



# BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR, v. v. i.

## Parazitologický ústav

adresa: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice  
telefon: +420 387 775 403  
fax: +420 385 310 388

IČ: 60077344 | DIČ: CZ60077344  
číslo účtu: 5527231/0710, ČNB České Budějovice  
www.paru.cas.cz | e-mail: paru@paru.cas.cz

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Lucie Šolcové:

### **Analýza invazivní schopnosti a infekčního potenciálu nově popsaných druhů borelie z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *B. americana* a *B. carolinensis* na laboratorním modelu infikovaných savců.**

Diplomová práce se zabývá problematikou vztahů patogen-vektor-hostitel u dvou nově definovaných druhů spirochét komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato v modelovém systému dvou druhů klíšťat a laboratorní myši coby hostitele. Zatímco klíšťata rodu *Ixodes* jsou obecně považována za kompetentní vektory spirochét Lymeské boreliózy (LB), vektorová kompetence u klíšťat rodu *Amblyomma* je stále otázkou. V práci byla navíc použita kombinace „evropského“ zástupce klíštěte rodu *Ixodes* (*I. ricinus*) a převážně v USA se vyskytujících druhů borelií. Cílem práce je zjistit, zda jsou vybrané druhy klíšťat schopné přenosu spirochét *B. americana* a *B. carolinensis*. Vzhledem k množícím se průkazům těchto spirochét ve stále širším spektru vektorů a v nových geografických oblastech (včetně Evropy) je tato problematika vysoce aktuální.

Téma je zpracováno na celkem 43 stranách, z čehož 10 tvoří literární rešerše, 9 materiál a metody, 6 výsledky a 5 diskuze. Práce má po formální stránce uspokojivou úroveň (až na chybějící odkazy na obrázky v textu rešerše) a je psána v podstatě dobře srozumitelnou češtinou. Jen na některých místech dokonalé srozumitelnosti brání tvorba složitých souvětí, ve kterých se pak objevují i nesprávné vazby. V některých případech autorka nevolila zcela adekvátní odborné termíny, ojedinele sklouzává i k použití citově zabarvených výrazů. Překlepů (včetně anotace v angličtině) by také mohlo být méně, obzvláště když je většina z nich snadno odhalitelná zapnutím kontroly pravopisu.

#### **Úvod**

Literární rešerše shrnuje základní poznatky o spirochétách LB, jejich biologii, interakci s vektory a hostiteli. Až na drobné výjimky (Bartůněk 2013 na str. 6) autorka cituje adekvátní zdroje uvedené v rozsáhlém seznamu literatury. Do většího detailu je rozpracována část popisující imunitní odpověď hostitele na infekci boreliemi i různé strategie, kterými se naopak spirochéty před imunitní reakcí hostitele brání. Vzhledem k tématu bych očekával větší důraz na faktory ovlivňující kompetenci vektorů k přenosu. Autorce by se jistě snáze psala i diskuze.



### **Materiál a metody**

Kapitola materiál a metody je zpracována přehledně, ačkoli některé podstatné údaje se mi nepodařilo dohledat. Např.: Kolik klíšťat bylo nasazeno na myš? V jakém časovém intervalu po infekci? Jaké úseky a jaké vzorky byly ověřovány sekvenací? Metodicky práce zahrnuje metody molekulárně biologické detekce borelií, klonování, sekvenování, práci s laboratorními zvířaty a klíšťaty.

### **Výsledky**

Rovněž kapitola výsledky je logicky členěna, jednotlivé výsledky přehledně prezentovány, jen kvalita fotografií gelů kolísá, místy je na hranici únosnosti (obr. 6, obr. 7 křivý). Získané výsledky jsou bezesporu zajímavé, zejména pak rozdíly mezi oběma testovanými druhy borelií a náznak ovlivnění průběhu infekce hostitele druhem vektora, který infekci přenesl. V kapitole postrádám prezentaci výsledků k ověření identity použitých kmenů borelií (alespoň uvedení procenta identity získaných sekvencí porovnáním s databází).

### **Diskuze**

Diskuze je poměrně rozsáhlá a autorka si vybírá relevantní informace ke konfrontování s vlastními výsledky. Z části ale dochází pouze k jejich odcitování a návaznost na vlastní výsledky zůstává nejasná. Zmiňuje například, že zatím nejpravděpodobnějším rezervoárem *B. americana* jsou ptáci, tento fakt však přímo nedává do souvislosti tím, že v myším modelu byla přítomnost DNA této spirochéty detekována prakticky pouze v krvi. Diskuze nicméně bývá obecně problematickou částí, v kontextu jiných diplomových prací bych ji považoval za dostačující.

