

Oponentský posudek na diplomovou práci Marka Brože „Tažní psi v Arktidě jako potenciální zdroj parazitárních infekcí lidí a volně žijících zvířat“

Ve své magisterské práci se Marek Brož věnoval problematice parazitárních infekcí u psů chovaných na Svalbardu. V práci navazuje na svou bakalářskou práci se stejnou problematikou. Bakalářskou práci jsem neviděl a nemůžu tedy přímo porovnat kvalitativní posun (metodika, zpracování výsledků atd.). Bohužel počet nalezených parazitů je velmi nízký, nižší než v předchozí práci. Je také škoda, že počet odebraných vzorků z Grónska je velmi malý a neumožňoval by jakékoli porovnání s nálezy ze Svalbardu, což by dalo magisterské práci jistě mnohem větší kvalitu.

Práce je po formální stránce v pořádku. Je psána velmi dobrou češtinou. K práci mám následující konkrétní otázky, připomínky a náměty pro případný navazující výzkum.

V případě negativních vzorků bych doporučil otestovat zda PCR nemůže být ovlivněna přítomností inhibitorů, které se ve vzorcích exkrementů vyskytují (přestože byl použit kit, který má inhibitory odstraňovat). A to přidat pozitivní DNA do PCR k několika vybraným vzorkům. Dále bych doporučil testovat účinnost izolace DNA tak, že se přidá k části vzorku před izolací DNA určené množství spor nebo oocyst parazita a provede se izolace DNA s následnou PCR. Tím lze jednoduše otestovat to, že v případě přítomnosti parazita je molekulární metodika účinná. Bylo by určitě i praktické a užitečné pro budoucí výzkum otestovat detekční limit pro jednotlivé parazity – tzn. pokud jsou v laboratoři dostupné spory nebo oocysty parazitů, tak přidat ke vzorkům jejich dané množství a zjistit tak limitní množství pro jejich detekci

V naší laboratoři používáme DNA stool kit, který v protokolu zahrnuje i rozdrcení materiálu pomocí zirkonových kuliček – to je vhodné pro porušení velmi odolné stěny spor (oocyst) parazitů. Zahrnutí tohoto kroku by mohlo zvýšit šanci na detekci parazitů.

Předpokládám, že pozitivní kontrola obsahovala kvalitní DNA o dobré koncentraci. To že vychází pozitivní kontrola je známka dobře provedené PCR reakci, ale nemusí to znamenat, že mé testované vzorky jsou negativní, obzvlášť u problematických vzorků z výkalů. Byla vyzkoušena i jiná polymeráza, která by mohla být vhodnější pro dané vzorky?

V úvodu je tvrzení (str. 6), že s klesající diverzitou hostitelů v závislosti na zeměpisné šířce lze předpokládat, že parazitofauna živočichů bude druhově chudší. To je určitě pravda – je relativní množství parazitů vztažené na jednoho hostitele také nižší? Pokud ano, proč by to tak mohlo být?

Jaká antiparazitika se používají u psů na Svalbardu? Působí i na protisty (kryptosporidie, mikrosporidie)? je prakticky nulový záchyt parazitů způsoben právě používáním těchto antiparazitik? Jsou přísné veterinární kontroly dodržovány z důvodu ochrany tažných psů před původními parazity, nebo je to ochrana volně žijících zvířat před zavlečenými parazity?

Lze v současnosti bezpečně určit, kteří paraziti karnivorů jsou v arktidě původní, a kteří sem byli zavlečeni spolu se psy v dřívějších dobách před prvním sledováním parazitárních nákaz?

Jak lze poznat, že pes nakažený parazitem hostí v lokalitě původního parazita nebo parazita, kterého si přivezl sebou?

Počet nalezených parazitů je žalostně nízký. To nelze přičíst jako chyba (doufám) autorovi práce, protože se nedá předem predikovat, jestli budou hostitelé infikováni. Nicméně to bylo velmi riskantní zadání magisterské práce. U bakalářských prací to podle mého názoru nevádí, ale magisterský student by měl i prokázat, že kromě dobře zvládnuté metodiky umí i analyzovat výsledky. Naštěstí se podařilo získat aspoň sekvence *E. bienewisi* ze čtyř vzorků a mikroskopicky zachytit v jednom vzorku *Toxocara canis*. U mikroskopické dokumentace *T. canis* bych uvítal nějakou morfometrickou analýzu a následné porovnání s údaji v literatuře o *T. canis*. Pokud bylo nalezeno víc než jedno vajíčko tasemnice ve vzorku, byla by určitě vhodnější tabule s více vajíčky, tak aby byla dokumentována jejich rozmanitost.

