



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**  
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 – Motol

**I. infekční klinika**  
**Doc. MUDr. Dušan Pícha, CSc.**  
přednosta kliniky

E-mail:dusan.picha@lfmotol.cuni.cz

---

V Praze dne: 11. 8. 2013

Vážený pan, Spectabilis  
Prof. MUDr. RNDr. Miroslav Červinka, CSc.  
Děkan  
Lékařská fakulta UK  
500 38 Hradec Králové

### **Oponentský posudek**

dizertační práce Mgr. Petry Kučerové

### **Molekulárně biologické metody v laboratorní diagnostice patogenních leptospir**

Prostudovala jsem předloženou dizertační práci a předkládám své hodnocení

#### **1. Hodnocení dizertační práce po stránce formální.**

Dizertační práce je předložena v klasické svázané formě, je poměrně rozsáhlá, má 167 stran, vlastní práce s literaturou je uvedena na 156 stranách, zbývající strany obsahují 15 příloh. Cíle práce uvedené na str. 14 jsou uvedeny v 5 bodech a mají konkrétní formace pro praktické použití. Práce je vhodně rozčleněna na úvodní teoretickou část (historické aspekty leptospirózy, jejich taxonomie, kultivace, epidemiologie, patogeneze, uvádí klinickou i laboratorní diagnostiku a léčbu leptospiroz a podrobněji se věnuje molekulárně biologickým metodám PCR a jejich využití v mikrobiologii, ve vlastním souboru vyšetřovaného biologického materiálu uvádí nejenom práci s laboratorními kmeny, vzorků z vnějšího prostředí, ale i epidemiologické šetření výskytu leptospiroz a posléze vlastní metody a výsledky, následně s bohatou 11 stránkovou diskusí a závěrem práce, hodnotící práci po bodech stanovených v cílech práce.



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**  
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 – Motol

**I. infekční klinika**  
**Doc. MUDr. Dušan Pícha, CSc.**  
přednosta kliniky

E-mail:dusan.picha@lfmotol.cuni.cz

---

V Praze dne: 11. 8. 2013

Práce je výborně graficky zpracována, úvodní část obsahuje 30 obrázků a 2 tabulky, které jsou vloženy do textu a velmi dobře doplňují text. Obrázky výborně ozřejmují PCR metody nejen pro laboratorního pracovníka. Vlastní práce obsahuje dalších 13 obrázků a 4 grafy, v příloze je uvedených ještě dalších 17 grafů a obrázků z vlastní práce. Seznam literatury je bohatý, autorka uvádí v práci celkem 147 citací. Většinu představují citace zahraniční literatury v posledních 10 letech, pouze u dvou se jedná o autocitace, v těchto jsou však již výsledky dizertační práce, v 1 případě s IF.

Práce je napsána pěknou češtinou, text je dobře srozumitelný, vyskytuje se v něm jen minimum překlepů a pravopisných chyb. Seznam zkratk je adekvátní, zkratky jsou řádně vysvětleny. U některých ne zcela zvyklých zkratk (pro klinika) by bylo vhodnější použít vysvětlení v textu.

## **2. Hodnocení dizertační práce z hlediska zvoleného tématu**

Celosvětově stoupá význam zoonóz v lidském onemocnění. Také leptospiroza se stává globálním problémem. I když incidence v ČR je nízká a příliš se nemění, vyšší incidence bývá zaznamenávána zejména po povodních ale pouze v postižených oblastech. Z hlediska klinických příznaků vypadávají z diagnostiky zejména osoby v první fázi onemocnění – netypický febrilní stav (často však s pozitivní epidemiologickou anamnézou), buďto že diagnóza není zvažována, nebo že v tomto období je nepřímá diagnostika negativní. Navíc jak sama autorka uvádí, nejsou kromě lidských infekcí v EPIDATu dlouhodobě dostupná data o situaci v zevním prostředí. Považuji i tuto epidemiologickou část práce (zejména z pohledu infekcionista) za velice záslužnou.

