



Ústav biologie a lékařské genetiky UK 2. LF a FN Motol

V Úvalu 84, Praha 5, 150 06

Tel. 224 433 501, fax. 224 433 520

Universita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

V Úvalu 84, Praha 5, 121 08

Ivana.Tinkova@lfmotol.cuni.cz

Praha, 5. října 2013

Věc: Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Kláry Vilimovské Dědečkové

Spectabilis, Vážená komise,

v příloze zasílám svůj oponentský posudek na disertační práci Mgr. Kláry Vilimovské Dědečkové - „*Molekulární a epidemiologická charakteristika kmene Burkholderia cenocepacia dominujícího u pacientů s cystickou fibrózou v České republice*“.

Pokud byste měl jakékoli další dotazy týkající se uchazečky nebo této disertační práce obraťte se prosím na mě na této emailové adrese: milan.macek.jr@lfmotol.cuni.cz

Se srdečnými pozdravy!

Prof. MUDr. Milan Macek ml. DrSc.

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Kláry Vilimovské Dědečkové

„Molekulární a epidemiologická charakteristika kmene *Burkholderia cenocepacia* dominujícího u pacientů s cystickou fibrózou v České republice“.

Praha, 5. října 2013

Tato práce byla vypracována na Ústavu lékařské mikrobiologie (dále ÚLM) UK 2. LF Praha a FN v Motole pod odborným vedením Doc. MUDr. Pavla Dřevínka, Ph.D. V této práci je shrnuto více než 6 let práce na této důležité problematice, která zásadním způsobem přispěla k ozřejmění epidemiologické situace a patogenetické role nebezpečného kmene *Burkholderia cenocepacia* ST32 (Bcc ST32) pro pacienty s cystickou fibrózou (CF). Řešená problematika je u nás prioritní a má pozitivní klinicko-epidemiologické dopady pro Centrum cystické fibrózy ve FN v Motole (CCF), včetně dalších center u nás a v zahraničí.

Hodnocení předložené disertační práce sleduje následující oponentská kritéria:

1/ Základní scientometrická analýza.

Disertační práce je napsána čtivě, věcně a bez zásadních stylistických chyb. Po formální stránce má práce celkem 119 stran, včetně publikačních příloh, které obsahují standardní strukturu disertačních prací. V obecné části je přehledně zpracována problematika CF a role Bcc v jeho její patogenезi, morbiditě a mortalitě. Přínosný, a pro nespecialisty poučný, je rozbor taxonomie komplexu Bcc a jeho epidemiologického šíření. Vhodné je i srovnání prevalence a distribuce epidemiologického kmene Bcc. Klinickou nezbytnost této práce uvádí charakterizace kritické epidemiologické situace CCF od poloviny devadesátých let minulého století spojené se šířením epidemiologického kmene Bcc ST32. Podrobně je rozebrána i kultivační diagnostika pomocí selektivního agaru a molekulárně genetická diagnostika pomocí amplifikace genu *recA* zavedená v roce 2001 na ÚLM. Dále jsou rozebrány faktory virulence.

Velmi jsem se poučil v sekci typizace bakterií pomocí molekulárně genetických metod. Ve specifické části disertační práce je rozebrána problematika dosažených výsledků, které se budu věnovat dále. Výsledky této práce byly publikovány ve třech zahraničních publikacích (*Journal of Cystic Fibrosis*, *Journal of Clinical Microbiology*) se středně vysokým impakt faktorem, a byly adekvátně prezentovány pro domácí a zahraniční odbornou veřejnost.

Uvedený publikační výčet svědčí o velmi dobré kvalitě odborné práce uchazečky a o splnění publikačních kritéria pro disertační práce na 2. lékařské fakultě University Karlovy.

2/ Cíle a hypotézy disertační práce.

Základním cílem disertační práce Mgr. Vilimovské Dědečkové bylo a) vypracování rychlé a účinné molekulárně mikrobiologické diagnostiky Bcc, b) ex vivo studium virulence jednotlivých kmenů Bcc na zvířecích modelech (zebrafish), včetně c) studia diversity plicního mikrobiomu u pacientů kolonizovaných epidemickým kmenem.

V souhrnu lze uvést, že cíle a hypotézy předkládané práce jsou adekvátně uvedeny a tak odpovídají obecným postupům uplatněným v epidemiologii a molekulární mikrobiologii.

3/ Aktuálnost zvoleného tématu disertační práce.

Mgr. Vilimovská Dědečková zvolila medicínsky důležitou a dosud ne zcela dořešenou problematiku vypracování rychlé a citlivé diagnostiky epidemického kmene Bcc ST32. Tato práce měla zásadní dopad pro monitoring epidemiologických opatření v CCF k zamezení dalšího šíření tohoto epidemického kmene. Rovněž analýzy zvířecího modelu virulence Bcc izolovaných od různých pacientů v různých stádiích infekce jsou průkopnické, jakož i stanovení molekulárního mikrobiomu u CF pomocí typizace mezigenového segmentu mezi ribozomálními geny 16S a 23S rRNA.

