

Oponentský posudok na diplomovú prácu

Študent: **Bc. Hana Hájková**
Vedúca práce: Nataliia Rudenko, PhD.
Škola: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta

Názov práce: **Patogeny v kliešťatech získaných ze psů a koček v Českých Budějovicích a okolí.**

Diplomová práca má 69 strán textu včítane zoznamu použitej literatúry, 12 tabuliek a 12 obrázkov (grafov, mapiiek a fotografií). Je klasicky členená na 7 častí so zoznamom použitej literatúry, ktorý zahŕňa 246 literárnych odkazov. Cieľom práce bolo vyšetriť kliešte zbrané zo psov a mačiek z útulku pre zatúlané zvieratá v Českých Budejoviciach, vyšetriť ich na prítomnosť kliešťami prenášaných patogénov štyroch rodov príslušnými molekulovými metódami dôkazom DNA a spracovať literárny prehľad k danej téme. K naplneniu cieľa bolo potrebné zozbierať potrebný materiál a zvládnuť diagnostiku pôvodcov chorôb.

Zhodnotenie výberu témy

Diplomová práca sa zaoberá vysoko aktuálnou problematikou, ktorá najmä v ostatných desaťročiach nadobúda nové rozmery aj v dôsledku dopadov globálnych zmien na rozšírenie kliešťov v prostredí, kde sa eviduje nárast ich populácií vo vyšších polohách a aj ich častejší výskyt v mestách a prímestských rekreačných zónach. Práca je významná aj tým, že využíva túlavé psy ako indikátory výskytu nákaz v prostredí, kde zaradila aj štúdiu o význame túlavých mačiek v šírení týchto nákaz. Mnohé z nich už dostali prívlastok „emerging“ či „neglected diseases“ a predstavujú riziko aj pre chovateľov týchto domácich zvierat.

Práca s literatúrou

Práca má veľmi precízne spracovaný literárny prehľad, ktorý má vysokú výpovednú hodnotu. Autorka v ňom spracovala aktuálne údaje z takmer 250 literárnych prameňov z Čiech a zo sveta, pričom do prehľadu zahrnula aj informácie dostupné na internete, aj nepublikované údaje školiaceho pracoviska. Pojednáva o štyroch skupinách patogénov prenášaných kliešťami na ľudí a zvieratá. Z bakteriálnych pôvodcov je to komplex Lymskej boreliózy, anaplazmózy a rickettsiôz a z protozoárnych pôvodcov rod *Babesia* spp., so širokým spektrom príslušníkov daných rodoov.

V komplexe pôvodcov Lymskej boreliózy prezentuje už najnovšie údaje, ktoré evidujú 21 druhov borélií z celého sveta s dôrazom na druhy, ktoré sú prenášané kliešťami *Ixodes ricinus* a *I. persulcatus* a spôsobujú ochorenie ľudí i zvierat v Európe a Euroázii. Do štúdie zaradila aj často „podceňovaného“ kliešť a *I. hexagonus* (kliešť ježí), ktorý je častý na domových zvieratách, najmä psov v Európe. Aj na Slovensku predstavuje tento druh asi 10% kliešťov zbraných zo psov v horských oblastiach. Na nížinách je zriedkavý. Je kompetentným vektorom Lymskej boreliózy najmä v horských oblastiach. Literárny prehľad je doplnený konkrétnymi údajmi o jednotlivých pôvodcoch, epidemiológii, klinike ochorenia ľudí i zvierat v ČR, kde JČ kraj patrí k tým viac postihnutým touto zoonózou.

Cennou časťou je aj prehľad o anaplazmóze ľudí a zvierat v Európe i vo svete, ktorá patrí k typickým vynárajúcim sa nákazám, ktorá si právom zasluhuje zvýšenú pozornosť aj v odborných kruhoch. Autorka prezentuje významné druhy anaplazmiem a ehrlichii, ktoré ešte nedávno boli považované za jeden rod *Ehrlichia* spp. V prehľadnej tabuľke s geografickou distribúciou, vektorom a rezervoármi ich prezentuje 11 druhov, s údajmi o klinike, epidemiológii a životnom cykle týchto patogénov. Keďže klinické príznaky sú zväčša nešpecifické, často sa zamieňa za iné ochorenia, čo môže komplikovať liečbu.

V ďalších dvoch podkapitolách podobným prehľadným spôsobom spracováva historické i nové údaje o proteobakteriálnych pôvodcov rickettsiôz ľudí a zvierat vo svete a Európe

a jednobunkových parazitov najmä červených krviniek ľudí a zvierat, príslušníkov rodu *Babesia* spp. Najmä babézie patria k život ohrozujúcim patogénom ľudí a zvierat, kde najmä *Babesia canis* je v súčasnosti sa narýchlejšie sa šíriaci kliešťami prenášaný patogén v Európe a zasahuje už celé južné Slovensko a južnú Moravu. Ďalšie druhy možno označiť za zanedbávané nákazy, ktorých diagnostika je často problémová a príznaky zastreté inými infekčnými chorobami, ktoré patria do úplne iných schém terapie.

Použitá literatúra je mimoriadne bohatá pre uvedený druh práce.

Metodika práce

Metodika práce využíva súčasné moderné molekulové metódy detekcie DNA patogénov z kliešťov zobrazených zo psov a mačiek, ktorá zahŕňa izoláciu genómovej DNA z kliešťov, polymerázovú reťazovú reakciu (PCR), elektroforézu, purifikáciu DNA, sekvenovanie a overenie správnosti detekcie druhej špecifčnosti patogénov. Pre optimalizáciu podmienok PCR reakcie boli upravené podmienky amplifikačnej reakcie a použité príslušné primery s ich prehľadom v tabuľkách. Rozdiel v pozitívite u pohlaví kliešťov, resp. hostiteľov bol pomocou chí-kvadrátu, štatistické analýzy v programe „R-project“.

Materiál predstavuje 343 kliešťov dvoch druhov, *Ixodes ricinus* a *Ixodes hexagonus* (20 dospelých jedincov), získaných z 39 mačiek (92 kliešťov) a 67 psov (251 kliešťov) z rokov 2014, 2015 a 2016 na území mesta České Budejovice. Kliešte boli odobraté na jar a v lete v čase maxima ich aktivity. Súbor je dostatočný pre získanie objektívneho obrazu a zvládnutie metodiky práce, i posúdení rizika týchto ochorení u zvierat i ľudí, nakoľko patria medzi zoonózy. Vlastná metóda práce je podrobne opísaná, použiteľná pre zopakovanie vyšetrení a nemám k nej pripomienky.

Výsledky práce a diskusia

Výsledky sú prezentované logicky, prehľadne a zrozumiteľne, podľa skupín patogénov, vektorov a hostiteľov, sezóny roka (mesiacov) a rokov pozorovania a vyšetrovania. Samostatne sú uvedené počty kliešťov zo zvierat s jedným a viacerými patogénmi, zvlášť mačky a psy, jednotlivé skupiny patogénov a nakoniec aj jednotlivé druhy. Spracovanie výsledkov prináša podrobný prehľad výskytu patogénov v kliešťoch s poukázaním na význam výsledku. Výsledky sú doplnené aj obratovou a grafickou prílohou v texte.

U *I. ricinus* bolo zistených 9 druhov patogénov, najčastejšie bol zastúpený rod *Borrelia* spp. (21,9%), ďalej *Anaplasma* spp. (11,1%), *Rickettsia* spp. (10,2%) a nakoniec *Babesia* spp. (4,1%), čo svedčí o vysokom riziku ohrozenia zvierat i ľudí. Medzi boréliami boli zistené aj druhy *B. carolinensis*-like a *B. bissettii*, o výskyte ktorých sa v strednej Európe veľa nevie a možno to považovať za veľmi významný výsledok.

Z anaplaziem to boli *A. phagocytophilum* a málo známa *A. platys*, ojedinele aj *Ehrlichia canis*, ktorých vektormi v Európe sú stredomorské *Rhipicephalus sanguineus*, ktoré sa v strednej Európe vyskytujú skôr len ako importované druhy, čo taktiež poukazuje na možnú novú epidemiologickú situáciu.

Z babézií bola detekovaná v *I. ricinus* aj *B. canis*, naviac kliešť bol získaný z mačky, čo je niečo nové, doposiaľ boli v strednej Európe známe len z pijakov *Dermacentor reticulatus* alebo kliešťov *Rhipicephalus* spp. U mačiek však v literatúre sa opisuje aj jej špecifická *Babesia felis*, resp. *B. cati* (synonymá). Autorka ju v literárnom prehľade nespomenula, ale patrí do tejto skupiny potenciálnych patogénov mačiek, najmä v južnej Afrike a zaslúži si svoju pozornosť.

Medzi boréliami, rickettsiami, anaplasmami i babeziami boli aj neidentifikované druhy, čo otvára ďalšie otázky o existencii ďalších možných druhov kliešťami prenášaných patogénov.

V kliešťovi ježom autorka potvrdila infekciu u 40% kliešťov, pričom takmer všetky (18 z 20) pochádzali z mačiek. Z patogénov to boli najčastejšie *Anaplasma phagocytophilum*, ďalej *B. burgdorferi* s.s., *Babesia venatorum* a najmenej *Rickettsia helvetica*, čo nie sú bežné patogény

v strednej Európe. Za významné je možné považovať aj zistenie častejšieho napadnutia kliešťom ježím u mačiek ako psov, čo doposiaľ asi nebolo predmetom podrobnejšej štúdie v ČR.

Diskusia je dynamická, kde sú porovnávané vlastné výsledky s údajmi z literárnych zdrojov z ČR, Európy i vo svete. Autorka sa dobre zhostila porovnávania použitých metód rôznymi autormi, aby zhodnotila reálnosť svojich výsledkov s porovnanými. Konštatuje sa skutočnosť, že narastá počet zvierat chovaných v mestách s nárastom počtu túlavých zvierat, je snaha zachovávať zelené plochy, ktoré sú miestom výskytu kliešťov. Poukazuje na rastúci význam kliešťá ježieho v mestách pri udržiavaní ohnisk Lymskej boreliózy a zrejme aj anaplazmózy a babeziózy, ako aj na zistenie nových, či menej známych patogénov v kliešťoch z územia južných Čiech a ČR vôbec.

Pripomienky

Autorka sa v texte nevyhla preklepom, ktoré som vyznačil v texte. Tabuľka 10 nie je nazvaná správne, ani jednotlivé kategórie. Nie sú porovnávané mačky a psi s patogénmi, ale s kliešťami s patogénmi, podobne aj obr. 9.

Záver

Diplomová práca rieši vysoko aktuálnu problematiku. Autorka preukázala, že vie získať a vyšetriť biologický materiál modernými metódami vyžadujúcimi skúsenosť a prax, opísať výsledky a porovnať ich s literárnymi údajmi a zhrnúť stručné závery, poukázať na významné výsledky a vhodne ich okomentovať. Spracovala veľmi prehľadný literárny prehľad s použitím širokého spektra literárnych údajov. Práca prináša konkrétne vedecké poznatky, má svoju vedeckú i metodologickú hodnotu. Po formálnej stránke je to veľmi dobre štrukturovaná diplomová práca i spísaná ako vedecký spis, aj keď sa nevyhla preklepom a drobným nepresnostiam.

Predložená diplomová práca študentky Bc. **Hany Hájkové** spĺňa požadované kritériá a hodnotím ju známkou

v ý b o r n e.

V Košiciach 15.5.2017



Doc. MVDr. Branislav Petko, DrSc.
oponent

Oponentský posudek na magisterskou práci **Bc. Hany Hájkové**

„Patogeny v klíšťatech získaných ze psů a koček v Českých Budějovicích a okolí.“

V předložené práci se autorka zaměřila na detekci čtyř klíšťaty přenášených patogenů v klíšťatech sesbíraných ze psů a koček v Českých Budějovicích (ČB) a okolí. Jako hlavní cíle si zvolila vypracování literární studie k této problematice, sběr vzorků a optimalizaci molekulárních technik detekce patogenů a v neposlední řadě interpretaci výsledků v souvislosti s ohrožením veřejného zdraví obyvatelstva ČB.

Práce je strukturovaná do sedmi kapitol (úvod, cíle, literární přehled, materiál a metody, výsledky, diskuze, závěr) v celkovém rozsahu 69 stran s množstvím obrázků a tabulek. Je vyvážená a přehledná a svým rozsahem odpovídá nárokům na magisterskou práci. Autorka splnila všechny vytyčené cíle práce. Výsledky práce přehledně zpracovala do tabulek i grafů a rovněž je celkem úspěšně diskutovala s velkým množstvím literárních zdrojů.

Magisterská práce Bc. H. Hájkové je zaměřena na zajímavé téma. Zvláště oceňuji, že se zaměřila na klíšťata odebraná přímo z hostitelů, neboť o prevalenci patogenů v těchto klíšťatech je známo relativně málo. Rovněž musím vyzdvihnout obrovské množství analýz, které studentka sama prováděla. Vyšetřila celkem 343 klíšťat na přítomnost čtyř patogenů, které pak ještě dále přesně identifikovala pomocí sekvenování a klonování. Proto moje připomínky nijak nesnižují kvalitu této práce, je však potřeba na některé nedostatky upozornit.

K formální stránce práce mám tyto připomínky:

Práce je napsaná velmi přehledně, zvláště pak literární přehled, kde jsou informace k jednotlivým patogenům naprosto dostačující. Diskuze je však sepsaná méně přehledně a v několika případech není jasné, zda autorka míní své vlastní výsledky, či výsledky jiných prací. Také není v některých případech jasné, zda autorka míní infikovanost klíšťat sbíraných vlnkováním, klíšťat sesbíraných ze zvířat či infikovanost zvířat samotných. Navíc v diskuzi autorka používá velmi složitá souvětí, která ve výsledku postrádají smysl. Některé pasáže diskuze jsou pak hůře srozumitelné a čtenář si nemůže být jist, co autorka daným popisem měla na mysli.

V práci se vyskytují občasné překlepy (*R. momacensis*, *Rickettsia*, *A. phagocytophilum*, průměrům, klíšťat, prenos a další) a několik gramatických chyb („cyrkulace“). Autorka by v celém textu místo „kousnutí“ klíštěte či „pokousání“ klíštětem měla spíše používat termín „přísátí“ klíštěte, neboť klíště nekouše.

K jednotlivým kapitolám:

Ke kapitole literárního přehledu nemám žádné zvláštní připomínky. Kapitola je velmi dobře zpracovaná s velkým množstvím informací, které jsou také zpracované do přehledných tabulek. Pouze ve dvou místech mi chyběla citovaná literatura (str.11 stejné rozšíření Anaplasmózy a LB a str.20 SFG u koček).

Materiál a metody jsou pečlivě zpracované. Pouze chybí citace či odkaz u použitých pozitivních kontrol - kultura i klíšťata. Použitá pozitivní klíšťata jsou z jiných studií či z této práce?

Rovněž chybí odkaz u termínu „spacer“ PCR, kterým je pojmenován první amplifikační krok nested PCR reakce. Prosím o vysvětlení z jakého zdroje tento termín použila.

Kapitola výsledky je rovněž velmi pečlivě sepsaná s velkým množstvím tabulek a grafů. V některých případech jsou uvedena pouze procenta výskytu určitého patogenu a chybí absolutní čísla.

Tab. 8: Zajímalo by mne, proč se nepodařilo specifikovat místo odchytu u relativně velkého počtu psů.

Obr. 5: U výsledku počtu nalezených klíšťat v průběhu měsíců je napsáno, že byl potvrzen jarní pík. Jakou statistickou metodou jste toto potvrdila?

Obr. 6 AB, 7, 8: Chybí popis testovaných pozitivních i negativních vzorků. Byla to klíšťata z koček či ze psů?

Obr. 11: *Bb* s.s místo *B.canis*

Obr. 12: Koinfekce - Pro lepší přehlednost by bylo dobré tyto data prezentovat i v tabulce s doplněním o jaká klíšťata se jednalo (ze psů či z koček).

Kapitola diskuze je velmi obsáhlá a až na již zmíněné nedostatky je více než dostačující.

Str. 40: Odstavec o *I.hexagonus* nedává smysl. Jaké hodnoty frekvence borelie jsou srovnatelné s průměrem? A s průměrem čeho?

Str. 41: Dle výsledkových tabulek se vám *B.carolinensis* – like podařila detekovat u 4 vzorku (ne tří) pomocí *flaB*. U jednoho vzorku se potvrdila podobnost také p66 a nifS s *B.carolinensis*. U ostatních tří vzorků to bylo pouze pomocí *flaB*? Jak dopadla analýza *ospC* a dalších sedmi housekeeping genů?

Prokázala MLST analýza u 4 z 8 analyzovaných genů opravdu 100% homologii s *B.californiensis*?

Str. 42: V prvním odstavci není jasné, jaká data jsou vaše a která jsou z citované literatury, také není zřejmé, zda se jednalo o klíšťata sesbíraná vlajkováním či ze zvířat. V druhém odstavci vysvětlete, jakému evropskému průměru odpovídají vaše data.

Na autorku mám ještě několik doplňujících dotazů:

Mohou být neurologické příznaky nebo lymfská artritida projevem časně fáze boreliózy?

Objevuje se erythema migrans a boreliový lymfocytom vždy v místě přisátí klíštěte?

Kolik *ospC* typů existuje a kolik jich je spojováno s invazivním fenotypem?

Jak si vysvětlujete 80 % koček s infikovanými klíšťaty oproti pouze 48 % psů s infikovanými klíšťaty?

Závěr:

Autorka zvládla metody molekulární biologie a úspěšně optimalizovala všechny techniky pro detekci patogenů v klíšťatech. Dosažené výsledky jsou jistě dobrým základem pro odbornou publikaci v tomto tématu. Proto doporučuji magisterskou práci k obhajobě a navrhuji hodnocení práce 1 – 2 v závislosti na obhajobě.

V Praze 16.5.2017


RNDr. Kateřina Kybicová, Ph.D.

NRL pro lymeskou boreliózu, Státní zdravotní ústav Praha