

Oponentský posudek bakalářské diplomové práce

Autorka: Nelly Keplová

Název: Analýza infekčního potenciálu nově popsaných druhů borelie z komplexu *B. burgdorferi* sensu lato, *B. americana* a *B. carolinensis* na laboratorním modelu infikovaných zvířat.

Školitelka: Maryna Golovchenko, MSc

Vedoucí práce: Nataliia Rudenko, PhD

Fakultní garant: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

Oponentský posudek vypracoval: RNDr. Radek Šíma, PhD., Parazitologický ústav BC AVČR, České Budějovice

Bakalářská diplomová práce Nelly Keplové se zabývá zajímavým tématem charakterizace infekčního potenciálu nově popsaných druhů borrelií a navazuje tak na stěžejní téma školící laboratoře, kterým je právě popis nových druhů borrelií. Bakalářská práce má 39 stran a dle zvyklostí je členěna na úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuzi, závěr, seznam použitých zkratk a seznam literatury. Rozsah a vzájemný poměr jednotlivých částí je přiměřený a odpovídající nárokům na bakalářské diplomové práce na Přírodovědecké fakultě JU.

Úvod čítá 8 stran textu, autorka se v něm věnuje taxonomickému zařazení a morfologickému popisu borrelií, dále se celkem podrobně věnuje popisu patogenního potenciálu jednotlivých druhů borrelií. Oceňuji, že se autorka nezaměřila pouze na obecně známé druhy borrelií způsobující Lymeskou borreliózu, ale zpracovala rovněž dostupné informace o infekčním potenciálu méně známých druhů borrelií. Celý úvod má logickou strukturu a dostatečně seznamuje čtenáře s řešenou problematikou. Kromě obecných připomínek týkajících se celé práce, kterým se budu věnovat na závěr, nemám k této části zásadní výhrady. Vytknul bych pouze použití nepůvodních zdrojů informací. Např. hojně citované publikace "Křupka a kolektiv" a "Bednář a kolektiv" zcela jistě nejsou původními pracemi přinášejícími citované informace.

Cíle práce jsou stručné, jasně definované a konkrétní.

Kapitola **Materiál a metody** je sepsaná na 9 stranách, je přehledně členěná, jednotlivé metody jsou vysvětleny dostatečným způsobem. K této kapitole bych měl následující připomínky a dotazy:

1. V tabulce I. na str. 10. je ve složení mastermixu pro real-time PCR uvedeno kromě SYBR green I ještě "barvivo". Co přesně je tím myšleno? (**prosím o komentář při obhajobě**)
2. Není mi jasný smysl obrázků 3-5 v kapitole Materiál a metody. V textu na ně není žádný odkaz a popisky obrázků jsou nedostatečné. Bylo by lepší tyto obrázky neukazovat vůbec, nebo je s patřičným komentářem zařadit do kapitoly Výsledky.

Výsledky předložené bakalářské práce jsou shrnuty na 12 stranách, včetně 8 obrázků a 9 tabulek. Tato kapitola je dle mého názoru nejslabším článkem celé práce. Text výsledků je poměrně nepřehledný a hůře se v něm orientuje. Rovněž mám výhrady k provedení a prezentaci výsledků některých experimentů.

- V kapitole "Optimalizace podmínek kultivace spirochét" (str. 19) autorka prezentuje svá zjištění týkající se vhodnosti tří typů kultivačních médií pro růst různých druhů borrelií. Není mi jasné na základě jakých kritérií došla autorka k prezentovaným závěrům. Výsledky by měly být podpořeny konkrétními daty (např. růstové křivky). Takto to vypadá, že se jedná pouze o subjektivní hodnocení. (**prosím o komentář při obhajobě**)

- Další výhrady se týkají obrázků 6, 10 a 11, které mají prokazovat přítomnost genů důležitých pro rozvoj infekce v hostiteli. Velikost PCR produktů na gelu neodpovídá předpokládaným velikostem. Např. fragment genu *adeC* má mít velikost 496 bází, jeho skutečná velikost na obrázku 6 je ale výrazně větší (asi 600 bází), na obrázku 10 je jeho velikost dokonce kolem 800 bází. Fragment genu

pncA má mít velikost 243 bazí, ale jeho velikost na obrázku 10 je kolem 400 bazí. Stejně tak na obrázku 11, kde na první pohled velikostně neodpovídá ani pozitivní kontrola a tudíž nepůsobí příliš specificky. Byla ověřována specifita těchto PCR produktů sekvenačně? **(prosím o komentář při obhajobě)**

