

Oponentský posudek na diplomovou práci **Zlaty Limpouchové** „Diverzita kryptosporidií u pěvců“

V předložené bakalářské práci se **Zlata Limpouchová** zabývala diverzitou kryptosporidií u pěvců, kterou stanovovala pomocí mikroskopických a molekulárních metod. Zjistila, že dominantní druhy kryptosporidií parazitujících u pěvců jsou *Cryptosporidium baileyi* a *C. galli* a ve vlaštovce objevila nový genotyp žaludeční kryptosporidie. Pomocí molekulárních analýz a infekčních experimentů navíc popsala vnitrodruhovou variabilitu v sekvencích tří genů, v morfologii a biologických vlastnostech izolátů *Cryptosporidium galli*.

Práci považuji za velice zdařilou jak po formální stránce tak po obsahové. Úvod a metodika jsou napsány jasně s dobrou češtinou s minimem překlepů i když se mi zdálo, že v některých částech jsou až zbytečně obšírné. Přehled hostitelů u každého druhu/genotypu kryptosporidie mohl být vepsán do Tabulky 1 anebo do nové tabulky, aby se předešlo zdouhavému úvodu. U PCR primerů by jsem doporučovala specifikovat, jak velký úsek genu amplifikují. Výsledky jsou srozumitelně shrnuty a vhodně doplněny o několik tabulek a obrázků. Prosím o upřesnění nesrovnalosti na obrázcích 7 a 8B, kde tvrdíte, že infekce pocházejí z přirozeně infikované sýkory koňadry, ovšem v textu k obrázkům (paragraf 5.3.4) uvádíte, že se jednalo o experimentálně nakažené sýkory. Diskuze je pečlivě vypracována, shrnuje a porovnává dosažené výsledky s publikovanými daty.

K práci mám následující dotazy a připomínky:

1) Z práce není jasné, jaký byl podíl studentky na sběru skoro 760 vzorků trusu ptáků? Rovněž by jsem poprosila o upřesnění podílu studentky na jednotlivých metodách, kterých je v práci nepřehledné množství zahrnující např. izolaci DNA, PCR, vyhodnocování sekvencí včetně konstrukce fylogenetických stromů, barvení oocyst, experimenty, histologii, atd. Jestli studentka opravdu prováděla všechny metody, gratuluji ji a také školiteli za obrovské množství odvedené práce.

2) V práci Nakamury a kolektivu (2015, revize) se uvádějí další druhy kryptosporidií nalezených u ptačích hostitelů, a to konkrétně primárně savčí druhy *C. andersoni*, *C. muris*, *C. parvum* a *C. hominis*. Proč tyto druhy ve vašem přehledu (tabulka 1) neuvádíte nebo se shodují s nějakými liniemi, které již v tabulce jsou? Podobně Sréter a Varga (2000, revize) rovněž uvádí *C. parvum* jako druh parazitující u ptáků.

3) Byly výsledkem sekvenování PCR produktů vždy jednoznačné píky v chromatogramech? Neuvažovali jste o klonování PCR produktů a následném osekvenování plazmidů za účelem zjištění vnitrogenomové variability ve zkoumaných genech a k detekci potenciálně se vyskytujících smíšených infekcí vícero druhů kryptosporidií v jednom vzorku? Jsou smíšené infekce těchto parazitů u ptáků známy?

4) S tím souvisí i moje následující otázka týkající se značné variability ve velikosti oocyst a orgánové specificity *C. galli* u vašeho izolátu a v publikovaných datech. Je možné, že by tyto odlišnosti mohli být dány tím, že byl váš vzorek ve skutečnosti infikován dvěma druhy kryptosporidií - jedním, který jste mikroskopicky pozorovali a druhým - skutečným *C. galli*, který nebyl mikroskopicky detekován, ale byl ovšem osekvenován? Jakou metodou by bylo možné tuto teorii ověřit?

5) Jaký je váš názor na nižší sekvenční variabilitu - schopnost rozlišení jednotlivých izolátů *C. galli* a *C. baileyi* na základě protein-kódujících genů HSP70 a aktinem v porovnání s SSU rDNA? Neuvažovali jste o analýze protein-kódujících dat na základě aminokyselin?

6) Předpokládáte, že průzkum dalších vzorků trusu z různých druhů pěvců z různých geografických oblastí by mohl odhalit existující dosud neprobádanou diverzitu těchto parazitů nebo se domníváte, že většina izolátů by klastrovala s již známými druhy *C. baileyi* a *C. galli*? Máte v plánu se v budoucnu zabývat touto tematikou?

7) Předpokládáte, že druh kryptosporidie z vlaštovky je jenom pasáží nebo opravdu parazituje u zmiňovaného druhu ptáka? Jaký důkaz by byl potřebný pro tvrzení, že vlaštovka je skutečným hostitelem této kryptosporidie?

Bakalářskou práci považuji za zdařilou a doporučuji vřele k obhajobě s hodnocením výborně.

V Českých Budějovicích, 13. 5. 2019

RNDr. Pavla Sojková, Ph.D.

