

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Jaroslav Nunvář, Ph.D.
	Datum: 9.9.2014
Autor: Bc. Lucie Kladivová	
Název práce: Role efluxového systému AdeABC v rezistenci <i>Acinetobacter baumannii</i> k aminoglykozidům	
Cíle práce Hlavním cílem práce bylo definovat roli systému AdeABC při vzniku rezistence k aminoglykozidům u genotypově odlišných kmenů <i>A. baumannii</i> .	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Práce je členěna obvyklým způsobem na sekce Úvod (1 str.), Cíle práce (1 str.), Přehled literatury (10 str.), Materiál a přístroje (3 str.), Metody (9 str.), Výsledky (14 str.), Diskuze (3 str.), Souhrn (1 str.) a Seznam literatury (7 str., celkem 70 citací) Rozsah práce (počet stran): 58 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? Pro zodpovězení této otázky záleží na definici pojmu „metoda“. Autorka použila značný počet metod z oblasti klinické mikrobiologie a molekulární biologie: selekce rezistentních bakterií, několik typů vyšetření citlivosti k antimikrobním látkám, makrorestrikční analýza genomové DNA, diagnostická PCR pro specifické geny a real-time PCR. Jsou metody srozumitelně popsány? spíše NE – především mnohokrokové metody (různé izolace, extrakce) by byly mnohem přehlednější ve formě jednotlivých bodů postupu samostatně na řádcích, než takto ve formě souvislého textu.	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? většinou ANO, ale chybí replikační experimenty pro stanovení frekvence vzniku netilmicin-rezistentních mutantů u jednotlivých kmenů	

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? spíše NE

Celkově diskuzi pokládám za suboptimální, o čemž svědčí např. její velmi malý rozsah (necelých 2 a ½ stránky). Postrádám návrhy na další řešení problematiky, resp. rozvinutí a pokračování současných experimentů.

Nesouhlasím s několika interpretacemi výsledků autorkou (viz níže) – data v Tab. 7 jsou s nimi v rozporu, navíc tato tvrzení nejsou doplněna ani primitivní statistikou nebo grafickým vynesemím:

„Předpoklad výhody přítomnosti systému AdeABC se celkově potvrdil, jak ukazují rozdíly ve frekvencích vzniku rezistentních variant u kmenů nesoucích funkční sestavu genů efluxu a kmenů s neúplnou sestavou těchto genů.“

„Podobně v prostředí netilmicinu 16 mg/l většina kmenů s kompletním efluxovým genotypem vytvářela rezistentní varianty na rozdíl od kmenů s nekompletním genotypem AdeABC.“

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO, avšak v některých případech velmi diskutabilní a nedostatečně podložené daty, viz připomínky k Diskuzi.

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Obrazová dokumentace je vhodná, avšak v Literárním přehledu a Diskuzi značně sporadická (4 a 0 obrázků). Pochopitelnosti problematiky práce by jistě prospělo více názorných obrázků, hlavně přehledných schémat.

Jazyková úroveň práce dostačující, chyb a překlepů, byť se vyskytují (především v anglických pasážích), je minimum.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Na předložené diplomové práci Lucie Kladivové v první řadě oceňuji objem odvedené experimentální práce a množství různých metod, které autorka zvládla používat. Toto experimentální úsilí vedlo k velmi robustním a neoddiskutovatelně průkazným výsledkům zejména v oblasti testování spektra citlivostí izolovaných kmenů *A. baumannii* a určení exprese transportérového genu pro netilmicin (*adeB*) u rezistentních mutantů. Naopak slabým místem práce je nepodložené vyvozování závěrů z experimentálních výsledků. Mutace v regulačním systému efluxní pumpy AdeABC, vedoucí k jeho overexpresi a následně k rezistenci k netilmicinu, jsou z literatury dobře známé, a jejich selekce v přítomnosti tohoto antibiotika je předvídatelná. V těchto aspektech práce příliš nových poznatků nepřináší. Za zajímavou naopak pokládám selekci rezistentních mutantů u kmenů *A. baumannii*, které systém AdeABC postrádají. Těmto mutantům v práci větší pozornost věnována není. Je škoda, že v práci nebyla zkoumána přítomnost mutací v genech regulačního systému AdeSR alespoň u některých netilmicin-rezistentních mutantů. Celkově se domnívám, že vytyčené cíle práce byly splněny. Text přes výše uvedené připomínky prokázal kompetenci Lucie Kladivové k práci v oboru a doporučuji jej proto k obhajobě jako závěrečnou práci magisterského stupně studia.

Otázky a připomínky oponenta:

1. Je AdeR pozitivní, nebo negativní regulátor exprese *adeABC*? Jaké jsou molekulární nebo jiné stimuly, které jsou vnímány systémem AdeS/AdeR
2. Jak jste měřili koncentraci nukleových kyselin?
3. Ze směrnice jaké přímký jste počítali efektivitu amplifikace? Prosím o grafické znázornění odpovědi.
4. Pokuste se vysvětlit (zdůvodnit) skutečnost, že exprese operonů kódujících bakteriální chromozomální efluxní systémy bývá často v normálním (původním) stavu umlčena a nepřispívá tak k rezistenci vůči antibiotikům.
5. Jak si vysvětlujete rozdílné hodnoty frekvence selektovaných mutantů (při shodné koncentraci netilmicinu) mezi jednotlivými zkoumanými kmeny *A. baumannii*?
6. Pokud byste opakovali selekci mutantů v replikátních experimentech, jaký očekáváte rozptyl v jejich frekvencích mezi jednotlivými replikáty téhož kmene při téže koncentraci netilmicinu? Zdůvodněte.
7. Určení přítomnosti genu pomocí PCR z principu nikdy nemůže být 100% spolehlivé – nelze vyloučit mutace v místech nasedání primerů, které ruší iniciaci polymerace DNA. Uveďte alespoň jeden způsob, jak tuto možnost (vedoucí k falešně negativním výsledkům) minimalizovat.
8. Jmenujte velmi přesnou alternativní metodu ke specifické PCR, s jejíž pomocí byste mohli zjistit přítomnost genů *adeABC* v genomech daných kmenů bakterií.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: