



Oponentský posudek na doktorskou dizertační práci Mgr. Lenky Baškové

Molekulární detekce invazivních mykotických onemocnění u imunokompromitovaných pacientů

Předkládaná práce popisuje některé teoretické a zejména experimentální aspekty vývoje a validace 3 PCR metod pro kvantitativní detekci a identifikaci kvasinkové a plísňové DNA v biologickém materiálu. Zvolené téma velice dobře reaguje na současný stav a trendy v oboru molekulární genetiky a diagnostiky.

Práce je přehledně členěna. Teoretická část podpořená více jak 150 citacemi podává stručný, avšak plně dostačující přehled všech metod v současnosti využívaných pro identifikaci plísní a kvasinek způsobující invazivní mykotická onemocnění. Metody jsou členěny na kulturační a ostatní, kde je prokazován buď specifický antigen, protilátky nebo přímo DNA patogenního organismu. Ačkoliv největší díl experimentů probíhal v letech 2001 – 2006, je pozitivní, že teoretická část dokumentuje současný stav znalostí molekulárně genetických přístupů průkazu a identifikace patogenních plísňových i kvasinkových organismů. V některých pasážích textu jsem však postrádala konkrétní údaje, které by potvrdily autorčino hodnocení a shrnutí významu metody pro klinickou praxi (hl. str. 20, 21, 22). Také pasáž na str. 22 nahoře, upozorňující na metodu průkazu specifických protilátek proti *C. albicans* s téměř 100% sensitivitou a specificitou testu, by zasloužila větší prostor. Doporučila bych důslednou vyváženost všech kapitol v teoretické části.

Studentka se vyvarovala běžných formálních chyb, jako jsou např. překlepy, špatně citovaná literatura, používání hovorových laboratorních výrazů. Kladně hodnotím i fakt, že kvalita vyvíjených metod byla ověřována i pomocí biologického materiálu odebraného pacientům s dokumentovanou invazivní mykózou.

V další části posudku uvedu pouze drobné připomínky a náměty k diskuzi, které se vzhledem k mé specializaci budou týkat hlavně metodické části práce.

- Negativně hodnotím vložení všech tabulek, grafů až na konec příslušných kapitol. Logické začlenění těchto dat přímo do výsledkové části by určitě zvýšilo přehlednost textu spolu s následující diskuzí dosažených výsledků.
- Na str. 41 (dole) dizertantka uvádí, že metoda byla validována pomocí vzorků od 17 pacientů s potvrzenou IFD diagnózou, vzorky od zdravých dárců v tomto případě nebyly testovány? Jak

byla vyhodnocována míra rizika kontaminace vzorků? Byl některý biologický materiál rizikovější než ostatní?

- Chybné číslování obrázku na straně 87.
- Zaujalo mne tvrzení, že citlivost testu (32 a 37 fg pro *Aspergillus* a *Candida* sp., str. 42) je stejná jako u metody, kde je vložen krok detekce DNA kapilární elektroforézou (32 a 37 fg pro *Aspergillus* a *Candida* sp., str. 77). Dizertantka hodnotí detekční limit jako reprodukovatelný, kolikrát byl experiment opakován? Tato informace chybí.

Na závěr bych měla na dizertantku některé dotazy, týkající se předložené problematiky. Prosím o stručné odpovědi.

- 1) Zajímalo by mne v jaké fázi je nyní patentové řízení na 2 panAC a panfungal PCR metody. Lze uvažovat i o zavedení metod do praxe? Probíhá další testování a validace těchto metod na pracovišti, kde byly vyvinuty?
- 2) Měla dizertantka při validaci testů a identifikaci patogenů k dispozici výsledky parametrů aktuálního stavu imunitního systému testovaných pacientů? Souvisí skladba patogenů s typem geneticky podmíněné imunodeficiency či imunosuprese vyvolané iatrogeně?
- 3) Již dnes lze v klinické praxi provádět identifikaci patogenních bakterií pomocí hmotnostní spektrometrie. Identifikace je založena na průkazu proteinů specifických pro daný bakteriální rod nebo kmen. Nedílnou součástí metody je databáze všech patogenních kmenů běžně se vyskytujících v populaci. Existuje dnes již i podobná databáze pro patogeny způsobující plísňová a kvasinková invazivní onemocnění?
- 4) Jaká je dynamika imunitní odpovědi při invazi kvasinkových patogenů, jaká jsou „imunologická okna“ pro metody prokazující přímo DNA, proteiny patogenního organismu nebo nepřímo specifické protilátky?
- 5) Autorka zmiňuje vysoké riziko kontaminace vyšetřovaného materiálu, jsou nějaká úskalí při odběru biologického materiálu? Jaký objem plné krve nebo CSF byl pro tyto testy odebírán a je doporučován (str. 30, 41)?

Uvedené připomínky a náměty nikterak nesnižují vysokou odbornou úroveň předložené práce. Kvalitu práce dokládají i 2 hodnotné publikace, kde je dizertantka první autorkou nebo spoluautorkou. Výsledky práce otištěné v časopise s IF 9,56 se vysoce vymykají standardům pro

doktorské studium. Dizertantka prokázala schopnost na odborné úrovni popsat vymezenou problematiku a zasadit ji do kontextu současného stavu diagnostiky patogenů, způsobujících invazivní mykotická onemocnění. Autorka prokázala schopnost samostatně řešit složité vědecké problémy a pro jejich řešení využívat nejmodernější postupy. Autorka splnila vytčené cíle práce beze zbytku. Vzhledem k uvedenému doporučuji práci přijmout k obhajobě a Mgr. Baškové po úspěšné obhajobě udělit titul Ph.D.

V Pardubicích 28. 5. 2013

Doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.