

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 stromových a zemních veverek

Cryptosporidium and cryptosporidiosis of tree and ground squirrels

Autorka: MVDr. Jitka Prediger

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 **MVDr. Jitkou Prediger**, 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 121 stran a skládá se abstraktů v českém a anglickém jazyce, vlastní práce a závěrů disertace, dále ze seznamu impaktovaných publikací, příspěvků na konferencích a grantů.

Vlastní práci tvoří: úvodní strana, 24 stran literární rešerše, dvě strany s vytyčenými cíli a hypotézami disertační práce, devět stran komentářů k výsledkům vlastní práce, jedna strana se závěry a 25 stran seznamu použité literatury a konečně přílohy tzv. full textů vědeckých publikací v rozsahu 39 stran.

Aktuálnost zvoleného tématu

Téma disertační práce „**Kryptosporidie a kryptosporidióza stromových a zemních veverek**“ je významné proto, že veverky často sdílí životní prostor s lidmi, mohou tak být významným rezervoárem řady zoonotických patogenů, včetně kryptosporidií.

Proto vědeckovýzkumné práce, zaměřené na problematiku kryptosporidií, s ohledem na mezery v odborném českém písemnictví a dále i praktické využití výsledků v chovatelské praxi, mají velký vliv na prevenci zdraví zvířat i člověka.

Literární přehled

Autorka vychází z problematiky čeledě Sciuridae (veverkovití) a zabývá se odlišnostmi stromových a zemních veverek a jejich charakteristickými znaky. Dále sleduje sociální chování a introdukci nepůvodních druhů veverek do Evropy a jejich význam jako rezervoár zoonóz.

Doktorandka se zaměřila na kryptosporidie (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infikující primárně gastrointestinální, respirační a urogenitální trakt řady obratlovců, včetně člověka, které celosvětově vyvolávají kryptosporidiozu a významně mohou ohrožovat juvenilní jedince.

Splnění vytyčeného cíle

Autorka disertační práce si vytyčila základní cíl: studovat výskyt, diverzitu a biologii kryptosporidií a prevalenci kryptosporidiosis hlodavců podčeledi Sciurinae, přičemž si stanovila čtyři hypotézy.

V první části se v dílčích cílech zaměřila na vyhodnocení výskytu a prevalence kryptosporidiových infekcí u volně žijících stromových veverek v Itálii, České republice, na Slovensku a studovala se zahraničními kolegy z USA rozšíření kryptosporidií u stromových a zemních veverek.

Ve druhé části doktorandka popsala biologii získaných genotypů kryptosporidií, zejména průběh infekce, patogenitu a lokalizaci vývojového cyklu včetně popisu vývojových stádií.

Autorka ve třetí části vyhodnocovala pomocí multilokusové genotypizace a fylogenetických analýz diverzitu kryptosporidií studovaných veverek a ověřila hostitelskou specifitu jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií.

Obsah a rozsah této kapitoly 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.

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 „Kryptosporidie a kryptosporidiosis stromových a zemních veverek“ **MVDr. Jitky Prediger** byla zpracována formou **souboru publikací** studentky již uveřejněných **a opatřených komentářem**, na základě multidisciplinárního přístupu z řady vědeckých disciplín k řešení problematice, spojujícího metody molekulární biologie, parazitologie, zoologie, histologie a práce se zvířaty, které byly publikovány v průběhu studia ve třech světových, recenzovaných, impaktovaných, vědeckých publikacích.

V této části autorka odkazuje na přílohy, které reprezentují metodické postupy i dosažené výsledky výrazně rozšiřují znalosti: o kryptosporidiosis specifických pro veverky o výskytu a diverzitě, o morfologii vývojových stádií, hostitelské a orgánové specifitě, patogenitě a přenosu.

