

Oponentský posudek na magisterskou práci „Detekce spirochét lyské boreliózy v klinických vzorcích metodami PCR a optimalizace podmínek kultivace borelií ze vzorků pacientů s příznaky lyské boreliózy“ pana Jiřího Havrana.

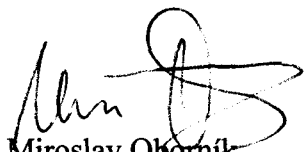
Předložená práce s poněkud krkolomným a dlouhým názvem je klasicky členěná na Úvod, Cíle práce, Materiál a metodika, Výsledky, Diskuse a Závěr, které jsou doplněny o seznam použité literatury. Práce je sepsána česky na 34 stranách včetně seznamu literatury. V Úvodu podává diplomant ucelený přehled o cílovém organismu – spirochétách rodu *Borrelia*, morfologii, klinických příznacích infekce a metodách detekce tohoto patogena. Práce je sepsána přehledně a snesitelnou češtinou. Mám k ní ale několik zásadních připomínek a otázek:

- 1) První a naprosto zásadní připomínka se týká absence obrázků gelů z PCR diagnostiky klinických vzorků. V celé práci není fotka jediného gelu, výsledky jsou pak představeny pouze formou tří grafů bez vysvětlivek, které by u dvou z nich byly dost zapotřebí. Absence obrázků gelů, tedy jediné dokumentace provedené experimentální práce, je téměř neomluvitelná.
- 2) První graf na straně 19 (grafy nejsou číslovány) ukazuje procentuální úspěšnost detekce patogena v klinických vzorcích. Zajímalo by mně, co to vlastně v tomto grafu znamená. Je to úspěšnost detekce v pozitivních vzorcích? V takovém případě je velmi malá. Je to prevalence v klinických vzorcích? V tom případě je název grafu špatně. Proč se liší „úspěšnost“ detekce z krve a mozkomíšního moku? Znamená to snad, že je zde různá prevalence nebo spolehlivost a citlivost metody z různého klinického materiálu?
- 3) Druhý graf, již označený jako Graf 2, ukazuje procentuální „rozdělení“ (asi spíš zastoupení) jednotlivých druhů borelií v pozitivních klinických vzorcích. Nechápu ale, proč graf, který ukazuje zastoupení jednotlivých druhů *B. burgdorferi* s.l., obsahuje též kategorii *B. burgdorferi* s.l.??
- 4) V textu úvodu chybí řada citací, informace jsou uvedeny bez zdroje, ze kterého byly získány.
- 5) Kurzívou se píšou pouze názvy rodů a druhů, nikoliv pak čeledí, řádů, či kmenů.
- 6) Na straně 5 chybí kurzíva u názvu druhu.
- 7) RFLP je metoda postavená čistě na restrikci celkové, případně genomové DNA, která může být doplněna následnou hybridizací se specifickou sondou u komplexnějších vzorků. To, co popisuje diplomant je PCR-RFLP.
- 8) Naprosto mi uniká účel *in silico* RFLP. Výhoda RFLP spočívá především v tom, že k charakterizaci a následné identifikaci izolátu není třeba znalost jeho DNA. Používat zpětně *in silico* RFLP k určení fragmentů v již známém úseku DNA, považuji za naprosto zbytečný krok; když znám sekvenci, mohu přeci použít k identifikaci přímo tuto sekvenci...
- 9) Co je to p66? Není vysvětleno.
- 10) V případech, kdy existují české ekvivalenty, doporučuji je používat místo anglicismů (jako například intergenic spacer region).
- 11) Následující větu nechápu: „Lokalizace genu flagelin na megabázi lineárního chromozómu je konzervativní v rámci rodu *Borrelia*.“
- 12) Zaujal mne způsob izolace PCR fragmentů z gelu. Můžete jej blíže vysvětlit?
- 13) Virtuální hybridizaci považuji za srovnatelně „přínosnou“ jako *in silico* RFLP.

