

**ÚSTAV INFEKČNÍCH CHOROB A EPIZOOTOLOGIE
FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ
VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO
Palackého 1-3, 612 42 Brno**

Přednosta:
Prof. MVDr. František Tremel, CSc.

Tel.: 420-5- 41 56 23 07
Fax: 420-5-74 88 41
E-mail: tremf@vfu.cz

Oponentský posudek na disertační práci

Mgr. MARKÉTY VYDRŽALOVÉ

„*Mycoplasma hominis* v genitálním ústrojí žen“

Předkládaná disertační práce představuje ucelený vědecký spis, který je členěn do obvyklých předepsaných kapitol a který je doplněn přehlednými tabulkami, grafy, schémata a obrázky. V seznamu použité literatury je uvedeno 111 citací, včetně elektronických zdrojů.

Práce se zabývá problematikou *M. hominis*, její diagnostikou, vzájemným srovnáním použitých metod, souvislostmi mezi přítomností uvedeného agens v genitálním traktu žen, jejich zdravotním stavem, věkem a jimi používanou antikoncepcí. Dílčím cílem práce bylo též stanovení citlivosti izolovaných kmenů *M. hominis* k vybraným antibiotikům.

Autorka si zvolila velmi aktuální a současně velmi komplikované téma, kterému se po vědecko-výzkumné stránce věnuje v České republice, ale i v zahraničí jen malý počet pracovišť. Mykoplazmata obecně jsou spojována s celou řadou onemocnění, a to nejen u člověka, ale i u zvířat. Avšak až na poměrně vzácné případy, kdy tyto původci hrají zcela evidentně primární úlohu při vzniku onemocnění, jsou mykoplazmata vesměs chápána jako komenzálové či potenciální patogeny,

kteře se uplatňují nebo se mohou uplatňovat při vzniku infekcí především polyfaktoriálního charakteru. Přestože v humánní i veterinární medicíně v posledních desetiletích postupně přibývá nových poznatků o těchto atypických baktériích, patogeneze mykoplazmových infekcí zůstává stále velmi nejasná. Na základě současných znalostí je proto nanejvýš obtížné se jen i pokusit definovat jejich úlohu při vzniku daného infekčního procesu. Každá snaha o řešení zmíněné problematiky a každá nově získaná informace má tudíž mimořádný význam pro rozvoj této vědní oblasti a zaslouží si ocenění.

Dílčí cíle práce jsou jasně a srozumitelně formulovány a jak vyplývá z dosažených výsledků, byly splněny.

Materiálové i metodické zázemí je vhodně zvolené a přiměřené vytýčeným cílům. Autorka do své práce zařadila jak klasické diagnostické postupy (kultivační vyšetření), tak i nejmodernější, molekulárně-biologické techniky. Pro stanovení citlivosti izolátů *M. hominis* vůči vybraným antibiotikům si vybrala zkumavkovou diluční metodu. Pečlivým zpracováním dosažených výsledků Mgr. Vydržalová dospěla k řadě významných zjištění:

- Optimalizovala postup pro transport a zpracování vyšetřovaných vzorků, což je prvořadým předpokladem pro úspěšný záchyt mykoplazmat. Jak je známo, mykoplazmata patří díky své morfologii k velmi choulostivým mikroorganismům a podcenění správného odběru vzorků a jejich odpovídajícího transportu vede často ke znehodnocení vzorků a tím k zavádějící interpretaci výsledků.
- Pro přímý průkaz *M. hominis* ve stěrech z děložního krčku autorka zavedla metodu PCR, kterou uzpůsobila pro podmínky své laboratoře a pro co nejnižší detekční limit (0,56 pg). Touto metodou se autorce podařilo prokázat *M. hominis* ve čtyřech dalších vzorcích, které kultivační metodou byly označeny jako negativní. Z autorkou uvedených výsledků je zřejmé, že tato tzv. klasická PCR metoda je vysoce senzitivní i specifická a že ji lze spolehlivě využít jak k identifikaci izolátů *M. hominis*, tak i k přímému průkazu tohoto agens v transportních médiích.
- Dále optimalizovala a zavedla metodu real-time PCR, s jejíž pomocí vyšetřovala vzorky amniové tekutiny gravidních žen. Vzájemným porovnáním s metodou kultivační odhalila pomocí kappa koeficientu

střední shodu obou metod. Podle očekávání i real-time PCR se ukázala být velmi vhodnou metodou pro rychlou a přesnou diagnostiku *M. hominis*, a to především ve vzorcích s nižší koncentrací mikroorganismu .

- Při stanovení citlivosti kmenů *M. hominis* k vybraným antibiotikům, determinovala účinnost jednotlivých testovaných preparátů a vymezila úroveň rezistence.

Přestože statistické vyhodnocení dosažených výsledků neprokázalo souvislost mezi nálezem *M. hominis* a jednotlivými diagnózami či dalšími sledovanými faktory ve skupině vyšetřovaných žen, je žádoucí i nadále nepodceňovat infekce mykoplazmového původu a věnovat jejich laboratorní diagnostice zvýšenou pozornost. Lze proto jen plně podpořit autorčina doporučení pro klinickou i laboratorní praxi, která uvádí v závěru své práce.

