Oponentský posudek magisterské diplomové práce

Autorka: Bc. Jana Cimická
Název: Molekulární diagnostika fungálních patogenů z klinických vzorků
Školitelka: RNDr. Kateřina Černá, Ph.D.

Oponentský posudek vypracoval: RNDr. Radek Šíma, Ph.D., Parazitologický ústav BC AVČR, České Budějovice

---

Magisterská diplomová práce Jany Cimické se zabývá zavedením a optimalizací molekulárně biologických metod sloužících k detekci mykotických infekcí v klinickém materiálu. Zpracované téma je zajímavé a zároveň velmi přínosné pro praxi. Mykotické infekce jsou často přehlížený problém, včasná a přesná diagnostika infekčního agens je významná zejména u pacientů s oslabenou imunitou, onkologických pacientů a pacientů trpících idiopatickými střevními záněty. Současná diagnostika je založena především na kultivačních technikách, které jsou pomalé, málo citlivé a málo specifické. Zavedení molekulárních metod tedy může diagnostiku nejen výrazně zrychlit, ale i zpřesnit a tím umožnit včasné nasazení přesně zacílené léčby.

Diplomová práce má 51 stran a dle zvyklostí je členěna na úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuzi a závěr. Rozsah a vzájemný poměr jednotlivých částí je přiměřený a odpovídající nárokům na magisterské diplomové práce na Přírodovědecké fakultě JU.

Cíle práce jsou dostatečně podrobné a jasně definované.

Úvod čítá 13 stran textu. První podkapitolu autorka věnovala obecné biologii hub a jejich klasifikaci. Dále porovnává střevní mykobiom zdravé populace s mykobiomem pacientů trpících zánětlivými onemocněními střev a podrobně popisuje úlohu jednotlivých druhů hub ve střevním mykobiomu. V poslední podkapitole pak popisuje příčiny a mechanismy rozvoje chronických zánětlivých onemocnění střev (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida). Celkově považuji úvod za velmi zdařilý, má jasnou a logickou strukturu a dostatečně seznamuje čtenáře s řešenou problematikou.

Kapitola **Materiál a metody** je sepsána na 7 stranách, autorka zde podrobně vysvětluje všechny metody, které při své práci používala. Na tomto místě bych chtěl vyzdvihnout široké spektrum metod, které musela během řešení svého úkolu zvládnout, považuji to za významný vklad do budoucí práce v diagnostické laboratoři. K této kapitole mám pouze několik (spíše drobných) připomínek:

- str. 16: Vzhledem k tomu, že jsou všechny primery převzaté z literatury, bych navrhoval název kapitoly 3.3.1 „Přehled použitých primerů“, spíše než „Design primerů“.
- Popis PCR metod v kapitolách 3.3.2 a 3.3.3 je trochu zmatený a málo podrobný. Např. mi nejsou zcela jasné, metody v Tab. 3 a 4. Bylo by vhodné podrobněji popsat, co která kombinace primerů amplifikuje.
- str. 17: Marker molekulových velikostí není „leader“, ale „ladder“.
- str. 18: Chemie pro sekvenování se jmenuje „BigDye 1.1 Mix“, nikoliv „BigDie 1.1 Mix“.

Výsledky předložené magisterské práce jsou shrnuty na 14 stranách, včetně 11 obrázků. Další 4 obrázky jsou pak v příloze. Klíčovým úkolem bylo optimalizovat izolaci fungální DNA z formalínem fixovaných, v parafínu zalitých vzorků, což je zásadní předpoklad pro všechny navazující aplikace. Autorka porovnává čtyři různé izolační kity a vyhodnocuje jejich účinnost. Dalším dílčím úkolem byla optimalizace PCR a nalezení nejvhodnější kombinace primerů, které by zachytily co nejširší spektrum možných mykotických infekcí. Následně navazovala analýza získaných PCR produktů pomocí klasického Sangerova sekvenování, ale i pomocí sekvenování nové generace (NGS). Optimalizovaná metodika byla poté použita k analýze mykotických infekcí u pacientů s Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou.

V závěrečné kapitole jsou pak prezentovány tři kazuistiky demonstrující smysl molekulárně biologického vyšetření mykotických infekcí.

K výsledkům bych měl několik poznámek a otázek (prosím o stručný komentář při obhajobě):

1. Jedním z kritérií, podle kterých byl izolační kit vyhodnocen jako vhodný, byla celková výtěžnost DNA. Tento údaj může být velice zavádějící, vzhledem k tomu, že většinu vyizolované DNA tvoří DNA z tkáně. Naopak, fungální DNA je zde zastoupena minoritně. Naměřená koncentrace DNA tedy nemusí vypovídat nic o schopnosti kitu rozbít odolnou fungální buněčnou stěnu a extrahovat DNA. V práci mi chybí otestování izolačních kitů na nějaké běžně dostupné houbě (kvasinka, plíseň, žampión...), což by mohlo potvrdit vhodnost jednotlivých kitů k izolaci fungální DNA. Byly takové testy provedeny?
2. Z prezentovaných výsledků plyne zjištění, že ve všech vzorcích lze detekovat houby. Souhlasí to s dostupnou literaturou?
3. Navíc zde nejsou zásadní rozdíly mezi vzorky z negativních pacientů a pacientů se zánětlivými změnami. Ve většině případů se jedná o celkem běžné, volně žijící druhy. Takové výsledky lze velmi těžko interpretovat, je obtížné odlišit, zda se jedná o skutečné původce patologických změn, nebo náhodné kontaminace z prostředí. Nikde jsem nenašel zmínku o tom, zda byly provedeny kontrolní izolace prázdných parafínových bločků. Výsledek z těchto analýz by velmi pomohl s interpretací zjištěných výsledků.

Diskuzi je věnováno celkem 5 stran textu. Autorka porovnává svoje výsledky s literárními údaji i s výsledky pocházejícími ze školící laboratoře. K této kapitole nemám žádné zásadní připomínky.

Závěrečné hodnocení:
Autorka se během svého magisterského studia seznámila s celou řadou laboratorních technik, navíc musela většinu používaných metod sama optimalizovat, což je z didaktického hlediska vždy cennější, než pracovat s již zavedenými metodami. Dále je třeba ocenit zajímavé téma, ambiciózní cíle a objem vykonané práce. Jazyková úroveň je velmi dobrá, práce je napsána srozumitelně a čtivě s přijatelným množstvím pravopisných chyb a překlepů. Předloženou magisterskou práci doporučuji k obhajobě a hodnotím ji stupněm 1.

Doplňující otázky:

1. Na straně 8 mě zaujala zmínka, že u pacientů s ulcerózní kolitidou má kouření pozitivní protektivní účinek. Můžete to prosím okomentovat?
2. Na straně 8 se píše, že dieta bohatá na vlákninu snižuje riziko vzniku zánětlivých střevních onemocnění „díky střevním bakteriím, které vlákninu rozkládají na mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které mají protizánětlivý účinek“. Můžete prosím biochemicky vysvětlit, jak bakterie rozkládají vlákninu (=polysacharid) na krátké mastné kyseliny?
3. Prosím o laické vysvětlení obrázku Příloha č. 4.

V Českých Budějovicích 18.6.2020

Radek Šíma