

## Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Venduly Vetiškové

### „Porovnání metod detekce patogenů *Borrelia burgdorferi* s. l. a viru klíšťové encefalitidy v klíštěti *Ixodes ricinus*“

Vendula Vetišková předložila diplomovou práci řešící problematiku detekce dvou v evropském kontextu nejvýznamnějších klíšťat přenášených patogenů, konkrétně viru klíšťové encefalitidy a spirochety *Borrelia burgdorferi*. Hned na úvod musím konstatovat, že zvolené téma považuji za zásadní a velmi přínosné, a že je skoro škoda, že podobná studie nebyla provedena dříve.

Po formální stránce má předkládaná práce o rozsahu 91(!) stran všechny náležitosti diplomové práce. Cíle práce jsou formulovány jasně, literární rešerše dané problematiky zahrnuje celkem 25 stran vcelku srozumitelného textu, pojednávajícího nejen o klíšťatech a jimi přenášených patogenech, ale i zevrubně popisující nejmodernější postupy při extrakci nukleových kyselin a PCR detekci. Následuje pečlivě zpracovaná metodika, obsáhla výsledková část a devítistránková diskuze zakončená shrnutím. Práci uzavírá seznam použité literatury, čítající úctyhodných 191 původních pramenů a několik odkazů na manuály k použitým kitům.

Celkový dojem z předložené práce poněkud kazí zbytečné stylistické a gramatické chyby a překlepy, mj. chybějící interpunkce, záměna malých a velkých písmen, nejednotné formátování, špatné skloňování a další zřejmé pozůstatky „překopávání“ odstavců na poslední chvíli. Už název práce obsahující dvoje závorky nepůsobí opticky dobře. Některé formulace, např. v kapitole 3.1 „Klíště, vektor přenosu klinicky významných patogenů“, nezní příliš česky. Obrázky 9 a 10 jsou zcela totožné, fotografie gelů nejsou dobré kvality, na některých není ostrý ani marker. Doporučovala bych také zapracovat na vzhledu tabulek (nejednotný styl a velikost písma, jedna tabulka rozdělená na dvě stránky).

Na autorku mám následující dotazy a faktické připomínky:

- 1) Virus Langat uvádíte ve výčtu medicínsky významných virů. V čem spočívá význam viru Langat pro humánní medicínu?
- 2) V kap. 3.3 uvádíte celkový odhad případů onemocnění Lymeskou boreliózou na 255 tisíc ročně. Existují nějaká data o tom, jaký podíl z tohoto počtu představuje neuroborelióza, boreliová artritida, kožní manifestace či jiné projevy LB?
- 3) Kap. 4.2.: Proč byl homogenát připravován z klíšťat z přírodních sběrů? Uvažovala autorka možnost kontaminace? Byl homogenát předem vyšetřen na přítomnost VKE a borelií?
- 4) Kap. 4.4.: Jak byla stanovena koncentrace borelií v zásobním vzorku ( $10^8$ /ml)?
- 5) Z obr. 9/10 vyplývá, že účinnost q-PCR reakce byla pouze 88 %. Jak může být účinnost zvýšena?
- 6) Čím si autorka vysvětluje obecně vyšší citlivost real-time PCR oproti konvenční PCR?
- 7) Proč nebyla klíšťata na arteficiální infekci boreliemi krmena z kapiláry, ale inokulována do análního otvoru?

8) Kap. 6.6.: Domnívám se, že v rámci předcházení kontaminacím je třeba zejména prostorově oddělit přípravu PCR reakcí od veškeré manipulace s PCR produkty, tj. od cycleriů a elektroforetických van.

Přes uvedené připomínky považuji předloženou magisterskou práci Venduly Vetiškové za kvalitní, zejména díky širokému metodickému záběru a schopnosti autorky dobře a s nadhledem diskutovat získané výsledky. Práce plně vyhovuje požadavkům Přírodovědecké fakulty JU a **doporučuji** ji k obhajobě.

V Českých Budějovicích 12. ledna 2012



RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.

## POSUDOK NA DIPLOMOVÚ PRÁCU

### **Bc. Venduly Vetiškovej: Porovnaní metod detekce patogenů (*Borrelia burgdorferi* s.l. a viru klišťové encefalidity) v klišťeti (*Ixodes ricinus*)**

Predložená diplomová práca napísaná v českom jazyku má 91 strán a je členená do 7 kapitol: úvod, ciele práce, literárny prehľad, materiál a metódy, výsledky, diskusia a záverečné zhrnutie. V literárnom prehľade, pri popise metodických postupov, ako aj v diskusii využila autorka úctihodný počet literárnych prameňov – takmer 200. Musím zdôrazniť, že všetky citované práce úzko súvisia s témou diplomovej práce, z čoho vyplýva, že sa autorka v danej problematike dobre orientuje.

**AKTUÁLNOSŤ ZVOLENEJ TÉMY:** Diplomová práca rieši veľmi aktuálnu problematiku týkajúcu sa metód detekcie dvoch významných klišťami prenášaných patogénov: *Borrelia burgdorferi* s.l. a vírusu klišťovej encefalidity. V súčasnosti je dostupných mnoho metodických postupov ako aj komerčných kitov, preto je niekedy ťažké zvoliť ten najvhodnejší. Pozitívne hodnotím fakt, že autorka do svojej práce vybrala metodiky často používané v diagnostických laboratóriách, takže výsledky tejto práce iste významnou mierou prispejú k odstráneniu mnohých metodických problémov a chýb.

