



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

POSUDEK OPONENTA NA BAKALÁŘSKOU/DIPLOMOVOU* PRÁCI

Autor práce: Bc. Veronika Morávková

Název práce: Analysis of genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Borrelia miyamotoi* across Central and Eastern Europe using multilocus sequence typing (MLST) in range of Slovakia and data from the MLST database with focus on Central and Eastern Europe

Školitel práce: MVDr. Girma Belay, CSc.

Oponent práce: RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.

Pracoviště opONENTA: PŘF JU

	Bodový rozsah hodnocení ¹	Body
(1) FORMÁLNÍ POŽADAVKY		
Celkový rozsah práce (pro bakalářské práce min. 18 stran, pro diplomové práce min. 25 stran), vyváženost rozsahů jednotlivých částí, logická struktura práce (u experimentálních prací doporučení pro teoretickou část do 1/3 celkového rozsahu)	0-3	1
Kvalita literární rešerše (počet použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru, aktuálnost zdrojů)	0-3	2
Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	0-3	2
Grafická úprava textu a obrázků	0-3	2
Úroveň souhrnu/anotace (i v angličtině)	0-3	2
Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	0-3	1
Správnost a úplnost popisů u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	0-3	1
Formální požadavky – body celkem		11
(2) VĚCNÉ POŽADAVKY		
Splnění cílů práce	0-3	2
Schopnost porozumět výsledkům, jejich interpretace a jasný popis, srozumitelnost diskuze a závěrů	0-3	1

* Nehodící se škrtněte

¹ Bodový rozsah hodnocení: 0-nevyhovující, 1-vyhovující, 2-průměrné, 3-excelentní. U teoretických prací hodnotíte jenom (1) Formální požadavky, u experimentálních prací i (2) Věcné požadavky a u prací v cizím jazyce i (3) Jazykovou úroveň práce v cizím jazyce.

Úroveň diskuse – interpretace výsledků, zařazení do kontextu v literatuře (absence diskuse výsledků s literaturou je nepřijatelná)	0-3	2
Logika postupu při vlastní výzkumné práci	0-3	3
Úplnost popisu použitých metodik	0-3	1
Experimentální náročnost práce, samostatnost při práci	0-3	1
Úroveň zpracování experimentálních dat	0-3	2
Aktuálnost použitých metod	0-3	3
Přínos práce pro obor a publikovatelnost výsledků (po případném doplnění)	0-3	2
Věcné požadavky u experimentálních prací – body celkem		17
(3) PRÁCE V CIZÍM JAZYCE		
Jazyková a stylistická úroveň	0-3	1.5
CELKEM BODŮ (MAX/ZÍSKANÝCH)	51²	28.5³

Komentář oponenta:

Ve své magisterské práci Bc. Morávková studovala genetickou variabilitu borelií ve vzorcích klíšťat ze čtyř/pěti míst na Slovensku doplněných o údaje z MLST databáze. Práce je to zajímavá, ale také obsahuje nedostatky, které z velké části souvisí se dvěma aspekty této práce – neobvyklá délka (128 stran bez dodatků a bez doplňkových informací) a volba anglického jazyka. U studentských prací obvykle platí jednoduché pravidlo – čím víc stran, tím víc chyb, což platí i v tomto případě a volba anglického jazyka počet chyb ještě zvýšila (viz samotný název ... using multilocus sequence typing (MLST) in range of Slovakia ...; popř. „... middle (and Eastern) Europe; vynechaná slova jako např. The ability to establish infection of a motile wild-type FlaB with a flat-wave morphology ...; asi špatně pochopený zdroj jako např. str 19: Molecular detection of *Borrelia* from blood of patients may be diagnosed by collecting (whole-EDTA) blood samples ... ; těch chyb je ale velké množství). Je trochu nepochopitelné, proč je tato práce takto obsáhlá, v mnoha případech bylo rozsah možné zkrátit, viz příklady níže.

Velkým nedostatkem je to, že studentka důsledně nenaplněovala cíle práce, především co se týče 3. cíle a sledování asociací mezi typy sekvencí a příznaky Lymské nemoci. Jeden z výsledků práce, sekvence submitovány do NCBI (tab. XVX), není možné ověřit.

Připomínky a dotazy, na které má student/-ka reagovat při obhajobě. Chyby, na které si má dávat student v budoucnu pozor:

Studentka z nepochopitelných důvodů sepsala extrémně rozsáhlou práci, což se sebou nese riziko velmi velkého počtu chyb – tato práce je ukázkou toho, že toto riziko je reálné. Do budoucna doporučuji studentce velmi velkou rozvahu v tom, které údaje zahrne do své práce. Součástí vědecké práce je i schopnost rozlišit relevantní údaje. Níže uvádím příklady některých chyb, kterých by se studentka měla vyvarovat. **Trochu s podivem je, že na tyto chyby, ale i na další, které se**

² Vyberte jednu z hodnot: 48 bodů pro experimentální práce, 51 bodů pro experimentální práce v cizím jazyce

³ Zadejte počet přidělených bodů.

vyskytují v předložené práci, jsem již upozorňoval v posudku před několika lety.

- V práci se objevuje spousta zkratk, z nepochopitelného důvodu dokonce některé, které jsou synonymem (LD anebo LB a k tomu ještě LG; RF anebo RFG; REP anebo REPG). Zavedení zkratk by mělo pomoci čtenáři, a ne vnášet zmatek. Kromě toho pak mohou vznikat zajímavé věty jako například *There were two SGs of STs of the USA, 3 SGs of STs of Japan, and one SG consisting of ...* Současně se některé zkratky objevují bez toho, aby byly zavedené (např. PCR, str. 2) anebo dvakrát (např. LNB, str. 1 a 14).
- Rodový název se obvykle po prvním použití zkracuje. Kromě toho je potřebná vhodná úprava textu včetně kontroly toho, aby rodový název (anebo zkratka) nezůstal „viset“ na konci řádku – čili je potřebné v takovém případě použít pevnou mezeru.
- V práci je citováno obrovské množství literatury, takovýto počet se spíše objevuje v rešeršních typech prací. V tomto případě bylo možné mnoho z citovaných zdrojů vypustit, čímž by se práce zkrátila. Současně se v seznamu literatury objevují běžné chyby – některé názvy článků jsou psané kapitálkami, naopak některé názvy časopisů kapitálkami psané nejsou.
- V anglicky psaných odborných pracích se obvykle používá tzv. Oxford comma, nezávisle na použití britské, americké anebo jiné angličtiny. Pokud ji používáme, tak ji máme používat v celém textu.
- V textu se objevuje mnoho případů zbytečného prodlužování textu (což se může stát, ale v takto obsáhlé práci se toho autorka měla vyvarovat):
 - o Zbytečné opakování té samé informace, která se vyskytuje dokonce jen o tři řádky výše (např. str.4), popř. popisování toho samého jinými slovy (např. str. 4-5)
 - o Zbytečný odstavec o návrhu na oddělení LG a RFG na *Borrelia* a *Borrelia*, kdy v tom samém odstavci bude tento návrh zamítnut – pro tuto práci nerelevantní
 - o Zbytečné volné řádky – např. na str. 8
 - o Zbytečně podrobný popis PHYLOVi 2 str. 29-31
 - o Zbytečné velké písmo, především v přílohách
 - o Zbytečné rozdělení tabulek (např. Tab. XII a XIV.)
 - o Zbytečný popis postupu izolace pomocí komerčního kitu (str. 48)
- Obrázek by se měl vyskytovat poblíž místa, kde je zmiňován – Fig. 1 je zmiňován na straně 8, ukázán je ale na straně 10. Současně u tohoto obrázku by měl být vysvětlen životní cyklus klíštěte a jeho souvis s přenosem borelií, borelie v popisku ani na obrázku uvedené ale nejsou
- V některých problémech problémy s počty, např. str. 12: ... are divided into three categories. Those are factors related to: climatic changes, distribution of tick hosts (mainly cervids), anthropogenic-induced changes, and other ecological changes; str. 14: From five genospecies of *Borrelia burgdorferi* s.l. known to cause LB in Europe (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii*, and *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s)) ...
- Pozor na různé nesmyslné věty, např. str 29 In case of *B. valaisiana*, two new genospecies were delineated by MLSA, namely, *B. californiensis*, and *B. yangtze* (Margos et al. 2015b; Postic et al .2007).
- Fig. 8 je slabě čitelný.

Dále uvádím otázky, které by studentka měla zodpovědět. Vzhledem k jejich počtu by v průběhu obhajoby měla zodpovědět otázky vyznačené tučně, n ostatní může zaslat odpovědi předem e-mailem a pokud budou odpovědi v pořádku, tak se při obhajobě nemusí číst:

1) Kolik genů je analyzováno při MLST analýzách (obecně)?

