

Oponentský posudek diplomové práce

Infekce klíšťat *Ixodes ricinus* spirochetami *Borrelia burgdorferi* sensu lato

autor: Bc. Lenka Fišerová

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na problematiku vzniku a přenosu infekce způsobené bakteriemi *Borrelia burgdorferi* s průkazným vztahem k Lymeské borelióze. Bakteriální infekce může být obecně v těle hostitele příčinou i následkem mnoha patologických procesů, v případě Lymeské boreliózy jde o celosvětový zdravotní problém, pro jehož pochopení je nezbytné jak studium patogenetických mechanismů, tak studium samotných infekčních agens včetně všech aspektů, které lze pro potenciální vznik infekčního onemocnění vyvodit. Podstatou diplomové práce je průkaz některých interakčních vztahů v přenosu boreliové infekce klíšťaty *Ixodes ricinus* a představuje tak cenný příspěvek k této široké problematice.

Diplomová práce v rozsahu 47 stran včetně použitých informačních zdrojů je rozčleněna do 6 základních kapitol. První kapitola (Literární přehled) přináší stručný souhrn základních informací o infekčním agens *Borrelia burgdorferi*, charakterizuje onemocnění Lymeská borelióza a zaměřuje se na hlavní přenašeče borelií (klíšťata) včetně popisu vzájemných interakcí klíště - borelie - hostitel. Druhá kapitola vytyčuje cíle práce, v třetí kapitole je popsán biologický materiál a použité laboratorní metody. Výsledky jsou shrnuty v kapitole 4, následuje diskuse (kap. 5) a závěr (kap. 6).

Jednotlivé kapitoly jsou poměrně vyvážené, v literárním přehledu bych doporučila doplnit citace ohledně zařazení borelií do komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (str. 6 - 7), a kap. 1.1.3. rozšířit o výčet a základní charakteristiku některých dalších důležitých boreliových antigenů (např. OspD, OspE, OspF, Hsp).

Práce je psána poměrně přehledným způsobem a gramaticky téměř bezchybně, přesto se autorka nevyhnula některým nepřesnostem, např.

- str. 6 - Bergey's Manual nelze překládat jako „Bergerův“
- str. 7 - popsán byl kmen *Borrelia turdae* (Fukunaga et al. 1996), nikoliv *Borrelia turdii*, přestože lze tuto nepřesnost v literatuře nalézt
- str. 29 - nesmyslný text pod tabulkou 5
- v anglickém překladu anotace není vhodné psát „Mgr.“ Thesis
- sjednotit psaní názvů - flagellin (str. 8) x flagelin (str. 19)
- v odkazu na citaci Jonsson and Bergström (str. 9) překlep Johnson and Bergstrom.

Kromě těchto drobných nedostatků věcně postrádám ve struktuře práce kapitolu „Úvod“, která má v práci tohoto charakteru nezastupitelné místo a mimo jiné by např. objasnila, proč se autorka vůbec práci věnuje, případné vazby na problematiku dlouhodobě řešenou na daném pracovišti aj.

Další připomínky k práci jsou následující:

- čeleď *Spirochaetaceae* zahrnuje dle zmiňovaného Bergeyova manuálu 9 rodů spirochet, nikoliv dva, jak je uvedeno v kapitole 1.1. (*Borrelia* 30 spp., *Brevinema* 1 sp., *Clevelandina* 1 sp., *Cristispira* 1 sp., *Diplocalyx* 1 sp., *Hollandia* 1 sp., *Pillotina* 1 sp., *Spirochaeta* 14 spp., *Treponema* 18 spp.)

- reprodukce obrázků s výsledky PCR detekce je nekvalitní (obr. 2 a zvláště obr. 3 a 4), chybí popis molekulového markeru (bp) a popis velikosti vlastního detekovaného produktu amplifikace (669 bp)
- pokud fotografie některých výsledků nejsou k dispozici, do textu bych tuto skutečnost neuváděla - zbytečně se zaměřuje pozornost na fakt, že něco „není v pořádku“. Pokud je to uvedeno tak, jako v práci na str. 29 nebo 31, je vhodné odůvodnit, proč tomu tak je.
- nesrovnalosti s uváděnými odkazy na literaturu v textu a přehledem citované literatury
 - o Kurtenbach et al. 2001 (str. 7) - v seznamu lit. Kurtenbach et al. 2000 (str. 42)
 - o Fingerle et al. 2000 (str. 16) a Fingerle et al. 2002 (str. 35) - v seznamu lit. pouze Fingerle et al. 2002 (str. 40) (nepřesnost nebo chybí citovaný zdroj)
 - o Burgdorfer 1987 (str. 16) a Burgdorfer 1957 (str. 35) - v seznamu lit. pouze Burgdorfer 1987 (str. 39) (nepřesnost nebo chybí citovaný zdroj)
 - o k citaci Radolf et al., 1995 (str. 9) jsou v přehledu lit. dva odkazy (str. 43 a 44), vhodné odlišit např. „a“ a „b“ a citovat Radolf et al. 1995 a, b.
 - o odkaz na citaci Liebisch et al., 1998 (str. 42) jsem v práci nenalezla
 - o odkaz na citaci Toutoungi et al., 1993 (str. 45) jsem v práci také nenalezla
 - o naopak citovaná práce Janouškovcová 2004 (str. 14) v seznamu literatury chybí, jde jistě o nedopatření - žádná práce autorky nemá přímou souvislost s kap. 1.4.


