

## Oponentský posudek na magisterskou práci

Bc. Leštínová K., 2014: Morfologická analýza vajíček tasemnic řádu Diphyllbothridea.

Magisterská diplomová práce Kateřiny Leštínové je poměrně obsáhlá: 90 standardních stran (včetně 25 stran literatury) a přílohy. Podrobně sepsaná literární rešerše, zaujímající více než polovinu práce, je zaměřena na vajíčka a vývojové cykly tasemnic řádu Diphyllbothridea. Především pak na rody parazitující u člověka (*Diphyllbothrium*, *Diplogonoporus* a *Spirometra*). Nenašel jsem žádnou významnou práci, která by v rešerši chyběla. Byl bych naléhavě doporučoval, aby tato část práce byla publikována samostatně jako review nebýt skutečnosti, že letos vyšla kapitola v kompendiu Biology of Foodborne Parasites zabývající se těmito třemi rody. (Kuchta a kol. 2014), která je často citována. Možná uvažovat o zkrácené verzi v češtině do odborného lékařského časopisu? Moje chvála se týká té části literárního přehledu, která je věnována hlavněmu tématu: morfologické analýze. V rešerši prakticky chybí část věnovaná larválním stádiím a experimentálním infekcím. Dělá to na mne dojem, že cíl č. 4 nebyl původně plánovaný, že studentka (velmi vhodně!) využila nečekanou možnost práce s živým materiálem, ale bohužel bez hlubší teoretické přípravy (viz dále). Publikovatelná je v každém případě vlastní morfologická analýza vajíček, čímž je splněna podmínka pro magisterskou práci.

Druhá část práce je zaměřena na podrobné zpracování materiálu nashromážděného z celého světa v helmintologické sbírce PaU a ve sbírce školitele, který se těmto tasemnicím věnuje. Tento sbírkový materiál byl doplněn živými plerocerkoidy *D. latum*, se kterými byly provedeny experimentální infekce a získána živá vajíčka pro další experimenty.

Tento rozsáhlý materiál byl využit k podrobnému proměření vajíček 22 druhů, přičemž některé druhy byly z různých hostitelů. Kromě šířky a délky pak byl počítán jejich poměr, v dalším textu označovaný jako kulatost (obvykle se tato veličina označuje jako rozměrový index, ale budiž: kulatost termín jednoduchý a srozumitelný).

Značný počet vajíček (17 druhů) byl použit i ke studiu povrchové struktury pomocí SEM.

Ve všech případech (velikost vajíček, tvar vajíček, množství a velikost prohlubní na povrchu vajíček) byla zamínuta nulová hypotéza – jinými slovy bylo zjištěno, že se vajíčka různých druhů mezi sebou liší, ale žádný ze znaků sám o sobě nestačí k rozlišení druhů. Jak je však formulováno v kapitole Závěry, při kombinaci morfometrických a morfologických (povrchových) údajů vajíček je možné některé zástupce (zejména infikující člověka) zařadit do druhu.

Tady se nabízí otázka: nebylo by možné "dotáhnout to do konce" a sestavit užitečnou pomůcku umožňující orientační determinaci aspoň druhů infikujících člověka podle vajíček? Bud' jako klasický klíč (teze – antiteze) nebo formou tabulky, kde v řádcích budou rozměry a kulatost a ve sloupcích předem kategorizovaná povrchová struktura (nebo naopak, pochopitelně). Překonal jsem nutkání sestavit to za Kateřinu, abych ji nepřipravil o možnost dovršit cíl „Shrnutí získaných údajů a posouzení využitelnosti vajíček diphyllbothriidů v diagnostice.“ S případnou námítkou, že už to tam je, plně souhlasím, ale podotýkám, že ve stávající formě se v tom dobře orientuje Katka a možná školitel, kdežto nezasvěcený musí opakovaně listovat a srovnávat jednotlivé rozměry i struktury a ještě si není jistý, že něco nepřehlédl.

