalitní, o kterých jsem se zmínil v předchozím posudku na práci ing. Prantlové. Dokladem toho je 7 publikací v prestižních časopisech s vysokým impaktem, v nichž spočívá těžiště práce. Nikola je u 6 z nich první autorkou, navíc připojila úctyhodný seznam dalších publikací, které s tématem nesouvisejí nebo souvisejí jen okrajově. Bylo by nošením dříví do lesa vyjmenovávat přínosy těchto publikací, soustředím se na podle mého názoru hlavní rysy:

- snaha o dodržení nomenklatorických a taxonomických pravidel, která vyústila v popisy nových druhů. Řada jiných autorů na tento přístup rezignovala a jednotlivé genotypy číslují, navíc podle různých kritérií. Takový přístup by vedl ke stavu, ve kterém by bylo velmi obtížné se vyznat. I když dnes víme, že biologické druhy objektivně neexistují, že jsou vlastně výsledkem konvence, je kvůli možnostem domluvit se mezi sebou srozumitelným způsobem je popisovat a zacházet s nimi dle přijatých pravidel.
- syntéza různých přístupů (morfologie a morfometrie, experimentální infekce a velmi kvalitní molekulární analýzy vedoucí k fylogenetické charakterizaci popisovaných druhů, genotypů a izolátů.
- velký rozsah vyšetřeného materiálu, zahrnující jednak široké hostitelské spektrum (ptáci z různých řádů), jednak různé geografické oblasti.

Tento komplexní přístup staví např. nově popsané druhy na úroveň, u které lze předpokládat, že zůstanou platnými. Odlišují se tak od některých jiných popsanych „druhů“ či genotypů, které autoři popsali na základě jednotlivých nálezů bez hlubší analýzy a které pak často bývají zpochybňovány či synonymizovány.

Za významnou považuji i metodickou publikaci věnovanou kultivaci kryptosporidií na kuřecích embryích

Úkolem oponenta je nejen vyzdvihovat přednosti, ale i hledat nedostatky práce. Ty, které jsem našel, by bylo možné pojmenovat: „nedůsledná práce s literaturou, zejména s citacemi“. K tomu, že jsem se na tento problém soustředil mě přivedla vlastně náhodou citace práce, u které jsem jedním ze 2 autorů:

„Velmi složitý a fyzicky náročný způsob ptačího pohybu vyžaduje intenzivní tělesný metabolismus a velmi výkonný oběhový i dýchací systém (Kučerová-Pospíšilová et Ditrich 1998).“

V citované práci jsme se tehdy zabývali výskytem protilátek proti mikrosporidiím u lidí. Přesto jsem si raději tuto dávnou práci pečlivě znovu přečetl, abych se ujistil, zda se tam citovaná informace nevloudila třeba v souvislosti s „ptačím“ druhem *Encephalitozoon hellem*. Nic o ptácích jsem v naší publikaci nenašel a **upřímně by mě zajímalo vysvětlení, jak k této poněkud úsměvné chybičce došlo**. Vedlo mne to však k tomu, že jsem si několik dalších citovaných skutečností původní zdroj vyhledal a ověřil (v obecných částech prací to čtenář obvykle nedělá). A bohužel musím konstatovat, že tato nedůslednost v citacích není v úvodní části ojedinělá. Například u tvrzení: „Schopnost ptáků létat a překonávat značné vzdálenosti usnadňuje přenos patogenů zahrnující velké množství původců virových (např. virus ptačí chřipky, newcastleská choroba, ptačí pneumoviry, kachní virus, riketsie, západonilská horečka nebo virus koňské encefalomyelitidy), bakteriálních (např. borelie, chlamydie, kampylobaktery, pasterele či salmonely) nebo parazitárních onemocnění (bičenky, hlístice, kryptosporidie)“ je mimo jiné uvedena citace Hubálek et al. 2020. Opět, v práci věnované *Hyalomma rufipes* v ČR a Evropě není o vyjmenovaných parazitech ani zmínka a jediné, co by opravňovalo uvést i tuto citaci je pravděpodobnost přenosu těchto klíšťat migrujícími ptáky. Pak by ovšem měla být klíšťata uvedena mezi ostatními skupinami parazitů, aby citace byla věcně správná.

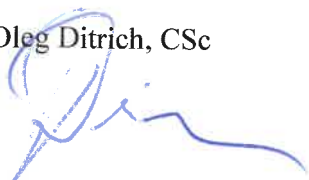
S problémem nedůsledné přesnosti v citacích souvisí i odstaveček věnovaný *Cryptosporidium struthionis*. „Nicméně je nutné poznamenat, že druh *Cryptosporidium "struthionis"*, podle kterého byla evoluce kryptosporidií mapována a který byl izolován ze pštrosa a jehož příbuzné kmeny byly nalezeny ve zkamenělinách ptáků Moa (Wood et al. 2013), v přílivových a odlivových usazeninách (Wilms et al. 2006) a odpadní vodě z lodí (Lohan et al. 2017) není platným druhem rodu *Cryptosporidium* a s největší pravděpodobností se nejedná o kryptosporidii, ale jiný kryptosporidiím příbuzný organismus.“ Musel jsem se vrátit k jednotlivým citovaným publikacím, abych si ujasnil, že věta je z práce Garcia et Hayman (2016) citované v úvodu kapitoly 3.2.1. Tito autoři opravdu upozornili na dlouhé větve fylogenetických stromů zahrnujících tento „dosud nepopsaný druh“ a cituje 2 práce (Bergsten 2005; Slack et al. 2007), ve kterých je vysloven názor, že další sampling tuto skutečnost vyjasní. **Objevily se od té doby další informace, které by podporovaly domněnku, že nejde o kryptosporidii? Jaký jiný příbuzný organismus by to čistě teoreticky mohl být?** Konstatuji, že v dalších částech práce, věnovaných konkrétním problémům, se už nedůslednost v citacích nevyskytuje.

I další nedostatky, kterých jsem si všimnul, jsou drobnosti, ale považuji za užitečné se na některé z nich zeptat:

- V úvodu se dočteme „Miliony let trvající vývoj ptáků směřoval zřejmě k jednomu cíli, a to k ovládnutí vzdušného prostoru.“ **Opravdu se Nikola domnívá, že evoluce směřuje k nějakým cílům? Pokud ano, k jakým?**
- „Paraziti rodu *Cryptosporidium* jsou nejčastější původci parazitárních **onemocnění** volně žijících, v zajetí a hospodářsky chovaných ptáků. Neměla Nikola na mysli spíše pojem „infekce“? (že je potřeba infekci od onemocnění důsledně odlišovat nás poučuje i současná pandemie, kdy některé desinformace podobné záměny zneužívají.
- Kapitoly 3.2.1 a 3.2.2 mají totožný název, předpokládám, že omylem a **prosím o uvedení na správnou míru.**
- Kapitola 3.2.6 Terapie a prevence je umístěna nevhodně mezi kapitolu o přenosu a o hostitelské specifitě (patřila by spíše nakonec nebo by klidně mohla být vynechána).
- Předpokládal bych, že autorka popisující nové druhy je podrobně seznámena s mezinárodním kódem zoologické nomenklatury a souvisejícími pravidly. K nim patří, že zkratka sp.n. („species nova“ za binomickým názvem v práci daný druh popisující, zásadně ne předtím, ale ani potom. Nikola toto pravidlo v několika místech porušila a nic na tom nemění skutečnost, že v některých případech šlo o „její“ druhy.
- Nebývá zvykem, že by se připomínky oponenta zabývaly drobnými nedostatky již publikovaných prací. Přesto jsem na něj narazil: V závěrečném výčtu druhů v práci věnované popisu druhu *Cryptosporidium ornitophilus* (mimochoodem, škoda že jej nepojmenovala správněji *C. ornitophilum*) chybí u *Cryptosporidium galli* autor popisu.
- V práci je jen málo chyb a překlepů, některé však činí část textu špatně srozumitelným: „Tyzzer pravděpodobně nebyl první, kdo kryptosporidie dekoval“ nebo „Studie o průběhu kryptosporidiových infekcí a hostitelské a tkáňové specifitě jsou často chybějící části biologické charakteristiky kryptosporidií, a to nejenom u druhů infikujících ptáky“. **Prosím o vysvětlení.**

Závěr: mé připomínky jsou marginální (očekávám reakci na ty, co jsou psány tučně) a nijak nesouvisejí s vysokou kvalitou posuzované práce, která je podle mého názoru především díky publikacím nadprůměrná. Konstatuji, že beze zbytku splňuje požadavky na disertační práce a doporučuji ji k obhajobě.

Doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc



27.1.2022

Oponentský posudek na disertační práci

Oponentka: prof. MVDr. Daniela Lukešová, CSc.

Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta tropického zemědělství

Název disertační práce: **Kryptosporidie a kryptosporidióza ptáků**
Cryptosporidium spp. and cryptosporidiosis in birds

Autorka: **Ing. Nikola Holubová**

Školitel: **prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D**

Fakulta: Zemědělská fakulta

Univerzita: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Na základě Vaší žádosti o vypracování oponentského posudku na disertační práci předloženou Ing. Nikolou Holubovou, v rámci doktorského studia na Jihočeské univerzitě v Českých Budějovicích, v souladu s platnými předpisy pro studium v doktorských studijních programech, zaujímám k uvedené disertační práci následující stanoviska.

Předložená disertační práce má rozsah 181 stran. Práce se skládá ze seznamu impaktovaných publikací, seznamu příspěvků na konferencích, seznamu grantů a abstraktů v českém a anglickém jazyce.

Vlastní práci tvoří: dvě strany úvodu, 26 stran literární rešerše, jedna strana s vytyčenými cíli disertační práce, 16 stran komentářů k výsledkům vlastní práce, jedna strana se závěry a 32 stran seznamu použité literatury a přílohy tzv. full textů vědeckých publikací v rozsahu 81 stran.

Aktuálnost zvoleného tématu

Téma disertační práce „**Kryptosporidie a kryptosporidióza ptáků**“ je významné proto, že v současnosti problematika volně žijících ptáků nabývá na významu, především v době jejich migrace. Proto vědeckovýzkumné práce, zaměřené na problematiku kryptosporidií, s ohledem na mezery v odborném písemnictví a dále i praktické využití výsledků v chovatelské praxi, mají velký vliv na prevenci zdraví zvířat i člověka.

Literární přehled

V první části autorka vychází z problematiky třídy ptáků, s charakteristickým znakem adaptace stavby těla na let, i když některé druhy ptáků tuto schopnost létat ztratily, např. běžci. Autorka se v této kapitole zaměřila na anatomii trávicího traktu ptáků i na migraci ptáků.

Druhá část je věnována kryptosporidiím a kryptosporidióze ptáků. V této části se autorka věnuje historii a evoluci kryptosporidií, vývojovému cyklu kryptosporidií, orgánová a tkáňové specifitě ptačích kryptosporidií, ale i přenosu infekce, terapii a prevenci, hostitelské specifitě kryptosporidií a v neposlední řadě i druhům a genotypům kryptosporidií infikujících ptáky.

Obsah a rozsah této kapitoly, především druhé části, svědčí o velmi dobré orientaci autorky v dané problematice, o schopnosti využití dostupných způsobů práce s literárními citacemi, včetně jejich adekvátní interpretace. Takto zpracovaný literární přehled vytváří solidní základ pro vlastní řešení vytyčeného cíle.

Splnění vytyčeného cíle

Autorka disertační práce si vytyčila základní cíl: studovat výskyt, diverzitu a biologii ptačích kryptosporidií u vybraných skupin ptáků.

V první části se zaměřila na vyhodnocení výskytu a prevalence kryptosporidiových infekcí u různých skupin ptactva, např. volně žijícího, ze zoologických zahrad, z exotických chovů, z ptačích farem a od pernaté zvěře.

Autorka ve druhé části tohoto cíle vyhodnocovala hostitelskou specifitu a infektivitu různých druhů a genotypů kryptosporidií pomocí experimentálních infekcí.

V následující třetí části chtěla doktorandka popsat biologii získaných druhů a genotypů kryptosporidií (průběh infekce, patogenita, lokalizace vývojového cyklu a popis vývojových stádií).

Součástí vytyčeného základního cíle byl i popis diverzity ptačích kryptosporidií pomocí genotypizace a fylogenetických analýz. Předložené výsledky obsáhly vytyčené cíle disertace.

Metody zpracování a výsledky disertační práce

Pracovní postup a design vlastní práce, jak je autorka uvádí, jsou správně podřízeny koncepci i vytyčeným cílům a jsou v souladu s bodem 9.2 Opatření děkana Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích k zajištění studia v doktorském studijním programu č. 7 z 2. listopadu 2017.

Disertační práce **Ing. Nikoly Holubové byla zpracována formou souboru publikací** studenta již uveřejněných **a opatřených komentářem** na základě multidisciplinárního přístupu z řady vědeckých disciplín (zoologie, parazitologie, molekulární biologie, histologie i vědeckých přístupů při zavádění experimentálních infekcí), které byly publikovány v průběhu studia v sedmi světových, recenzovaných vědeckých publikacích.

V této části autorka odkazuje na sedm příloh, které reprezentují metodické postupy i dosažené výsledky výrazně rozšiřují znalosti: o kryptosporidiích specifických pro ptáky, o výskytu a diverzitě v rámci 25 řádů a 176 čeledí ptáků, o morfologii vývojových stádií, hostitelské a orgánové specifitě, patogenitě a přenosu.

- **Bylo získáno a vyšetřeno pomocí mikroskopických a molekulárních metod 4740 vzorků trusu ptáků** nejen z ČR, ale i dalších zemí světa. Specifická DNA kryptosporidií byla detekována v 255 případech, tj. **5,4 %**.
- **Fylogenetické analýzy** prokázaly přítomnost **11 druhů a 6 genotypů kryptosporidií**, kdy nejčastěji byly detekovány druhy *C. baileyi* 1,4 %, *C. proventriculi* 0,7 % a *Cryptosporidium* sp. goose genotyp Id 0,7 %, zatímco nejméně často byl detekován *Cryptosporidium* sp. avian genotyp I 0,04 %.
- Na základě fylogenetických a experimentálních studií byl popsán jeden nový genotyp - *Cryptosporidium* avian genotyp VI a tři nové druhy *C. avium*, *C. proventriculi* a *C.*

ornithophilus. Ani jeden výše jmenovaných druhů kryptosporidií **nebyl infekční pro laboratorní myši kmene SCID a BALB/c**.

- Kryptosporidiové infekce ptáků **nejsou většinou provázeny klinickými příznaky onemocnění**. Ani během experimentů nebyly zaznamenány **klinické příznaky ptáků** infikovaných druhů *C. avium*, *C. proventriculi* a *C. ornothophilus*. V rámci popisu druhu byla popsána **morfologie a morfometrie oocyst, hostitelská a tkáňová specifita a patogenita**.
- Disertační práce byla dále rozšířena o **kultivaci kryptosporidií pomocí kuřecích embryí**, která jsou vnímavá k infekci střevními kryptosporidii. **Byla zavedena metoda kultivace kryptosporidií** ptačího specifického druhu *C. baileyi* a dále převážně savčího druhu *C. parvum*, který byl částečně infekční v postnatální fázi vývoje. **V kuřecích embryích tak byla prokázána mnohem vyšší výtěžnost oocyst kryptosporidií než u jiných, dosud zavedených metodických postupů**.

Disertační práce se dále vyznačuje účelným využitím moderních technických, dokumentačních i výrazových prostředků. Z práce je zřejmé velké úsilí doktorandky i jejího týmu, zpracovat a vyhodnotit velké množství sledovaných parametrů.

Úroveň předkládané práce, která přináší prioritní výsledky, je nezpochybnitelně vysoká. Autorka zpracovala obdivuhodný počet vzorků rozdílnými metodickými postupy, výsledky zpracovala spolu se svými kolegy do sedmi recenzovaných publikací. Výsledky výzkumu doktorandka prezentovala na deseti konferencích v tuzemsku i zahraničí. Během doktorského studia se doktorandka, jako spoluautorka, podílela na dalších 14 publikovaných a recenzovaných publikacích, které nejsou součástí práce.

K práci nemám zásadních připomínek, při jejím studiu vyvstává několik otázek:

- Předpokládá autorka zpracování disertační práce do formy monografie, určené pro vědeckou, ale i odbornou chovatelskou veřejnost, např. exotického ptactva nebo běžců ?
- V přehledu komentované části práce autorka zaznamenala cíle, ale ne hypotézy, proto v komentované části závěru práce postrádám souhrnný přehled, které z hypotéz byly explicitně potvrzeny a které potvrzeny nebyly ?
- Jaký je, podle názoru autorky, potenciál kryptosporidiózy, zoonózy, zjištěné v exotických chovech ptáků chovaných v domácnosti nebo zoologických zahradách, při manipulaci s infikovanými ptáky v České republice ?
- Zaznamenala autorka v literárních pramenech vědecky zdokumentované koinfekce kryptosporidií v mikrobiomu nebo v dýchacích cestách s ostatními bakteriálními a virovými patogeny ? Uvažuje autorka zaměřit svůj výzkum tímto způsobem ?
- V rozvojovém světě jsou průjemová onemocnění častou příčinou úmrtí kojenců, jakou roli sehrává infikované ptactvo v přenosu patogenních kryptosporidií v těchto zemích a jaké stresové faktory (abiotické a biotické) mohou působit na migrující nebo exotické ptactvo ?

Významným se jeví v předkládané práci především:

- systematické zpracování literárního přehledu a komentovaných výsledků sedmi recenzovaných vědeckých publikací
- popis jednoho nového genotypu - *Cryptosporidium avian* genotyp VI a tří nových druhů kryptosporidií *C. avium*, *C. proventriculi* a *C. ornithophilus*
- zavedení metody kultivace kryptosporidií ptačího specifického druhu *C. baileyi* a dále převážně savčího druhu *C. parvum*, který byl částečně infekční v postnatální fázi vývoje.

Závěr

Autorka v závěru práce prezentuje souhrn výsledků, dosažených v průběhu zpracování doktorské disertační práce formou komentovaných výsledků a doložených v sedmi recenzovaných vědeckých publikacích.

V této části práce bylo přínosem celé její zpracování ve stručné, jasné a srozumitelné podobě. V závěru práce by, podle mého názoru, měla být přehledně uvedena i následná doporučení pro praxi.

Shrnutí

Po prostudování a zhodnocení doktorské disertační práce mohu konstatovat, že se autorce podařilo dosáhnout vytyčeného cíle.

Na základě výše uvedeného **d o p o r u č u j i** doktorskou disertační práci „**Kryptosporidie a kryptosporidióza ptáků**“ autorky Ing. Nikolý Holubové přijmout k obhajobě. Po jejím úspěšném průběhu **d o p o r u č u j i udělit Ing. Nikolý Holubové vědeckou hodnost:**

Philosophiae doctor

V Praze 25.1.2022

prof. MVDr. Daniela Lukešová, CSc.
Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta tropického zemědělství

Oponentský posudek na disertační práci

Ing. Nikoly Holubové

„Kryptosporidie a kryptosporidióza ptáků“

Autorka se ve své disertační práci věnuje výskytu a diverzitě kryptosporidií infikujících ptáky, zaměřuje se na také na morfologii vývojových stádií, hostitelskou a orgánovou specifitu, patogenitu a přenos.

V rámci této práce bylo vyšetřeno úctyhodných 4740 vzorků trusu ptáků pomocí mikroskopických i molekulárních metod (na lokusech pěti různých genů). Práce zahrnuje i řadu experimentálních studií. Díky tomuto nemalému úsilí a s podporou řady grantů je výsledkem nejen popis nového genotypu (*Cryptosporidium* avian genotyp VI z vlhověce), ale hned tři nových druhů ptačích kryptosporidií (*Cryptosporidium avium* z kakarikiho, *C. proventriculi* z papouška a *C. ornithophilus* z pštrosa), u kterých je Ing. Holubová první autorkou. Celkem se podílela na 21 publikacích, z nichž se v 15 případech autoři věnují studiu kryptosporidií a v šesti případech mikrosporidiím *Encephalitozoon cuniculi*.

