

Oponentský posudek

na disertační práci

**„Molekulárně biologické metody v laboratorní diagnostice
patogenních leptospir“,
kterou předkládá**

Mgr. Petra Kučerová

Předložená disertační práce je napsána na 167 stranách strojopisného textu, doplněná 19 tabulkami a 4 grafy a 43 obrázky. Práce je doplněna 17 přílohami, které vhodně dokreslují výsledky práce. Literatura zahrnuje významné publikace jak tuzemských, tak i zahraničních autorů a obsahuje 145 citací. Předložená práce má klasické členění, které je v těchto případech vyžadováno.

Hodnocení práce

1) Význam zvoleného tématu v oboru

Leptospiróza je závažná přírodně ohnisková zoonóza, která patří patrně k nejrozšířenějším infekčním chorobám, jak mimo jiné uvádí autorka i v literárním přehledu. S onemocněním leptospirami se setkáváme i v našich podmínkách, i když případy onemocnění nejsou tak časté. K výraznějším epidemiím dochází většinou při změněných klimatických podmínkách, jako jsou např. povodně a záplavy. V takových obdobích jsou evidovány i smrtelné případy onemocnění. I z tohoto krátkého úvodu je zřejmé, že leptospirózu, jako infekční onemocnění, nelze ani v dnešní době podceňovat. Dosavadní diagnostické metody však nejsou schopny zachytit akutní fázi infekce, což činí značné problémy hlavně klinikům z hlediska nasazení včasné terapie. Proto práce, které se snaží najít a v praxi uplatnit rychlé diagnostické testy, považuji za aktuální a prakticky potřebné. Lze konstatovat, že předkládaná disertační práce, která se zabývá využitím molekulárně biologických metod v laboratorní diagnostice patogenních leptospir, tyto skutečnosti splňuje, a proto považuji zvolené téma za aktuální.

2) Metodika zpracování

Metodika práce a používané vyšetřované metody odpovídají záměru a cílům předkládané práce a jsou poměrně obsáhle v práci popsány. Do vyšetřování byly zahrnuty jak laboratorní kmeny leptospir používané k sérologické diagnostice v našich podmínkách, tak i referenční kmeny z Royal Tropical Institute Holandsko. Vyšetřovány byly biologické materiály od pacientů se suspektní leptospirozou a dále pak vzorky vnějšího prostředí. Provedeno bylo i epidemiologické šetření výskytu leptospirozy v Královohradeckém, Pardubickém kraji a kraji Vysočina. Krevní séra byla vyšetřována jak klasickými metodami (MAL a ELISA), tak i molekulárně biologickými metodami (PCR, rt PCR, MLST analýza).

3) Výsledky práce a dosažení nových poznatků

Výsledky dosažené pomocí molekulárně biologických metod jsou porovnávány s výsledky dosaženými běžnými diagnostickými testy a následně jsou navrženy nové metody pro rychlou diagnostiku leptospirozy, čímž splňují i zadané cíle předkládané práce, které jsou stanoveny v 5 bodech na straně 14 disertační práce.

a) byla navržena a vypracována rt PCR metoda detekce genu kódujícího povrchový lipoprotein LipL 32, který je typický pro patogenní leptospiry. Metoda byla ověřena jak na laboratorních kmenech tak i biologickém materiálu.

b) pro průkaz patogenních leptospir metodou PCR s následnou sekvenací pro důkladnější identifikaci leptospir byla navržena tzv. MLST metoda (Multiplex Locus Sequence Typing), která využívá při PCR reakci pět různých lokusů, jejichž produkty se následně používají k sekvenční analýze. Výsledky sekvenční analýzy byly analyzovány pomocí různých internetových programů pro bližší identifikaci leptospir.

c) komerční ELISA metodou (komerční Serion ELISA kit) bylo vyšetřeno 1553 vzorků krevních sér. Jako konfirmační metoda byla použita metoda aglutinace-lýze (MAL). Při hodnocení výsledků vyšetření došlo mezi těmito metodami k výrazné diskrepanci v dosažených výsledcích a na jejich základě autorka považuje ELISA metodu za nevhodnou pro diagnostiku akutní leptospirozy.

d) z hlediska mapování a vyhodnocování území republiky z pohledu rizikivosti leptospirózy řešitelka zařadila vyšetření 680 vzorků vod (tekoucí, stojaté, nátoky na čistírny odpadních vod). Z dosažených výsledků řešitelka usuzuje, že metoda rt PCR pro LipL 32 není vhodná pro testování takto náročných materiálů

e) epidemiologické šetření zahrnovalo vyšetření 5840 pacientů se suspektní leptospirózou. Výsledky potvrzují i výsledky jiných epidemiologických šetření z hlediska incidence onemocnění evidovaných v ČR. Poukazují na vyšší incidenci v období povodní a záplav a potvrzují dominanci leptospir sérovaru *L. grippotyphosa* při vzniku onemocnění.