Další mé připomínky a otázky se týkají pokusů infikovat prvního meziphostitele. Poněkud mne zarazilo tvrzení, že vznášivky nejsou v létě dostupné. Vždy jsem se domníval (a přednáším to studentům), že klanonožec, ať už z čeledi Diaptomidae, Cyclopidae nebo další, se infikuje především v larválním stádiu (kopepoditovém nebo metanaupliovém) a procerkoid přežívá vývoj do dalších stádií. Dospělci se infikovat mohou taky, ale s menší pravděpodobností. Akvaristé odchováající ryby dobře vědí, že mladé ryby mohou krmit buď nauplii nebo později dospělými klanonožci: dravá kopepoditová stádia mohou rybky usmrtit. To se týká především buchaneč, vznášivky jsou všežravé a méně dravé. Některých druhů buchaneč se může týkat ta zdánlivá nedostupnost v létě: v té době jsou jejich kopepoditová stádia ukryta u dna. Naopak různé druhy vznášivek takovou sezónní dynamiku nemají a na mnohých lokalitách jsou celoročně.

Pokud se mýlím, prosím, abych byl z omylu vyveden; pokud se nemýlím, tak se piám, zda byla v experimentu larvální stádia použita nebo proč nebyla. Popřípadě to berte jako námět pro další experimentální práci: doporučuji konzultaci s hydrobiologi (potravou vznášivek se podrobně zabýval např. Michal Šorf).

Další kritická poznámka se týká předposledního odstavce str. 74: je zcela nesrozumitelný a vypadá jako připravený pro doplnění informací. Nejdřív jsem se domníval, že jsem dostal jinou než finální verzi, ale tataž visí na internetu. Pokud jde o údaj Bartošové a kol., nejde o nález z koprolytu (ani z koprolytu, jak je uvedeno), ale z nepřilísí zpevněného materiálu středověké jímky, která byla zaplňována odpadem včetně fekálií. Archeologové nám sice původně slibovali přesnější dataci vrstev, ale jinak je „původ nálezu“ dokumentován, jak jen být mohl. Pokud měla studentka na mysli skutečnost, že nevíme, odkud pocházela ryba, kterou se člověk (popř. pes, kočka) infikoval, má pravdu – ale jistě se ryby tehdy nedopravovaly na tak dlouhé vzdálenosti jako nyní a lidé sice cestovali, ale méně a pomaleji.

Když už jsem zmínil „překlep“ (koprolyt), stejně chybné spelování je na str. 25 (termín pochází z řečtiny kopros – výkal, hnůj, lithos –kámen). Ale v práci se vyskytují i skutečné překlepy a přesmyčky (kostka místo kosatka, braktické, ordinal, prosec). Mnohým z nich se lze snadno vyhnout použitím funkce „kontrola pravopisu“. Bohužel se to týká i odborných názvů: *Paragonomus*, *Ursus arcto*). Doporučuji vyhnout se skloňování nepočestěných latinských názvů (*Spirometry*). Počestňování je v práci nejednotné a nedůsledné (diphyllobothrid x difylobothrid, diphyllobothridní x diphyllobothridní). Nezvyklé je psaní českých rodových jmen s velkým písmenem (Rybák, Racek).

Některé práce citované v textu chybějí v seznamu citací Guttowa 1965, Jansen a Over 1962), jinde neodpovídá citace v tabulce citací v seznamu (Yurakhno 1973 x Yurachno 1992 - spelování i letopočet, Dörücü et al. 1995). Seznam literatury je nejednotný: někde je uváděn volume časopisu, jinde jen ročník, názvy časopisů jsou v kurzívě, ale ne vždy atd.). Pro publikaci to bude nutné sjednotit.

Závěrem bych chtěl zdůraznit, že kritické připomínky nesnižují přínos práce, který spočívá v důkladném vyhodnocení velmi rozsáhlého materiálu vajíček difylobothridních tasemnic.

Práci doporučuji k obhajobě.

České Budějovice 13. 5. 2014

Doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc



## Oponentský posudek na diplomovou práci

Oponent: RNDr. Jana Bulantová, Ph.D.

Student: Bc. Kateřina Leštinová

Název práce: Morfologická analýza vajíček tasemnic řádu Diphyllobothriidea

### Předmět diplomové práce

Autorka se v předkládané diplomové práci věnuje analýze vajíček vybraných druhů tasemnic z řádu Diphyllobothriidea. Zaměřuje se zejména na sledování případných mezidruhových rozdílů v morfometrii vajíček a rozdílů v topografii vaječné skořápky mezi ekologickými skupinami i jednotlivými druhy studovaných tasemnic. Vlastní práci předchází literární úvod shrnující dosavadní poznatky o problematice včetně obecného přehledu vývoje a formování vajíček tasemnic, který je doplněný o představení zástupců skupiny Diphyllobothriidea způsobujících infekce u lidí.

Dostupný materiál (koprologické vzorky, samotná vajíčka, případně části tasemnic s vajíčky) autorka zpracovávala pomocí skenovací elektronové mikroskopie a světelné mikroskopie, aby pak svá pozorování a měření mohla vyhodnotit za použití programů pro statistické zpracování dat a ověřit tak své pracovní hypotézy. Součástí práce bylo i sledování vývoje vajíček získaných z cíleně nakažených definitivních hostitelů a pokus o experimentální infekce prvních a druhých mezihostitelů.

### Členění práce

Práce je členěna do devíti základních kapitol včetně příloh, přičemž největší důraz je kladen na literární úvod a vlastní výsledky.

### Připomínky:

- údaje z kapitoly „Difyllobotrióza“ a „Geografické rozšíření“ se překrývají
- nelogické řazení odstavců, např. na straně 5 je jako pátý zařazený odstavec o obecném dělení typů vajíček napříč živočichy, ačkoli odstavce předchozí i následující se věnují striktně vajíčkům tasemnic. Vmezeření takového odstavce na mne působí rušivě, hodil by se spíše na úvod ještě předtím, než bude rozebírána situace u tasemnic. Totéž se týká kapitoly „Difyllobotrióza“ na str. 18, poslední odstavec by se podle mého názoru hodil spíše na začátek.

### Literární zdroje

Seznam literatury obsahuje téměř 200 citovaných prací, kde jsou zahrnuty jak práce recentní, tak i velmi staré, s původními popisy některých druhů studovaných tasemnic. Odkazy na citovanou literaturu jsou do textu i tabulek vhodně zařazené, objevují se však drobné formální nedostatky

### Připomínky:

- např. Wardle a kol. 1974 má být Wardle a kol. 1947
- Dörücü 1995 má být pravděpodobně Dörücü a kol. 1995)
- pravděpodobně chybně seřazené citace u Rausch RL
- čísla ročníků nejsou v přehledu literatury uváděna jednotně

### Grafická úprava, tabulky a obrazová dokumentace

Po grafické stránce působí celá práce až na výjimky uceleným a přehledným dojmem, a to i přesto, že tabulky jsou často velmi rozsáhlé. Ilustrační obrázky jsou vybrány i zařazeny příhodně a vhodně dokreslují probírané téma. Originální fotografie autorky jsou velmi zdařilé, a velmi dobrým dojmem na mne působí i jejich uspořádání do obrazových tabulí.

### Připomínky:

- v obrázku 3.6. postrádám označení pohlavního atria či děložního póru, na které je odkazováno v textu
- na str. 27: Odkaz na obrázek 3.3.1. má být pravděpodobně odkaz na obrázek 3.10.
- tabulka 4.3. nedokumentuje přítomnost vajčec v trusu experimentálně infikovaných křečků, jak je odkazováno v textu, ale přítomnost dospělců ve střevě, o vajčkách zde není ani zmínka.

### Jazyková úroveň

V textu se bohužel vyskytuje řada chyb, které kazí celkový dojem, a je jen škoda, že stejná míra trpělivosti a pečlivosti, s jakou byla experimentální data získána, nebyla vložena i do finální úpravy textu a případných jazykových korektur.

### Připomínky:

- překlepy (např. str. 3: „Platyhelminthes“ namísto Platyhelminthes)
- nesprávné použití velkých písmen (např. str. 1: „v chladných vodách Severní a Jižní polokoule“ nebo str. 20: velká písmena na začátku českých rodových názvů ptáků)
- gramatické chyby v použití i/y (např. str. 36: „Novější pokusy se psi jako definitivním hostitelem“ nebo str. 74: „koprolyty“ namísto koprolity)
- používání dvou tvarů jednoho slova (např. scolex i skolex)
- používání výrazů, které se hodí spíše do popularizačního textu (např. str. 4: „Neuvěřitelná je i rozmanitost tvaru skolexu“, str. 7: „Reprodukční schopnost tasemnic je naprosto ohromující“, str. 27: „děravá struktura“) nebo nespisovných slov (např. str. 74: „proč se D. latum vyskytuje jen v několicí omezených lokalitách v Evropě“)
- v některých případech nekompletní autorské citace (např. str. 20 u *Oithona nana* Giesbrecht, kde chybí rok).

- výrazy nevhodné odvozené z angličtiny (např. str. 24: „Dalším vhodným charakterem je struktura povrchu zralého vajíčka“ nebo str. 74: „Teplota v tomto případě není jediným charakterem, který zabazpečí úspěšný průběh a dokončení cyklu,“)
- chyby ve slovosledu (např. str. 44: „Po 230 DPI (25. září 2013) došlo ke spontánnímu vyloučení 2,65m strobily dobrovolníkem bez skolexu.“ nebo str. 35: „Vylíhnutá koracidia přežila minimálně 4 dny při těchto podmínkách.“)
- jazykově neobratné formulace (např. str. 16: „Po pozření infikované buchanky se ve střevě ryby procerkoid uvolní z buchanky.“ nebo str. 20: „První původní náказа byla zaznamenána až za téměř 60 let, kdy byla v Peru poprvé zaznamenána autochtonní náказа *D. pacificum*.“)
- formulační nepřesnosti (např. str. 3: „Najdeme mezi nimi řadu veterinárně i medicínsky významných zástupců.“ - předpokládám, že autorka má na mysli zástupce významné z hlediska veterinární i humánní medicíny, nebo str. 24: Diagnostika difylobotriózy je velmi složitá, protože v klinických vzorcích stolice jsou často pouze vajíčka nebo vzácněji natrávené části strobily.“ – zde je to patrně myšleno tak, že složitá je diferenciální diagnostika, při které by bylo možné určit druh tasemnice pouze na základě morfologie vajíček, která jsou v trusu přítomna.)
- zavádějící formulace (např. str. 8: „Cirrus je neozbrojen a spolu s vaginou často vyústuje do společného pohlavního atria (genitál pore)“, kde to vypadá, že pohlavní atrium a „genital pore“ označují totéž).
- názvy některých částí pohlavní soustavy jsou doplněné o anglický ekvivalent, který je ale v několika případech špatně napsaný (str. 5: „vitelline follicles“ namísto vitelline follicles nebo str. 8: „genitál pore“ místo genitál pore)
- nekompletní věta (str. 74: „Vajíčka *D. latum* však byla nalezena v koprolitech z Byl však nalezen z, s výjimkou archeologického nálezu vajíček *D. latum* z koprolýtů v Chrudimi (Tab. 3.3.) (Bartošová a kol. 2011).“)

### Otázky k obhajobě

1. Proč se lišila teplota inkubace vajíček získaných z křečka a člověka, a délka intervalu, po kterou byl vývoj sledován?
2. Str. 36: Autorka píše, že: „Vajíčka *D. nihonkaiense* se vyvíjejí pouze v brakické vodě, *D. latum* se vyvíjí pouze ve sladké vodě (Muratov a Posokhov 1989; Muratov a kol., 1992). Naopak například *D. macroovatum* pouze ve vodě mořské (Hatsushika 1981).“ Jsou známé hranice hodnot salinity, při kterých se vajíčka jednotlivých skupin tasemnice ještě dokážou úspěšně vyvíjet?
3. V literárním úvodu (str. 27) je na základě citací již dříve vydaných prací psáno, že: „V proximální části uteru, blízko ootypu, se objevují první rozpoznatelná vajíčka, která jsou čtyřikrát větší než zralá vajíčka.“, Rozdíl ve velikosti vajíček samovolně uvolněných do stolice a těch vypitvaných z uteru uvolněných článků se tedy může lišit, což potvrzují i data získaná samotou autorkou během experimentálních infekcí křečků (str. 53). Jak moc jsou ale porovnatelná data, kde vajíčka náležející k individuálním vzorkům pocházejí z různých částí uteru, resp., lze při „pitvě“ zralého článku tasemnice říci, že vajíčka pochází pouze z určitého definovaného úseku uteru (např. z první čtvrtiny apod.)?
- Mění se velikost vajíček i poté, co jsou přirozenou cestou vyloučena z těla hostitele, tedy během doby, co se v nich vyvíjí koracidium?
4. V literárním úvodu na str. 28 autorka píše: „U mořských druhů byl poměr šířky ku délce nižší než 0,69 zatímco u sladkovodních byl vyšší (Hilliard 1960), to znamená, že vajíčka sladkovodních druhů

jsou více kulatá.“ Graf znázorněný na obr. 5.4. z vlastních výsledků autorky ale říká, že poměr šířky ku délce vajíček vychází vždy u všech druhů vyšší než 0,70. Rovněž na základě grafu na obr. 5.4. nelze říci, že by sladkovodní/anadromní druhy tasemnic měly kulatější, nebo méně kulatá vajíčka v porovnání s mořskými druhy. Jestli jsem tedy situaci správně pochopila, Vaše výsledky se od výsledků citovaných výše významně liší. Lze tyto rozdíly nějak zdůvodnit?

5. Co se týká statistiky, jsem naprostý laik. Pokud je ovšem psáno, že: „Rozdíly ve velikosti vajíček mezi jednotlivými druhy jsou statisticky průkazné“, a je toto tvrzení ponecháno bez dalšího doplnění hned v závěsu, pak to pro mne vypadá tak, že na základě rozměrů vajíček by mělo být možné spolehlivě vajíčka jednotlivých druhů odlišit. To, že je odlišit nelze (minimálně ne u většiny druhů) je ale uvedeno až v dalším textu. Z mého laického pohledu tedy dochází k tomu, že úvodní informace (rozdíly jsou statisticky průkazné) si odporuje s dalším textem, kde se píše, že morfometrie vajíček neumožňuje jejich druhovou determinaci. Bylo by možné mi nějak stručně vysvětlit tento možná jen zdánlivý rozpor?

6. Jaké jsou možnosti molekulární koproduktivity ve vztahu k difylobotridům?

### Celkové hodnocení

Jeden ze stanovených cílů, jehož součástí byly infekce prvních a druhých meziposítků se sice nepodařilo bezevýtku splnit, i přesto lze konstatovat, že autorka při vytváření diplomové práce prokázala schopnost pracovat s literaturou, osvojila si práci se skenovacími elektronovým mikroskopem, s aplikacemi umožňujícími přesné měření velkého množství objektů na mikrofotografiích i s programy umožňujícími statistickou analýzu dat. Z dostupného materiálu dokázala připravit vzorky vajíček pro následnou morfometrickou studii, pro sledování povrchové struktury vaječných skořápek i pro sledování vývoje vajíček a líhnutí koracidii, která pak využila pro nákazu potenciálních prvních hostitelů. Svoje výsledky pak spolu s poznatky načtenými z literatury sepsala do podoby diplomové práce, kterou i přes množství připomínek a dotazů doporučuji k obhajobě a hodnotím ji jako *V4 bez vad*.....

V Praze 20.5.2014

RNDr. Jana Bulantová, Ph.D.

*Jana Bulantová*  
.....