Dizertační práce Ing. Holubové vychází ze sedmi impaktovaných publikací na výše uvedené téma. Práce je klasicky členěná na úvod, cíle práce, literární přehled, komentář k výsledkům, závěry, seznam použité literatury a přílohy v podobě zmíněných sedmi publikací, celkem 181 stran.

Obsahově se jedná o velmi zajímavé a vhodně zvolené téma disertační práce, jejíž cíl byl jasně stanoven a splněn. Celková úroveň práce včetně práce s textem je vynikající a rozsah práce je nadstandardní, což dokládají opublikované články.

Předložená práce a její výsledky jsou jednoznačným přínosem, proto předloženou **disertační práci doporučuji k obhajobě** s následujícími dotazy:

1. Literární přehled, str. 37, obr. 2: na základě jakého markeru/genu byl vytvořen fylogenetický stromek demonstrující příslušnost jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií ptáků ke střevní a žaludeční linii?

2. Příloha I. *Cryptosporidium galli* and novel *Cryptosporidium* avian genotype VI in North American red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). Chelladurai J.J., Clark M.E., Kváč M., Holubová N., Khan E., Stenger B.L., Giddings C.W., McEvoy J. 2016: Parasitology Research 115: 1901–1906.

Do jakého média byly odebírány vzorky žaludečních a střevních obsahů usmrčených ptáků? Proč se nedělalo mikroskopické vyšetření a histologické preparáty? V čem byl odlišný od ostatních pozitivních jedinců samec, který byl jako jediný pozitivní na *C. galli*. Byla nějakým způsobem hodnocena intenzita infekce a možnost pasáže?

3. Příloha II. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. Holubová N., Sak B., Horčíčková M., Hlásková L., Květoňová D., Menchaca S., McEvoy J., Kváč M. 2016: Parasitology Research 115: 2243–2251.

Proč nebyly součástí studie kromě trávicí soustavy také další orgány (citace Curtiss et al., 2015) jako Fabriciova burza, respiratorní a urogenitální systém? A stejný dotaz mám i u dalších dvou zde nově popsanych druhů kryptosporidií.

V návaznosti na tuto otázku bych zmínila publikaci: „Revisiting the infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium avium* provides new information on parasitic sites within the host. Cui Z, Song D, Qi M, Zhang S, Wang R, Jian F, Ning C, Zhang L. Parasit Vectors. 2018 Sep 19;11(1):514. doi: 10.1186/s13071-018-3088-x.

4. Příloha III. *Cryptosporidium meleagridis* and *C. baileyi* (Apicomplexa) in domestic and wild birds in Algeria. Laatamna A.E., Holubová N., Sak B., Kváč M. 2017: Folia Parasitologica (Praha) 64: 018.

Je zajímavé, že v USA (Příloha I) a v Alžírsku se našly vždy dvě odlišné kryptosporidie, jak si to vysvětlujete? Velmi kladně hodnotím stanovování OPG u vyšetřovaných vzorků. Na čem konkrétně jste se podílela v této práci (laboratorní vyšetřování, sběr trusu v terénu...)?

5. Příloha IV. Host specificity and age-dependent resistance to *Cryptosporidium avium* infection in chickens, ducks and pheasants. Holubová N., Sak B., Hlásková L., Květoňová D., Hanzal V., Rajský D., Rost M., McEvoy J., Kváč M. 2018: Experimental Parasitology 191: 62–65.

Jak si vysvětlujete, že vnímaví k infekci nebyli bažanti, ale kuřata a kachny ano? V dalších vašich studiích se již bažanti jako pokusní neobjevují, považujete je za nevhodná experimentální zvířata?

6. Jak práce popisující nové druhy kryptosporidií, tak i práce na kuřecích embryích jsou velmi zajímavé. Co z celé Vaší práce, Vy sama, považujete za nejvíce zajímavé nebo nejvíce přínosné?

V Praze, dne 25.1. 2022



.....
MVDr. Lada Hofmannová, Ph.D.

Vedoucí Oddělení patologie a parazitologie
Státní veterinární ústav Praha
Sídliště 136/24
165 03 Praha-Lysolaje