Připomínky k předložené práci (formální):

Práce je napsána kultivovanou formou. Přesto bych chtěl upozornit, že se autorka nevyhnula překlepům a nepřesným formulacím, které však nesnižují odbornou hodnotu předložené práce. Spíš je uvádím proto, aby se jich autorka nedopouštěla, pokud bude výsledky publikovat v odborných časopisech.

Str. 13.: Druhá věta v úvodu nedává smysl, něco tam chybí. Otázkou je zda infekce se stává globálním zdravotním problémem, možná spíše onemocnění.

Str. 23.: že by se řezníci veterináři či chovatelé dobytka nakazili pitím mateřského mléka – asi by to chtělo trochu jinou formulaci.

Str. 23.: je správné označení „kolonizace“?

Str. 23., 24., 31., 32.: pozor na označování sérovarů. Velkými písmeny se označují sérologické skupiny, sérovary pak malými písmeny na začátku.

Str. 25.: *L. sejroe* M64 je chyba, má být *L. sejroe* M84. *Sorexjalna* – je chybně; má být *Sorex jalna* (opakuje se)

Str. 26.: V tabulce 2., opět chyba v označování sérovarů – viz str. 23. – 24.

Str. 38.: jak je doxycyklin využíván v profylaxi leptospirózy?

Str. 46.: ve větě „Fluorescenci: je pravděpodobně navíc jedno „u“; v roztoku – má být v roztoku.

Str. 65.: Vijayachari a kol. 2004 – cit. literatury 136 Vijayachari – co je správné?

Str. 68.: Na našem území se kmeny nevyskytují, vyskytují se sérovary. Těchto 11 laboratorních kmenů se používá pouze pro laboratorní diagnostiku. Nejedná se ani o kmeny, které by byly na našem území izolovány. Např. kmen *L. sejroe* M84 byl izolován Borg-Petersenem v Dánsku již v roce 1938. Stejně tak i u některých dalších kmenů.

Borrelia burgdorferi (klinický izolát) – jednalo se o *B. burgdorferi* s.l., nebo s.s.

Str. 68.,71. – 72.: jsou chyby v mezerách – např. *L. weilii* – má být *L. weilii*; stejně i dále.

Str. 73.: jak je to s výskytem krysy obecné (*Rattus rattus*) na našem území.

Str. 101.: znovu chyba nejedná se o kmeny izolované na území ČR, jak již bylo výše konstatováno.

Str. 103.: proč se najednou používá anglické označení serogroup?

Str. 105. - 106.: jak jste zjistili reakci v titru 1:50, když v metodice uvádíte základní ředění séra 1:50 + stejné množství kmene a máme výsledné ředění 1:100.

Řada drobných nepřesností se vyskytuje i v souboru literatury, především chybí zdroj 84 a 85, nebo jde o špatné číslování?

Dotazy na disertantku:

Je možné pomocí PCR prokázat v organismu postiženého jedince, např. i mrtvé původce popřípadě jejich fragmenty, nebo jsou detekovány pouze živé mikroorganismy?

Podle jaké metodiky bylo prováděno sérologické vyšetření metodou MAL a jakou vypovídající hodnotu má jednorázové sérologické vyšetření ve vztahu ke zjištěným klinickým příznakům?

Můžete vysvětlit princip koaglutinace a paradoxní reakce při sérologickém vyšetření na přítomnost protilátek proti leptospirám při použití metody MAL?

Jaké klinické příznaky by disertantka upřednostnila pro vyslovení podezření z onemocnění leptospirózou?

Jaká je možnost profylaxe proti leptospiróze a jaký typ se používá v našich podmínkách?

Závěr

Předložená disertační práce splňuje kritéria, která jsou v případě disertačního řízení požadována, prokazuje teoretickou a odbornou erudovanost disertantky. Práce splnila sledovaný cíl a zároveň přináší nové a praktické poznatky, kterých lze využít při rozvoji vědního oboru „**Lékařská mikrobiologie**“.

Doporučuji, aby práce byla přijata jako podklad dalšího disertačního řízení.

V Brně 31. 07. 2013

**prof. MVDr. František Tremel, CSc.
Ústav infekčních chorob a mikrobiologie
FVL VFU Brno**