

| | |
|---------------------------|---|
| Téma diplomové práce | Optimalizace nested PCR pro detekci kandidové DNA v klinickém vzorku |
| Jméno studenta, studentky | Erika Kvasničková |
| Jméno oponenta | Mgr. Radka Bolehovská |

II. Posudek oponenta

Diplomová práce Eriky Kvasničkové má rozsah 79 stran s 27 obrázky a 9 tabulkami. Použitá literatura obsahuje 30 citací, převážně zahraničních autorů. Práce je členěna standardním způsobem, jednotlivé části jsou vyvážené a přehledné. V práci ale postrádám celkový souhrn (abstrakt).

Diplomová práce se zabývá aktuální problematikou diagnostiky infekcí způsobených kvasinkami rodu *Candida*. V teoretické části autorka popisuje epidemiologii a terapii kandidóz, včetně jejich diagnostiky. Zdůrazňuje také situaci u imunosuprimovaných pacientů, kde tyto infekce mohou vyvolávat velice závažná, v řadě případů život ohrožující onemocnění (především v případě systémové kandidózy). Především u těchto pacientů hraje včasná a správná diagnostika systémové kandidózy, eventuelně i druhová identifikace etiologického agens, důležitou roli v přístupu k léčbě.

Důraz celé práce je kladen na PCR detekci kandidové DNA, a to zejména na optimalizaci nested PCR a následně i vrstvené nested PCR. Po důkladně provedené optimalizaci byl zjištěn také vliv na citivost a specifitu oproti neoptimalizované reakci. Vše je dokumentováno řadou ukázkových obrázků gelové elektroforézy.

K práci mám pouze několik praktických a formálních připomínek. V práci jsou popsány dvě metody izolace (fenol-chloroformová extrakce a izolace pomocí YeaStar Genomic DNA kitu), ale ve výsledcích není uvedeno, zda některá z nich byla lepší či jsou srovnatelné. V případě optimalizace primerů nested PCR bych ještě vyzkoušela vyšší koncentraci primerů (př. 1,2 mikromol/l). V případě real-time PCR se nested uspořádání využívá minimálně, protože během, ve Vašem případě, 50 cyklů dochází k velikému zmnožení produktů, které při přípravě 2. reakce nested PCR představují vysoké riziko kontaminace (vyšší než u klasické nested PCR). Podmínky real-time PCR je vždy nutné přizpůsobit danému přístroji, je nutné upravit podmínky, např. koncentrace hořčíku je u real-time PCR vyšší (obvykle okolo 3 mmol/l). Nejednoznačnost výsledků real-time PCR může být také způsobena použitím nespecifického interkalačního barviva SYBR Green I, neboť je vždy nutné provést tzv. melting analýzu, kde rozlišení jednotlivých produktů (píků) nemusí být optimální. Použití PCR pro detekci jakýchkoliv patogenů z hemokultivačních nádobek je omezené, neboť je PCR reakce ve vysokém procentu inhibována. Použití nested PCR v jedné zkumavce je zcela běžnou metodou nazývanou také jako vrstvená nested PCR. V případě některých elektroforéz bych doporučovala použít DNA marker o jiném rozsahu (viz obr. 22). Možnost rozlišení jednotlivých druhů pomocí PCR je často spojena s nižší citivostí metody a opačně.

Navrhovaná klasifikace **výborně až chvalitebně (1/2)**

V Hradci Králové dne 2.6.2006

Podpis oponenta diplomové práce

V práci by bylo vhodné ujednotit psaní teplot, isoamylalkoholu (jedno se "s" a podruhé se "z"). Doporučuji také pát postupy jedním způsobem (střídání trpného rodu s "ich" formou). V práci se objevují také některé formální chyby (př. str. 23: "U mykopatogenů jsou v mnoha případech jsou používány panfungální primery. "Další protiargumentem zvyšování množství polymerázy..", „ampifikace" místo „amplifikace", slovo "standardů se píše s "d" atd.) Vhodnější je používat slovo naamplifikovaná DNA než zamplifikovaná DNA.

Celá práce je velice přínosná, neboť je zde značná možnost praktického využití získaných výsledků v přímé diagnostice kandid metodami PCR, a to zejména v biologických materiálech. Celkově lze konstatovat, že práce splnila všechny uvedené cíle, a proto ji doporučuji k obhajobě.

K autorce mám následující dotazy:

1. V kterém PCR cyklu dochází ke vzniku úplných produktů ohraničených z obou stran primery?
2. Je nutné ve všech cyklech převrstvovat PCR směsi minerálním olejem?
3. Jaký typ napětí se využívá při elektroforéze?
4. Řekněte nezkrácený název dNTPs.