

# O p o n e n t s k ý   p o s u d e k

## na disertační práci MVDr. Zuzany Čermákové

s názvem

**„Molekulárně biologické vyšetřovací metody, praktická aplikace v diagnostice parazitárních infekcí“**

Zvolené téma je velmi aktuální vzhledem k problémům spojeným s klasickou diagnostikou původců infekčních chorob uvedených v disertační práci.

Průkaz *Toxoplasma (T.) gondii* na tkáňových kulturách nebo vnímavém laboratorním zvířeti je náročný nejen časově ale i ekonomicky. Mnohdy problematická je také interpretace výsledků sérologických vyšetření, zejména v akutní fázi onemocnění. S řadou obtíží se mikrobiologové setkávají také v rámci přímé i nepřímé diagnostiky původců leptospiróz. Především z hlediska léčebného postupu je velmi významné rychlé odlišení invazivní *Entamoeba (E.) histolytica* od morfologicky shodné nepatogenní *E. dispar*.

Molekulárně biologické metody, založené na detekci specifické sekvence v genomu infekčního agens, úskalí klasických diagnostických metod vylučují. Jejich výhodou je navíc vysoká specifita a rychlost průkazu mikroorganismů v různém biologickém materiálu. Nacházejí proto stále širší uplatnění v rutinní mikrobiologické diagnostice. Rychlé a spolehlivé výsledky mikrobiologických vyšetření jsou nezbytné pro klinickou praxi, zejména pro zavedení včasné specifické terapie, zabraňující dalším komplikacím zdravotního stavu pacienta.

Autorka v úvodu zdůvodňuje význam zavedení metody polymerázové řetězové reakce (PCR) pro detekci *T. gondii*, *E. histolytica*, *E. dispar* a patogenních sérovarů *Leptospira sp.* v parazitologické laboratoři.

V literárním přehledu problematiky seznamuje s principy a metodickými postupy PCR a kvantitativní PCR v reálném čase (Real time PCR), neuvádí však informaci o modifikaci PCR metody - nested PCR, kterou prováděla. Dále charakterizuje jednotlivé výše uvedené mikroorganismy, cesty jejich přenosu, formy a průběh onemocnění které způsobují a možné komplikace, zejména v případě pozdní či nepřesné diagnózy. Popisuje také používané metody přímého i nepřímého průkazu a úskalí která laboratorní diagnostiku komplikují.

Cíle práce jsou stanoveny srozumitelně.

Vlastní práce je rozčleněna do tří experimentálních úseků podle jednotlivých species. Jednotlivé úseky zahrnují odběr a uchovávání vzorků k vyšetření, izolaci DNA z jednotlivých biologických materiálů, výběr primerů, postupy optimalizace metod PCR pro průkaz jednotlivých genů, včetně určení specifity a senzitivity reakcí. Výsledky jednotlivých experimentů byly podkladem pro vypracování „Standardních operačních postupů“ detekce specifických úseků DNA jednotlivých druhů nebo sérotypů. Zavedené metody PCR byly podrobeny interní i externí kontrole kvality průkazu DNA. Výsledky získané PCR metodami

byly srovnávány s výsledky sérologických vyšetření. Principy, postupy a hodnocení prováděných metod průkazu specifických protilátek jsou popsány v příslušných úsecích práce.

Jelikož výsledky experimentů spojené s optimalizací PCR metod jsou uvedeny v jednotlivých úsecích kapitoly „Materiál a metody“, následující kapitola „Výsledky a diskuse“ obsahuje pouze výsledky provedených vyšetření biologických materiálů, získané metodami PCR a sérologickými metodami, konkrétně testy reakce vazby komplementu (RVK), ELISA a mikroaglutinace-lyze (MAL). Získané výsledky autorka v rámci diskuse srovnává s publikovanými údaji a připojuje vlastní názory. Kapitola je doplněna několika poměrně rozsáhlými kasuistikami (zřejmě pro zdůraznění některých výsledků), které však do disertační práce nepatří.