I přes uvedené připomínky je nesporné, že největší váhu celé práce představuje vlastní experimentální činnost, její vyhodnocení a snaha o interpretaci dosažených výsledků v závislosti na předpokládaných nebo již známých skutečnostech, jejíž náznaky jsou patrné v diskuzi. Výsledky práce, kterých bylo dosaženo na základě časově i experimentálně náročných cílů, stanovené cíle do značné míry naplňují, přestože se autorce nepodařilo některé z plánovaných postupů úspěšně provést.

V souvislosti s předkládanou prací mám následující dotazy:

1. Sáním na infikovaných myších se podařilo infikovat klíšťata *Ixodes ricinus* všemi použitými boreliovými antigeny, jako nejslabší se ukázala schopnost infikovat kmenem *Borrelia afzelii*. Přesto byla klíšťata *Ixodes ricinus* infikovaná *Borrelia afzelii* použita k experimentu, jehož cílem bylo zjistit u infikovaných klíšťat po metamorfóze jejich schopnost nakazit hostitele. Proč byl zvolen právě kmen *Borrelia afzelii*?
2. U sledování schopnosti infikovaných klíšťat po metamorfóze nakazit hostitele je uvedeno, že proto, aby myš přežila sání dvou samic klíštěte, nebylo těmto samicím klíšťat umožněno plné nasátí krve, ale byly odstraněny po pěti dnech sání. Je to vlastní zkušenost, nebo existují studie, které sledují schopnost přežití myši vlivem sání klíšťat (v laboratoři či přírodě)? Na jakém základě uvádíte, že pět dní v tomto případě ještě dostahuje pro přežití myši (velikost a s tím související množství krve, imunita atp.)?
3. Plánujete s ohledem na dosažené výsledky opakování experimentů či jejich modifikaci?

Závěr: Předkládanou práci považuji za zdařilou, autorka si osvojila základy vědecké práce a tvorby výstupů z této činnosti, jednoznačně prokázala schopnost plánování experimentů, zvládnutí několika laboratorních technik, samostatného zpracování stanovených úkolů i schopnost orientace a práce s odbornou literaturou. I přes některé nedostatky tvoří práce ucelený soubor, který splňuje podmínky kladené na vypracování diplomové práce, a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Brně 19. května 2007


 RNDr. Eva Janouškovcová, Ph.D.

AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY



ÚSTAV BIOLOGIE OBRATLOVCŮ, v.v.i.

ODDĚLENÍ MEDICÍNSKÉ ZOOLOGIE

Klášterní 212, CZ-691 42 Valtice, Česká republika



Telefon: ++420-519352961 Fax: ++420-519352387 e-mail: rudolf@ivb.cz

Věc: Oponentský posudek magisterské diplomové práce Katedry obecné biologie Biologické fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Studentka magisterského studia Katedry obecné biologie Bc. Lenka Fišerová předložila k posouzení diplomovou práci s názvem „**Infekce klíšťat *Ixodes ricinus* spirochétami *Borrelia burgdorferi sensu lato*““. Cílem práce bylo optimalizovat tři různé metody infekce klíšťat borreliemi, ověřit schopnost infikovaných klíšťat přenést borrelie na dalšího hostitele a zvolit vhodnou metodu detekce borrelií v klíšťatech. Téma práce bylo zvoleno velmi vhodně, protože metody infekce vektorů patogeny jsou u nálezů přenášených hematofágními členovci nezbytné pro studium vzájemných interakcí mezi patogenem, vektorem a hostitelem. Posluchačka se ve své práci věnovala třem hlavním postupům infekce klíšťat borreliemi, které se objevují v literatuře: nasávání na infikovaných myších, sání z kapiláry a ponoření do suspenze borrelií.**

Práce jako celek má 47 stran, je přehledně členěna do několika kapitol (Literární přehled; Cíle práce; Materiál a metody; Výsledky; Diskuse a Závěr). Dále je práce doplněna Seznamem použité literatury (99 citací).

Práce je psána pečlivě, úhledně a s malým počtem překlepů. Vhodné bylo začlenění Seznamu použitých zkratk v závěru práce. I přesto bych měl k předkládané práci několik připomínek, jejichž výčet předkládám.

Připomínky k literárnímu přehledu:

Str. 6 – ne podle Bergerova manuálu, ale podle manuálu Bergey a kol.

- vratný tyfus nezpůsobují bakterie komplexu *B. burgdorferi* s.l., ale *B. recurrentis*
- v češtině je vhodnější místo termínu genospecies užívat označení genomický druh

Str. 7 - ...v Evropě byl potvrzen výskyt 7 genomických druhů komplexu *B. burgdorferi* s.l., nikoliv rodu *Borrelia*.

Str. 12 – označení TBE virus pro střeoevropskou klíšťovou encefalitudu není vysvětleno v seznamu použitých zkratk, rovněž zkratka ELISA by si zasloužila vysvětlení.

Str. 14. – citace v textu „Janouškovcová 2004“ chybí v seznamu citované literatury.

Připomínky k metodické části:

Str. 20 - v metodické části mi chybí u nasávání klíšťat borreliemi přes kapiláru podrobnější informace o jakou kapiláru šlo (např. průměr, velikost), jak dlouho nymfy sály, zda nasávání probíhalo v termostatu a při jaké teplotě, zda byla aparatura umístěna ve vlhké komůrce. Určitě by pro lepší představu oponenta nebylo na škodu vložení fotky nasávací aparatury s klíšťaty.

Připomínky k výsledkům a diskusi:

Str. 31 - fotka na obr. 4 byla do diplomové práce vložena navíc (PCR produkty na ní nejsou vidět) a nepodává tedy potřebnou informaci. Legendy k fotkám by se spíše hodily pod fotky samé a nikoliv do textu výsledků.

Str. 31 - protože se nepodařilo ověřit úspěšnost nasátí kapilárou při expozici na myších, bylo by vhodné ověřit úspěšnost nasátí alespoň PCR vyšetřením klíšťat samotných při jejich dlouhodobější inkubaci s borreliemi (Hubálek et al., 1996).

Str. 34 - 37 – v části diskuse mi chybí porovnání výsledků nasávání klíšťat kapilárou s několika důležitými literárními prameny:

Kocan K.M., Yoshioka J., Sonenshine D.E., De la Fuente J., Ceraul S.M., Blouin EF, Almazan C. 2005. Capillary tube feeding system for studying tick-pathogen interactions of *Dermacentor variabilis* (Acari : Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales : Anaplasmataceae) J. Med. Entomol. 42: 864-874.

Mátlová L., Halouzka J., Juřicová Z., Hubálek Z. 1996. Comparative experimental infection of *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) with *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Folia Parasitol. 43: 159-160.

Dotazy diplomantce:

1. Jakou mol.-biologickou metodou byly určeny kmeny *B. burgdorferi* použité v pokusech?
2. Mohou antibiotika obsažená v kultivačním médiu pro spirochéty (BSK-H) nějak ovlivnit jejich fyziologické popřípadě genetické vlastnosti?
3. Jak bylo zabráněno možné kroskontaminaci mezi vzorky v mikrotitračním panelu v případě homogenizace klíšťat při izolaci borreliové DNA?
4. Jak si diplomantka vysvětluje nízké procento úspěšnosti infekce klíšťat *B. afzelii* (16%) na infikovaných myších - na rozdíl od *B. garinii* (44 %) a *B. burgdorferi* s.s. (64%)?

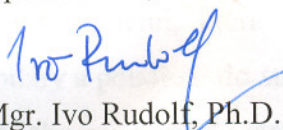
5. Jak si diplomantka vysvětluje zjištění, že se nepodařilo prokázat infekci u myší, na kterých sály larvy klíšťat infikované ponořením do suspenze borrelií (negativní ELISA i PCR), ale podařilo se prokázat infekci po metamorfóze u nymf z těchto larev vzniklých?
6. Jak se diplomantce podařilo optimalizovat zkoušené metody nasávání? Dle oponenta šlo spíše o jejich experimentální ověření.

Chtěl bych podotknout, že mé připomínky nijak nesnižují jinak dobrou úroveň předkládané diplomové práce. Za zmínku stojí, že posluchačka do své práce začlenila značné spektrum metodik (kultivace borrelií, experimentální nasávání klíšťat, práce s laboratorními zvířaty, PCR, ELISA, Western blotting) a použité metodiky nasávání jistě budou moci být brzy začleněny do provozu Laboratoře interakcí vektor-hostitel v PaÚ AVČR v Českých Budějovicích.

Závěrem:

Předkládaná práce splňuje všechny nároky kladené na magisterskou diplomovou práci, a proto ji doporučuji k obhajobě.

S pozdravem,


Mgr. Ivo Rudolf, Ph.D.

Ve Valticích dne 17.5. 2007