- Celkem bylo vyšetřeno **n=925 vzorků trusu** (z České republiky, Slovenska, USA a Itálie) pomocí mikroskopických a molekulárních metod, od osmi druhů stromových a zemních veverek.
- Specifická DNA kryptosporidií byla detekována pomocí multilokusové genotypizace a přítomnost kryptosporidií byla potvrzena u **n=182 jedinců**.
- Fylogenetické analýzy prokázaly přítomnost tří druhů a šesti genotypů kryptosporidií
- V Americe byly severoamerické stromové a zemní veverky hostiteli různých druhů a genotypů kryptosporidií. Zemní veverky byly infikovány specifickým druhem *C. rubeyi* a *Cryptosporidium* sp. ground squirrel genotyp I, II a III. Na rozdíl od stromových veverek infikovaných druhem *Cryptosporidium* sp. deer mouse genotyp III, *Cryptosporidium* sp. skunk genotyp a *C. ubiquitum* (dvě posledně jmenované kryptosporidie byly patrně hostiteli, veverkami popelavými, introdukovány do Evropy, což naznačila studie provedená v Itálii.
- Na území Itálie byly původní veverky obecné infikovány výhradně *Cryptosporidium* sp. ferret genotypem, který se u tohoto druhu běžně vyskytuje, na rozdíl od introdukovaných veverek popelavých, u nichž byla prokázána infekce *C. ubiquitum*, *Cryptosporidium* sp. skunk genotyp a *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I.
- Výsledky navazujících studií v České republice a na Slovensku ukázaly, že původní veverka obecná je výhradně infikována *Cryptosporidium* sp. ferret genotypem a kryptosporidie specifické pro veverky popelavé se do střední Evropy nerozšířily.
- S ohledem na rozšíření v populaci původních veverek obecných byl podrobněji studován *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp a bylo prokázáno, že se geneticky liší od ostatních druhů rodu *Cryptosporidium*.
- Oocysty *Cryptosporidium* sp. ferret genotypu experimentálně podané, nebyly infekční pro laboratorní myši, pískomily mongolské, mastomyši, kura domácího a andulky vlnkované.
- Oocysty *Cryptosporidium* sp. ferret genotypu byly bezbarvé, sférické, o velikosti $5,54 \times 5,22 \mu\text{m}$ a standardními barvicími metodami a specifickými protilátkami se barvily jako ostatní druhy a genotypy kryptosporidií.
- Intenzita infekce u volně žijících veverek se lišila věkem, se zaznamenanou silnou intenzitou infekce u juvenilních jedinců.
- Na základě výsledků byl *Cryptosporidium* sp. ferret genotyp popsán jako nový samostatný druh *Cryptosporidium sciurinum*.

Disertační práce se 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 tří recenzovaných publikací, které se vztahují k tématu disertace, z toho 2x jako první autorka. Dále se vědecky podílela i na třech dalších

impaktovaných publikacích, které se sice přímo netýkaly tématu disertační práce, ale zabývaly se problematikou kryptosporidií.

Výsledky výzkumu doktorandka prezentovala s výzkumnými spolupracovníky na devíti konferencích v tuzemsku i zahraničí (2x jako přednášející a 7x formou posterů). Během doktorského studia se jako členka týmu podílela na řešení pěti grantů, např. GAJU (3x), GAČR (1x), MŠMT (1x).

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

- Jaký je, podle názoru autorky, potenciál přenosu kryptosporidií na člověka, při manipulaci s infikovanými veverkami stromovými a zemními ?
- Zaznamenala autorka v literárních pramenech u dalších zástupců čeledě Sciuridae (veverkovití) rovněž vysokou prevalenci kryptosporidiózy ? Byla prevalence u syslů, psounů, svišťů, čikarí a čipmanků vyšší než u veverek stromových a zemních ? Zvažuje výzkumný tým autorky zaměřit pozornost i na další lokality zástupců této čeledě ?
- Jakou roli v šíření těchto patogenů sehraává geografická distribuce při introdukci jednotlivých druhů a genotypů veverek ? Byly popsány i možnosti vědecky zdokumentovaných častých koinfekcí kryptosporidií s ostatními bakteriálními a virovými patogeny ?
- Jaká veterinární preventivní opatření a diagnostické postupy autorka navrhuje k zabránění přenosu oocyst kryptosporidií u jedinců (např. při importu a exportu těchto druhů), když efektivní léčba ani vakcína proti kryptosporidióze není k dispozici ? Zvažuje se i eradikace invazivních druhů v rámci EU ?
- Předpokládá autorka a její spolupracovníci zpracování disertační práce do formy monografie, určené pro vědeckou, ale i odbornou chovatelskou veřejnost ?

Významným se jeví v předkládané práci především:

- Systematické zpracování literárního přehledu a komentovaných výsledků tří recenzovaných vědeckých publikací
- Vzorky pro mikroskopické a molekulární analýzy byly sbírány na dvou kontinentech, v Severní Americe a Evropě. Intenzita infekce kryptosporidiových infekcí u volně žijících zvířat je často pod detekční hladinou mikroskopických metod
- Rozdíly v prevalenci mohou ovlivňovat nejen druh a genotyp kryptosporidie, ale také hustota populace vnímavých hostitelů a prostředí usnadňující šíření infekce
- Fylogenetické analýzy prokázaly, že *Cryptosporidium* sp. **ferret genotyp** vytváří mezi ostatními střevními kryptosporidii samostatnou skupinu a tento genotyp byl popsán jako samostatný druh - *Cryptosporidium sciurinum*
- U stromových veverek na dvou kontinentech byly detekovány zoonotické druhy *C. ubiquitum* a *Cryptosporidium* sp. **skunk genotyp** a *Cryptosporidium* sp. **chipmunk genotyp I** a proto mohou být přirozeními hostiteli zoonotických kryptosporidií

Závěr

Disertační práce přináší nové poznatky o výskytu, diverzitě a biologii kryptosporidií parazitujících u stromových a zemních veverek, které mohou být potenciálním rizikem a rezervoárem kryptosporidií, infekčních pro člověka.

