

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. lékařská fakulta

I. infekční klinika

přednosta: doc. MUDr. Vilma Marešová, CSc.

Fakultní nemocnice na Bulovce
Budínova 2, 180 81 Praha 8



Tel.: 26608 2620

283840517

Fax: 283840504

E- mail: Vilma.Maresova@lfmotol.cuni.cz

E- mail: Maresovv@fnb.cz

Oponentský posudek

Molekulárně biologické vyšetřovací metody praktické aplikace v diagnostice parazitárních infekcí

Autorka: MVDr. Zuzana Čermáková

Dizertační práce MVDr. Zuzany Čermákové má mimořádně zajímavé téma: nové metody v diagnostice parazitárních infekcí. Incidence parazitárních infekcí není příliš vysoká a zřejmě proto stojí nezaslouženě v pozadí mezi jinými humánními nákazami.

Autorka však zvolila méně obvyklé složení práce a její rozdělení s spojením výsledků a diskuse ji zbytečně činí méně srozumitelnou. Vlastní práce má 102 stránek, dalších 14 stránek je seznam prací autorky a literatura. Nepřesnosti jsou také v číslování obrázků, tabulek a grafů. Pokud jsem dobře počítala, je v praxi 10 obrázků, 2 grafy a 43 tabulek. Podle autorčina číslování je obrázků jenom 8 a nerozlišuje obrázky a grafy. Není uvedeno číslování kapitol, vycházím z názvů uvedených v obsahu na str. 2.

Vlastní práce je věnována diagnostice agens třech infekčních onemocnění: *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica* a *Leptospira* species. Poslední agens je však bakterie, název práce autorky je nepřesný.

Přehled problematiky molekulárně biologických metod je zpracován jako popis polymerázové řetězové reakce (PCR) obecně a je vlastně popisem laboratorního postupu kontroly kvalit PCR a málo tomu, jak současný problém vypadá v evropských relacích. Podrobně a nejlépe je popsán prvok *Toxoplasma gondii*, epidemiologická situace toxoplasmózy, cesty přenosu a na straně 20 jsou uvedeny nejčastěji používané laboratorní diagnostické metody a jejich problémy se správnou interpretací pro kliniku. Autorka uvádí i léčbu, kde jsou nepřesnosti a vzhledem k tématu, bylo zcela zbytečné je uvádět. U dalšího prvoka *Entamoeba histolytica* je uvedeno zařazení dle nové klasifikace, velmi stručně epidemiologie, podrobně životní cyklus *E. histolytica*, klinické formy onemocnění a velmi stručně diagnostika infekce.

Trochu nesourodě dle názvu práce parazitární infekce je zařazena bakterie *Leptospira*. Její popis je však uveden detailně, jsou uvedeny i diagnostické problémy, epidemiologické souvislosti i novou taxonomii rodu *Leptospira*. Je uvedena incidence v ČR a diagnostické metody a hodnocení PCR. Opět jsou nepřesnosti v uvedené léčbě (lékem volby zůstávají peniciliny).

Cíl práce je vypracován v 7 bodech a tyto jsou dobře definovány: vypracovat, optimalizovat a standardizovat metodou PCR pro vybraná infekční agens, vypracovat standardní operační postupy pro zavedení metod do rutinní diagnostiky v úseku parazitologie, vyhodnotit výsledky metod PCR a porovnat je s klasickou sérologickou a morfológickou diagnostikou pro jednotlivá infekční agens, navrhnout optimální laboratorní algoritmus u jednotlivých skupin pacientů

Materiál a metody: V této části mi chybí upřesnění od koho byl biologický materiál získáván, je uvedeno pouze v jakém biologickém materiálu lze vyšetření PCR provádět a jak s biologickým materiálem zacházet. Tato data jsou uvedena až ve společné kapitole Výsledky a diskuse. Jsou uvedeny jak metody studované (PCR), tak sérologické, které se ale běžně v diagnostice toxoplasmózy používají.

U *E. histolytica* je uvedena jen metodika PCR. Metody průkazu *Leptospira* species jsou uvedeny podobně jak u *Toxoplasma gondii*: PCR, sérologické (klasické) metody, které jsou využity k porovnávání s nově zaváděnými molekulárně biologickými metodami: U všech agens je PCR metodika uvedena velmi podrobně, i s kontrolou kvality a popisem rizik falešné positivity, s ověřením citlivosti i specifity metody.

Výsledky a diskuse jsou zpracovány společně. Až v této části je zřejmý velký rozsah laboratorní práce, bylo by práci prospělo věnovat se, resp. zpracovat jedno agens, nejlépe a prakticky komplexně jsou uvedeny výsledky týkající se *Toxoplasma gondii*. Čísla uváděna v práci: 22 427 vzorků sér a plodové vody od 15.117 pacientů, jsou zřejmě vzorky, ze kterých byla prováděná klasická sérologická vyšetření. Zkoumanou metodou PCR bylo vyšetřeno **441 vzorků** od 347 pacientů různých biologických materiálů s výraznou převahou žen (318). Zvláště je hodnocen soubor 120 těhotných žen – u deseti v 8,3% byla zjištěna metodou PCR DNA *Toxoplasma gondii* se současným zjištěním IgG Ab v séru. Zhodnocení tohoto souboru by zcela stačilo pro disertační práci. Vypracování metodiky, ověření specifity v nejvíc rizikové skupině (u těhotných žen, transplantovaných pacientů, HIV/AIDS osob) a návrh systému vyšetřování těhotných žen s rozšířenou diskusí by zcela stačily i pro závěry pro praxi. Diagnostika *E. histolytica* pomocí PCR je však takovým bonbónkem autorky: autorka uvádí problémy diagnostiky v kombinaci s 8 uvedenými kasuistikami, škoda však, že nebyly jako diagnostický problém publikovány. Protozoární infekce nejsou příliš četné, včasná diagnóza může opravdu zabránit komplikacím onemocnění a při současném cestovním ruchu budou pravděpodobně přibývat. *Leptospira spp* vybočuje ze zadání, aspoň podle názvu práce parazitární infekce. Z hlediska infekcionisty je však zajímavá, dle výsledků a porovnání s klasickými vyšetřovacími metodami (MAL) je zřejmé, že detekce agens pomocí PCR diagnózu urychlí, dle autorky je možná již v prvním týdnu onemocnění, umožní včasnou léčbu a klasickými metodami pak upřesnění sérovarů.

Závěry pro praxi jsou naformulovány dobře a pravdivě.

Hodnocení disertační práce:

1. zvolené téma je bezesporu výborné, pro disertační práci mohlo být užší, jak již v textu uvádím, autorka by měla dost práce s molekulárně biologickou metodou u samotné toxoplasmózy. Tím, že do disertační práce zařadila i diagnostiku leptospir, je práce méně přehledná a navíc byla významně náročnější.
2. metody laboratorního zpracování, příprava primerů, optimalizace a standardizace PCR diagnostiky, srovnávací studie s klasickými metodami u toxoplasmózy i leptospir byly provedeny skvěle, vlastní postup pro získávání cyst améb a vlastní způsob koncentrace jsou určitě dobrým podkladem pro další laboratoře
3. z předchozího je zřejmé, že práce přinesla nové poznatky v diagnostice parazitárních nemocí, prokázala možnosti časnější diagnostiky a tím i racionální a včasné antiinfekční léčby. Bylo však zbytečné uvádět léčbu, ta není cílem disertační práce a navíc byla nepřesná, přestože jsou v SIL ČLS vypracovány doporučené postupy v léčení toxoplasmózy, a také leptospirózy. Tato neznalost však pro laboratorního pracovníka není tak velkou chybou a neznehodnocuje vlastní práci.
4. disertační práce **splnila cíle, která si autorka stanovila**. Moje výhrady jsou uvedeny v textu – jsou spíše formálního a ne odborného charakteru. Je spíše škoda, že jinak rozsáhlou a náročnou práci znehodnotily některé nepřesnosti, a ne právě tradiční uspořádání práce.

K práci mám tyto dotazy:

1. zda stanovení protilátek proti T. gondii u žen by nemělo být ještě před těhotenstvím, aby bylo zjevné, u které ženy je riziko primoinfekce, která je rizikem v těhotenství?

2. amebóza není v současné době častým onemocněním, jaká je situace v Evropě ve výskytu i použití PCR metody. Zda by podobná metoda nebyla vhodná také u giardiázy, která se v ČR vyskytuje častěji?

Autorka předloženou disertační práci splnila podmínky k udělení vědecké hodnosti PhD. a doporučuji návrh na udělení tohoto titulu předat vědecké radě LF UK v Hradci Králové.

doc. MUDr. Vilma Marešová, CSc.

Předn. I. infekční kliniky UK 2.LF

FNB Praha 8