**POUŽITÉ METÓDY SPRACOVANIA** sú veľmi prehľadne rozpísané vo viacerých podkapitolách. Autorka popisuje jednotlivé metódy extrakcie nukleových kyselín borélií a vírusu. Oceňujem, že sa autorka zamerala aj na otestovanie kombinácie rôznych extrakčných metód. Pri samotnej detekcii vybraných patogénov popisuje dnes veľmi využívanú Real-time PCR, ako aj klasickú PCR metódu. Na detekciu jednotlivých genospecies borélií autorka zvolila metódu DNA-DNA hybridizácie – reverse line blot (RLB).

**DOSIAHNUTÉ VÝSLEDKY A VYHODNOTENIE NOVÝCH POZNATKOV:** Predkladanú prácu považujem za veľmi cennú, získané výsledky sú vhodným základom pre výber správnych metodických postupov na detekciu patogénov. V množstve publikovaných metodík a dostupných komerčných kitov (izolačných/purifikačných/PCR) je často problematické zvoliť optimálnu metodiku, čo prináša potom problémy aj pri samotnej diagnostike a interpretácii získaných výsledkov. Z použitých extrakčných kitov vyhodnotila autorka ako

najcitlivejší RNAGEM<sup>tm</sup> Tissue (ZyGEM). V súvislosti s týmto kitom sú v predloženej diplomovej práci uvedené veľmi zaujímavé výsledky. Napriek tomu, že je tento kit určený najmä na izoláciu RNA, potvrdila autorka vhodnosť tohoto kitu aj na simultánnu izoláciu RNA a DNA.

Autorka ďalej v práci popisuje viaceré faktory ovplyvňujúce citlivosť detekcie patogénov, z ktorých sú závažné najmä rozdielne výsledky získané pri PCR reakciách prebiehajúcich v rozdielnych PCR termocykléroch, výber optimálneho počtu amplifikačných cyklov, ako aj vizualizácia PCR produktov v géli.

Celková kvalita formálneho spracovania diplomovej práce je na vysokej úrovni. Preklepy sa v práci vyskytujú iba ojedinele, literárne zdroje sú citované jednotne. V zozname literatúry však chýbajú niektoré práce citované v texte, čo sa však pri takom veľkom množstve citovaných prác stáva a nepovažujem to za veľkú chybu.

K práci mám niekoľko pripomienok a otázok:

1. Strana 2, kapitola 3 Literární přehled: Pri systematickom začlenení kliešťov mi chýba citácia práce, z ktorej autorka čerpala.
2. V celej práci mi chýbajú k latinským názvom kliešťov autori a roky pomenovania druhov (napr. *I. scapularis* Say, 1821).
3. Str. 14, kapitola 3.3.4 Přenos spirochéty *Borrelia burgdorferi*: V súvislosti s asociáciou genospecies borélií cituje autorka k tzv. hlodavčím genospecies aj prácu Poupon et al. 2006, ktorá je zameraná na vtáacie genospecies borélií. K plchom ako rezervoárom *B. spielmanii* chýba citácia (Richter et al. 2004). K asociácii *Borrelia lusitaniae* s jaštericami mohla autorka citovať napr. prácu Majláthovej a kol. z roku 2006.
4. Na strane 26 (kapitola 3.5.4 Detekce patogenů v klíšťatech) popisuje autorka prítomnosť infikovaných kliešťov v mestách (parkoch). Má autorka prehľad o súčasnom výskyte kliešťov v urbánnych oblastiach? Predstavujú kliešte v týchto oblastiach v súvislosti s kliešťami prenášanými patogénmi reálnu hrozbu pre ľudí?
5. Strana 29, kapitola 4.5.2 Extrakce pomocí hydroxidu amonného: Môže autorka vysvetliť, prečo je potrebné po 15 minútovej inkubácii vzorky ochladiť na izbovú teplotu? Je tento krok potrebný k úspešnej izolácii?

6. Str. 40, kapitola 4.7 Reverse line blotting (RLB): Autorka v tejto kapitole uvádza, že na testovanie citlivosti tejto metódy použila *B. burgdorferi* sensu stricto, kmeň B31. Za akým účelom boli na membránu nanosené aj sondy ďalších genospecies (Tab. 6)?
7. V texte chýbajú odvolávky na niektoré obrázky (Obr. 9 a 10), niektoré tabuľky sú v texte označené nesprávnymi číslami (napr. na str. 52 má byť namiesto Tab 6 uvedená Tab 8).
8. Str. 64, kapitola 5.3 Další faktory ovlivňující citlivost detekce patogenů ve vzorku: Prečo považuje autorka za problém dimery primerov vznikajúce počas PCR reakcie? Ovplyňuje ich prítomnosť výsledok PCR reakcie?

CELKOVÉ ZHODNOTENIE: Predložená dizertačná práca dokazuje schopnosť autorky samostatne a na výbornej úrovni riešiť problematiku dôležitú ako z teoretického, tak aj praktického hľadiska veterinárnej a humánnej parazitológie. Výsledky práce sú originálne a práca je výborná aj po formálnej stránke.

Záverom konštatujem, že Bc. Vendula Vetišková splnila všetky stanovené ciele práce a predložila diplomovú prácu vysokých odborných kvalít, preto ju odporúčam prijať k obhajobe a hodnotím ju známku: 1.

V Bratislave, dňa 16. 1. 2012



.....  
Mgr. Veronika Tarageľová, PhD.

Ústav zoológie SAV, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava