

POSUDOK

na magisterskú diplomovú prácu

Bc. Pavly Sziewieczkovej: „Genetická variabilita spirochét druhového komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato pochádzajúcich z južných Čech: PCR-SSCP a PCR-RFLP analýza genového medzerníku s následujúci sekvenační confirmáci“.

Posudzovaná práca rieši aktuálnu problematiku rozšírenia a genetickej variability najvýznamnejšej kliešťami prenášanej zoonózy v Európe - lymfatickej boreliózy. Posudzovaná práca má rozsah 45 strán, je členená do dvanástich základných kapitol s viacerými podkapitolami, obsahuje 5 obrázkov, 6 tabuliek a 65 literárnych citácií.

Práca je napísaná jasným a zrozumiteľným odborným štýlom. Malé gramatické alebo štylistické nepresnosti, ktoré sa v texte vyskytujú, neznižujú autorkinu schopnosť presne a stručne definovať ciele vedeckej práce a prezentovať výsledky.

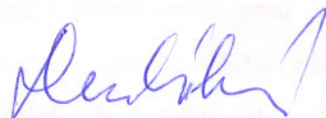
Témou práce je genetická variabilita spirochét druhového komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Pôvodca ochorenia, spirochéta z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato sa vyznačuje vysokým stupňom heterogenity, v rámci ktorého bolo doteraz určených 12 genospecies. Správny názov novo uznaného 12 genospecies je *Borrelia spielmanii*. Autorka používa v texte na niektorých miestach *B. spielmani* s jedným *i*. Preto navrhujem ujednotiť terminológiu. Medzidruhová aj vnútrodruhová variabilita borélií zohráva úlohu z hľadiska ekologického a má aj zásadný význam pri patogenite a klinických príznakoch ochorenia. Presná typizácia borélií a stanovenie stupňa polymorfizmu sú preto nevyhnutné nie len z hľadiska klinického, ale aj ako východisko pre ďalšie detailnejšie štúdie borélií. Autorka si pre štúdium epidemiológie lymfatickej boreliózy vybrala molekulové metódy, ktoré poskytujú veľmi presné informácie o diverzite borélií.

Cielom predkladanej práce je stanovenie miery genetickej variability *B. burgdorferi* s.l. v kliešťoch *Ixodes ricinus* s využitím metód analýzy DNA, konkrétne metód PCR-RFLP, PCR-SSCP a sekvenovania. Pre stanovenie miery genetickej variability bol zvolený medzerník medzi 5S a 23S podjednotkou génu pre ribozomálnu DNA. Podjednotky tohoto génu sa vyznačujú rôznym stupňom konzervatívnosti a sú preto vhodné pre štúdium variability aj fylogenetickú príbuznosť organizmov rôznych taxonomických úrovní. 5S-23S intergénový medzerník sa ukázal ako vhodný pre štúdium genetickej heterogenity medzi aj

v rámci jednotlivých genospecies *B. burgdorferi* s.l. Získané výsledky distribúcie jednotlivých genospecies a dominancia *B. afzelii* v oblasti Českých Budějovic sú v súlade s výsledkami získanými inými autormi. **Preto mám na autorku otázku, akí rezervoároví hostitelia sa môžu podieľať na cirkulácii borélií v danej oblasti a prečo?**

Ďalším z cieľov magisterskej práce bolo optimalizovať podmienky pre metódu PCR-SSCP a previesť analýzu materiálu z Českých Budějovic pomocou tejto metódy. Výhodou SSCP metódy bolo to, že umožnila stanoviť aj vnútrodrohové rozdiely v rámci jednotlivých genospecies. Navyiac autorka vo vzorkách pozitívnych na *B. burgdorferi* s.l. zisťovala metódou PCR aj prítomnosť ďalšieho kliešťami prenášaného patogéna *A. phagocytophilum*. Tieto výsledky poukazujú na možnú koinfekciu oboma patogénnymi u ľudí. Doporučovala by som však vyšetriť väčšie množstvo kliešťov, aby sa získal ucelený obraz o rozšírení *A. phagocytophilum* v danej oblasti.

Záverom konštatujem, že Bc. Pavla Sziewieczková predložila kvalitnú magisterskú prácu, ktorú hodnotím známku „**výborne.**“



MVDr. Markéta Derdaková, PhD.