## **3. Hodnocení dizertační práce ke zvoleným metodám zpracování**

Autorka si v cílech své práce stanovila náročné cíle. Metody práce byly zvoleny velmi dobře, kromě zavedení molekulárně biologických metod do klinického provozu vhodnou metodu pro diagnostiku akutní formy, určit metodiku pro sekvenaci DNA patogenních leptospir, modifikace PCR metodiky pro vzorky zevního prostředí, stanovení diagnostické specifity a senzitivity a velice důležitou konfirmaci výsledků PCR. Všechny metody splňují předpoklady správného diagnostického postupu



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**  
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 – Motol

**I. infekční klinika**  
**Doc. MUDr. Dušan Pícha, CSc.**  
přednosta kliniky

E-mail:dusan.picha@lfmotol.cuni.cz

---

V Praze dne: 11. 8. 2013

#### **4. Hodnocení výsledků dizertační práce a nové poznatky, které přinesla**

Autorka splnila cíle, které si stanovila a přinesla tyto nové poznatky:

- 1. Navrhla a vypracovala RT PCR metodu** pro detekci genu kódujícího povrchový AG, typický pro patogenní leptospiry. Metoda byla ověřena na 230 laboratorních kmenech. **Výsledek je k dispozici do 5 hodin a umožní stanovit diagnózu v prvním týdnu onemocnění** na rozdíl od dosud používané MAT
- 2. Pro sekvenaci DNA patogenních leptospir byla navržena metodika MLST**, nepodařilo se však determinovat sekvencí DNA typickou pro Weilovu chorobu
- 3. Modifikace PCR metodiky nebyla vhodná pro detekci patogenních leptospir ve vzorcích ze zevního prostředí.**
- 4. V epidemiologickém šetření bylo vyšetřeno 5840 pacientů** z Pardubicka, Hradecka a části Vysočiny s podezřením na leptospirozu, 101 bylo pozitivních (1,7%). Nejvyšší výskyt byl v roce 2002 a 2005 v souvislosti s povodněmi (incidence 1,83 a 2,17/100.000 obyvatel). **Nejčastějším typem byl sérovar *L. grippityphosa***
- 5. Byla stanovena diagnostická specifita a senzitivita MAT a ELISA – potvrzení PCR vyšetření.** Podařilo se prokázat (vyšetřením 1553 příslušníků AČR), že metoda MAT má 100% diagnostickou senzitivitu i specifitu, podobnou senzitivitu má i ELISA, specifita IgG Ab je 54,3%, IgG Ab 54,3%, proto **pro potvrzení PCR byla doporučena MAT**



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**  
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 – Motol

**I. infekční klinika**  
**Doc. MUDr. Dušan Pícha, CSc.**  
přednosta kliniky

E-mail:dusan.picha@lfmotol.cuni.cz

---

V Praze dne: 11. 8. 2013

**6. Dizertační práce splnila sledovaný cíl, lépe řečeno cíle. Práce byla rozsáhlá jak v přípravě diagnostických metod, jejich ověření a confirmaci na velkém počtu zkoumaných, tak ve významném epidemiologickém šetření. Z hlediska klinického je především důležitá včasná etiologická diagnóza, sledována včasnou antibiotickou léčbou s možností confirmace klasickou laboratorní metodou MAT**

Dizertační práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci. Výsledky byly publikovány v renomovaných časopisech.

K autorce mám jedinou otázku: výsledky její práce potvrdily, že použité metody zlepšují včasnou diagnostiku leptospirózy a tím i včasné léčby, snižující rizika komplikací a následných stavů. Zřejmě však je finančně náročnější. Nebylo by vhodné ve spolupráci s infekční klinikou v Hradci Kálové připravit doporučený postup, který by pak prošel oponenturou společností ČLS JEP?

Předložená práce splňuje požadavky kladené na doktorskou dizertační práci. **Doporučuji obhajobu práce před Vědeckou radou a rovněž doporučuji udělení titulu „Ph.D.“**

**Posudek dizertační práce zpracovala:**

Doc. MUDr. Vilma Marešová, CSc.

1. Infekční klinika 2. LF UK a

Vedoucí katedry infektologie IPVZ

Nemocnice Na Bulovce

180 81 Praha 8

maresovv@email.cz



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**  
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 – Motol

**I. infekční klinika**  
**Doc. MUDr. Dušan Pícha, CSc.**  
přednosta kliniky

E-mail:dusan.picha@lfmotol.cuni.cz

---

V Praze dne: 11. 8. 2013