Zaznamenané výsledky, včetně jejich statistických vyhodnocení které budou prezentovány v rámci obhajoby potvrdily význam metod PCR v laboratorní diagnostice všech sledovaných mikroorganismů. Autorka v závěru zdůrazňuje nutnost včasného zjištění původce onemocnění a okamžité zahájení léčby zabraňující generalizaci infekce. Splnění této potřeby umožňují molekulárně biologické metody.

Přesto, že uvedené poznatky svědčí ve prospěch PCR, autorka správně upozorňuje na možné problémy ovlivňující výsledky této metody, které začínají již správným odběrem vhodného biologického materiálu. Velmi významné je i materiálové a prostorové vybavení pracoviště a odborná úroveň laboratorních pracovníků.

Před závěrečným hodnocením disertační práce si dovoluji uvést některé připomínky, dotazy a doporučení:

- pro přehlednost a snadnou orientaci v předložené práci bych doporučila autorce číslování jednotlivých kapitol a podkapitol – desetinné členění textu
  - některé zkratky používané v textu nejsou uvedeny v „Seznamu zkratek“ (IHA, BAL, SOP, ÚKBD, ÚKM, QCMD ...) a také zavádění zkratk není vždy správné (str. 46 QCMD..., str. 48 ... TMB (tetramethylbenzidinu)... Zavedení zkratky se provádí zpravidla při prvním použití slov v plném textu a zkratka, jež bude tato slova v dalším textu nahrazovat je v závorce za slovy
  - v textu je v některých případech nesprávné označení procenta (1 %) a procentní (1%), např. str. 19 ... T. gondii zjištěna u 0,03% (0,03 %) novorozenců, ... k přenosu nákazy na plod dochází asi ve 40% (40 %) .... dále str. 17, 19, 20 45, 52, 56, 84...
  - z popisů odběru a uchovávání biologického materiálu není u jednotlivých mikroorganismů zcela zřejmé, které konkrétní vzorky byly odebírány pro realizovanou vyšetření, např. část týkající se T. gondii str.34 – autorka uvádí v jakém biologickém materiálu se detekce DNA provádí, případně lze provádět s odkazy na jednotlivé autory. O konkrétním vyšetřovaném materiálu se dovídám až z tabulky č. 6 (str. 78), uvedené v kapitole „Výsledky a diskuse“. Podobně je popsána také izolace DNA (str. 35). Takto zpracované informace se uvádějí v literárním přehledu problematiky.
  - forma popisu diagnostických postupů v jednotlivých úsecích spisu je nejednotná a mnohdy nepřesná, např. str. 38-43,45 nepopsáno bližší označení nebo složení či původ lyzačního roztoku s proteinázou K, extrakčního pufru s NaOH, pufru, PBS, neuvedeno bližší označení cykléru, ne vždy uveden zdroj (výrobce, dodavatel) primerů (str. 42, 56). Autorka neuvádí žádné informace o fenol-chloroformové metodě použité při izolaci DNA. Popisy teplotních profilů (někde uváděných jako podmínky reakce) jsou nepřehledné.
- Obecně platí, že metody musí být popsány tak, aby každý následovník (i částečně obeznámen s touto problematikou) mohl uvedené experimenty opakovat (a výsledky potvrdit).

- není uveden „Standardní operační postup PCR“ pro detekci patogenních sérovarů *Leptospira* sp.
- na str. 73 uveden nadpis „Princip reakce“ ale není zřejmé jaké?
- problematické a nejednotné uvádění „tabulek“ a „obrázků“ v kapitole „Materiál a metody“. Příkladně na str. 50 autorka odkazuje na tabulku, která však není číselně označena ani uvedeno vysvětlení údajů v tabulce (++, +++). Podobně na str. 51, kde nejsou uvedeny ani názvy tabulek. Na str. 53 uvedeny „popisy“ k tab. č. 19 a obrázku č. 20 ale odkaz na tabulku, číslo a název tabulky i obrázku v textu chybí. Podobné problémy se vyskytují u tabulek a obrázků na str. 58-64, 66, 68-71.
- nepřesné názvy tabulek, mnohdy i nesprávná legenda v tabulkách v kapitole „Výsledky a diskuse“. Příkladně název tab. č. 6: Výsledky PCR v krvi...Doporučení přesnějšího názvu: Výsledky detekce genů *Toxoplasma gondii* metodou PCR ve vyšetřovaném materiálu, titry protilátek zjištěné v krevním séru testem reakce vazby komplementu a ELISA metodou, vyhodnocení shody výsledků. Ostatní je zřejmé z legendy v tabulce. Další příklad : tabulka č. 5 – legenda „sérologické metody“ je nepřesná neboť IgM, IgA ... nejsou sérologické metody. Tabulka č. 6 – „odběr“, přesněji vyšetřovaný materiál, „TGR 1E, B1“ pro srozumitelnost doplnit legendu nadepsáním geny *T.gondii*, IgM, IgA.... opět upřesnit doplněním ELISA . Tabulka č. 2 nemá žádnou vypovídající hodnotu. Obecně platí, že každá tabulka musí mít takový popis aby byla srozumitelná sama o sobě bez pracného hledání souvislostí v textu. Podobné problémy se vyskytují i při popisu grafů na str. 81, 82. Pokud by autorka pojala grafy jako obrázky, pak jejich číslování neodpovídá skutečnosti, neboť obrázek č. 1 je uveden na str. 2 a obrázek č. 2 na str. 24.
- zejména v kapitole „Výsledky a diskuse“ autorka užívá některé nepřesné pojmy (např. str. 83 ... v tabulkách a grafech uvedených ve výsledcích jsou znázorněny postupy (výsledky), které jsme .... Str. 84 ... ve čtrnácti případech vzorků s pozitivní ..., ve 100 % PCR pozitivních vzorků ... za týden až 14 dní po infekci (od vzniku infekce)...str.47 ... přebytečné protilátky vymyty /odstraněny promytím/..... spočítána jejich denzita (kvantita).
- ve „Standardním operačním postupu „ pro detekci *E. histolytica*/dispar jsou uvedeny rozdílné teplotní profily pro 1. a 2. stupeň PCR (str. 52) ve srovnání s údaji v popisu experimentu (str. 50) – objasněte prosím.
- jak dlouho jste uchovávali cysty *E. histolytica* a *E. dispar* při uvedených teplotách a jak jste posuzovali výtěžnost DNA? Jaká je vhodná doba uchovávání cyst při obou teplotách?
- vysvětlete údaj 30-50 cyst v 1 ml F1/1
- objasněte negativní výsledek při teplotě 53 °C během optimalizace annealingu pro PCR s primery B64-I a B64 II
- který postup závěrečné extenze byl optimální (str.65)?
- jak dlouho lze uchovávat likvor a plásmu při 5 a -20 °C pro dosažení spolehlivých výsledků vyšetření patogenních sérotypů leptospir metodou PCR?
- vysvětlete příčiny rozdílných výsledků vyšetření neupravených vzorků moči se stejným počtem leptospir v ml (str. 68)
- uveďte výhody a nevýhody PCR pro odlišení *E. histolytica* od *E. dispar* ve srovnání s metodami uvedenými na str. 22, případně metodami používanými dříve na vašem pracovišti

## **Z á v ě ř e č n ě   h o d n o c e n í .**

Disertační práce MVDr. Zuzany Čermákové splnila vytyčený cíl. Po obsahové stránce se jedná o seriózně pojatou studii přinášející nové dílčí poznatky, dokumentující význam zavádění molekulárně biologických metod v laboratorní diagnostice původců infekčních onemocnění. Důvodem některých formálních nedostatků je zřejmě určitá nezkušenost autorky při sepisování takto zaměřených vědeckých spisů. Přes uvedené připomínky nutno konstatovat, že autorka vykonala značné množství experimentální práce, jejíž výsledky nejen že najdou uplatnění v teoretickém rozvoji oboru ale jsou již využívány v praxi.

**Z uvedených důvodů doporučuji disertační práci k obhajobě.**

V Pardubicích 27. února 2006.

Doc. MVDr. Jaroslava Mazurová, CSc.