

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Michal Čáp
	Datum: 11.9.2012
Autor: Anna Malinová	
Název práce: Výskyt a molekulární typizace kmenů <i>Clostridium difficile</i> v České republice	
Cíle práce Cílem práce bylo blíže určit kmeny <i>Clostridium difficile</i> z klinických izolátů od pacientů trpících CDAD (<i>C. difficile</i> associated disease) získaných v letech 2008-2011 ve čtyřech pražských zdravotnických zařízeních. Pomocí několika metod molekulární typizace (toxintypizace, ribotypizace a analýzy multilokusové variability - MLVA) prozkoumat genetickou variabilitu <i>C. difficile</i> v České republice a přispět tak k objasnění epidemiologie CDAD. Dalším cílem bylo typizovat kmeny <i>C. difficile</i> vyskytujících se u selat, jako pilotní studie pro rozsáhlejší výzkum výskytu tohoto patogena v chovech v České republice.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 107 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? Použité metody: izolace a kultivace <i>C. difficile</i> , PCR, RFLP, kapilární elektroforéza, práce s databázemi a vyhodnocovacím softwarem Jsou metody srozumitelně popsány? ANO	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO	
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? ANO	

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO

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

V literárním přehledu obrazy vhodně doplňují text, ve výsledkové části jsou pak všechny výsledky podloženy kvalitní obrazovou dokumentací. Grafická úprava i použití českého jazyka jsou na velmi dobré úrovni.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle práce byly splněny. Získané výsledky bezpochyby přispějí k prohloubení vědomostí o výskytu různých toxinotypů a ribotypů *C. difficile* v České republice (nebo spíše Praze a okolí?) a jejich porovnání s výskytem v jiných zemích. Detailnější analýza příbuznosti jednotlivých izolátů pomocí MLVA zatím jednoznačné výsledky nepřinesla, ale může sloužit jako základ pro další podobné analýzy s potenciálem objasnit epidemiologii CDAD. Součástí výsledkové části je i detailní porovnání výsledků ribotypování za použití tří typů sekvenátorů s kapilární elektroforézou. Výsledky získané z různých sekvenátorů se lišily, což znesnadňovalo následné porovnávání velikostí s databází.

Cenným poznatkem z této práce je srovnání spolehlivosti komerčních testů používaných v klinické praxi s výsledky molekulární typizace. Používané testy mají vysoký podíl falešně pozitivních i negativních výsledků.

U selat bylo zaznamenáno vysoké procento výskytu patogenního kmene *C. difficile* (i když se jednalo o pilotní studii se vzorky z jednoho chovu).

V práci bylo charakterizováno téměř 300 klinických izolátů *C. difficile* pomocí toxinotypizace a ribotypizace. 65 vybraných izolátů bylo dále podrobněji charakterizováno metodou MLVA, při níž se sleduje variabilita počtu kopií repetice v sedmi vybraných lokusech. Vzorky byly zpracovány systematicky a bylo získáno velké množství originálních dat, která jsou přehledně prezentována.

Otázky a připomínky oponenta:**K práci mám několik drobných připomínek:**

Na straně 18 používáte pro real-time neboli kvantitativní PCR nesprávně zkratku RT-PCR, která se používá pro PCR spojenou s reverzní transkripcí. Pro kvantitativní PCR se používá zkratka qPCR.

Při použití fluorescenčně značených primerů by mělo být popsáno, jaké nastavení přístroje bylo použito pro excitaci a detekci každého fluoroforu.

Při barvení gelů barvivem GelRed by měla být popsána spíše použitá koncentrace než ředění zásobního roztoku.

Napětí použité pro agarosovou elektroforézu je udáno jako 5 V/cm². Jakým způsobem je vypočítána plocha pro stanovení celkového napětí na elektrodách?

Princip PCR jakožto základní a všeobecně známé metody molekulární biologie není potřeba v tomto typu práce vysvětlovat.

Do PCR směsi fragmentu A3 genu *tcdA* byla přidána komponenta označená jako TMA, která

není popsána a nevyskytuje se v seznamu zkratek.

Skutečně přidáváte do tekutého selekčního média 1,5% agar?

K práci mám následující dotazy:

Proč probíhá PCR toxinotypizace za velmi neobvyklých podmínek (nasedání primerů a syntetická fáze při 47°C nebo 56°C, denaturace při 72°C)? Dovoluji si odhadnout, že produkt o předpokládané velikosti několika Kbp nebude kompletně denaturovat při 72°C. Proč probíhá syntetická fáze s Taq polymerázou při 47°C, když teplotní optimum tohoto enzymu je okolo 75°C?

Proč byl u každé reakce MLVA PCR jinak nastaven poměr fluorescenčně značených a neznačených primerů?

C. difficile je kultivováno na selekčním médiu obsahujícím antibiotika cefoxitin a cykloserin. Jaký je mechanismus resistance *C. difficile* k těmto antibiotikům?

Toxinotypizace se nezdařila u 99 vzorků. Máte nějaké vysvětlení proč tomu tak bylo?

Má typizace *C. difficile* pouze epidemiologický, nebo i diagnostický význam? Je typizace důležitá pro terapii konkrétního případu CDAD?

Čím si vysvětlujete povětšinou asymptomatickou kolonizaci prasat pro člověka patogenním kmenem AI-12?

Detekce *C. difficile* v klinické praxi u nás probíhá převážně pomocí komerčních testů, které nejsou příliš spolehlivé. Jaký by byl podle vás vhodný způsob diagnostiky?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: