

Oponentský posudek na bakalářskou práci Katky Mansfeldové na téma:

Diseminovaná latentní mikrosporidióza jako potenciální příčina ohrožení lidského zdraví

Studentka si pro svou práci zvolila přímý průkaz přítomnosti spor mikrosporidie rodu *Encephalitozoon* v lidských vzorcích mozkomíšního moku pomocí metody PCR. Rod *Encephalitozoon* patří mezi nejrozšířenější mikrosporidie, které infikují člověka a které na rozdíl od ostatních mikrosporidií mohou u člověka způsobovat diseminované infekce postihující téměř všechny orgánové soustavy. Jedná se o oportunní mikroorganismus, který způsobuje závažná onemocnění zejména imunokompromitovaných pacientů.

Studentce se podařilo naplnit cíle této práce, jimiž bylo sepsání literární rešerše na dané téma, pomocí molekulárních metod vyšetřit vzorky mozkomíšních moků na přítomnost mikrosporidií rodu *Encephalitozoon*, v pozitivních vzorcích kvantifikovat množství spor pomocí kvantitativní RT PCR a vyvodit závěry ze získaných dat v souvislosti s epidemiologií mikrosporidióz.

Předložená bakalářská práce rozsahu 31 stran je psána čtivě a celkem srozumitelným jazykem s minimem chyb a překlepů. Na str. 5 mi nedává úplně smysl spojení závažné latentní infekce, buď je infekce závažná s příznaky anebo latentní asymptomatická, čekající na svou příležitost. **Mohla byste prosím vysvětlit, co je to diseminovaná latentní mikrosporidióza?**

Práce je klasicky členěna do jednotlivých kapitol.

Literární přehled je tvořen 10 stranami, na kterých se čtenář blízce seznamuje se základní biologii, morfologií a vývojem taxonomie mikrosporidií, poměrně podrobně jsou zde popsány projevy mikrosporidiózy, detekce infekce a její léčba s důrazem na infekce způsobené rodem *Encephalitozoon*.

Z kapitol Materiály a Metody je zřejmé, že autorka zvládla širokou škálu laboratorních technik spojených s molekulárními metodami (izolace DNA z mozkomíšního moku či kontrolní DNA z infikované *in vitro* tkáňové kultury, vlastní PCR reakce, následná charakterizace a extrakce získané DNA a kvantitativní stanovení počtu spor pomocí qRT PCR). Na str. 16 v odstavci 3.2 Koncentrace mozkomíšních moků – centrifugace, není jednoznačné, kterou část vzorku po centrifugaci jste pro vlastní izolaci DNA použila, byť rozum velí, že supernatant to jistě nebude. Otázky k metodice:

1. Používá se označení primeru vnitřní a vnější obecně pro PCR?

2. Jakým způsobem jste se podílela na sekvenaci získané DNA a na hodnocení sekvenovaných dat?

3. Co jste použila jako pozitivní a negativní kontrolu při qRT PCR?

Z výsledků je patrné, že se studentce úspěšně podařila i experimentální část této práce, a to detekce a určení genotypu mikrosporidií v několika vzorcích testovaného likvoru. Zde bych se chtěla zeptat:

- 1. Jaká je citlivost, resp. limit detekce použité metody? Dle kalibrační křivky na str. 21 je nejnížší hodnota stanovena na 10^3 spor na ml, ve výsledcích pak uvádíte, že v pozitivních vzorcích bylo detekováno 3–50 spor na ml? Jak jste k této koncentraci došla?**
- 2. Jak hodnotíte získané výsledky ve vztahu k pacientům? Myslíte si, že by se u pacientů s pozitivním nálezem mohlo jednat právě o mikrosporidiózu CNS?**
- 3. Jak si vysvětlujete, že nejčastějším, resp. jediným detekovaným genotypem mikrosporidie byl „myší kmen“ *Encephalitozoon cuniculi* II?**

V diskusi, která je psána jasně a zasvěceně, autorka analyzuje získané výsledky v konfrontaci s domácí i světovou literaturou. Na konci diskuse zmiňujete možnost preventivního testování pacientů na mikrosporidiózu. **Zkuste prosím navrhnout schéma postupu pro rutinní screening mikrosporidiózy (u jakých pacientů, z jakého materiálu, jakou metodou, jaké mikrosporidie, kdy pomýšlet na léčbu)?**

Předkládané téma možné hrozby latentní mikrosporidiózy pro pacienty se sníženou kvalitou imunitní obrany se stává čím dál tím víc aktuální právě s narůstajícím počtem sekundárních imunodeficiencí způsobených zejména biologickou terapií autoimunitních či nádorových onemocnění, která významně cílí na funkci imunitního systému. Škoda, že se studentce nepodařila získat klinická data u pozitivních vzorků. Domnívám se, že by to významně pomohlo při stanovení hranice positivity.

Studentka sepsáním této práce dokázala, že je schopna samostatně pracovat s vědeckou literaturou, plánovat a provést experimenty, porovnat a vyhodnotit získané výsledky. Předloženou bakalářskou práci Katky Mansfeldové považuji po stránce formální i obsahové za spis, který splňuje standardní požadavky kladené na diplomové práce na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Práci doporučuji k obhajobě a hodnotím ji stupněm velmi dobře.

V Českých Budějovicích, 16.5.2023.

RNDr. Pavlína Tinavská, PhD.