Autorku bych rád požádal o zodpovězení následujících otázek:

1. Jakým způsobem byste prokázala, že určitý druh členovce může být vektorem určitého patogenu? Jak se v této souvislosti díváte na možnost přenosu spirochét LB jinými členovci než klíšťaty (str. 5)?
2. Na str. 17 je uvedeno „Pro zvýšení citlivosti reakce a zároveň pro snižování inhibice PCR reakce cizorodou DNA (DNA myši) byla použita tzv. nested PCR“. Jak nested PCR snižuje inhibici PCR? Napadl by Vás postup, kterým ověřit zda dochází k inhibici PCR?
3. Pro ověření přítomnosti vybraných plazmidů v kultivovaných kmenech borelií byla využita PCR (str. 21). Skutečně výsledek prokazuje přítomnost/nepřítomnost plazmidu? Jakou jinou metodu by bylo možné použít? Proč se autorka domnívá, že plazmid lp28-1 je přítomen, ačkoli gen *VlsE* se amplifikovat nepodařilo?



4. Jak byla specifikována velikost biopsie z ucha myši? Není možné, že v prvních týdnech byl odebírán menší vzorek než v posledním, kdy byl pokus ukončen (str. 22)?
5. Jak si vysvětlujete, že po injekční infekci myši byla ve vzorcích z uší prokázána přítomnost DNA obou druhů borelií, zatímco po infekci klíštětem byla *B. americana* detekována ve vzorku ucha jen u jedné ze 4 myši? Co mohlo způsobit rozdíly u *B. americana* po infekci různými vektory? (str. 25, Tab. 18)
6. Na str. 26 je uvedeno „Detekce přítomnosti persistentních forem spirochét v hostiteli vyžaduje PCR s primery odlišnými od těch, které jsme používali v naší práci.“ Jaký je pro to důvod?
7. Vaše výsledky naznačují, že oba druhy borelií nemají příliš velkou specifitu pro druh vektora. Je známo, zda je jejich geografické rozšíření omezené na nějakou oblast? Pokud ano, co toho může být příčinou?

Závěrem konstatuji, že se jedná koncepčně sice o poměrně jednoduchou studii, která byla ovšem čistě provedena a poskytla jednoznačné výsledky jako základ pro další studium vektor-patogen-hostitelských interakcí u popsanych genospecies borelií. Velmi pozitivně hodnotím komplexní provedení přenosového experimentu od arteficiálně infikované myši, přes přirozenou infekci klíšťat, transstadiální přenos až po dokumentaci infekce dalšího hostitele včetně ověření identity přenášených kmenů borelií sekvenováním. Tento typ experimentů skrývá nemnohá úskalí a studentka se s nimi podle výsledků práce vyrovnala úspěšně a splnila tedy cíle práce v příslušné kapitole definované. Diplomovou práci Lucie Šolcové mohu s klidným svědomím doporučit k obhajobě. Bohužel nebudu moci být obhajobě přítomen. Nyní, bez dojmu z prezentace práce a zejména reakcí studentky na otázky, bych navrhoval práci hodnotit stupněm „velmi dobře“.

V Českých Budějovicích, 11.1.2017

Mgr. Václav Hömig, PhD.



**SLOVENSKÁ AKADÉMIA VIED  
ÚSTAV ZOOLOGIE**

Dúbravská cesta 9  
845 06 BRATISLAVA  
tel: 02 59302645  
e-mail: maria.kazimirova@savba.sk

**Oponentský posudok na diplomovú prácu Bc. Lucie Šolcovej  
„Analýza invazívnej schopnosti a infekčného potenciálu nově popsaných druhů borelie z  
komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *B. americana* a *B. carolinensis* na laboratorním  
modelu infikovaných savců“**

Kliešťami prenášané spirochéty komplexu *Borrelia burgdorferi* s.l. majú v celosvetovom meradle veľký medicínsky význam a predstavujú vážne riziko pre zdravie ľudí. Borélie v prírodných ohniskách cirkulujú medzi stavovcami a kliešťami, pričom sa kliešte rodu *Ixodes* považujú za ich hlavných prenášačov. V posledných rokoch počet opísaných genetických druhov patriacich do komplexu *B. burgdorferi* s.l. narástol, ale u viacerých druhov chýbajú poznatky o ich patogenite a ekoepidemiológii. Predpokladá, že okrem kliešťov rodu *Ixodes* môžu byť zapojené do cirkulácie borélií v prírode a prenosu nákazy na ľudí aj iné druhy kliešťov. Takýmto druhom je v USA druh *Amblyomma americanum*. Vzhľadom na uvedené skutočnosti je téma diplomovej práce veľmi aktuálna a významná.

