

Akademie věd České republiky Parazitologický ústav

Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

☎ +420 38 777 5467, fax: +420 385 310 388, www.paru.cas.cz, e-mail: ruzekd@paru.cas.cz

Vyjádření konzultanta k bakalářské diplomové práci Miroslava Fišera: „Experimentální infekce klíšťat a klíštěcích buněk virem klíšťové encefalitidy“.

Základním pilířem, na kterém Mirek při tvorbě bakalářské práce stavěl, se stala kandidátská disertační práce MUDr. Rudolfa Bendy z roku 1958. Je až zarážející, že od doby sepsání této práce bylo dosaženo při studiu této problematiky jen nepatrného pokroku. V současné době prakticky neexistuje pracoviště, které by se otázkami, které řešil Mirek, jakkoli systematicky zabývalo. Už z těchto důvodů pokládám Mirkovu práci za určitým způsobem průkopnickou, neboť měl odvahu se začít zaobírat tématy, která byla v minulosti intenzivně řešena, ovšem s nevalnými či málo průkaznými výsledky, a která byla následně experimentátory z těch či oněch důvodů opuštěna. Tato témata jsou však stále spojena s řadou nevyřešených otázek, otázek mimořádného významu. Jejich zodpovězení by nám mělo přinést nesmírně cenné informace, díky kterým by mohlo dojít k vyjasnění tajů spojených s cirkulací viru klíšťové encefalitidy v přírodě, jeho fenotypových proměn, důležitosti trasovariálního, transstadiálního, či sexuálního přenosu viru, nebo i stále do jisté míry kontroverzní záležitosti neviremického přenosu viru.

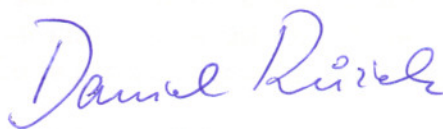
Mirek v první části své bakalářské práce předkládá podrobnou literární rešerši pojednávající o biologických a molekulárně-biologických vlastnostech viru klíšťové encefalitidy se zvláštním zřetelem na interakci viru s jeho vektorem. Posouzení odborné kvality literární rešerše nechávám na oponentech, přesto si zde neodpustím nezmínit jednu, podle mého názoru důležitou záležitost, u které bych byl rád, kdyby byla při posuzování práce brána v zřetel. Měl jsem možnost sledovat vznik Mirkovy bakalářské práce od jeho nesmělých prvních konceptů až po finální verzi. To, co zde chci zdůraznit, je skutečnost, že Mirek při psaní jeho bakalářské práce prošel nesmírným pokrokem, ať už se to týká formy vyjadřování a pravopisu, tak i práce s anglicky psanou odbornou literaturou či vědeckého kritického myšlení. A není právě toto smyslem psaní prací v nižším stupni vysokoškolského studia? Domnívám se, že to, co je pro začínajícího vědce nejdůležitější, není ani tak získání originálních experimentálních dat, jako spíše získání schopnosti se orientovat ve složité spleti vědecké literatury a vytvoření si jakéhosi vzoru kritického uvažování. V tomto směru, dle mého názoru, pobyt Mirka v naší laboratoři i vlastní proces sepisování nyní posuzované práce splnil svůj účel.

Experimentální část Mirkovy práce od počátku narážela na neočekávané problémy a komplikace. Vycházejíc z designu pokusu bylo potřeba infikovat virem klíšťové encefalitidy klíšťata *Ixodes ricinus* ve stadiu nymfy. Na první pohled se zdálo, že tento úkol, ačkoliv s jeho řešením nejsou na našem pracovišti žádné zkušenosti a literatura se takovou záležitostí zabývá jen nepatrně, by nemusel představovat nic složitějšího. Ovšem opak se stal pravdou. Pro infekci imág virem KE existuje řada osvědčených postupů. Některé simulují přirozený způsob nákazy (sání klíšťat na infikovaných myších), jiné jsou arteficiální (infekce sáním virové suspenze z kapiláry apod.). Jak je prezentováno v Mirkově práci, pokusil se využít pro infekci

nymf širokou paletu metod, včetně metody, která byla primárně vyvinuta pro infekci klíšťat spirochétami *Borrelia burgdorferi*. V tomto směru je Mirkova práce pro nás nesmírně cenná, neboť nám napomohla určit, jaké způsoby pro experimentální infekci klíšťat jsou více či méně vhodné. Rovněž se Mirkovi podařilo zjistit, a to bylo pro nás nemalým překvapením, že metoda plakové titrace viru popsána DeMadridem a Porterfieldem (1969) je zcela nevyhovující pro detekci viru v klíšťatech, neboť je v nich často přítomen takový titr viru, který je pod hranicí detekovatelnosti metody. V tomto směru Mirkovy výsledky vnáší určitým způsobem pochybnosti do prací publikovaných Labudou a spol. (1993), které jsou zaměřeny na tzv. „SAT efekt“. V tomto případě byla klíšťata vyšetřována na přítomnost viru ihned po nasátí metodou plakové titrace. Nestalo se i v tomto případě, že klíšťata, která byla pokládána za negativní obsahovala titr viru pod hranicí detekovatelnosti? Současně vyšetření klíštěte ihned po nasátí prokáže pouze to, že se klíště nasálo viremické krve, ale již nám neřekne nic o tom, zde se skutečně infikovalo. Pozoruhodné je, že i průkaz viru metodou RT-PCR dával sice pozitivní výsledky, ovšem i v tomto případě množství virové RNA v suspenzi klíšťat bylo na hranici detekovatelnosti. Z toho vyplývá, že pro detekci viru KE v klíšťatech je stále bezkonkurenčně nejvhodnější a nejcitlivější metodou inokulace suspenze klíštěte do mozku sajících myšek.

Některé z výsledků, které Mirek prezentuje ve své práci, mohou na čtenáře působit takovým dojmem, že jich bylo dosaženo jaksi metodou „pokus-omyl“. Toto zdání je do jisté míry oprávněné, neboť z různých důvodů nebylo možné některé z experimentů zopakovat. Jednak byl Mirek po celou dobu práce v naší laboratoři ve značné časové tísní, která byla způsobena dostupností dostatečného počtu klíšťat jen v určitých obdobích roku, nutností opakování pokusných infekcí klíšťat a v neposlední řadě dlouhým vývojovým cyklem klíšťat. Některá z Mirkových pozorování si zajisté zaslouží detailnější zkoumání. Mám na mysli např. pozorované rozdíly v titru viru (respektive pozitivitu a negativitu) v klíšťatech po sání na inbredních a outbredních myších. Těmto otázkám se zřejmě bude Mirek věnovat v budoucnu. Mirkova bakalářská práce, ačkoliv nepřináší originální výsledky, klade řadu nových otázek a v tomto směru ji vnímám jako přínosnou.

Co se týče Mirkovy samostatné laboratorní práce, domnívám se, že i v tomto směru bylo možno pozorovat znatelný pokrok. Mirek sice nepatří k těm studentům, kteří by si sami na základě studia literatury navrhli sérii experimentů, kterým by se následně samostatně věnovali. To však nic neubírá na tom, že se Mirek úspěšně seznámil s laboratorním režimem a se základními principy metodologie vědy. A v tomto směru vidím Mirkův pobyt v naší laboratoři jako úspěšný. Jako konzultant jsem tudíž s Mirkovou prací, navzdory drobným počátečním rozpakům, spokojen.



Mgr. Daniel Růžek, v.r.