

## Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Petra Jošta

V předkládané diplomové práci se student Bc. **Petr Jošt** věnuje identifikaci *Malassezia pachydermatis* molekulárně biologickými metodami. Autor provedl izolaci DNA pro 114 vzorků, které byly sbírány v letech 2004-2009 a kultivační metodou určeny jako druh *Malassezia pachydermatis*. Dále autor zavedl a zoptimalizoval metodu polymerázové řetězové reakce (PCR) pro amplifikaci DNA, PCR produkt detekoval elektroforeticky. Optimalizovanou metodu použil pro DNA vyizolované ze vzorků a výsledky získané klasickými kultivačními technikami porovnal s molekulárně biologickou metodou PCR.

Vlastní práce je zpracována na 69 stránkách, obsahuje 9 tabulek a 15 obrázků (včetně elektroforetických záznamů, které vhodně doplňují získané výsledky). Po formální stránce obsahuje předkládaná práce všechny předepsané kapitoly, některé jsou však psány netradičně.

Souhrn je psán obecně jako úvod do problematiky, pouze poslední dva odstavce stručně shrnují výsledky práce.

V teoretické části autor shrnuje historii taxonomického zařazení rodu *Malassezia*, velice podrobně popisuje morfologické a fyziologické vlastnosti dosud popsanych 13 druhů této kvasinky, dále se věnuje stručné charakteristice onemocnění otitis externa a poslední část teoretické části je věnována molekulárně biologickým metodám-metodě PCR, stručné charakteristice jednotlivých modifikací metody PCR a v závěru publikovaným molekulárně-biologickým metodám pro detekci *Malassezia* sp. Vypracování literární rešerše není blíže specifikováno, ale podle názvu „Identifikace druhu *Malassezia pachydermatis* molekulárně biologickými metodami“ bych očekávala zaměření především na metody molekulární biologie, bohužel této problematice je věnováno pouhých 6 stran.

Experimentální část práce je řešena v souladu s aktuálními metodickými postupy používanými v laboratoři. Pro izolaci DNA byla použita fenol-chloroformová extrakce a izolace pomocí kolonek Qiagen. Po zavedení PCR bylo využito publikace dle Sugita a kol. (2001), optimalizována byla pouze teplota annealigu, dále byla provedeno stanovení selektivity PCR a detekčního limitu reakce. Použité přístroje, materiál i metody odpovídají zadanému úkolu.

Výsledky jsou stručně komentovány a vhodně prezentovány formou tabulek a elektroforetických záznamů, jejichž množství je přiměřené a umožňuje čtenáři dobrou orientaci ve výsledcích. Diskuze je poměrně chudá (pouze dvě stránky), proto bych navrhovala tuto kapitolu rozšířit a spojit s výsledky. V závěru je práce stručně a přehledně a shrnuta. Literatura je až na pár chyb citována dle platné normy ČSN ISO 690.

Práce je psaná s minimem tradičních překlepů, jednotlivé části na sebe logicky navazují, kromě kapitoly v teoretické části 2.7.5 Metody separace a detekce (PCR produktu), po které následuje kapitola 2.7.6 Modifikace metody PCR a jejich využití – zde bych zařadila detekci PCR produktu jako poslední kapitolu a také kapitoly v experimentální části, kde po izolaci DNA následuje detekce ampliconů elektroforézou a poté teprve vlastní amplifikace DNA.

K diplomové práci mám následující připomínky či dotazy:

- Kapitola 2.5 Zástupci rodu *Malassezia* je velice podrobně sepsána, a kromě druhu *Malassezia pachydermatis* nemá zvláštní opodstatnění pro tuto práci. Pro přehled by stačilo uvést pouze tabulku 1 (na str. 25), která vše přehledně shrnuje.

- Na str. 18 je uveden obr. 2 Gramovo barvení druhu *Malassezia pachydermatis*. **Jedná se opravdu o Gramovo barvení, nebo o barvení diazoniovou modří B, kterého se využívá při identifikaci?**
- Na str. 32 tvrzení: Dnes se používá výhradně *Taq* polymerázy není pravdivé. V současnosti je dostupných několik druhů DNA polymeráz, a právě na jejich výběru závisí úspěšnost či neúspěšnost PCR.
- Na str. 39 v materiálu pro PCR postrádám uvedení sekvencí primerů, jsou uvedeny až na str. 45 v metodice PCR.
- Na str. 42 je v bodu je překlep, není pravda, že se po přidání TE pufru DNA ukládá na 1-2 dny do lednice pro rozpuštění.
- Na str. 49 jsou shrnuty výsledky gradientové PCR pro optimalizaci teploty annealingu, kde došlo ke střídání teplot od 56 – 66°C. **Proč byly ependorfky dány jen do sudých teplot při optimalizaci teploty annealingu a nebylo využito celé rozmezí jak je obvyklé?**
- **Jaká byla čistota DNA použité pro stanovení detekčního limitu?**
- **Pro stanovení detekčního limitu byla použita řada s desítkovým ředěním. Proč mezi poslední pozitivní jankou a první negativní nebylo použita řada s nižším ředěním?**
- Na str. 53 je uvedeno, že izolace DNA pro sbírkovou kulturu byla vždy provedena pomocí kolonek Qiagen a izolace DNA vzorků za pomoci fenol-chloroformové extrakce. **Pro ověření správnosti izolačního postupu je však nutné použít stejnou metodu i pro pozitivní kontrolu.**
- **Co si autor myslí o použití interní kontroly?**
- V textu chybí odkaz na tabulky č. 7 a 8.
- **Na čem pěstoval Morris a kol. (2005) zástupce rodu *Malassezia*? Pokud bude autor hodnotit výsledky PCR získané ze vzorků z období 2004-2007 (rod *Malassezia* pěstován na Sabouraudově glukózovém agaru), shoduje se s Morrisem a kol. (2005) – odhalení falešně kultivačně negativních výsledků. Ovšem z období 2008/2009 (rod *Malassezia* pěstován na *Malassezia* agaru) – odhalení falešně kultivačně pozitivních výsledků.**

Přes uvedené nedostatky a připomínky lze konstatovat, že vytčené cíle práce byly splněny. Diplomovou práci Bc. Petra Jošta doporučuji přijmout k obhajobě a navrhuji její klasifikaci stupněm **velmi dobře**.

V Pardubicích 20.5.2009

  
Ing. Petra Šnévajsová