Studovaná problematika má i potenciální farmakoekonomické dopady z hlediska případné prognostické stratifikace pacientů s CF. V souhrnu uchazečka uchopila důležitou problematiku, kde nebyly dostatečně standardizované metody, a kde vyvstala naléhavá nutnost vypracování přesnějších diagnostických postupů.

4/ Použité metody v rámci disertační práce.

O velmi dobré metodické úrovni svědčí široké spektrum použitých klinických a laboratorních postupů, včetně náročné práce se zvířecími modely. Nejsem sice expert na molekulární mikrobiologii, ale velice si cením standardizace a validace metod podle obecných principů. Statistické metody jsou přiměřené a prověřené oponenty mezinárodních časopisů.

5/ Nové poznatky disertační práce a jejich význam pro další rozvoj oboru.

Mgr. Vilimovská Dědečková potvrdila důležitou roli molekulárně genetické diagnostiky v rutinní diagnostické klinické praxi při vyšetřování přítomnosti Bcc. Z klinického úhlu pohledu je potěšitelné, že citlivá molekulárně genetická diagnostika prokázala, že poslední případ infekce tímto epidemickým kmenem Bcc ST32 byl v roce 2004. Jinak řečeno správnost epidemiologických opatření v CCF byla potvrzena citlivým molekulárně-mikrobiologickým testem. V tomto ohledu je přínosné provedení genomické subtraktivní hybridizace v genomu Bcc ST32, které vedlo k navržení diagnostického testu na bázi PCR, což doplnilo stávající metody diagnostiky a genotypizace jednotlivých subtypů Bcc.

Z vědeckého hlediska a nad rámec řešení konkrétní epidemiologické situace v CCF bylo zjištění vysokého stupně variability ve virulenci klinických izolátů Bcc ST32 izolovaných od stejných pacientů z různých fází infekce, ale i od různých pacientů na „zebrafish“ zvířecím modelu.

Pozoruhodný je rovněž nález snížené diverzity plicního mikrobiomu u pacientů kolonizovaných Bcc, včetně nízké míry superinfekce *Pseudomonas aeruginosa*, což otevírá prostor pro další studie tohoto důležitého fenoménu.

Velmi si cením studia virulence Bcc na zvířecím modelu *Danio rerio* alias „zebrafish“ na spolupracujících zahraničních pracovištích ve Francii (Montpellier, Nîmes) v rámci studijního pobytu uchazečky. Metodika přežití mikroorganismu v hostiteli nebo analýza průběhu infekce v reálném čase jsou metodicky inovativní, a poctivě řečeno i pracné. Zde byly studovány epidemické izobáty z CCF z různých klinických stavů a fází infekce. Presentované výsledky odpovídají hypotéze, že lze na zvířecím modelu prokázat variabilitu virulence jednotlivých kmenů, což se jistě odrazí v budoucí kvalitní publikaci.

Vzhledem k dlouhodobému zaměření této studie dosáhla Mgr. Vilimovská Dědečková prioritních výsledků na domácí a evropské úrovni. Dosažené poznatky otevírají metodický prostor pro další studie tohoto typu, ať už u CF (dětí a dospělých) nebo dalších respiračních onemocnění.

Otázky oponenta:

1/ z pozice klinického genetika bych se chtěl zeptat, zda by bylo možné v souboru vysledovat případné nepřímé asociace virulence Bcc vzhledem k přítomnosti různých mutací v genu *CFTR* u studovaných pacientů (pochopitelně stačí uvést orientačně v souvislosti s malým počtem studovaných případů)?

2/ byly nalezeny rozdíly ve virulenci Bcc mezi pohlavími u studovaných pacientů?

3/ do jaké míry jsou výsledky nalezené u „zebrafish“ aplikovatelné / replikovatelné u dalších modelových organismů?

Závěr: Disertační práce Mgr. Vilimovské Dědečkové je modelová a přínosná i pro jiné molekulárně mikrobiologické studie u dalších plicních onemocnění. Práce je tedy nejenom odrazem specifické problematiky CF, ale i vývoje celého oboru.

Předložená práce je věcná a má velmi dobrou odbornou úroveň, se širokým komplexem použitých klinických a diagnostických metod. Předložené výsledky prošly zasvěceným kritickým hodnocením v impaktovaných časopisech, což vše jednoznačně svědčí o tom, že uchazečka má velmi dobré znalosti studovaného oboru.

Na předložené disertační práci jsem nenašel žádné formální a formulační nedostatky a **tak ji mohu plně doporučit k obhajobě**. Disertační práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné vědecké práci a **tak doporučuji udělení titulu „Ph.D“ za jménem**.

S pozdravy!



Prof. MUDr. Milan Macek ml, DrSc.