Posudek na diplomovou práci: „Genetická variabilita spirochét druhového komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato pocházejících z jižních Čech: PCR – SSCP a PCR – RFLP analýza genového mezeru rrfA – RRIB s následující sekvenční konfirmací“ autorky Pavly Szewieczkové

Předložená diplomová práce se zabývá určením genetické variability spirochét komplexu *B. burgdorferi* sensu lato a to metodami RFLP a SSCP. Samotné determinaci variability předcházela identifikace pozitivních klišťat metodou PCR. Variabilita v rámci jednotlivých genospecies byla ověřena sekvenováním některých vzorků. Dovolím si stručně v bodech charakterizovat jednotlivé oddíly a vznést připomínky a dotazy.

Obsah:

velmi podrobný a pečlivě členěný. Důsledkem je dobrý přehled a rychlá orientace v práci. Oddíly 3 až 7 mohly být zařazeny jako podkapitoly úvodu (oddíl 2).

Cíle práce:

Jsou dobře, jasně a stručně definované v pěti bodech.

První cíl práce vytyčuje úkol monitorovat klišťata infikované boreliemi z lokalit v jižních Čechách molekulárně biologickými metodami. Vlastní práce se zabývá podle všeho jednou lokalitou – okolí Českých Budějovic. V případě, že by šlo o několik lokalit, chybí v metodice jejich počet a popis. Ve výsledcích pak by mohly být zmíněny rozdíly v zastoupení jednotlivých genospecies v závislosti na lokalitě atd.

Prosím upřesněte.

Obdobně, čtvrtý cíl vytyčuje studium vnitrodruhových rozdílů komplexu *B. burgdorferi* s.l. na dlouhodobě sledovaných lokalitách jižních Čech.

Úvod (úvodní kapitoly 2-7):

Jsou velmi podrobné a čtenáře dobře uvedou do dané problematiky. Kromě seznámení s vlastním studovaným objektem - komplexem *B. burgdorferi* s.l. a jím působené nemoci, LB - je zde dále věnován prostor přenašečům a dalšímu patogenu *Anaplasma phagocytophilum* přenášenému klišťaty. Ocenil jsem přehledný popis molekulárních metod používaných pro studium borelií.

Poznámky:

Vyšší taxonomické jednotky jsou psány kurzívou – kurzívou se píše pouze rodové a druhové názvy. Např. na straně 12 by měl být nadpis „*Anaplasma phagocytophilum*“ napsán kurzívou a čeled Anaplasmataceae a řád Rickettsiales normálním písmem – v práci je to přesně naopak. (Rickettsiales – dvě „t“ ve slově, ne jedno)

Citace by měly být jednotné. Na straně 6 je literatura citována třemi způsoby: Rosický a kol.; Steere et al.; Burgdorfer a ost.

Metody a materiál:

K metodám bych měl několik poznámek a dotazů:

Množství DNA pro PCR by mělo být uváděno v nanogramech a ne v mikrolitrech – může být různá koncentrace DNA ve vzorku.

Proč se používá speciální směs nukleotidů pro borelie (o různé konc.) v PCR diagnostice (str. 18)? Přičemž produkty stejného cílového genu pro RFLP a SSCP byly amplifikovány s nukleotidy o stejné konc.

Na str. 18 a 21 je záměna konc. primerů a dNTPs: je uvedeno, že byly použity pro PCR primery o konc. 10mM a dNTPs o konc. 10pmol. Pro PCR se standartně používají 10pmol primery a 10mM dNTPs. Na str. 19 je správně uvedeno 10mM dNTPs, ale opět špatná koncentrace primerů (10mM).

Proč byla použita teplota extenze 74°C (str. 18), když Taq polymeráza pracuje nejlíp při 72°C?

Na str. 20 je uvedeno, že pro optimalizaci podmínek SSCP byly použity primery 5SCB a 23SN2, přičemž na str. 18-19 je uvedeno, že pro SSCP a RFLP metodu byly použity produkty získané amplifikací s primery IGSa a IGSb. Prosím upřesnit.

Co se týče primerů uvedených v tabulce na str. 24 není zřejmé, který z dvojice je forward a který reverse. Pravděpodobně chybná velikost 222-255 bp pro PCR produkt získaný pomocí primerů IGSa a IGSb (má být 222-225 bp). Prosím o vysvětlení proč se používají tři různé dvojice primerů pro stejný úsek DNA u stejného organismu. V textu chybí literární zdroj, podle kterého byly tyto primery navrhnuty. Nemá být správná sekvence primeru 5SCB GAGAGTAAGGT... namísto uvedené sekvence GAGAGTAGGT... ?

