

Posudek na diplomovou práci

<u>oponentský posudek</u>	Jméno posuzovatele: <div style="text-align: right;">Mgr. Alena Morávková, Ph.D.</div>
	Datum: 17. 9. 2007
Autor: Mgr. Štěpán Ryba	
Název práce: Monitoring chřipkového viru v populaci ptáků pomocí RT-PCR	
<p>Posudek:</p> <p>Předložená diplomová práce je členěna klasicky do šesti kapitol na Úvod, Literární přehled, Cíle práce, Materiál a metody, Výsledky a Diskusi. Celá práce má 51 stran, z nichž devět je věnováno velmi stručnému přehledu problematiky, na deseti je rozepsána použitá metodika a na dvanácti stranách jsou shrnuty výsledky práce, které jsou poté diskutovány na čtyřech stranách.</p> <p>Kapitola „Literární přehled“ je značně kusá a zabývá se prakticky jen velmi stručnou definicí hlavních antigenů viru chřipky a metodou jejich detekce pomocí PCR. Domnívám se, že by alespoň tyto metody mohly být více rozvedeny, srovnány, vymezeno jejich praktické použití. Tato kapitola navíc trpí mnohými formálními nedostatky (viz. níže).</p> <p>Cílem práce je porovnání různých metod izolace totální RNA z biologických vzorků, její převedení do cDNA a následná identifikace a typizace takto získaných genomových úseků chřipkových virů přítomných v daném vzorku. Gen pro hemagglutinin a část genu pro M protein byly naklonovány do komerčního vektoru pCR4 TOPO. Autor celkem zpracoval úctyhodných 205 vzorků, přičemž u některých z nich používal pro srovnání více metod izolace RNA a reverzní transkripce, což celkový objem práce dále zvyšuje. Použité metody práce jsou jednoduché a přitom účinné. Zejména oceňuji metodu „Izolace plazmidů metodou pr“, která autorovi umožňuje zároveň zpracovat a vyhodnotit velké množství vzorků bez zbytečných časových ztrát a prodlev. Také zavedení metodiky pro odběr Chelexovou metodou a přepravu vzorků jistě najde uplatnění při sběru biologického materiálu pro virologické analýzy. Metodická práce je sepsána celkem přesně a přehledně, nicméně i zde se vyskytují nedostatky, které se vyskytují v celé práci (viz. níže), zejména při popisu průběhu PCR reakcí.</p> <p>Z kapitoly „Výsledky“ jednoznačně vyplývá, že autor sebral a zpracoval velké množství vzorků, přičemž zároveň na pracovišti zavedl některé nové techniky pro izolaci RNA a nadto provedl srovnání několika různých metod izolace RNA a reverzní transkripce. Z metodického hlediska je proto práce nadmíru přínosná. Výsledkem zpracování 205 vzorků bylo osm vzorků prokazatelně pozitivních na Influenza A virus, přičemž byla dále provedena subtypizace těchto vzorků do subtypů H1 a H3. Zajímavé také je, že chřipkový virus byl prokázán pouze u hnízdících ptáků (15,6%) a ptáků ze Zoologické zahrady (18% zkoumaných vzorků). V této kapitole mám hlavní výhrady k prezentaci výsledků a zejména popisu obrázků (viz níže).</p> <p>Diskuse je vedena řádně a jednoznačně z ní vyplývá, že autor se v problematice výtečně orientuje. Z formálního hlediska je asi nejpečlivěji psanou částí práce. Diskuse je věcná a odpovídá relevantně na všechny otázky, které vyplývají z práce.</p>	

Zcela jednoznačně vyznívá srovnání všech použitých metod pro izolaci RNA a jsou zde i trefně pojmenovány problémy, které s problematikou izolace virové NK souvisí. Vědecky a i formálně je diskuse na výborné úrovni.

V závěru práce je přehled literárních zdrojů použitých v práci. Celkem se jedná o 59 původních prací a čtyři monografie, přičemž většina původních prací se zabývá různými metodami charakterizace chřipkových virů. Použitá literatura je recentní, jen patnáct odkazů je starších deseti let. Bohužel se ani této kapitole nevyhnuly chyby, které provázejí celou práci. Celkem čtyři práce, které jsou uvedeny v textu práce jsem nenašla v seznamu literatury. Jedná se o práce GAMBYRYAN et al., 2005 (text str.8), FANNING et al., 1999 (text str.8), GAMBARYAN et al., 2004 (text str. 13) a NEUMANN 2000 (text str. 16). Navíc další tři citace jsou uvedeny v textu uvedeny jinak než v seznamu literatury. Jsou to práce uvedené v textu chybně jako HALE et al., 1995 (str. 14) (v seznamu literatury správně 1996) a JENSEN et al., 1990 (str. 14) (v seznamu správně JANSEN). V obou případech chybně je uvedena práce ROBERTS et al., 1998 (Roberts, Lamb, Compans, Virology 1998, 240: 127 – 137), kdy je jméno prvního autora uvedeno špatně jak v textu (str.13), tak v seznamu literatury (str. 48). Další nepřesnost se vyskytuje v citování časopisu PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, který v seznamu literatury vystupuje jednou jako PNAS, jindy pod oficiální zkratkou (Web of Science) Proc. Natl. Acad. Sci.

