

# Spatial Distribution of Tick-Borne Pathogens as a Consequence of Vector-Host-Pathogen Interactions with Environment

*PhD thesis*

Vaclav Hönig

Purports to contribute to the basic knowledge in tick (*Ixodes ricinus*) and tick-borne pathogen (*Borrelia burgdorferi* sensu lato, tick-borne encephalitis virus) ecology, in particular the spatial distribution, host associations and its causes and consequences in Central European habitats.

## General comments

The thesis consists of a literature review, 6 manuscripts, one so far unpublished. All the papers are multi-authored. In the first three of these the candidate appears to be a secondary coauthor but in Papers 1 and 2 he had the important task of designing methods for pathogen detection and identification, and in Paper 3 collected *Ixodes ricinus* ticks and processed them for a study based in the USA. He is the first author in three papers (4-6), indicating that he had the leading role in the research, so these appear to qualify as evidence of independent research on which the award of a PhD thesis depends. Two of these (Papers 4 and 5) focus on the distribution of *I. ricinus* and associated pathogens, the first the presentation of data in conjunction with environmental variables, and the second concerning a risk model for infected ticks, with a mapping deliverable. The third of these papers (Paper 6 - unpublished) focuses on the hosts of ticks and the reservoir hosts of the two pathogens under study, *B. burgdorferi* s.l. and the tick-borne encephalitis virus, by utilizing the still somewhat experimental methodology of host DNA detection in unfed ticks.

Although there are some issues to be discussed, the thesis makes a worthwhile contribution to the topic and, subject to matters that might arise in the defense of the thesis. It is evident that the candidate has reached the standard required for the award of a PhD degree.

## Introduction and Literature Review

The contents of the 'Introduction' shows that candidate has a very good knowledge of the topic and has clearly read the relevant literature with understanding. There is, however, a tendency to simply report what is in the literature rather than analyse and discuss it, so it is difficult to see where the candidate stands on some of the controversial issues, such as the dilution effect and co-feeding transmission (see below).

The following questions should be addressed. Note that they are to be regarded as discussion points rather than requiring specific 'correct' answers.

1. How well does the concept of nidity apply to Lyme borreliosis (see page P2 and 18)?
2. What is the difference here between 'relative abundance' and 'mean intensity of infestation' in the table on page 4? In the thesis this term is not used in the normal ecological sense and only refers to 'ticks per unit time' versus 'ticks per unit area'.
3. What is the evidence for genetic variation (in addition to DNA studies) in *Ixodes ricinus* and what are the ecological implications? (Page 6)
4. What is the main mechanism whereby increasing temperature results in an expanding range of ticks? (Page 8)
5. What is the mechanism for diapause induction in *Ixodes ricinus* and how does it regulate seasonal activity? (Page 9)
6. How might the 'dilution effect' (increasing biodiversity resulting in decreasing disease) in Europe differ from the USA with regard to Lyme borreliosis? (Page 26)
7. Are there explanations for distribution trends of genospecies in Europe? For example why is *B. afzelii* rare in southern UK and in Ireland, why if *B. valaisiana* primarily associated with western regions ? (Page 28)
8. The TBE virus can get into milk, but can goats, cattle etc infect ticks? If not why not? (Page 33)
9. If co-feeding transmission of TBE can occur on any host, why is the disease so focal? (Page 35)

Observations were made of the establishment of *I. ricinus* at higher altitudes than before and their infection with various genospecies of *Borrelia burgdorferi* s.l. but not with tick-borne encephalitis virus. Quite logically, *B. afzelii* dominated at lower altitudes and *B. garinii* at higher ones, supporting the concept of rodents as reservoir hosts for the former genospecies and birds for the latter. It is suggested that the observed changes are associated with increased air temperatures over the last decades.

#### Questions

1. When ticks are collected per hour, is non-sampling time when ticks are being removed from the blanket excluded? If not why not? (Page 78)
2. What was the nature of the positive and negative controls? (Page 78)

#### Paper 2 Schwarz et al

This study described an increase in numbers of *I. ricinus* over a 20 year period at three sites in southern Germany and documented their infection with genospecies of *Borrelia burgdorferi* s.l.. No pattern of change in genospecies prevalence could be discerned, but the authors showed an increase in multiple infections. The basic conclusions are supported by the data, despite the variable methodology used for determining tick numbers. As in Paper 1 above, climate change was suggested as the main driver of the observed changes.

#### Question

1. Dragging a plot until no more ticks are caught is an unusual methodology and needs more explanation (Page 96). What was the rationale and what is the precedent? What was the variation in the time taken and the number of sweeps required?

#### Paper 3 Crowder et al

This paper describes the detection of *B. miyamotoi* in ticks collected at multiple locations in the USA and Europe (the Czech Republic and Germany). In addition an isolate from Japan was characterized. It was established that this spirochaete occurs as three different genotypes from the three geographical regions. It is unfortunate that isolates from more European locations were not included, for

example from Scandinavia and Russia, but the design of this study was not under the control of the candidate. Note that *B. miyamotoi* does not cause relapsing fever as such, and perhaps should not be described as a relapsing fever spirochaete (Page 14 et seq)

#### Paper 4 Hönig et al 1

An ambitious large-scale sampling project designed to identify the factors that give rise to high levels of infected ticks over a large geographical area in south Bohemia. Variability in tick numbers was associated with vegetation characteristics but not with climatic or weather variables. The overall infection prevalence of ticks infected with *B. burgdorferi* s.l., which was present at all sites, was similar to other European values. TBEv prevalence in ticks was rare but the virus was found at most sites. In view of the effort involved these results might be considered disappointing, particular regarding correlations with weather and climate. This may be a reflection of the large scale of the study and the nature of the tick data, but on the other hand could emphasise the importance of vegetation as an ecological indicator and the irrelevance of crude short term-factors such as air temperature, relative humidity and rainfall.

#### Questions

1. Is a single sample obtained three times per year sufficient to determine seasonal activity or draw correlative conclusions? Was it possible to measure variation?
2. Since TBEv prevalence was so low, was any consideration given to alternative sampling methods to increase detection in ticks? If so what? (Page 120). How much evidence was there for the absence of synchronous larval and nymphal activity, which might explain low transmission rates?

#### Paper 5 Hönig et al 2

This study attempted to make use of tick and pathogen data collected from southern Germany and South Bohemia to construct a risk model for both tick-bite and tick-borne disease that can be accessed by the public through the

internet. The amount of data from a wide variety of sources was considerable and their integration into risk maps is impressive. It will be interesting to see if the predictions emanating from this model match reality in the future.

#### Questions

1. How much overlap was there in data collection with Paper 4?
2. Was any consideration given to selecting areas where contact between ticks and people was guaranteed? Page 130
3. How was the model validated? i.e. was any attempt made to correlate acarological index with disease foci?

#### Paper 6 Hönig et al 3

This as yet unpublished study describes attempts to identify host DNA in the remnants of blood meals in questing ticks, thereby identifying the vertebrate host of the preceding stage, and also by detecting pathogen(s) in the same tick, indicating possible reservoir hosts of the pathogen(s). This approach was pioneered for ticks 20 years ago but is still very difficult to implement with interpretable results. The candidate has done well to complete this study and despite the many questions that the results raise, should be encouraged to publish it. It is particularly important that there should be no room for any suspicion of laboratory contamination or procedural failures that might interfere with the reliability of the results and special attention should be paid to this aspect.

#### Questions

1. Why was the 12SrRNA gene chosen as a target? What are the relative merits of the other gene targets that have been used (the original study by Kirstein et al should be cited)? Note that the gene used here should be specified in the abstract of this paper. That aspect is at least as important as the selected detection methodology (RLB). (Page 152)
2. Why were two DNA extraction methods used? Were there any differences in the results?
3. Some superficial details on anti-contamination measures have been provided but little on the nature of controls. What exactly were they and what agents were used to denature contaminant DNA in reagents?

4. Was the sensitivity and specificity of the developed system determined before testing field samples? What were the results? How do they relate to the high percentage success (66%) of host DNA detection. (Page 158)
5. The present place of blood meal analysis in tick ecology needs to be discussed more fully. What are the limitations? Is there a future for this approach? (Page 164)

Use of English is always a challenge to non-native speakers, but candidate has done well in this respect in that his sentences are usually comprehensible, despite minor though understandably frequent problems with grammar. However, the English in Paper 4 is particularly poor and it is unfortunate that submission of this paper to '*Ticks and Tick-borne Diseases*' coincided with the withdrawal of the copyediting service from that journal coupled with failure by the journal to make clear to authors that the English is the sole responsibility of authors.

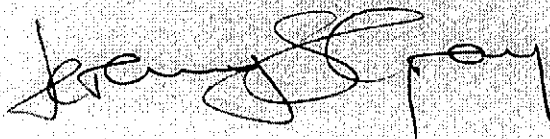
Elsewhere, the following errors, although minor, changed the meaning of the text.

1. P 1. line 16 'infected' should be 'uninfected'
2. P. 12 line 4. 'mounting' should be 'moulting'.
3. P. 33 line 29 Not 'relapse' of first symptoms, but 'disappearance' or 'subsidence'
4. P. 162 line 1. 'ixodid' should not be italicized or start with a capital
5. P. 162 line 3 The references for justifying wild boar as important hosts for *Ixodes ricinus* are inaccurate – one does not involve a survey for ticks, the other does not involve *I. ricinus*.
6. P.163 line 7 incorrect meaning of sentence. The concordance is not with references 2, 23, 25 but with 10, 12, 15. Replace 'which' with 'but'
7. P. 174 line 22 What is TBEv prevalence 'lower' than? Perhaps this should just be 'low'?
8. P. 178 line 15. Choose either 'seem' or 'are'
9. P. 181 The final sentence, unfortunately, does not make sense. It presumably should read 'Studies integrating ecological, epidemiological and

biological findings need to be performed at different scales and spatial resolutions from the level of a single natural focus of pathogen circulation up to intercontinental level, concerning global climatic changes and evolutionary tendencies.'

The references appear to be mostly accurate though not always appropriate (see below). However, there is a lack of italics for scientific names in the references for the literature review, Paper 1 and Paper 6. Furthermore, in the review and Paper 6 there is a mixture of sentence and title case. These errors probably result from the use of reference-organizer software, which has made both authors and journal editors lazy, and should be resisted.

To summarise, the candidate has evidently gained experience in an impressive range of methodologies and has shown the ability to organize a large number of co-workers in realizing his research goals, while obviously making a prodigious effort himself. It is particularly pleasing to see how he has integrated his laboratory bench skills with those associated with ecological field work to produce interesting results that have potential for practical implementation. The thesis is worthy of a PhD degree.



Jeremy Gray

Emeritus Professor of Animal Parasitology  
UCD School of Biology and Environmental Science  
University College Dublin  
Belfield, Dublin 4  
Republic of Ireland  
[jeremy.gray@ucd.ie](mailto:jeremy.gray@ucd.ie)

02/12/2015







## OPONENTSKÝ POSUDOK

na dizertačnú prácu Mgr. Václava Höniga na tému

„Spatial distribution of tick-borne pathogens as a consequence of vector-host-pathogen interactions with environment“

Predložená dizertačná práca Mgr. Václava Höniga spĺňa po formálnej stránke všetky požiadavky kladené na tento druh záverečnej práce. Posudzovaná práca rieši aktuálnu problematiku eko-epidemiológie kliešťami prenášaných zoonóz, a to Lymskej boreliózy a kliešťovej encefalitídy. Lymská borelióza a kliešťová encefalitída predstavujú najvýznamnejšie kliešťami prenášané zoonózy v podmienkach strednej Európy. K danej problematike autor pristupoval komplexne, čo veľmi oceňujem. Autor sa zameril na sledovanie dynamiky výskytu vektora kliešťa *I. ricinus* vertikálne ale aj horizontálne vo vzťahu k viacerým biotickým a abiotickým faktorom v mikro a makro habitatoch v podmienkach globálne sa meniacej klímy. Autor sa podieľal na vývoji modelu výskytu kliešťov a spomínaných kliešťami prenášaných patogénov a následne získané výsledky preniesol do praxe, keď vytvoril na webe verejne prístupnú mapu rizík výskytu kliešťov a ich nakazenia boréliami a vírusom kliešťovej encefalitídy. Vzťahy medzi rezervoárovými hosťiteľmi a jednotlivými druhmi borélií študoval na základe tzv „blood meal“ analýzy, ktorá je neinvazívna, ale má určité obmedzenia z hľadiska kvality DNA krvi hosťiteľa v kliešťoch po metamorfóze ako aj náročnosti na dodržanie maximálnej sterility analyzovaného materiálu a častým kontamináciám.

Dizertačná práca je napísaná formou súboru 5 opublikovaných článkov a jedného manuskriptu pripraveného na zaslanie. Václav Hönig je prvým autorom na dvoch už opublikovaných manuskriptoch a jednom doteraz neopublikovanom. Súčasťou práce je aj výstižný úvod do danej problematiky, ciele práce a celkový súhrn práce. Formálne spracovanie práce, ako i jazyková a estetická stránka sú na požadovanej úrovni v angličtine, aj keď som v práci našla zopár preklepov a štylistických chýb. V prehľade literatúry po výstižnom úvode do problematiky je podaný podrobný prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky. Ciele práce sú formulované jasne a vhodne zadané. Metodika je adekvátna, aj keď niektoré molekulové prístupy izolácie DNA a RNA ako aj detekcie patogénov sa v jednotlivých manuskriptoch líšia. Podľa mňa by bolo vhodnejšie všetok materiál spracovať rovnakým spôsobom. Vysoko však

# ÚSTAV ZOOLOGIE SAV

Dúbravská cesta 9

845 06 Bratislava

hodnotím komplexný prístup k danej problematike a široký záber autora v realizovaní celkovej eko-epidemiologickej štúdie. Autor zvládol zber, spracovanie a analýzy vzoriek v laboratóriu, štatistické spracovanie výsledkov, návrhy modelov a vytvorenie máp rizika aktivity kliešťov a výskytu Lymskej boreliózy a vírusu kliešťovej encefalitídy.

Prácu hodnotím veľmi pozitívne. Napriek tomu mám na doktoranda nasledovné pripomienky prípadne otázky:

Úvod:

1. V stati *B. burgdorferi* hosts, autor píše, že veveryce a ježe predstavujú menej významných rezervoárov v cirkulácii borélií. Tu by som si dovoľila oponovať, keďže v mestských ohniskách (parky, lesoparky), predstavujú práve veveryce ako zástupcovia hlodavcov a ježe ako zástupcovia hmyzožravcov významné skupiny hostiteľov kliešťov, ktoré sú navyše aj kompetentnými rezervoárovými hostiteľmi viacerých druhov borélií ale aj iných kliešťami prenášaných patogénov ako napríklad *A. phagocytophilum*.

Výsledky:

Daniel et al. Vertical distribution of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne pathogens in the northern Moravian mountains correlated with climate warming. *Central European Journal of Public Health*, 2009, 17(3).139-145.

2. Nemám skúsenosti s metódou izolácie DNA/RNA Chelexom. Prosím Vás ako ste izolovali DNA/RNA? Bola RNA izolovaná z tých istých kliešťov ako DNA? Boli vzorky spracúvané individuálne alebo poolované? Bola určená vstupná koncentrácia vzoriek, prípadne otestovaná úspešnosť izolácie?
3. Zisťovali ste k akému druhu patrili borélie, ktoré ste nevedeli určiť druhovo špecifickou PCR?
4. Pozoruhodný je nález *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s., a *B. valaisiana* v larvách. Myslíte si, že sú tieto druhy prenášané transovariálne?

Crowder et al. Prevalence of *B. miyamotoi* in *Ixodes* ticks in Europe and the United States. *Emerging Infectious Diseases.*, 2014,

5. Zaujalo ma určovanie kliešťov do druhov. Okrem morfológických znakov, boli druhy kliešťov potvrdené aj prítomnosťou druhovo špecifických endosymbiontov. Existujú druhovo špecifické endosymbioty pre každý druh kliešťa z rodu *Ixodes*? Vyskytujú sa u 100% kliešťov?

# ÚSTAV ZOOLOGIE SAV

Dúbravská cesta 9

845 06 Bratislava

Hönig et al. Tick and tick-borne pathogens in South Bohemia (Czech Republic) spatial variability in *Ixodes ricinus* abundance, *Borrelia burgdorferi* and tick-borne encephalitis virus prevalence. 2015.

6. Ako si vysvetľujete najvyššiu hustotu kliešťov v zmiešaných lesoch?
7. Pokúsili ste sa určiť neznáme druhy borélií?
8. Akým spôsobom bola izolovaná DNA/RNA keď boli použité rôzne kity, boli na prítomnosť borélií a vírusu kliešťov encefalitídy testované rovnaké alebo odlišné kliešte?
9. Veľmi oceňujem prenesenie výsledkov výskumu do verejne prístupných máp rizík.

Hönig et al. *Ixodes ricinus* tick host species spectrum and its association with genospecies of *Borrelia burgdorferi* s.l. complex.

10. Boli rozdiely v prevalencii borélií v kliešťoch cicajúcich na srnčej zveri oproti ostatným hostiteľom? Aká bola prevalencia borélií v kliešťoch cicajúcich na diviakoch?

## ZÁVER

Záverom konštatujem, že Mgr. Václav Hönig predložil dizertačnú prácu, ktorá spĺňa všetky podmienky kladené na tento typ práce. Je spracovaná na dobrej vedeckej a metodologickej úrovni. Doktorand preukázal schopnosť samostatne vedecky pracovať a priniesť nové poznatky vo zvolenej problematike. Na základe týchto skutočností hodnotím predloženú prácu kladne, **odporúčam** ju komisii prijať k obhajobe a po úspešnej obhajobe **navrhujem udeliť menovanému vedecko – akademickú hodnosť „PHILOSOPHIAE DOCTOR“**.

V Bratislave 2.12.2015



MVDr. Markéta Derdáková, PhD.

Ústav zoológie SAV





ÚSTAV BIOLOGIE OBRATLOVCŮ AVČR, v.v.i.

LABORATOŘ MEDICÍNSKÉ ZOOLOGIE

Kláštevní 212, CZ-691 42 Valtice, Česká republika

Telefon: ++420-519352961 Fax: ++420-519352387 e-mail: [rudolf@ivb.cz](mailto:rudolf@ivb.cz)



**Věc: Oponentský posudek doktorské dizertační práce pana Mgr. Václava Höniga, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích**

Student Školy doktorských studií pan Mgr. Václav Hönig předložil k posouzení doktorskou dizertační práci s názvem „**Spatial Distribution of Tick-borne Pathogens as a Consequence of Vector-Host-Pathogen Interactions with Environment**“. Hlavním cílem doktorské práce bylo sledovat výskyt a sezónní aktivitu klíšťat a prevalenci vybraných klíšťaty přenášených patogenů v prostoru (práce I., III., IV.) a čase (práce II.), dílčími cíly potom zhodnocení možných rizikových lokalit pro člověka (práce V.) – 'risk mapping/assessment' získaných na základě environmentálních (vegetační kryt, GIS analýzy) a epidemiologických (incidence klíšťaty přenášených onemocnění v jihočeském regionu) charakteristik. Posledním dílčím cílem bylo studium hostitelské preference sbíraných klíšťat v závislosti na biotopu (Práce VI). Téma práce je vysoce aktuální a bylo zvoleno vhodně, protože eko-epidemiologie nálezů přenášených klíšťaty společně s epidemiologickou surveillancí se stávají cílenými nástroji pro stanovení rizik klíšťaty přenášených nálezů, a následně mohou sloužit jako podklad pro nastavení smysluplných preventivních či kontrolních opatření. Velmi pozitivně kvituji odvahu uchazeče začlenit tzv. "spatial epidemiology" do problematiky klíšťaty přenášených nálezů (v ČR zatím velmi ojedinělý přístup vhodný pro stanovení rizik a predikci výskytu nálezů). Posluchač se ve své práci logicky věnoval dvěma nejdůležitějším infekcím přenášeným klíšťaty v jihočeském regionu, tj. lymfické borrelióze a klíšťové encefalitidě (pouze u nich dostupná data o incidenci onemocnění), v jedné práci se okrajově věnuje také nově zjištěnému (tzv. emergentnímu) patogenu přenášenému klíšťaty *Borrelia miyamotoi*.

Práce jako celek má 192 stran a je sestavena jako soubor publikací, ve kterých je uchazeč veden jako hlavní autor (jedna práce publikovaná, jedna v recenzním řízení a jedna před odesláním do tisku) nebo spoluautor (3 práce publikované). Práce je přehledně členěna do několika kapitol (Literární přehled nebo-li vzhled do studované problematiky; Cíle práce; vlastní příložené publikace; komentář k publikacím; Závěr; další směry výzkumu). Dále je práce doplněna Seznamem použité literatury, který čítá neuvěřitelných 300 citací s svědčí tak bezesporu o erudici autora v dané problematice. Na úvod si neodpustím spíše formální poznámku k pojetí díla: pokud je zvolen soubor komentovaných publikací, většinou se tento balík navenek jeví nesourodě, i když publikace samotné sami osobě jsou velmi nosné a cenné. To lze do jisté míry dokumentovat i v tomto případě především u publikací II (abundance klíšťat a prevalence *B. burgdorferi* v klíšťetě *I. ricinus* měnící se v čase – studijní lokalita v okolí Bonnu) a publikace III. (výskyt *B. miyamotoi* v klíšťatech komplexu *I. ricinus* v Evropě a v USA), které z části dle mínění oponenta odbíhají od původního zadání. Naopak jako stěžejní lze považovat publikace, kde je uchazeč prvním autorem (publikace IV., V., VI.), které naopak tvoří funkční celek, který by sám o sobě mohl tvořit samostatný dizertační spis bez ohledu nato, že poslední 2 publikace ještě nejsou v tisku.



Dizertační práce je psána pečlivě, úhledně a vcelku s malým počtem překlepů. Brožované pojetí v barvě dodává práci velmi vkusný rozměr. I přesto bych měl k předkládané práci několik připomínek, jejichž výčet předkládám.

### **Připomínky k literární rešerši:**

Obecně lze konstatovat, že literární úvod je dostatečný a svědčí o připravenosti uchazeče řešit danou problematiku.

- Table of Contents: *B. miyamotoi* nesprávně zařazena v kapitole pod *B. burgdorferi*
  - Preface (str. 1., odst. 1): zdůraznit roli zvířat, nejen lidí v existenci/cirkulaci vector-borne diseases
- Preface: konec 2.odstavce: doplnit socio-ekonomický pohled  
Preface: 3. odstavec, 4. komponenta PON je také prostředí (biotop)

Str. 3 'bridge vector' - definice podaná uchazečem je příliš úzká (bridge vector obecně saje na více obratlovcích...)

Str 10., 11. Fig.2 a Fig.3 chybí autor fotky

Str .14 '*Candidatus N. mikurensis*' byla popsána i u imunokompetentních pacientů

Str. 15 není uveden *D. reticulatus* jako primární vektor *F. tularensis* (publikováno mnoho prací), zatímco jeho roli jako vektora TBEV či *B. burgdorferi* bych vůbec neuváděl (jde spíše o mechanický přenos)

Str. 18 opět bych zdůraznil i socio-ekonomický pohled

Str 20 chybí kurzívy u taxonomického zařazení *B. burgdorferi* v kapitole 2.6.1.

Str 33. TBEV replikace v kapitole 2.7.3.2 dle oponenta jen velmi zkratkovitě naznačena, také mi chybí více eko-fyziologie u charakteristiky *B. burgdorferi*

Str. 34 dle oponenta většina arbovirových infekcí probíhá inaparentně

### **Připomínky a dotazy k publikovaným výsledkům a doprovodnému komentáři:**

Protože výsledky byly publikovány v hodnotných impaktovaných časopisech s přísným recenzním řízením a svědčí tudíž o jejich nesporné kvalitě, zaměřím se jen na pro mne zajímavé skutečnosti:

Obecná poznámka: závěrečný komentář neodpovídá řazení prací

#### **Práce I. (Daniel et al., 2009)**

- čím si uchazeč vysvětluje 0.7 % promořenost larev *I. ricinus* spirochétou *B. burgdorferi* ? Zvažuje snad i transovariální přenos?
- žádný záchyt TBEV v klíšťatech - málo vyšetřených klíšťat, neexistence ohniska?

#### **Práce II. (Schwarz et al., 2012)**

- nejsou rozdíly v prevalencích *B. burgdorferi* v klíšťatech *I. ricinus* způsobeny spíše odlišným metodickým přístupem (IFA, PCR) v rozmezí studovaných let než časovým intervalem. Byly vzorky vyšetřovány odlišnými laboratořemi, v různých obdobích, jak byly vzorky uchovávány?

#### **Práce III. (Crowder et al., 2014)**

- čím posluchač zdůvodní výběr dané metodiky (PCR/ESI-MS) pro záchyt *B. miyamotoi* v klíšťatech komplexu *I. ricinus* v Evropě a USA
- lze očekávat první lidské případy po infekci *B. miyamotoi* také u nás?





#### **Práce IV. (Hönig et al., 2015)**

- vzhledem k velkému počtu vyšetřených klíšťat bych ve vzorcích čekal vedle průkazu *B. spielmanii* také další patogenní genomické druhy *B. bavariensis* (patrně skryta pod *B. garinii*) či *B. bissetii* (která dokonce byla izolována u dvou pacientů z jihočeského kraje viz studie Rudenko et al. 2008, J. Clin. Microbiol.).
- jak si posluchač vysvětluje vyšší prevalenci *B. burgdorferi* u nymf klíšťat než u dospělců (bývá spíše naopak).
- jak si uchazeč vysvětluje vysoké procento vzorků (37% z analyzovaných), kdy se nepodařilo zařadit borrelii ke konkrétnímu genomickému druhu
- jak si posluchač vysvětluje průkazně vyšší spirochétální nálož u klíšťat infikovaných *B. garinii* ve srovnání s *B. afzelii*.

#### **Práce V. (Hönig et al., submitted)**

- dotaz k epidemiologické povaze studie - projeví o publikovaná data a názorné 'risk maps' zájem hygienická služba jihočeského kraje či Státní zdravotní ústav jako podklad pro varování obyvatel před nakaženými klíšťaty (acarological risk) a v důsledku i jako podklad pro preventivní či kontrolní opatření v rámci jihočeského regionu?
- troufne si uchazeč na základě analyzovaných dat stručně porovnat epidemiologii obou studovaných nálezů, tj. KE a LB.

#### **Práce VI. (Hönig et al., unpublished)**

- může uchazeč porovnat dva odlišné přístupy při bloodmeal analýzách, tedy sekvenační přístup na straně jedné a Reverse-line blotting (RLB). Proč si uchazeč vybral právě RLB?
- mezi sondami pro RLB není specifická sonda pro záchyt např. plazů (ještěrek), které jsou jak známo hostiteli nedospělých stádií klíšťat (larev a nymf) a pravděpodobně také hrají roli při cirkulaci *B. burgdorferi* a dalších jiných agens v přírodním ohnisku nákazy.

#### **Obecné dotazy uchazeči:**

1. Je všeobecně známo, že existují již desítky metodik pro diagnostiku a typizaci patogenních genomických druhů *B. burgdorferi*. Jakou mol.-biologickou metodu by uchazeč definoval jako 'gold standard' pro typizaci nálezu *B. burgdorferi* ve vzorcích klíšťat, potažmo ve zvířecích a lidských tkáních? Lze vůbec zvolit nějaký univerzální postup?
2. Jak bylo při studii zabráněno možným kroskontaminacím mezi vzorky při tak vysokém počtu vyšetřeného materiálu na dvě patogenní agens včetně typizace a následných 'bloodmeal analýz'?
3. Plánuje uchazeč či jeho domovská laboratoř využít cenného materiálu (přes 11 tis. vzorků DNA, RNA z klíšťat z 30 lokalit) k dalším molekulárním analýzám tentokrát na méně známé (opomíjené) patogeny (*Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., 'Candidate Neoehrlichia mikurensis')?
4. Jaký je pohled uchazeče na diskutovanou roli/význam globálních klimatických změn v šíření vektorů nákaz?



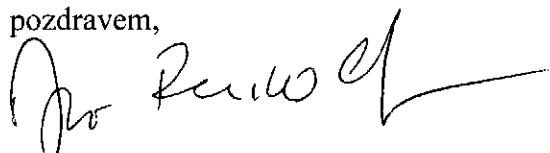
5. Můžete prosím stručně komentovat práce prof. Sarah Randolph z Oxford University týkající se socio-ekonomických činitelů (např. nezaměstnanost, propad HDP) jako jedním z (určujících) faktorů pro růst incidence klíšťové encefalitidy v Pobaltí a zemích střední a východní Evropy?

Chtěl bych podotknout, že mé připomínky nijak nesnižují velmi dobrou úroveň předkládané doktorské dizertační práce. Za zmínku stojí, že posluchač se v rámci dizertační práce začlenil v manažersko-vědecké funkci do mezinárodního přeshraničního projektu zabývajícím se klíšťaty a klíšťaty přenášenými patogeny, což dokládá jeho schopnosti nejen vědecké, ale i organizační. Na závěr si neodpustím malé povzdechnutí. Je škoda, že se posluchač této práci nebude věnovat i nadále (alespoň soudě dle přiloženého CV), protože si myslím, že jeho současná erudice v oblasti ekologie nákaz přenášených klíšťaty mu k tomu dává veškeré předpoklady.

**Závěrem:**

Předkládaná práce splňuje všechny nároky kladené na doktorskou dizertační práci, a proto ji doporučuji k obhajobě a po úspěšném obhájení také k udělení titulu *philosophiae doctor* se zkratkou **Ph.D.**

S pozdravem,

Handwritten signature of Ivo Rudolf in black ink, featuring a stylized 'I' and 'R' followed by a long horizontal stroke.

RNDr. Ivo Rudolf, Ph.D.

Ve Valticích dne 7.12. 2015

