

# Oponentský posudek diplomové práce

**Název diplomové práce:** Identifikace bakterie *Francisella tularensis* pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie

**Autor:** Bc. Štěpánka Jírková

**Vedoucí diplomové práce:** Mgr. Martin Hubálek, Ph.D.

**Konzultant diplomové práce:** RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.

**Oponent:** prof. RNDr. Aleš Macela, DrSc.

**Rozsah práce:** 88 stran

**Počet obrázků a grafů:** 20

**Počet tabulek:** 8

**Počet použitých citací:** 69

**Počet příloh:** 4

Hmotová spektrometrie je jedna z technologií, která je v poslední době velice atraktivní. Její užití poskytuje prioritní výsledky v řadě oborů, vyžaduje však velice promyšlenou a pečlivou přípravu experimentů. Diplomantka Bc. Štěpánka Jírková pak použila jednu z velice pokročilých hmotově spektrometrických technik v podobě tandemové metody SRM k získání identifikačních znaků gramnegativní bakterie *Francisella tularensis*. Nutno říci, že toto téma je z hlediska biologické bezpečnosti velice nosné a v poslední době intenzivně studované a diskutované. Je tedy dobře, že ze spektra hmotově spektrometrických postupů zvolila právě SRM techniku, která, jak je z práce patrné, je po výsledkové stránce velice slibná a v porovnání s dosud dominantní technikou real-time PCR konkurenceschopná.

Samotná diplomová práce má klasické členění, je napsána pečlivě s minimem překlepů a chyb. Úvodní teoretická část obsahuje všechny potřebné informace nutné k dobré orientaci v problematice a to jak z hlediska technologií vhodných pro proces identifikace mikroorganismů, tak z hlediska samotného modelu. Experimentální část pak odpovídá v plném rozsahu Zadání diplomové práce, které je uvedeno v úvodních stránkách. K této části práce nutno říci, že přes technickou a časovou náročnost použitých postupů se diplomantka se ctí vyrovnala se všemi nástrahami, které jí dané téma připravilo. Z výsledků vyplývá, že detekční limity pro určování charakteristických peptidů *Francisella tularensis* pomocí metody SRM jsou prakticky srovnatelné s detekčními limity real-time PCR, tedy metody, kterou diplomantka použila jako metodu klasickou. Oponent však nicméně vidí podstatný rozdíl ve využitelnosti obou identifikačních, a dá se říci i typizačních technik, v praktickém uplatnění v rámci civilního krizového řízení, vojenské doktríny BIO DIM (biological detection, identification, and monitoring) či v klinických diagnostických procedurách. V některých z těchto oblastí uplatnění identifikačních technik hraje rozhodující úlohu faktor času. Ve veřejné vědecké rozpravě k této diplomové práci bych se tedy rád zeptal, kde vidí diplomantka praktické uplatnění použité techniky SRM s ohledem na její zkušenosti získané v rámci realizovaných experimentů.

Velice cenné jsou pokusy o identifikaci dané bakterie ve směsné bakteriální kultuře a ve vzorcích, které diplomantka označuje jako environmentální. Právě rozpoznání vysoce

patogenního mikroorganismu v komplexních vzorcích je kamenem úrazu využitelnosti identifikačních technik v praxi. Většina prací zabývajících se identifikací bakterií, jak po stránce hledání identifikačních znaků, tak po stránce samotné identifikace využívá k experimentům čistých bakteriálních kultur. Zde nám diplomantka dokládá, jak je tento problém složitý, protože i přes to, že si vzorky písku zjednodušila promytím, není identifikace do vzorku aplikovaného mikroorganismu nijak jednoduchá a jednoznačná. Nicméně snaha o takovéto postupy je chvályhodná.

Přes to, že je práce napsána velice pečlivě se autorka nevyvarovala některých chyb a nepřesností na které musí oponent reagovat. Bakteriální vstup do hostitelské buňky nelze zobecnit na všechna protozoa (str. 44), v případě nutného zobecnění by bylo možné použít zobecnění pro prokaryota. Nelze se rovněž ztotožnit s tvrzením, že bakteriální kapsule je složena převážně z lipidů (str. 44), protože bakteriální kapsule jsou tvořeny převážně polysacharidy a polysacharid kapsule *Francisella tularensis* byl velice přesně popsán v práci Michaela A. Apicella a spolupracovníků (PLoS One. 2010; 5(7): e11060). Rovněž některá slovní spojení nejsou zcela v pořádku, např. patogenní nátěr (str. 40) či virulentní mechanismus (str. 42). Rovněž nejednotnost psaní slova Rapigest (str. 62) nedělá dobrý dojem. Citace ve zkrácené podobě se v textu uvádějí v podobě Macela et al. a ne Macela et all (str. 73).

V samotných výsledcích by pak mělo být vždy uvedeno, z kolika opakování byl dělán závěr či připraven graf (např. str. 63-64). Zaběhnutá praxe vyžaduje uvést v nějaké podobě i odchylky (buď standardní odchylku či nějakou jinou). Oponent se dále domnívá, že v kapitole týkající se detekce bakterie *F. tularensis* ve smíšeném vzorku s *E. coli* jsou nešťastně uvedeny stupně ředění (*E. coli* vs. *F. tularensis*). Oponent si musel opakovaně promyslet, jak byl ve skutečnosti připraven experiment. Obvykle se uvádí počet bakterií jedné k druhé a ne stupeň ředění jednotlivých bakteriálních suspenzí, které jsou následně smíchány (viz str. 76). Navíc oponenta znejistil údaj v kapitole Závěr, kde se uvádí poměr *E. coli* : *F. tularensis* 1:100, což je pravděpodobně chybné. Poslední připomínka se týká grafu č 14. Pokud se součet ploch pod křivkou týká jen diskriminačních peptidů, pak podle tabulky č. 4 musí být u stupně ředění e4 v řadě B hodnota nulová.

**Závěr:** Předložená diplomová práce je po všech stránkách hodnotná a přináší informace odpovídající slušné úrovni vyžadované pro diplomové práce. Všechny připomínky jsou uvedeny spíše pro klidnou mysl oponenta a nijak nesnižují hodnotu získaných experimentálních výsledků, ani kvalitu předložené diplomové práce. **Oponent proto doporučuje předloženou diplomovou práci Bc. Štěpánky Jírkové přijmout k obhajobě se známkou chvalitebně.**

V Nechanicích, 16. května 2011



Prof. RNDr. Aleš Macela, DrSc.