Otázky a připomínky oponenta:

Jak jsem již zmínila výše, kladný dojem z množství a kvality vykonaných experimentů kazí celková formální úroveň předložené diplomové práce. Nehledě na drobné překlepy a gramatické chyby se v práci vyskytuje celá řada stylistických a formálních nedostatků, které činí některé části práce zcela nepřehlednými a pro čtenáře jen těžko pochopitelnými. Tyto námitky se týkají to zejména kapitoly „Literární přehled“, ale i –což je závažnější- kapitoly „Výsledky“ a nepřesností se nevyhýbají ani jinak pěkné kapitole „Materiál a metody“. Čtenář je tak mnohdy odkázán na studium primárních pramenů, i ty jsou ovšem citovány nepřesně, někde chybí odkaz na použité prameny zcela (viz. výše).

V souhrnu mám k práci téměř čtyři desítky připomínek – většina z nich není příliš závažná, ale ve svém souhrnu podstatně snižují celkovou kvalitu práce.

Nejzávažnější nedostatky a nejasnosti v textu jsou následující:

- Na obr. 2, str. 11 není jasné které sekvence jsou převzaté z již dříve publikovaných prací a které byly navrženy autorem.
- Na straně 12 nerozumím pojmu hostitelsky-buněčné proteázy
- Na straně 13 kap. 3.7. „Metody detekce“ je řečeno, cituji: „Metoda detekce chřipkových virů je velice citlivá a je schopná detekovat i viry, jichž kapsidy a obaly jsou inaktivovány nebo denaturovány.“ To je jistě povzbudivé, nicméně není zde nic řečeno o tom o jakou metodu se jedná, navíc v dalším odstavci jsou zmiňovány sérologické metody určování titru protilátek v krvi pacientů, které ale těžko budou citlivější než dále probírané metody s využitím PCR.
- Literární přehled je velmi stručný a soustřeďuje se zejména na metody izolace a charakterizace virové RNA. To je v pořádku, nicméně bych uvítala rozšíření některých kapitol – např. jaké jsou výhody/nevýhody různých vzorků - kloakální vs. nasofaryngeální výtěr vs. fekální vzorky. Autor používá všechny tři typy vzorků, přičemž se ale nikde v práci nedozvídáme, je-li mezi nimi rozdíl v obsahu a kvalitě viru a který typ vzorků lze považovat pro detekci chřipkového viru za nejlepší.
- Text dále obsahuje některé –dle mého názoru nežádoucí- anglikanismy a výrazy z laboratorní hantýrky, např. „pakážovací signál“ (str. 9), „jednoho

- patogena“ (str. 14). Na mnoha místech se také objevuje pojem „anealing“ nebo „anealingová teplota“, přičemž tento výraz lze snadno nahradit českým „teplota nasedání primerů“. Navíc slovo „anealing“ psáno jednou s jedním „n“ (str. 25), jindy se dvěma „nn“ (str. 36). Protein hemaglutinin je psán se dvěma „g“, ačkoli ve všech ostatních případech je používán český přepis slov.
- Věty jsou často neukončené, nejasné, chybí exaktní pojmenování podnětu nebo předmětu věty, což činí věty značně nesrozumitelnými. Např. str. 16, 2. věta, cituji: „Zaklonováním úseku do plazmidu...“. Jaký úsek má autor na mysli?
 - U PCR je v kapitole 5.9.1 (str. 25) jako teplota přisedání primerů uvedeno 58°C. Poslední věta této kapitoly ale říká: „Anealingová teplotu a čas jsem operativně měnil podle použití primerů a typu amplifikace.“ To je při velkém množství použitých primerů pochopitelné, nicméně toto je jediná informace o teplotách přisedání primerů, kterou čtenář obdrží. Snad by bylo vhodné konkrétní teploty uvádět přímo v tabulce 1 a 2, kde je uveden výčet primerů.
 - V kapitole 5.9.2 „Gradientová“ (str. 25) je uveden rozsah teplot pro gradientovou PCR 48-58°C. V kapitole 6.4. „Gradientová PCR amplifikace“ (str. 36) je uveden rozsah teplot 50 – 70°C, přičemž jako nejvhodnější byla určena teplota 62,6°C, tedy zcela jiná teplota, než byla uváděna jak odstavci 5.9.1, tak v kapitole 5.9.2.
 - V kapitole 6.4. říká, cituji: „Z tohoto důvodu jsem vyzkoušel již pozitivní vzorky otestovat na nejvhodnější annealingovou teplotu pomocí teplotně-gradientové PCR amplifikace.“ A o tři věty dále: „Byla použita standardní PCR směs, 1 µl templátu vzorku standardu A/H5N1/dk./Viet. a primery pro typizaci chřipky.....). Na přiloženém obr. 13 není bližší specifikace templátu ani produktu PCR reakce. Jaký templát byl použit? Kolik takových reakcí bylo uděláno? Kolik různých vzorků bylo zpracováno touto metodou?
 - Obrázky v kapitole „Výsledky“ jsou spíše ilustrativní než informativní. Různými metodami byly zpracováno 205 vzorků nicméně jen 8 z nich bylo pozitivní. Nepochybně by bylo možno ukázat výsledky elektroforez všech těchto vzorků, nikoli jen jeden nebo dva náhodně vybrané. Navíc není zcela jasné, které vzorky jsou na obrázcích 6 -11. Vzorky reprezentované obrázkem 6 a 8 (snad i 7) jsou sice pojmenovány a očíslovány v tabulce 6, ale v popisu k obrázkům 6-8 se dozvídáme pouze „slot – pozitivní, slot – negativní“, což je trochu málo. Na obr. 8 (str. 32) je ukázán jeden pozitivní vzorek. V textu se hovoří o třech vzorcích. Navíc je v textu řečeno, že byly použity dvě metody reverzní transkripce. Z textu ani popisu k obrázku není jasné jakou metodou byly získány vzorky na obr. 8 a chybí slovní a/nebo obrazové srovnání metod.
 - V kapitole 6.3.4 je řečeno, cituji: „Pro zjednodušení procedury izolace RNA a následně i tvorby cDNA byly vzorky, po rozlyzování v lyzačním pufu (Qiagen) po deseti smíseny. Jeden ze směsných vzorků byl vytvořen 2x a jedna z dvojic obsahovala i příměs rozlyzovaného standardu A/H5N1/dk./Viet.“. Směsný vzorek se standardem je nepochybně důležitou pozitivní kontrolou. Na obr. 10 (str. 34) však chybí.
 - Z kapitoly 6.5. neplyne zda fragmenty klonované do vektoru pCR4 TOPO byly získány reverzní transkripcí sebraných vzorků virů nebo používaného virového standardu. Formulace v kapitole „Cíle“ mluví o standardu, ale text kapitoly 6.5 naznačuje spíše použití divokých typů virů.
 - V kapitole 6.5. se mluví o dvou navržených primerech pro hemaglutinin (HF18 a HR20). Na obrázku 16 je znázorněno 5 fragmentů genu pro hemaglutinin, získaných za použití pěti dvojic primerů. Z výše zmíněných primerů se zde ocitá jen HF18, HR20 nelze vysledovat.
 - V téže kapitole na str. 38 dole: „Celkově jsem získal 6 klonů s různě velkými

fragmenty hemaglutininu (obr. 16) a M genu.“ Vzhledem k tomu, že na obr. 16 je 5 fragmentů genu pro hemaglutinin, soudím, že byl do plazmidu pCR4 TOPO zaklonován jeden fragment genu M. O tomto fragmentu se však nedozvídáme žádné podrobnosti.

OTÁZKY:

1. Je známo, že některé látky, přítomné ve vzorcích sebraných v přírodě, mohou blokovat PCR, tak že reakce vůbec neproběhne, nebo proběhne jen částečně. Právě tyto inhibitory by měl vyvazovat Chelex. Proč nebyla tato metoda použita při analýze fekálních vzorků, kde se jistě dá očekávat velké množství různých inhibitorů?
2. V kapitole 7.2. na straně 42. nahoře se říká: „Jelikož jsem neměl veškeré možné varianty (H1-H16 a N1-N9) chřipkových aviárních virů, nemohu se 100% jistotou doložit, že žádný z negativních vzorků opravdu chřipkové viry neobsahuje.“ Znamená to, že nelze s jistotou určit přítomnost chřipkového viru za pomoci konzervativních úseků M genu, jak bylo řečeno na str. 41 ve 4. větě?
3. V kapitole 6.3.2. jsou vzorky ze Zoo Hluboká nad Vltavou testovány na subtyp neuraminidázy s negativním výsledkem. Stejně tak je negativní výsledek testu na přítomnost N1 neuraminidázy u standardního viru. A/H5N1/dk./Viet. Jak si tento neúspěch vysvětlujete? Zkoušel jste na subtyp neuraminidázy testovat i další vzorky?
4. Jaký typ vzorků (fekální, nasofaryngeální nebo kloakální výtěr) se jeví autorovi jako nejlepší? (Z hlediska snadnosti odběru, titru viru ve vzorku...)
5. Zaujal mne rozdíl ve výskytu viru mezi hnízdícími ptáky a ptáky v Zoo, oproti zvířatům odchyceným při podzimním odstřelu (kterých bylo navíc podstatně více 89 vs. 48). Jak si tento rozdíl vysvětlujete?

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Předložená diplomová práce obsahuje celou řadu velmi zajímavých a kvalitních výsledků a prozrazuje skutečný zájem posluchače o dané téma. Obdivuhodný je také objem otestovaných vzorků. Zpracování diplomové práce ale do značné míry trpí formálními a stylistickými nedostatky. Autor by si měl uvědomit, že důležitou součástí vědecké práce je i kvalitní prezentace dosažených výsledků. Celkově považuji práci za velmi dobrou a doporučuji tuto práci k obhajobě.

Návrh hodnocení školitele nebo oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

Mgr. Alena Morávková, Ph.D.