V rámci optimalizace metody SSCP bylo použito různé množství amplifikované DNA a to 10μl, 15μl a 20μl. Přesnější by bylo uvést množství DNA v ng. Mikrolitry nevypovídají nic o množství DNA.

Precipitace PCR produktů byla pravděpodobně provedena za účelem zvýšení koncentrace PCR produktu pro sekvenační reakci. Bylo měřeno výsledné množství PCR produktu? Pro sekvenační reakci se doporučuje asi 150 – 300 ng. V případě ne příliš slabého bendu by byla precipitační fáze možná zbytečná.

Které programy z programového balíku DNASTar byly použity (str. 21)?

Poznámky a dotazy k oddílu **Výsledky**:

Bylo identifikováno 31 pozitivních klíšťat z celkového počtu 204 vyšetřených klíšťat. Pro určení genospecies a jejich variability bylo použito pouze vzorků 30. Není vysvětleno proč nebyl jeden vzorek analyzován. Není 204 vyšetřených klíšťat málo? Zejména vzhledem k nízkému počtu nalezených samců?

V textu na straně 26 jsou shrnuty výsledky RFLP analýzy. Tyto výsledky jsou také přehledně zaznamenány v tabulce na straně 29. V textu chybí odkaz na tuto tabulku, která se překvapivě objeví o až za výsledky SSCP analýzy.

Důležitá vlastní fotodokumentace restrikčního paternu na gelu v práci chybí. Restrikční patern z RFLP analýzy je součástí tabulky 4 na straně 32.

Výše zmíněná tabulka 4 porovnává mimo jiné získaný restriční patern s publikovanými paterny u jednotlivých genospecies. Publikovaný patern u *B. burgdorferi* s.s. je složen ze čtyř proužků, jejichž součet nedává celkovou délku mezerníku (225 bp), ale je pouze 189. Je-li citovaný restriční patern pro *B. burgdorferi* s.s. správně, pak získaný patern v diplomové práci neodpovídá *B. burgdorferi* s.s.

Výsledky SSCP analýzy jsou velmi stručné. Shrnutí pouze do dvou vět. Výsledky této analýzy mohly být rozšířeny o popis jednotlivých profilů – které proužky jsou jedinečné pro určitý profil. Usnadnila by se tím orientace ve dvou ne příliš kvalitních fotografiích gelů. Byl by určitě vysvětlen i rozdíl mezi profilem I a profilem L u *B. afzelii*. Tyto dva profily se na fotografii jeví totožné. Prosím o vysvětlení rozdílu těchto dvou paternů. Na fotografii dále chybí popis velikosti proužků u uvedeného 100 bp markeru.

Oddíl sekvenování je také velmi stručný. Není uvedeno kolik se osekvenovalo vzorků. Až v poslední kapitole závěr je uvedeno, že některé vzorky byly sekvenovány. Domnívám se, že pro otestování skutečné citlivosti metody SSCP musí být osekvenovány všechny vzorky. Tak bude moci být zjištěno, zda se pod stejným paternem nevyskytuje sekvence odlišná jen třeba v jedné substituci. Obr. 4 nepovažuji v práci za podstatný, nejlépe by bylo uvést alignment všech získaných sekvencí s vyznačením jednotlivých substitucí.

Výsledky jsou doplněny o studium rozšíření *A. phagocytophilum*. Přestože tato studie nebyla součástí vytyčených cílů, přináší bezpochyby užitečný výsledek. Je dokonce doplněna dokumentační fotografií diagnostické PCR, která na druhou stranu chybí u diagnostické PCR pro zjištění přítomnosti *B. burgdorferi*.

Diskuze:

První čtyři odstavce diskuze jsou spíše opakováním poznatků, které jsou shrnuty v úvodních kapitolách práce. Samotná diskuze začíná až pátým odstavcem. Zde už jsou správně diskutovány získané výsledky se srovnatelnými literárními údaji. Malou výhradu bych měl k uvedení tabulky 6, která nijak přímo nesouvisí s tématem diplomové práce.

Chtěl bych zdůraznit, že práce bezpochyby přispěla k obohacení velmi zajímavé a aktuální tematiky spojené s patogeny přenášenými klíšťaty. A přes vznesené připomínky práci doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích, 25. 5. 2006



RNDr. Ivan Fiala