Predložená diplomová práca má spolu 43 strán vrátane 18 tabuliek a 7 obrázkov vložených do textu. Práca je členená logicky na úvod, ciele, materiál a metódy, výsledky, diskusiu, záver a zoznam použitej literatúry.

V úvode autorka podáva stručný prehľad o boréliách komplexu *B. burgdorferi* s.l., ich ekológii a medicínskom význame. Podrobnejšie opisuje novo opísané druhy *B. americana* a *B. carolinensis*. Kapitola Materiál a metódy zahŕňa použitý materiál, metodiky kultivácie borélií a ich detekcie v biologickom materiáli, laboratórny zvierací model a schému experimentov. V kapitole Výsledky sú v textovej časti, tabuľkách a obrázkoch spracované dosiahnuté výsledky kultivačných experimentov, dôkaz prítomnosti plazmidov ktoré nesú gény zodpovedné za infekčnosť borélií a dôkaz nákazy laboratórnych myší a kliešťov sledovanými druhmi borélií, ako aj transštadiálneho prenosu borélií v kliešťoch a nákazy myší boréliami po cicaní infikovaných kliešťov. V diskusii autorka stručne diskutuje svoje výsledky s výsledkami iných autorov a v závere práce poukazuje na dôležité zistenie, že kliešť *A. americanum*, ktorý bol donedávna považovaný za nekompetentného prenášača borélií, je schopný nakaziť sa boréliami a tieto preniesť transštadiálne a nakaziť laboratórne myši. Práca je podložená 138 citáciami literatúry.

Význam výsledkov dosiahnutých v rámci riešenia diplomovej práce L. Šolcovej je veľký a práca obsahuje prioritné údaje, ktoré môžu slúžiť ako základ pre ďalšie štúdie v oblasti ekoepidemiológie lyskej boreliózy. Preto s ľútosťou konštatujem, že diplomantka napísaniu práce a najmä jej záverečnej kontrole pravdepodobne už nestihla venovať dostatočný čas a pozornosť, čo sa odrazilo vo výskyte preklepov, chýb a nepresností v štylizácii v texte ako aj nepresností v zozname literatúry. Podľa môjho názoru sa týmto chybám dalo predísť dôslednou kontrolou napísaného textu.

Z nepresností ktoré sa v práci vyskytujú spomeniem v ďalšom iba niektoré, ktoré by bolo nevyhnutné zohľadniť pri publikovaní výsledkov.

Úvod, str. 1, podkapitola 1.1., v prvej vete je potrebné opraviť *Borrelia burgdorferi* na *Borrelia burgdorferi*

Str. 1, 7. veta zdola, *B. bisseettii* je potrebné opraviť na *B. bisseettii*.

Str. 3, Tabulka 1. Záhlavie, skratka PAT

Je potrebné rozlišovať medzi patogenézou a patogenitou. Patogenéza znamená vznik a vývoj chorobných zmien v tele, kým patogenita je schopnosť druhu poškodzovať a vyvolať chorobu. Z názvu tabuľky nie je jasné, či má autorka na mysli patogenitu borélie (pre ľudí, alebo aj pre zvieratá?), alebo fakt, že existujú pre nákazu uvedenými druhmi borélií publikované údaje o patogenéze.

Údaje o geografickom rozšírení a vektoroch *B. americana* a *B. carolinensis* nie sú kompletne, viz. Charakteristika dvoch druhov na str. 8-10.

Druhové meno *B. tanukii* je napísané nesprávne.

Pri druhoch ktoré sa vyskytujú v Európe aj v USA by bolo potrebné vektory priradiť podľa kontinentov. Takto tabuľka budí dojem, že vektorom *B. bisseettii* v USA je *I. ricinus* a v Európe *I. scapularis*, *I. pacificus* a *I. minor*.

Podobne to je pri *B. burgdorferi* s.s., pri *B. kurtenbachii* chýba vektor pre Európu.