K předložené disertační práci mám **připomínky** pouze formálního charakteru:

- V autoreferátu uvádíte, že *M. hominis*, je nejmenší známý mikroorganismus...Není to tak docela pravda, mnohem menší je např. *M. genitalium*. Pokud se týče Mollicutes, zdaleka nejmenší jsou příslušníci rodu *Ureaplasma*. V disertační práci však již tyto charakteristiky uvádíte správně.
- V kap. „Materiál a metody,“ a pak i na dalších místech práce, definujete soubor vyšetřovaných žen jako „ náhodně vybraný“. Náhodný výběr však podléhá určitým zákonitostem. Pokud nebyly brány v úvahu, bylo by vhodnější vypustit termín “náhodný“.
- Ve Vaší práci používáte pro metodu real – time PCR zkratku RT-PCR. Tato zkratka se však nejčastěji používá pro metodu reverse-transcription PCR.
- Správné a úplné označení původce plicní nákazy skotu je *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (small colony type).
- Při popisu Petriho misek by bylo vhodnější namísto „umělohmotné“ použít označení plastové, případně polystyrenové.

- V legendě k obr. č. 10 uvádíte, že jamka 1- 7 obsahuje různé vzorky, vyšetřované vzorky jsou však nanесeny pouze do jamek č. 1-5, ve zbývajících jsou již jen kontroly.
- Mnohem přesvědčivěji by působily obrázky dokumentující PCR produkty v gelu, kdyby u markeru byla uvedena velikost fragmentů.

K doktorandce mám následující otázky:

1. U některých animálních mykoplazmových druhů např. *M. agalactiae*, *M. bovis* a *M. gallisepticum* byly popsány mechanismy antigenní variability, které umožňují zmíněným druhům tzv. unikat před obrannými funkcemi imunitního systému hostitele. Existují podobné mechanismy i u humánních druhů?
2. V kap. „Extragenitální infekce“, na str. 21 se zmiňujete o výskytu mykoplazmat v krvi pacientů. Je tím míněna mykoplazmémie? Pokud ano, je Vám známo, jak dlouho přetrvávala?
3. V téže kapitole a témž odstavci také uvádíte, že v krvi pacientů byly zjištěny i jiné druhy mykoplazmat. Je Vám známo které? Jedná se o druhy, které dlouhodobě patří taxonomicky k rodu *Mycoplasma* anebo o druhy, u kterých došlo k jejich reklasifikaci, jak se s tím setkáváme v poslední době ve veterinární medicíně (např. bývalý rod *Eperythrozoon* a *Haemobartonella*)?
4. Zaznamenala jste nějaký významnější rozdíl při použití sestavených médií pro kultivaci *M. hominis* ve srovnání s *Mycoplasma Selective Supplement G* (fy Oxoid)?
5. Ve své práci jste se nezabývala serologickou diagnostikou, ani identifikací *M. hominis* pomocí specifických protilátek. O těchto metodách se pouze zmiňujete. Jsou Vám známy údaje, zda dochází a v jaké míře při těchto reakcích ke křížové reaktivitě?
6. Proč bylo kultivační vyšetření stěrů z děložního krčku a amniové tekutiny prováděno odlišným kultivačním postupem?
7. Z jakého důvodu jste zvolila pro vyšetření stěrů z děložního krčku „klasickou“ PCR a pro vzorky amniové tekutiny real-time PCR?

8. Proč byl odlišný postup izolace DNA u vzorků stěrů z děložního krčku (chlor-fenolová extrakce) a u vzorků amniové tekutiny (komerční souprava)?
9. Máte osobní zkušenost i s laboratorní diagnostikou chlamýdiových infekcí v genitálním aparátě žen? Hodláte se v budoucnosti věnovat komplexněji této problematice?

Závěr:

Předkládaná disertační práce je zpracovaná velmi pečlivě a na vysoké odborné úrovni. Jsou z ní zřejmé hluboké znalosti a intenzivní zájem doktorandky o řešenou problematiku. Dosažené výsledky přinášejí řadu nových poznatků a významným způsobem tak přispívají nejen k rozšíření informací v daném oboru, ale mohou napomoci zrychlit a zpřesnit rutinní laboratorní diagnostiku genitálních infekcí. Doktorandka jednoznačně prokázala, že se výborně orientuje ve zvolené problematice, a proto d o p o r u ě j i, aby disertační práce Mgr. Markéty Vyržalové byla přijata k obhajobě a aby jí po úspěšném obhájení a vykonání státní doktorské zkoušky byl udělen titul „Philosophiae Doctor“ (Ph.D) v oboru „Lékařská mikrobiologie“.

Doc. MVDr. Dagmar Zendulková, CSc.

V Brně – 1. 2. 2008