

Téma bakalářské práce	<b>Využití real-time PCR v diagnostice bakteriálních meningitid</b>
Jméno studenta, studentky	<b>Jana Blažková</b>
Jméno oponenta	<b>Mgr. Lukáš Červený</b>

## II. Posudek oponenta

Bakalářská práce Jany Blažkové s názvem "Využití real-time PCR v diagnostice bakteriálních meningitid je zpracována v rozsahu 84 stran a je rozdělena do šesti kapitol: 1. úvodu, 2. teoretické části, 3. experimentální části spolu s výsledky, 4. diskuze, 5. závěru a 6. literatury. V úvodu a teoretické části se autorka zabývá charakteristikou bakteriálních meningitid a popisem jejich nejčastějších etiologických agens. Dále rozebírá možné diagnostické postupy (zmiňuje jejich přednosti a nevýhody), možnosti léčby meningitid a jejich prevence. Dalším tématem teoretické části je popis molekulárně-biologických technik a to konkrétně izolace RNA a DNA, dále polymerázové řetězové reakce (PCR) a to jak v provedení standardním, tak i real time, a nakonec gelové elektroforézy. Tato část je zpracována velice podrobným způsobem nad rámec bakalářské práce. Co se týče real-time PCR jsou v bakalářské práci vysvětleny všechny moderní přístupy jako jsou FRET a TaqMan sondy umožňující specifickou detekci dané sekvence DNA. V experimentální části jsou uvedeny výsledky detekce etiologických agens meningitid (*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus*) pomocí standardní PCR. Detekce *Staphylococcus aureus* v biologickém materiálu pomocí standardní PCR jevila značné množství nespecifit. To bylo důvodem navržení real time PCR detekčního systému s hydrolytickou sondou FAM/BHQ1. Tato metoda byla optimalizována a validována. Ve výsledcích jsou dále uvedeny počty prokázaných původců jednotlivých bakteriálních meningitid v letech 2003 - 2006 v pozitivních likvorech. Dále autorka uvádí, že díky PCR technikám se podařilo zvýšit průkaz etiologického původce o 10%, což znamená, že v současné době je potenciál detekovat 80 % etiologických agens meningitid. To v konečném důsledku vede k možnosti okamžitě zahájit cílenou terapii antibiotiky. V práci je citováno celkem 39 prací českých i zahraničních autorů. 12 odkazů je na webové stránky. Práci hodnotím celkově velmi pozitivně. Její přínos pro klinickou praxi, zjm. tedy pro diagnostiku meningitid, je neoddiskutovatelný. Určitým negativem textu ovšem je, že není jasně vyjádřený cíl práce. Otázky: 1. Bylo primárním cílem vyvinout metodu PCR detekce etiologických agens meningitid nebo real-time PCR identifikace *Staphylococcus aureus* v biologickém materiálu? 2. Jak si vysvětlujete nespecifitu detekce *Staphylococcus aureus* v biologickém materiálu pomocí standardní PCR? Nestačilo by navrhnout nové primery, specifické jen pro *Staphylococcus aureus*? 3. Budete v reálu testovat cross-reaktivitu real time PCR detekčního systému *Staphylococcus aureus* s jinými bakteriemi nebo se spokojíte s daty uvedenými v tabulce č.21?

Navrhovaná klasifikace **Výborně**

V Hradci Králové dne 21.5.2007

  
Podpis oponenta bakalářské práce

Téma bakalářské práce	<b>Využití real-time PCR v diagnostice bakteriálních meningitid</b>
Jméno studenta, studentky	<b>Jana Blažková</b>
Jméno vedoucího bakalářské práce	<b>RNDr.Hana Klusoňová, PhD.</b>

## I. Posudek vedoucího bakalářské práce

Cílem předložené bakalářské práce bylo zjištění počtu pozitivních průkazů bakteriálních meningitid v posledních třech letech pomocí molekulárně biologických metod, zpracování výsledků PCR průkazů u vybraných původců a zavedení real-time PCR pro průkaz jednoho z nich.

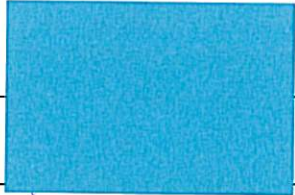
Autorka práce - paní Jana Blažková, je zkušenou a dlouholetou pracovnící laboratoře ÚKBD ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové, takže praktickou část práce - izolaci nukleových kyselin infekčních agens, jejich amplifikaci pomocí standardní PCR a detekci gelovou elektroforézou, stejně jako optimalizaci experimentálních podmínek pro real-time PCR a validizaci této metody pro *S. aureus* zvládla s přehledem a naprosto samostatně.

Co se týče úrovně sepsání práce, tato vysoce překračuje rámec požadavků kladených na bakalářskou práci. Studentka rozdělila teoretickou část na oddíl, ve kterém shrnula poznatky týkající se bakteriálních meningitid a na oddíl, ve kterém velice výstižně popisuje jednotlivé kroky vedoucí k průkazu infekce. V experimentální části stručně a jasně popsala jednotlivé kroky izolace a detekce infekčních agens. V diskuzi autorka věcně srovnává standardní a real-time PCR a dochází k závěrům, které srozumitelně, jednoznačně a samostatně formuluje.

Paní Jana Blažková sepsala a předložila bakalářskou práci, která vypovídá o její vysoké odborné erudici. Proto ji doporučuji k obhajobě a navrhuji hodnocení **v ý b o r n ě**.

Navrhovaná klasifikace **v ý b o r n ě**

V Hradci Králové dne 21.5.2007

  
Podpis vedoucího bakalářské práce