

Oponentský posudek na diplomovou práci Pavly Šnebergerové „Study of *Babesia microti* acquisition by ticks“

Ve své magisterské práci se Pavla Šnebergerová zabývala kvantifikací *Babesia microti* během sání klíštěte, dále genovou expresí ve tkáních klíštěte a také imunodetekcí parazita jak v obratlovčím tak klíštěcím hostiteli.

Úvod práce je napsán velmi čtivě a čtenář dostane ucelený přehled o dané problematice. Cíle jsou velmi smělé zahrnující řadu úkolů, které během poměrně krátké doby, která je určena pro vypracování magisterské práce, určitě nebylo lehké splnit. To se však povedlo velmi dobře a výsledky, které budou bezesporu podkladem pro velmi kvalitní publikaci, svědčí o nadstandartní kvalitě předložené diplomové práce a zejména o šikovnosti a kvalitách studentky. Práce je psána v anglickém jazyce, text je na vysoké jazykové úrovni a bude moci být z velké části použit do publikace.

V práci je minimum překlepů a nenašel jsem závažnější nedostatky jak po formální tak obsahové stránce (pouze v referencích se vyskytlo větší množství chyb, viz níže). Druhové jména parazitů mohly být doplněny autory popisu druhů, což je např. v taxonomicky zaměřených pracích úplnou nezbytností a v magisterských pracích by to mělo být také samozřejmostí, nicméně to nepovažuji v tomto typu práce za velký nedostatek.

K předložené práci mám následující připomínky/dotazy:

- 1) Proč byla vybrána pro studium právě *B. microti* a ne *B. divergens*, která je hlavním původcem lidské babesiózy v Evropě?
- 2) Jakým důvodem je fakt, že lidská babesióza se vyskytuje jen zřídka mimo evropský a americký kontinent?
- 3) Proč si myslíte, že když metoda nedetekovala žádnou expresi genu *ama-1* ve střevě v prvním dnu sání, tak že je velmi pravděpodobné (diskuse str. 46), že exprese genu *ama-1* přesto probíhala, ale v minimálním množství pod detekovatelnou hladinou metody? Pak by jakékoli negativní výsledky mohly být vysvětlovány dvojím způsobem, buď že je gen neexprimovaný nebo že se exprimuje, jen expresi neumíme zachytit.
- 4) Prosím o doplnění citace na straně 50 – informace týkající se CCp2 v proteomu sporozoitů *C. parvum*.
- 5) V magisterské práci by měli být podle mého názoru v referencích vypsáni všichni autoři citovaných publikací nejen první autor (plus et al.). Dále jsou některé časopisy uvedeny zkratkou a některé plným jménem. A pokud jsou plným jménem, jsou většinou chybně s malými písmeny na začátku slov ve jméně časopisu (kromě prvního slova).

Diplomovou práci Pavly Šnebergerové považuji za vynikající a vřele ji doporučuji k obhajobě s hodnocením výborně.

V Českých Budějovicích, 11. 5. 2019



RNDr. Ivan Fiala, Ph.D

Oponentský posudek na diplomovou práci Pavly Šnebergerové

Study of *Babesia microti* acquisition by ticks

Ve své diplomové práci se Pavla Šnebergerová zabývala studiem *Babesia microti*, jednobuněčného parazita se zoonotickým potenciálem, u BALB/c myši a u klíšťat druhu *Ixodes ricinus*. Ke studiu byl zvolen parazit, který se v mnoha vlastnostech liší od jiných skupin a druhů babesii, a to jak svým životním cyklem, tak morfologií i fylogenezí, což z něj činí zajímavý modelový organismus pro výzkum mechanismů vzniku a přenosu infekce. Jelikož se o dané problematice dosud mnoho neví, jedná se o poměrně aktuální téma.

Diplomová práce je stylisticky velmi dobře zpracována, je čtivá a přehledná. Práce čítá 55 stran včetně přehledu literatury. Úvod na 12 stranách je logicky strukturován a je pěkným vtažením do dané problematiky. Cíle práce jsou však na můj vkus uvedeny velmi stručně a chybí mi zde informace, proč byly jednotlivé kroky a celá práce vlastně provedeny. Čtenář se to dozví až na začátku diskuse, což je škoda. Dosažené výsledky na 19 stranách jsou srozumitelné a odpovídají stanoveným cílům. Diskuse na 6 stranách je velice zdařilá, poutavě napsaná, a opírá se o získané výsledky. Seznam použité literatury čítá 4 strany původních i zcela recentních publikací uvedené řádkováním 1. V práci velmi oceňuji obrázky, které jsou všechny velice kvalitní, názorné, a vždy jsou doprovázeny příslušnými odkazy v textu. Práce je po formální stránce v pořádku a je nadstandardně psána angličtinou na vysoké úrovni s minimem překlepů a nepřesností v terminologii. Jako příklad uvádím použití termínu „rose“ v souvislosti např. se zvýšenou expresí genu, kde by bylo vhodnější použít výraz „increased“, nejednotné užívání výrazu „time point“ či „timepoint“ (dle slovníku by se mělo psát dohromady), uvádění „*B. microti*-positive“ a „*B. microti*-negative“ bez pomlčky, „life cycle“ psaný dohromady, či absence určitého členu „the“ v mnoha případech.

Kromě výše uvedených drobných nepřesností, které jsou opravdu jen málo závažné, mám připomínku pouze k seznamu použité literatury (kapitola 7.). Jednotlivé citace by měly mít jednotný formát, konkrétně tím myslím uvádět všechny názvy časopisů buď celým názvem nebo platnou zkratkou (krásný příklad máte na straně 53: citace Hersh et al. 2012 – plný název časopisu; hned pod ním citace Herwaldt et al. 2003 – tentýž název časopisu zkratkou). Jelikož se jedná o diplomovou práci, považuji za vhodné uvedení všech (nebo alespoň prvních pěti) autorů dané publikace, a ne pouze jediného následovaného zkratkou „et al.“ Snižuje to jinak vysokou úroveň diplomové práce a budí ve mně dojem, že autorka se psaním práce vyčerpala, a na tuto kapitolu jí již nezbyly síly.

K práci mám následující dotazy:

1. V kapitole 1.1.2. uvádíte možné způsoby terapie babesiosy u lidí. Jak je tomu u zvířat? Existují nějaká léčiva, která lze použít k terapii babesiosy například u psů?
O vývoji vakcín proti babesiose se, pokud vím, mluví již mnoho let. Došlo v této problematice v současnosti k nějakému pokroku?
Na straně 4 v kapitole 1.1.2. uvádíte, že FDA v roce 2018 schválila testování dárců krve na přítomnost *Babesia microti*. Jak je to v současnosti s tímto testováním dárců v České republice?

2. V úvodu práce vysvětlujete zkratku AMA-1 (apical membrane antigen 1). Bylo by možné podobně vysvětlit i zkratku CCp2? Kolik ccp proteinů existuje? V průběhu diplomové práce se dozvídám, že minimálně dva (ccp2 a ccp3), přičemž u *B. microti* byl dosud popsán pouze ccp2.
3. V kapitole 3.7. uvádíte, že teplota annealingu byla pro všechny dvojice primerů 60 °C. Jednalo se o 12 dvojic primerů.(!) Je poměrně nepravděpodobné, že by teplota annealingu vyšla u tolika dvojic primerů, které amplifikují různé geny, jsou různě dlouhé a mají různý GC obsah, zcela shodně (a ještě poměrně vysoká). Jakým způsobem byl stanovován annealing pro jednotlivé dvojice primerů?
V práci postrádám informaci o PCR protokolech. Byly rovněž shodné pro všechny amplifikované geny a použité primery (tj. protokol uvedený v tabulce 2 na straně 18)? Rovněž chybí informace, z jakého zdroje/publikace byly PCR protokoly převzaty. Tabulka 3 uvádí pouze zdroje, ze kterých byly převzaty konkrétní primery, a to ještě ne všechny. Odkud jste získala například primery, u kterých je v posledním sloupci tabulky 3 pouze prázdné políčko?
4. Součástí práce bylo také potvrzení, zda si myši po infekci *B. microti* vytvářejí protektivní imunitu, tj. zda jsou rezistentní vůči reinfekci. Zjistila jste, že při infekci 30. den po primární infekci byl parazit po 14 dnech detekován ve 3 myších z 5. Nemohlo se jednat o reinfekci? Proč poté nebyly krevní nátěry sledovány i v dalších dnech? Máte v plánu se k tomuto výsledku vrátit a znovu ho otestovat, případně ho detailněji prozkoumat? Byla u infekcí 60. a 90. den po primární infekci také provedena kontrola po 14 dnech? Z obrázku 20 vyplývá, že patrně ano, ale v textu není právě tato poměrně důležitá informace nikde zmíněna.
5. Proč jste použili k barvení krevních nátěrů Diff-Quik? Nezkoušeli jste barvení nátěrů podle Giemsy, které – pokud je tedy Giemsovo barvivo čerstvé – je schopno lépe probarvit krevní nátěr a jednotlivé struktury v krevních buňkách? Jaký na to máte názor?
6. Zajímavé je zjištění přítomnosti *B. microti* ve slinných žlázách klíšťat již první den sání klíštěte, a časná exprese *ama-1*. Plánujete tento jev dále zkoumat?
7. Jak naložíte se získanými daty v budoucnu? Plánujete jejich publikaci?

Diplomovou práci Pavly Šnebergerové považuji za velice kvalitní, a vřele ji **doporučuji** k obhajobě s hodnocením výborně.

MVDr. Jana Kvičarová, Ph.D.

Kvičarová

V Českých Budějovicích, 14. května 2019