

Oponentský posudek diplomové práce:

Detekce a identifikace *Capnocytophaga canimorsus* metodou PCR

Autor práce: Bc. Lucie Jankovičová

Vedoucí práce: RNDr. Markéta Vydržalová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Květa Koryčanová, Ph.D.

Diplomová práce Bc. Lucie Jankovičové je zaměřena na diagnostiku a identifikaci bakterie *Capnocytophaga canimorsus*, která osidluje ústní dutinu psů a koček. Tato bakterie následně může být přenesena na člověka a způsobovat lokální, ale i vážné systémové infekce, proto je včasná diagnostika *C. canimorsus* klíčová pro následnou léčbu vzniklých infekcí.

Hlavním cílem diplomové práce bylo zavedení a optimalizace molekulárně biologické metody pro detekci *C. canimorsus* ve vzorcích orálních stěrů psů a koček. K tomuto účelu byly zvoleny metody PCR a qPCR. Výsledky získané oběma metodami byly následně vyhodnoceny a porovnány. Předložená diplomová práce má rozsah 77 stran a je členěna na teoretickou a experimentální část, na kterou navazuje spojená kapitola výsledků a diskuze. Teoretické informace jsou podloženy 72 citacemi publikovanými převážně v mezinárodních odborných časopisech.

V práci se nachází řada překlepů (*např. str. 32 - ... Spektrum využívaných molekulárně biologických metod v je v České republice...; str. 35, 37*) nepřesných vyjádření a částí, kde dochází k prodlužování textu nevhodným vkládáním mezer a odrážek (*např. strany 16, 44, 50*), velkým zvětšením obrázků (*str. 22*) apod. Některé části práce by pro větší přehlednost nemusely být členěny do samostatných podkapitol (*např. kapitola 2.1.1.1*). Experimentální část popisuje použité metodiky, které studentka ve své práci využila, nicméně část použitých postupů zde postrádám. Výsledkovo-diskuzní část je poté nepřehledněna členěna. Výsledky jsou porovnány s literaturou pouze v rámci jedné strany (*str. 66*), což hodnotím negativně.

K práci mám následující připomínky:

- 1) **Seznam obrázků** – Součástí seznamu obrázků jsou i citace, které by na tomto místě být nemusely. Pokud se je autorka rozhodla uvést, musí souhlasit s citacemi v textu práce. U obrázků 1, 3, 4, 5, 9 a 11 jsou zde uvedeny JINÉ citace, než které jsou uvedeny dále v textu práce.
- 2) **Seznam tabulek, seznam grafů** – Názvy tabulek a grafů jsou nepřesné. Např. Tabulka č. 4 – Porovnání vzorků koček. Porovnání jakých vzorků koček je zde myšleno? Název tabulky č.4 také obsahuje popis tabulky, který do tohoto seznamu nepatří. Stejně tak název grafu 3.
- 3) **Seznam zkratk a značek** – Autorka uvádí anglické vysvětlení zkratk jen u některých případech, seznam není sjednocen.
- 4) **Teoretická část (str. 15 – 40)**
 - a) Str. 19 a 21 – Objevuje se problém se zaváděním zkratk, není dodržen jednotný styl. Např. ...IL-6 (interleukin); ale dysgonický fermentor typu 2 (DF-2).
 - b) Str. 21 – Nejprve je v textu uveden obr. 2 a teprve poté obr. 1. Také zde vzniká velká mezera na konci stránky, která by alespoň částečně mohla být zaplněna prvním odstavcem ze str. 22.
 - c) Str. 22 - U mikroskopického snímku (Obr. 1) postrádám měřítko nebo alespoň zvětšení. Obr. 2 je nevhodně oříznutý.
 - d) Str. 23 - Ve dvou po sobě jdoucích odstavcích je 2x vysvětlena stejná zkratka DIC.
 - e) Str. 31 – Obr. 6 je skenovaný z knihy. Měl by být lépe upraven, popř. překreslen.
 - f) Str. 39 – Popis obr. 9 je špatně. Popisky exponenciální a lineární fáze nesedí.
 - g) Str. 41 – Je prázdná.
- 5) **Experimentální část (str. 43 – 52)**
 - a) **Postrádám výčet bakteriálních kmenů použitých v této práci. Dále také chybí popis metodiky, která byla použita k odběru vzorků od psů a koček.**

- b) Str. 46 – Postrádám koncentraci H₂O₂ pro detekci katalázy. Dále agaróza pravěpodobně nebyla rozpuštěna v 80 µL, ale v 80 mL. V kapitole 4.6 postrádám název kitu, který byl použit pro izolaci DNA k provedení qPCR.
- c) Str. 47 – Objevují se dva typy citace stejného článku ihned za sebou – Suzuki et al. (2010) a (6).
- d) Str. 49 – V rámci vyhodnocení výsledků PCR byl vložen obr. 10, který ale není okomentovaný. Chybí vysvětlení popisu vzorků, pozitivní a negativní kontroly. Není zřejmé, zda se jedná o výsledky analýzy nebo vložení ilustrační gel.

6) Výsledky a diskuze (str. 53-68)

- a) Str. 55, 57 a 58 – Z grafů 1, 2 a 3 není patrné, které vzorky odpovídají které amplifikační křivce. Není vysvětlena zkratka RFU.
- b) Str. 56 – Nevhodné oříznutí obr. 13, jeho velikost je neadekvátní.
- c) Str. 60 – Nevhodné oříznutí obr. 14, jeho velikost je neadekvátní.
- d) Str. 68 – U obr. 15 postrádám zvětšení nebo měřítko.

Otázky do diskuze pro autora:

- 1) Jaký je rozdíl mezi RT-PCR a qPCR?
- 2) Na základě jakých informací jste usoudila, že primery z publikace Suzuki et al. (2010) jsou vhodné pro qPCR?
- 3) Uvádíte, že jste prováděla tzv. melting analýzu v rozmezí teplot 50-70°C. Kde jsou výsledky této analýzy, popř. jak je hodnotíte?
- 4) Postrádám popis metodiky, která byla použita k odběru vzorků od psů a koček. Byl tento postup standardizován, např. prováděla odběr jedna osoba? Probíhal odběr stejně u psů a koček? Jak byly odvozeny názvy vzorků?

Na závěr bych ráda uvedla, že i přes výše uvedené připomínky studentka splnila cíle vytyčené v zadání diplomové práce. Práci **doporučuji k obhajobě** a hodnotím známkou **D**.

V Pardubicích 24. 5. 2022

Mgr. Pavlína Majtnerová, Ph.D.