Autorka v závěru práce prezentuje souhrn výsledků, dosažených v průběhu zpracování doktorské disertační práce formou komentovaných výsledků a doložených ve třech recenzovaných impaktovaných vědeckých publikacích. Přínosem celé disertační práce je její zpracování ve stručné, jasné a srozumitelné podobě, s přehledně uspořádanými výsledky a komentářem ke stanoveným čtyřem hypotézám.

Doktorandka současně nastiňuje možnosti dalšího výzkumu, k prohloubení znalostí v dané problematice.

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 ě u j i** doktorskou disertační práci „Kryptosporidie a kryptosporidióza stromových a zemních veverek“ autorky **MVDr. Jitky Prediger** přijmout k obhajobě. Po jejím úspěšném průběhu **d o p o r u ě u j i** udělit **MVDr. Jitky Prediger** **vědeckou hodnost:**

Philosophiae doctor

V Praze 15.9.2022

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

Oponentský posudek na disertační práci MVDr. Jitky Prediger „Kryptosporidie a kryptosporidióza stromových a zemních veverek“

Disertační práce MVDr. Jitky Prediger je založena na třech článcích publikovaných v impaktovaných časopisech *Microorganisms*, *European Journal of Protistology* a *Infection, Genetics and Evolution* (v práci zařazeno jako Přílohy) s úvodním textem členěným do sedmi kapitol včetně literatury. Práce je přehledná, s minimem chyb a ukazuje, že autorka je v problematice zběhlá a dokáže své znalosti a výsledky čtenáři zprostředkovat. Velice oceňuji formulování hypotéz pro celou disertační práci. Ovšem asi bych navrhla zařadit i kapitolu s přehledem metodiky, a to i přesto, že je v článcích samozřejmě uvedena. Jako zásadní problém toto však nevidím. Skvěle jsou formulovány závěry.

Nicméně zásadním způsobem mne překvapilo, že práce je psaná v českém jazyce, což v současné době považuji v biologii za překonanou věc, obzvláště u disertační práce. Je velká škoda, že se studentka nerozhodla napsat práci v angličtině. Takto bude mít práce pouze velmi omezený dosah, což je při její vysoké úrovni celkem škoda. Samozřejmě, články jsou v angličtině, ale myslím, že by se rozhodně našli i zahraniční vědci a studenti, kteří by si rádi práci, třeba i v budoucnu, přečetli a takto nemají vůbec šanci. Doporučila bych komisi i školiteli, aby studenty motivovali psát (nejen) disertační práce v anglickém jazyce. Zvýší se tím i počet možných oponentů.

Několik otázek:

- V článku č. 1 (příloha 1) autorka píše ohledně vysvětlení proč stromové a zemní veverky jsou parazitovány odlišnými druhy a genotypy kryptosporidií následující, citují: *„One possible explanation is the different ecologies and behaviors of tree squirrels and ground squirrels. Tree squirrel species usually remain active throughout the year, living in the trees of forests, riparian areas, and urban areas. In contrast, ground squirrel species seldom climb trees, living instead in underground burrow systems, most frequently in prairies or grasslands, where many species hibernate during the winter months.”* Chtěla tím autorka říci, že se veverky v podstatě nepotkávají i přesto, že jsou

sympatrické? Je řečeno, že zemní veverky nešplhají na stromy, avšak běhají studované stromové veverky občas po zemi? Existují nějaké studie, zabývající se kolik času tráví studované stromové veverky na zemi? Jaký vliv může mít celoroční aktivita vs. hibernace na absenci překryvu kryptosporidií?

- Má autorka nějaké vysvětlení proč pouze stromové veverky jsou hostiteli zoonotických kryptosporidií? Předpokládá autorka, že stromové veverky jsou původními hostiteli všech těchto zoonotických kryptosporidií, pokud ne, jaký je její názor na původ/zdroj těchto kryptosporidií u veverek?
- V textu disertační práce (str. 49) autorka píše, cituji: „Veverky obecné byly v Itálii parazitovány pouze druhem *C. sciurinum* (*Cryptosporidium sp. ferret* genotyp; Příloha 3) patřícím do dvou gp60 subtypů VIIIb a VIIIc. V této studii je mylně uvedeno, že byl detekován subtypem VIId. Tento subtyp byl mylně označen a jedná se o *C. parvum* subtyp IIa.“ Bylo opublikováno erratum, kde byla chyba opravena?
- V článku 1, strana 291 je řečeno, cituji: „Subtype XIIb was detected previously in a Verreaux's Sifaka.“ Jednalo se o zvíře ze zajetí?

Předložená disertační práce splňuje požadavky na disertační práci a doporučuji, aby byla přijata k obhajobě.

V Brně 15/9/2022

Mgr. Klára Petrželková, Ph.D.



Oponentský posudek na disertační práci MVDr. Jitky Prediger s názvem „Kryptosporidie a kryptosporidióza stromových a zemních veverek“

Doktorská disertační práce MVDr. Jitky Prediger představuje ucelenou vědeckou práci čítající 121 stran včetně 3 příložených původních vědeckých prací publikovaných v časopisech *Microorganisms*, *European Journal of Protistology* a *Infection, Genetics and Evolution*. Předložená práce byla vypracována v rámci doktorské studia na Zemědělské a technologické fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Po obsahové a formální stránce má předložená disertační práce charakter fundovaného vědeckého díla. Práce je velmi přehledně členěna do kapitol a podkapitol, které na sebe v průběhu celé práce navazují. Celkové uspořádání práce příznivě ovlivňuje její přehlednost a čtivost.

Stručně k jednotlivým kapitolám:

Cíl práce

Cíle práce je velmi dobře formulovány. Byly stanoveny dílčí cíle práce. Tato kapitola zcela splňuje svůj účel a oponent podle její formulace dokáže snadno ověřit, zda se autorka drží navržených cílů.

Hypotézy

Oceňuji stanovení hypotéz, které vhodně doplňuje předchozí kapitolu týkající se cílů práce.

Literární přehled

Tato kapitola je velmi dobře zpracovanou literární rešerší, která obsahuje setříděné informace týkající se tématu práce. Konkrétně se jedná o informace týkající se čeledi veverkovitých, odlišností stromových a zemních veverek, sociálního chování veverek, introdukce nepůvodních druhů veverek do Evropy, veverek jako rezervoáru zoonóz a kryptosporidií u stromových a zemních veverek.

Materiál a metodika

Tato kapitola není v práci uvedena, nicméně vzhledem k doloženým původním vědeckým pracím v příloze je metodika dostatečně popsána.

Komentář k výsledkům

Doporučil bych tradiční název kapitoly Výsledky a diskuse. Nicméně v této kapitole jsou podrobně popsány výsledky. Velmi vhodně a precizně je zde odpovězeno na jednotlivé stanovené hypotézy. Diskutováno s dostupnou literaturou.

Závěr

Závěr práce odpovídá dosaženým výsledkům a objektivně dokládá splnění cílů, které si autorka kladla.

Seznam použité literatury

Autorka použila vhodné literární zdroje, jak do kvantity, tak kvality. Citovány jsou převážně zahraniční vědecké práce.

Doplňující dotazy:

1. Která stanovení a analýzy byly provedeny samotnou autorkou práce, které byly provedeny ve spolupráci s jinými osobami, organizacemi, které byly provedeny v zahraničí?
2. Kdyby autorka měla pokračovat v práci na daném tématu, kam by zaměřila svůj zájem a výzkum?

Celkové hodnocení:

Předložená disertační práce má vysokou kvalitativní úroveň, přináší nové, velmi zajímavé a pro tento obor přínosné poznatky. Výsledky práce byly publikovány ve velmi kvalitních vědeckých časopisech. Články jsou odbornou veřejností přijímány velmi pozitivně, což dokládá jejich citovanost. Práce splňuje ta nejvyšší měřítko hodnocení.

Jako oponent konstatuji, že disertační práce splňuje všechny požadavky kladené na tento druh vědeckého sdělení, a proto

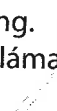
doporučuji, aby byla přijata k obhajobě,

a aby

MVDr. Jitce Prediger

na základě její obhajoby byl udělen titul „doktor“ (Ph.D.).

V Bydhošti, dne 12. 9. 2022

doc. Ing.  Digitálně podepsal
doc. Ing. Petr
Sláma, Ph.D.
Datum: 2022.09.12
11:06:40 +02'00'

doc. Ing. Petr Sláma, Ph.D.