Pri *B. yangtze* (*B. yangtzensis*?) je nesprávne uvedený vektor *I. haemaphysalis*, ide pravdepodobne o druh *Haemaphysalis longicornis*.

*B. bavariensis* – v mene autora citovanej práce je chyba, má byť Margos

Str. 5, 2. odstavec, 2. riadok, správne má byť “imunitní odpověď“ hostiteľa

Podkapitola 1.1.2, riadok 4, správne meno kliešťa je *I. persulcatus*

Str. 6, riadok 1, správne meno borélie je *B. garinii*

Str. 7, 2. Odstavec, riadok 3, Akira & Takeda 2004 “absent in the reference list” zostalo v texte pravdepodobne omylom

3. odstavec. Pozor, došlo ku chybnéj klasifikácii cytokínov: IL-6, atď. sú pro-inflamatory, t.j. prozánětlivé cytokíny, IL-10 patrí medzi protizánětlivé cytokíny.

Podkapitola 1.1.4. Text by mal byť napísaný zrozumiteľnejšie aby bolo jasné, ktoré stratégie v imunomodulácii resp. oklamaní imunitného systému hostiteľa využívajú samotné borélie, a akým spôsobom dokážu borélie využiť imunomodulačné schopnosti molekúl v slinách svojich prenášačov - kliešťov.

Str. 8, prvý odstavec, text by mal byť napísaný zrozumiteľnejšie, t.j. najprv by sa mal stručne charakterizovať plasminogen a jeho úloha vo fibrinolýze, t.j. procesy ktoré prebiehajú v tele hostiteľa nezávisle od infekcie boréliami, a až potom úloha plasminogenu v procese patogenézy po infekcii boréliami.

Str. 8, podkapitola 1.2., autorka príliš často opakuje slovo „vzorek“. Správne meno kliešťa je *Ixodes pacificus*

Str. 9, podkapitola 1.3. Podľa mňa je správnejšie písať „vzorka kože z ucha hlodavca“ než „vzorka ucha“

Str. 10, podkapitola 1.4., druhý odstavec. Bolo by žiadúce uviesť už na tomto mieste, ktoré látky v slinách *A. americanum* majú borreliacídny účinok.

Str. 12, Tab. 2. Je potrebné vysvetliť použité skratky, najmä pre gDNA a pDNA

Str 12-13, Podkapitola 3.1. Chýba vysvetlenie skratiek CMRL, BSA

Str. 14, podkapitola 3.3. Vo vete "Vzorek (10 µm) byl přenesen..." ide pravdepodobne o omyl, správne by malo byť "Vzorek (10 µl) byl přenesen..."

Podkapitola 3.4. Nie je potrebné pokusy na laboratórnych zvieratách podložiť povolením etickej komisie?

Str. 15, podkapitola 3.5. Chýbajú detaily o pôvode kliešťov a metodike infestácie. Odkiaľ pochádzali kliešte? Kde boli chované a ako??? Akým spôsobom a aký počet kliešťov sa aplikoval na myš? Ak sa neuvedú detaily, je potrebné citovať prácu, v ktorej sú tieto detaily opísané.

Pri opise vývinového cyklu kliešťov je potrebné dávať pozor na terminológiu. Autorka píše "Larvy klíštat se pak nechaly **vylíhnout** do dalšího stádia (nymfy)." V skutočnosti sa larvy **liahnu** z vajíčok a do ďalšieho vývinového štádia sa premenia - **metamorfujú**.

V podkapitole chýba schéma pokusu, v ktorom sa sledoval prenos borelií na myši prostredníctvom infikovaných kliešťov. Koľko a akých myší sa použilo? Aké boli experimentálne skupiny? Koľko nýmfov kliešťov sa dalo na myš? Čo sa udialo s nacicanými nymfami? Akým spôsobom boli myši usmrtené?

Podkapitola 3.6. Autorka píše "Klíšťata byla řádně rozdělena podle vývojových stádií (larva, nymfa)..." V metodike infestácie myši kliešťami sa však spomína, že sa nacicané larvy nechali metamorfovať. Preto nie je jasné, či sa vyšetrovali na prítomnosť DNA borelií aj nacicané larvy, alebo až metamorfované nymfy, prípadne dospelé kliešte po metamorfóze nýmfov.

Ako sa merala koncentrácia DNA? Chýba opis, resp, citácia metodiky.

Str. 17, podkapitola 3.7.2., chýba metodika pre detekciu myšieho aktínu, resp, citácia publikácie.