- 2) Na str. 4 uvádíte 22 genospecies patřících do komplexu *Borrelia burgdorferi* s.l., v App. 1 jich uvádíte 23. Které číslo je správně?
- 3) Str. 7, používáte zkratku kb. Je v tomto kontextu správná a co znamená?
- 4) Str. 8 „Adults are able to mate on or off host as the bloodmeal is not required to achieve the gonotrophic cycle“; str. 9 „Nonetheless, large mammals such as deer are essential for maintenance of tick population due to the fact that adult ticks mate on the vertebrates“. Můžete vysvětlit?
- 5) Str. 9 „owing to the fact that the size of nymphs causes difficult and almost impossible detection on the skin“ – můžete vysvětlit?
- 6) Str. 12: The results showed increasing prevalence of infected adults and nymphal ticks from west to the east of Europe (Rauter & Hartung 2005; Strnad et al. 2017). The geographical trend is considered to be associated with the high prevalence of ixodid ticks in Central Europe. Můžete vysvětlit?
- 7) Můžete sjednotit popis toho, které genospecies z komplexu *B. burgdorferi* s.l. jsou lidskými patogeny? V práci se uvádějí různé informace.
- 8) **Str. 14-15: *B. valaisiana* is considered to be unlikely human pathogenic, as the prevalence of the genospecies is highly frequent in *I. ricinus* ticks, known to bite humans – můžete vysvětlit?**
- 9) **Mohla byste popsat gen rRNA, který se nachází v rrfA-rrlB 5S-23S mezigenovém mezerníku? (dle popisu na str. 20)**
- 10) Mohla byste vysvětlit? str. 23: The approach requires an analysis of single point mutations of the sequences, since the single base difference represents a new allele. Therefore, the housekeeping loci need to be sequenced in both forward and reverse directions.
- 11) Fig. 3C – věděla byste uvést, co může způsobit takovýto výsledek? Co je příčinou?
- 12) Mohla byste vysvětlit? Str. 27: The comparative analysis of *B. afzelii* (the predominant genospecies in Europe) and *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.) (located in Europe and the USA) revealed an overlap of clinical samples of the genospecies among Europe and the USA. Nonetheless, there was no overlap of the populations isolated from ticks.
- 13) Co znamená zkratka n.d. u SW? (např. str. 29 PubMLST, n.d.)
- 14) **Kdo sbíral klíšťata pro tuto práci?**
- 15) Proč byla pro izolaci DNA použita alkalická hydrolýza, když ve vícero studiích bylo ukázáno, že izolace pomocí komerčních kolonkových kitů je vhodnější? Jaký objem 1,2% hydroxidu amonného byl použit? Jakým způsobem probíhala homogenizace?
- 16) **Probíhalo stanovení koncentrace izolované DNA popř. RNA?**
- 17) **Str. 35, primery v Tab. II – u těchto primerů je citována práce Black & Roehrdanz, 1998, v této práci jsem ale tyto sekvence nenašel. Proč byly vybrány tyto sekvence primerů?**
- 18) Proč jste v práci používala tolik různých fluorescenčních barviv pro značení nukleových kyselin? Proč ne pouze jednu?
- 19) Proč byl na analýzu dat použit QPweb a ne nějaký statistický SW?
- 20) **Při analýze byly postupně vyřazovány vzorky kvůli neúspěšné amplifikaci v PCR, popř. vzorky s koinfekcí. Co mohlo být důvodem neúspěšné amplifikace, jak se tomu dalo předejít a co to znamená vyřazení těchto vzorků z hlediska celkové analýzy a využitelnosti výsledků?**
- 21) Str. 48 – proč bylo 5 ul vzorku smícháno s 2 ul 6x loading dye.
- 22) **Jak byly připravené reakce pro Sangerovo sekvenování?**
- 23) **Fylogenetické analýzy MLST dat – jak byly vybrány informace/vzorky z MLST databáze, zařazené do fylogenetické analýzy, podle jakých kritérií? V textu je vícekrát zmíněno,**

že v databázích je málo vzorků *B. miyamotoi* (např. str. 79) a proto byly do analýz zahrnuty všechny, to ale není pravda. Proč nebyly zahrnuty všechny?

24) Počty v Tab XVIII. a přílohách (např. App. 6) neodpovídají. Proč?

25) Str. 59: The first parameter was the presence of individual genes ... Můžete vysvětlit?

26) V práci je ukázána jediná fotka agarózového gelu. Můžete v průběhu obhajoby ukázat další fotky z agarózové elektroforézy?

27) Sekvenovány byly PCR produkty z amplifikace osmi genů u 24 vzorků. Proč je 24 a jak byly tyto vzorky vybrány?

28) Fylogenetické analýzy trvaly přibližně dva roky. Můžete vysvětlit?

29) Čím si vysvětlujete pozorované rozdíly ve výskytu genospecies *B. burgdorferi* s.l. na jednotlivých studovaných lokalitách?

30) Proč bylo potřebné vyvíjet „nový protokol“ pro detekci a amplifikaci osmi housekeeping genů u *B. miyamotoi*?

31) Mohla byste vysvětlit, co je to singleton, clonal complex, clonal group, sequence type a jejich vztah?

32) V práci píšete, že pouze jeden vzorek *B. miyamotoi* v databázích byl detekovaný v lidském pacientovi (str. 79), to ale není správně. Mohla byste uvést, kolik jich je ve skutečnosti?

33) Str. 80: MST analysis of *B. burgdorferi* s.s. formed two distinct clusters of European STs, while the majority of STs of the analysis were detected in northern America. Můžete nám to vysvětlit a ukázat (asi Fig. 8)?

Závěr:

Práci

d o p o r u č u j i / n e d o p o r u č u j i *

k obhajobě. O známce se rozhodnu na základě průběhu obhajoby a odpovědí studentky.⁴

V Českých Budějovicích dne 23. 5. 2022.

.....
podpis

⁴ Je možné navrhnout známku s tím, že navržená známka může být upravená při obhajobě (pokud se oponent nezúčastní obhajoby, v posudku navržená známka se do výsledné známky nezapočítává). Znamky: výborně (1), velmi dobře (2), dobře (3), nevyhověl (4).