- Obrázek 6 je složený z několika fotografií gelů, což nepůsobí příliš věrohodně. Část obrázku zobrazující fragment genu *vlsE* je nápadně zvětšená a posunutá oproti zbytku fotografie, což může vyvolávat dojem, že bylo s fotografií účelově manipulováno, aby prezentovaný fragment odpovídal očekávané velikosti. Opět by mě zajímalo, zda byla specifita PCR produktu ověřena sekvenačně. **(prosím o komentář při obhajobě)**

- V experimentech prokazujících přítomnost borrelií ve tkáních myši jsou biopsie uší z prvního a druhého týdne vyšetřeny pomocí jiných primerů, než tkáně ze třetího a čtvrtého týdne, což je celkem nestandardní postup. Prosím o komentář proč nebyla použita jedna metoda pro všechny tkáně?

- Na straně 22 a 23 autorka uvádí, že borrelie byly v myších prokazatelné až ve čtvrtém týdnu po subkutánní injekci borrelií, což je poměrně překvapující. Podle literatury a zkušeností z naší laboratoře bývají borrelie v myších detekovatelné nejpozději ve druhém týdnu po injekci. Nemůže to souviset s předchozím bodem a nižší záchytností použitých primerů? Byla prováděna kontrola izolované DNA a vyloučena případná chyba při izolaci? **(prosím o komentář při obhajobě)**

- Legendy obrázků a tabulek nejsou dostatečně podrobné (měly by konkrétně vysvětlovat co čtenář na obrázku vidí).

- Obrázek 9 nic neříká.

- V kapitole 4.4.5. Real time PCR nejsou žádné informace, tudíž je zbytečná, včetně obrázku 13.

Diskuzi jsou věnovány celkem 3 strany textu. Autorka porovnává získaná data s výsledky pocházejícími ze školící laboratoře a zřejmě také s literárními údaji. Ty zde ale většinou nejsou uvedené, což je jediná závažnější připomínka k této kapitole. V celé diskuzi jsem napočítal pouze 4 odkazy na literaturu.

V **Seznamu literatury** chybí práce Hořejší V. 2009.

K diplomové práci bych měl ještě několik obecných připomínek:

Předloženou bakalářskou práci bohužel sráží nízká úroveň českého jazyka, věty mají poněkud kostrbatou stavbu a někdy je obtížné textu porozumět. Dále se zde vyskytuje celá řada pravopisných chyb a překlepů, někdy i celkem úsměvných. Např. plazmid x plastid (str. 6), komplement x kompliment (str. 17), hlodavec x hladovec (str. 26) a Šíma x Šimek (str. 20). Práce působí spíše jako první verze textu, než jako finální diplomová práce.

Závěrečné hodnocení: Předloženou bakalářskou práci doporučuji i přes její nedostatky k obhajobě. Je zřejmé, že se autorka během bakalářského studia seznámila s celou řadou laboratorních technik, což může být dobrým vkladem do další práce. Do budoucna bude ale nutné zapracovat na provedení experimentů a především na jejich písemné prezentaci.

Otázky oponenta:

1. Na straně 1. autorka uvádí, že borrelie jsou přenášeny tvrdými klíšťaty. Některé druhy borrelií jsou ale přenášeny také např. měkkými klíšťaty, roztoči, nebo hmyzem. Můžete uvést nějaké příklady?
2. Jaká kritéria musí splnit nový izolát borrelií, aby mohl být uznán za nový druh?
3. Autorka použila k injekci borreliemi kromě myši také pískomily. Proč byl vybrán zrovna pískomil?
4. V textu jsou hojně zaměňovány výrazy plazmid a plastid. Můžete vysvětlit, jaký je mezi nimi rozdíl?
5. Na straně 8. mě zaujala zmínka, že *B. carolinensis* byla izolována ze samce klíštěte *I. minor* krmícího se na hlodavci. Je pravda, že u *I. minor* sají i samci?

V Českých Budějovicích 22.5.2014

Radek Šíma