Proč nebyla zvolena PCR diagnostika také u jiných druhů parazitů, např. u *Toxocara canis*, kterou se podařilo identifikovat mikroskopicky?

Nejsem odborníkem na fylogenetickou analýzu mikrosporidií, ale nezdá se mi vhodně použitý outgroup mikrosporidie rodu *Nucleospora* pro odhalení příbuznosti izolátů *E. bienewisi*. Neexistuje jiná bližší sekvence příbuznějšího druhu mikrosporidie? Díky dlouhé outgroupové větvi jsou ingroupové větve velmi krátké a tudíž rozlišení izolátů *E. bienewisi* ve stromu špatně čitelné.

Nejsem také odborník na barevné spektrum a vystačím si s trojicí základních barev RGB, které i vidím na obr.6, fialovou, na kterou se odkazuje legenda pod stromkem tam nevidím. To je samozřejmě poznámka na odlehčenou, spíš postrádám jasně vyznačené nově získané vzorky v předkládané práci. Můžu jen odhadovat, že to budou vzorky s kódem obsahujícím číslo 2017, je to tak?

Tab. 1 týkající se meziskupinové nukleotidové diverzity: prosím o vysvětlení statistických údajů z této tabulky (s touto statistikou jsem se nesetkal a zajímala by mě).

Z přiloženého alignmentu ITS sekvencí (příloha II) jsou zjevné poměrně velmi vysoké nukleotidové rozdíly mezi skupinami – tyto rozdíly odhaduji v několika desítkách procent by byly u většiny organismů považovány za rozdíly přinejmenším na druhové úrovni. Prosím o uvedení nukleotidových rozdílů u zástupců skupin – krátkou distanční tabulku, která by podle mne každopádně lépe charakterizovala sekvenční podobnost izolátů než Tab.1 (v programu Geneious velmi jednoduše proveditelné).

Přes vznesené připomínky doporučuji diplomovou práci Marka Brože k obhajobě,

V Českých Budějovicích, 18. 1. 2019


RNDr. Ivan Fiala, Ph.D

Oponentský posudek

na diplomovou práci Bc. Marka Brože

„Tažní psi v Arktidě jako potencionální zdroj parazitárních infekcí lidí a volně žijících zvířat“

Diplomová práce Marka Brože na 32 stranách zpracovává problematiku parazitárních infekcí u psů ze dvou arktických oblastí. Celková úprava předložené práce odpovídá požadavkům kladeným na diplomovou práci.

V úvodní části autor stručně charakterizuje specifika Arktidy, psů, kteří zde žijí, a parazitofauny detekované u psů a psovitých šelem z arktických oblastí, jelikož cíle práce byly následující:

- shromáždit koprologický materiál tažných psů, vyšetřit ho pomocí molekulárních a koncentračních metod na přítomnost střevních parazitů

- na základě výsledků posoudit možnost přenosu parazitárních infekcí na člověka a volně žijící zvířata, zhodnotit epidemiologický význam tažných psů.

Ačkoli je kapitole Materiál a metodika věnováno 8 stran, vlastního sběru a zdroje materiálu se týká pouhých sedm řádků, dvě mapy a tři fotografie. Postrádám informaci, zda se jednalo o čerstvý trus nebo i trus starší. Byl trus identifikován a tedy shodný vždy s jedním psem nebo šlo o náhodný sběr a mohlo by se jednat i o několik vzorků od jednoho jedince (pak nelze hodnotit prevalenci)? Kolik psů bylo v každé stanici? Kolik vzorků bylo získáno z každé ze tří stanic? Proč bylo z Grónska získáno pouze šest vzorků? Jsou známá nějaká data jako původ psů (diskutovaný v práci jako významný ukazatel), pohlaví, věk? Za velmi důležitou informaci považuji také, zda je známo, čím byli vyšetřovaní psi krmeni (mražené/vařené maso, ryby, granule...) a v neposlední řadě, kdy a čím bylo provedeno poslední odčervení sledovaných psů.

V metodické části by bylo vhodné doplnit, jak dlouho byly vzorky skladovány než byly vyšetřeny, jelikož v dichromanu dochází ke sporulaci i rozpadání oocyst kokciidií, a také k rýhování a pozdějšímu rozpadu vylíhlých larev rhabditidních a strongylidních hlístic.

Předpokládám, že před izolací DNA ze vzorku trusu byl dichroman ze vzorku vymyt, je to tak?

U PCR je uvedeno, že „Součástí každé PCR reakce byla také pozitivní a negativní kontrola. U všech parazitů byl pozitivní kontrolou osekvenovaný vzorek.“ Pominu-li, že se dozajista nejednalo o přidání pozitivní a negativní kontroly do každé PCR reakce, ale tyto dvě kontroly

tvorily každá svoji reakci v setu PCR reakcí, bylo by vhodné uvést, co bylo negativní a zejména pozitivní kontrolou, co si máme představit pod pojmem „osekvenovaný vzorek“.

V kapitole výsledky bych doporučila pozměnit název odstavce 4.1 „Přítomnost dospělých helmintů ve výkalech“ na „Makroskopická detekce helmintů ve výkalech“, jelikož se může jednat (zejména po odčervení) i o nedospělé helminty nebo jen jejich části (např. články tasemnic).

Za zcela zavádějící, považuji informaci o detekci silné infekce *Toxocara canis* dokladovanou fotkou vajíčka (Obr. 5), kde je naprosto jednoznačně vajíčko *Toxascaris leonina*. Mohl by autor vysvětlit, zda jde o chybu v určení rodu škrkavky nebo o chybu v doložené fotografii. Prosím, aby autor uvedl jaké morfologické znaky jsou typické pro vajíčka rodu *Toxocara* a jaké pro *T. leonina*? Čím se liší *T. leonina* od *T. canis* ve svém vývojovém cyklu? Jaký je zoonotický potenciál *T. leonina*?

K tématu odolnosti vajíček škrkavek (viz Diskuze strana 24 nahoře), bych ještě doplnila, že záchyt vajíček v půdě [32,5% vzorků jak cituje (nikoli uvádí) Gillespie 1988 z Ghadirian, E. et al. (1976) Can. J. Publ. Hlth 67, 495] ještě neznamená, že tato jsou i života/infekce schopná!

Oceňuji vyhodnocení výsledků a diskuzi týkajících se *E. bieneusi*, ačkoli je na snadě již zmíněná otázka, zda se jednalo o pozitivní vzorky od různých jedinců nebo alespoň o vzorky z různých psích stanic. Šlo o jiné stanice/lokality oproti citovaným pozitivním nálezům (Brož 2016)?

Na autora mám kromě výše uvedených ještě dva dotazy:

- V úvodní části je zmíněn pokles množství ledu v souvislosti s globálním oteplováním (Serreze et al. 2007). Existují nějaké recentnější publikace (než uvedená jedenáct let stará citace), které by se zabývaly se stejnou problematikou?
- Proč je v celé práci místo českého pojmenování Špicberky používán norský název Svalbard?

Souhlasím se závěrem, že dle výsledků této práce je ve sledované oblasti parazitofauna u psů velmi skromná. Pravděpodobně i díky chladným zimám, jak uvádí autor v diskuzi. Spíše ale než spekulace o potencionálním riziku infekcí pro lidi, kteří do těchto oblastí v rámci turismu stále častěji přijíždí, bych považovala za vhodné vyzdvihnout tento nízký záchyt a tedy téměř nulové riziko infekce ve srovnání s oblastmi turisticky vytíženějšími nebo i u nás „doma“ např. zmíněná *Toxocara* (Dubná et al. 2007. Contamination of soil with *Toxocara* eggs in urban (Prague) and rural areas in the Czech Republic. Vet Parasitol 144:81-6; Macuhova et al. 2013 Contamination, distribution and pathogenicity of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs from sandpits in Tokyo, Japan. J Helminthol. 87:271-6.)

Velmi oceňuji zvolené téma a myšlenku, že by sledování potencionálně rizikových patogenů v arktických oblastech nemělo ustrnout, zejména s ohledem na globální oteplování.

Přestože jsem položila mnoho dotazů, věřím, že je autor práce snadno zodpoví a zmíněné nejasnosti uvede na pravou míru. Práci tedy doporučuji k obhajobě.

V Brně, dne 16.1. 2019



MVDr. Lada Hofmannová, Ph.D.

Ústav patologické morfologie a parazitologie
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno
Tel.: 541 562 264
hofmannoval@vfu.cz
www.vfu.cz