14) V práci bych přivítal seznam zkratk.

Shrnutí

Práce je formálně v pořádku, za největší nedostatek pak považuji naprostou absenci fotek gelů z diagnostické PCR. Také vzhledem k dalším nedostatkům, jako jsou nepopsané grafy a absence citací, předběžně hodnotím tuto práci jako „dobrou“ a doporučuji ji k obhajobě. Pokud mne diplomant při obhajobě přesvědčí, jsem ochoten klasifikaci práce změnit, třeba i k lepšímu.



Miroslav Oborník
Biologické centrum AVČR
Parazitologický ústav
Branišovská 31
37005 České Budějovice

V Českých Budějovicích, 19. 1. 2011

Posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Jiřího Havrana „Detekce spirochét lymské boreliózy v klinických vzorcích metodami PCR a optimalizace podmínek kultivace borelií ze vzorků pacientů s příznaky lymské boreliózy“

Téma práce je aktuální a vyplývá z dlouhodobého zaměření Laboratoře molekulární biologie vektorů a patogenů, jehož součástí je moderní diagnostika borelií a identifikace nových druhů těchto spirochét.

Práce má klasické členění na osmistránkový Úvod, Cíle, Materiál a metodiky, Výsledky, Diskuzi a Závěr. Přehled použité literatury zahrnuje 55 citací. Celkový rozsah práce včetně literatury je 34 stran.

Literární úvod zahrnuje informace o druhovém zastoupení původců lymské boreliózy, velmi stručně údaje o přenašečích a hostitelích, v rámci morfologie je stručně zmíněna i genetika borelií. Následují klinické projevy boreliózy a diagnostika, která se soustřeďuje na kultivaci spirochét a detekci pomocí PCR. Celkově je literární úvod psán velmi úsporně a postrádám v něm řadu užitečných informací. Na příklad podrobnější popis diagnostických metod, porovnání jejich citlivosti, specifčnosti a vhodnosti použití. *V souvislosti s úvodem diplomové práce bych se chtěl zeptat na úlohu ještěrek jako rezervoárových hostitelů Borrelia burgdorferi sensu lato.*

Cíle práce jsou značně ambiciózní a jejich hlavním kladem je to, že zřejmě nebyly přizpůsobeny výsledkům práce, jak se to při sepisování diplomových prací někdy dělá. Pokud ovšem oponent hodnotí splnění cílů tak, jak jsou formulovány, musí dojít k názoru, že nebyly splněny beze zbytku. Literární studie k problematice detekce spirochét by mohla být obsáhlejší, z metod byla použita prakticky jen PCR a sekvenování, ostatní metody jen virtuálně. Optimalizaci PCR metody jsem nezaznamenal, analýzu asociace specifických klinických projevů s jednotlivými druhy borelií také ne. Vypracování optimálních podmínek kultivace spirochét se omezilo na porovnání dvou medií (BSK-H a MKP), vzorky pocházely z krve a mozkomíšního moku (nikoli kůže nebo kloubní tekutina).

Materiál a metodika. Klinický materiál je nedostatečně charakterizován. Jednotlivé vzorky nejsou vztaženy ke konkrétnímu pacientovi a tak nemůže být splněn jeden z cílů – asociace průběhu onemocnění s druhem borelie. V souvislosti s materiálem mám otázku: *jak byla odebírána krev? Na jednom místě se mluví o vyšetření séra (str. 12), jinde o plazmě (str. 17).* Výběr materiálu pro laboratorní testy se mi jeví jako nejnešťastnější aspekt celé práce. Pro splnění stanovených cílů by bylo jistě vhodnější sledovat pacienty, u kterých byla LB prokázána serologicky i klinicky. Výběr pacientů mohl ovlivnit i velmi překvapivé druhové zastoupení borelií ve vzorcích. Na druhé straně chápu, že tento fakt jistě nemohl Jiří Havran ovlivnit a nelze ho za to kritizovat. Jednotlivé použité metody jsou popsány stručně, ale všechny důležité údaje uvedeny jsou. V souvislosti s kultivací borelií by mne zajímalo, *kolik králičího séra je v MKP mediu. Proč byla do BSK-H media inokulována celá krev a do media MKP jen krevní plasma? Nemohou být borelie v krvi vázány na buňky?*

Výsledky. Z výsledků byl pro mne kromě vysoké záchytnosti boreliové DNA v klinických vzorcích nejpřekvapivější graf 2 ukazující procentuální rozdělení jednotlivých druhů borelií v pozitivních vzorcích. Z výsledků totiž vyplývá, že 70% představovala *B. burgdorferi* s.s., 5% *B. garinii* a *B. afzelii* nebyla nalezena ani u jednoho ze 64 pozitivních pacientů. Toto zjištění je v příkrém rozporu s publikovanými výsledky zastoupení jednotlivých druhů borelií v klíšťatech i v lidských vzorcích. Na příklad Derdákova et al. Appl. Environ. Microbiol. 2003: V klíšťatech – 56% *B. afzelii*, 18% *B. garinii*, 8% *B. burgdorferii* s.s. Floris et al. New Microbiol. 2007: V vzorcích z pacientů – *B. afzelii* 8x, *B. garinii* 6x, *B. burgdorferi* s.s. 1x. Santino et al. Int. J. Immunopathol. Pharmakol. 2009: Vzorky patientské krve – výskyt genospecies v pořadí. *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*. Takže moje otázka zní: *Čím si to lze vysvětlit?*

Za zdůraznění (pochvalné) jistě stojí nalezení nového amerického druhu *B. carolinensis* u jednoho pacienta a *B. americana* u tří pacientů.

Pokusy o kultivaci borelií z odebraných vzorků krve nebo mozkomíšního moku byly ve většině případů neúspěšné. Ze šesti vzorků inokulovaných do media MKP se u dvou podařilo vykultivovat borelie. Oba vzorky byly z mozkomíšního moku. *Jaký byl původ ostatních vzorků vyšetřovaných v mediu MKP? Proč bylo v mediu MKP vyšetřeno 10x méně vzorků než v BSK-H?* Tato skutečnost ztěžuje porovnání obou medií z hlediska citlivosti izolace borelií.

Diskuse je relativně obsáhlá a zasvěcená. Zdůrazňuje důležitost dobrého výběru primerů, což nesporně ovlivňuje citlivost reakce. Ta je dále ovlivněna původem vzorků (nejcitlivější je detekce v biooptickém materiálu). V další části diskuse se Jiří Havran zabývá geografickým rozšířením jednotlivých druhů borelií i genetickou diverzitou v rámci druhu. Zjištění výskytu *B. carolinensis* v Evropě je podpořeno nálezem této borelie v klíšťatech ve Francii. Zajímavý je též nález DNA *B. bissettii* u 10 pacientů, což zřejmě potvrzuje patogenitu této borelie pro člověka.

Závěr: Diplomová práce je přehledná, psána pěkným jazykem prakticky bez překlepů. Některé kapitoly jsou však psány až příliš úsporně, takže chybí některé důležité informace. Na jedné straně bylo dosaženo velmi zajímavých výsledků (identifikace „amerických“ borelií v Evropě), na druhé straně nebyly splněny některé z velmi náročných cílů, které byly studentu zadány. Přesto si myslím, že Jiří Havran dokázal své schopnosti prostudovat a zpracovat dostupnou literaturu, zvládnout metody detekce borelií (boreliové DNA) v klinickém materiálu, identifikaci borelií bioinformatickými metodami na základě sekvence vybraných genů, zpracování výsledků a jejich zhodnocení v kritické diskusi. Proto práci doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích 18.1 2011

Doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.