Str. 22, podkapitola 4.3. Podľa môjho názoru by bol výstižnejší názov podkapitoly "Průkaz přítomnosti DNA borelií v tkáních myší **očkovaných kultúrou borelií**", alebo hneď v prvej vete by bolo žiadúce špecifikovať, o ktoré myši sa jedná.

Str. 23, podkapitola 4.4. V nadpise je žiadúce doplniť "... na nymfy kliešťov"

Pozor na termín „vylíhlých nymfách“ (pozri vyššie)

Tabuľka 16. Pozor na záhlavie, ľavý stĺpec, ide o druh, nie rod borelií

Str. 24. Obr. 5. Pozor, Latinské druhové mená sa neskloňujú, správne má byť *Borrelia americana*.

Obr. 6. Správny text má byť pravdepodobne nasledovný: „Potvrzení přenosu *B. carolinensis* nymfami obou druhů klíštat....“

Zoznam literatúry.

Zhodu citácií v texte a v zozname som nekontrolovala, ale upozorňujem na celý rad nepresností. V mnohých prípadoch nie je zachovaná jednotná forma citovania, ktorá sa vyžaduje ako v časopisoch, tak v prácach bakalárskych a diplomových. V zoznamoch literatúry v časopiseckých publikáciách, knihách, diplomových prácach a pod. sa väčšinou citácie prác jedného autora zoradujú primárne podľa abecedy a až potom chronologicky. V posudzovanej DP sú citácie prác jedného autora zoradené chronologicky, čo je bežnejší spôsob pri písaní bibliografií.

V niektorých citáciách sú názvy časopisov skrátene, inde sú vypísané celé.

Za skrátenejšími slovami názvov časopisov sú niekde bodky, inde bodky chýbajú.

V niektorých citáciách začínajú veľkými písmenami všetky slová v názve časopisov, v iných začína veľkým písmenom iba prvé slovo v názve.

Latinské názvy druhov sa v citovanej literatúre píše väčšinou kurzívou, v tejto práci tomu tak nie je. Nevieť však, či to je chyba, alebo je táto forma písania citácií daná internými pravidlami univerzity.

Barbour, A. G., & Hayes, S. F. (1986). Chýba rozsah strán.

Bissett, M. L., & Hill, W. (1987) - omylom je pri mene Hill uvedených ďalších 5 iniciálok.

Euroimmun (2015) citácia nie je úplná.

Gem, L., & Humair, P.F. má byť **Gern**, L. & Humair, P.F.

Hubálek (2009) – chýbajú mená editorov monografie.

Kurtenbach et al. 1998, 2002 – diametrálne odlišný formát, podobne Levin et al. 1996

Nau et al. 2009 - neúplná citácia, podobne Rygg & Borch (2006)

Otázky pre diplomantku:

1/ Aké sú známe funkcie kliešťového proteínu Salp15?

2/ Ako si vysvetľujete, že po inokulácii bola *B. americana* detegovaná v koži z uší všetkých inokulovaných myší, kým po cicaní infikovaných ným kliešťov iba v ušiach 25% myší napriek tomu, že analýza na prítomnosť DNA borelií prebehla nested PCR a v prípade inokulovaných myší konvenčnou PCR? Je možné, že po inokulácii *B. americana* bola v tkanivách myší vrátane kože detegovaná iba zvyšková DNA a nie DNA živých spirochét a dôvodom pre záchyt zvyškovej DNA bola vyššia infekčná dávka než pri prenose borelií počas cicania kliešťov?

3/ Existujú pokusy s infekciou *A. americanum* druhom *B. burgdorferi* s.s. a je teda možná selektívna kompatibilita aj pre iné druhy borelií, alebo iba pre *B. americana* a *B. carolinensis*?

4/ Mohla by prítomnosť boreliacidných látok v slinách *A. americanum* závisieť od rôznych populácií kliešťa, alebo sú tieto látky prítomné v kliešťoch vždy a prežitie či úhyn borelií závisí iba od kmeňa baktérie?

Záverom konštatujem, že napriek kritickým pripomienkam predložená práca Bc. Lucie Šolcovej splnila stanovené ciele a po formálnej a odbornej stránke spĺňa kritériá kladené pre diplomové práce. Preto navrhujem prácu po úspešnej obhajobe prijať ako podklad k štátnej záverečnej skúške.

V Bratislave, 13.1.2017

  
RNDr. Mária Kazimírová, CSc.