



RNDr. Veronika Urbanová, Ph.D.
Biologické centrum AV ČR, v.v.i.
Parazitologický ústav
Branišovská 31
370 05 České Budějovice

Oponentský posudek na bakalářskou práci Jakuba Opelky

„Detekce perzistentních borelií *Borrelia burgdorferi* sensu lato ve tkáních savců přeléčených antibiotiky“

V práci autor řeší problematiku vlivu antibiotické léčby na životaschopnost borelií a následně jimi způsobenou infekci u myši a člověka. Autor si během práce osvojil imunohistochemické metody, základní PCR metody a práci s laboratorními zvířaty.

Práce je přehledná, s minimem překlepů. Má 40 stran a je členěna do několika kapitol (Úvod, Cíle práce, Materiál a metody, Výsledky, Diskuze, Závěr, Seznam zkratk, Literatura a Přílohy). Úvod je poměrně rozsáhlý, přehledně uvádí čtenáře do řešené problematiky. Vytyčené cíle práce jsou splněny. Kapitola Materiál a metody je přehledně napsaná. Získané výsledky autor úspěšně sepsal, doplnil obrazovou dokumentací a nakonec dosažené výsledky diskutuje s několika literárními zdroji.

U jednotlivých kapitol mám tyto připomínky a otázky:

V Úvodu v podkapitole 1.2.2 je na obrázku 2 znázorněna cystická forma borelie? Jak bylo dosaženo přechodu borelie ze spirální formy do cystické?

V Materiálu a metodách v podkapitole 3.2 na straně 10 autor píše, že myši byly infikovány subkutánně. Předpokládám, že jde o překlep a bylo myšleno subkutánně? Jakým způsobem byly myši podrobeny antibiotické léčbě?

Ke kapitole Výsledky mám několik dotazů.

- 1) Na obrázku 9 je zobrazena detekce borelií pomocí protilátek v kultuře přeléčené antibiotiky. Pod jakým mikroskopem byly pořízeny fotografie a jsou tyto fotografie pořízeny pod stejným objektivem, případně při stejném zoomu? Na obrázku a, c, i je jinak velké měřítko než na obrázku e, g? A v insertním sloupci h je rovněž jinak velké měřítko, než v insertních sloupcích b, d, f. Proč jsou zobrazená měřítka různě dlouhá?
- 2) Na obrázku 10 je fotka gelu z PCR detekce genu *flagB*. Čím byla vizualizována DNA? V diplomové práci to není zmíněno. Proč mají jednotlivé produkty *flagB* z různých tkání jinou velikost, pokud se tedy jedná o jeden produkt (*flagB*). V kapitole metody je uvedeno, že výsledný produkt *flagB* by měl mít velikost 497 bp. Na fotce jsou některé výsledné produkty téměř o 100 bp větší. Čím si to vysvětlujete?
- 3) Na obrázku 11 jsou zobrazeny perzistentní formy borelie v močovém měchýři a kloubu myši infikovaných boreliemi s následným přelčením antibiotiky. Bylo provedeno imunoznačení borelií na vzorcích negativních myši, aby se vyloučila nespecifita vazby protilátky na nějaké jiné útvary? A naopak bylo provedeno značení borelií ve tkáních pozitivních neléčených myši? Má autor nějaké doplňující kontrolní fotky? Dále by mě zajímalo, z kolika infikovaných

a přeléčených myši byly připraveny imunohistochemické vzorky a v kolika z nich byly nalezeny perzistentní formy borélií?

- 4) V kapitole 4.3 je ukázána detekce DNA borélií v mozku člověka. Na obrázku 12 (fotka gelu) mi chybí negativní kontrola. Může ji autor ukázat? Co bylo použito jako pozitivní kontrola? Pozitivní kontrola pro *flagB* není moc reprezentativní. Proč jsou výsledné produkty *flagB* na gelu jiné velikosti než na obrázku 10? Gen pro *ospC* je u jednotlivých druhů borélií poměrně variabilní. Skutečně bylo možné použitými primery zachytit různé druhy borélií?
- 5) Dále je v textu a na obrázku 14 zmíněno, že není možná detekce borélií pomocí fluorescenčně značené sekundární protilátky Alexa 488 v mozku, kvůli autofluorescenci mozkové tkáně. Zkoušeli jste jinou sekundární protilátku s emisním spektrem, např. v červené oblasti? Byla zde také autofluorescence mozku nebo proč jste se rozhodli pro použití sekundární protilátky značené enzymaticky křenovou peroxidázou?
Na obrázku 16 je ukázána detekce borélií v týlním laloku lidského mozku. Byla provedena nějaká kontrola, že se nemůže jednat o nespecifické značení? Např. značení mozkové tkáně u neinfikovaného člověka?

V diskuzi autor porovnává dosažené výsledky s několika jinými studiemi. Zde mám ještě jeden dotaz. Zmiňujete zde, že kultura ošetřená antibiotiky zůstává pravděpodobně životaschopná. Nezkoušeli jste takto antibiotiky ošetřenou kulturu nakazit myši, aby jste prokázali, zda kultura je skutečně životaschopná? Nebo kulturu stočit, promýt od antibiotik a přenést do čerstvého média a sledovat, zda dojde k namnožení borélií?

Závěrem:

Autor zvládl poměrně dobře metody mikroskopických technik včetně imunolokalizací a naučil se rovněž základní PCR metody. Některé výsledky jsou díky chybějícím kontrolám z mého pohledu diskutabilní. Ale z vlastní zkušenosti vím, jak je velice těžké prokázat přítomnost borélií pomocí mikroskopie a proto si dovedu představit, že za dosaženými výsledky se může skrývat mnohem více práce, než je v bakalářské práci uvedeno.

Přes všechny připomínky jsem přesvědčena, že předložená práce splňuje nároky Přírodovědecké fakulty JU na bakalářskou práci, proto ji doporučuji k obhajobě, jako jeden z předpokladů udělení titulu Bc.

V Českých Budějovicích 17. 5. 2021



Veronika Urbanová