



## Posudek oponenta habilitační práce

<b>Masarykova univerzita</b>	Lékařská
<b>Fakulta</b>	Lékařská mikrobiologie
<b>Obor řízení</b>	<i>Mgr. Martina Lengerová, Ph.D.</i>
<b>Uchazeč</b>	Sekce oportunních infekcí CMBGT IHOK FN Brno a LF MU
<b>Pracoviště uchazeče</b>	<i>Včasná diagnostika oportunních infekcí pomocí molekulárně biologických metod</i>
<b>Habilitační práce</b>	<i>Doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.</i>
<b>Oponent</b>	Ústav klinické mikrobiologie FN a LF UK Hradec Králové
<b>Pracoviště oponenta</b>	

### Text posudku

Předložená habilitační práce je ve formátu komentáře k publikovaným vědeckým pracím, které vyšly v recenzovaných odborných periodících (převážně s IF).

Celkový rozsah habilitační práce je 143 stran, z toho komentáře zaujímají 44 stran a přílohy 99 stran. Komentář je doplněn 5 tabulkami a 1 obrázkem, seznamem 86 literárních citací a kompletní bibliografií uchazečky. Přílohy tvoří 7 odborných, originálních sdělení v časopisech s IF, 4 sdělení v recenzovaných (českých) časopisech, doplněné 2 patenty.

Téma habilitační práce, molekulárně-biologická diagnostika oportunních infekcí, je vysoce aktuální, protože moderní medicínské postupy vyznačující se nezdědkou agresivním působením na imunitu hostitele se stávají běžným standardem a jsou aplikovány na stále rostoucí populaci rizikových pacientů, kteří potom v důsledku základního onemocnění anebo léčby procházejí kritickým obdobím s výrazně oslabenou obranyschopností, což vytváří vhodné podmínky pro širší uplatnění oportunních infekčních agens. Bohužel infekční komplikace spojené s touto rizikovou skupinou pacientů podstatně přispívají k jejich morbiditě a mortalitě. Zkušenosti ukazují, že terapeutický management těchto infekcí je extrémně závislý na včasné a přesné diagnostice, která zásadním způsobem rozhoduje o přežití těchto pacientů, a tedy i úspěchu léčby základního onemocnění. A právě na tuto oblast diagnostiky se zaměřilo úsilí uchazečky.

Originální sdělení uchazečky ukazují na systematickou práci zaměřenou na metodiku detekce a identifikace oportunních patogenů, od návrhu metody, jejího vypracování, zavedení do praxe resp. ověření klinické použitelnosti, až po patentovou ochranu nově vypracovaných postupů. Práce je zaměřena na původce invazivních houbových infekcí, zejména aspergilózu a mukormykózu, dále na virové infekce ze skupiny herpesvirů.

Metodicky bylo úsilí směřováno do vývoje metod, které by byly dostatečně citlivé a zároveň specifické, tj. byly schopné detekovat a identifikovat v relevantních klinických vzorcích hlavní původce aspergilózy a mukormykózy. V případě aspergilózy v rámci tvůrčího týmu vypracovala kvantitativní real-time PCR pro stanovení aspergilové ribozomální DNA (gen *ITS2* u *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*) v BAL tekutině s ohledem na v České republice nejfrekventovanější druhy a hlavně na možnost rozlišení kolonizace od patologické nálože. To je pro klinickou rozvahu velmi cenné, protože samotný nález mykotického agens nemusí nutně znamenat houbovou infekci, resp. v případě druhové identifikace, citlivost jednotlivých druhů aspergilů se může významně lišit jak k triazolovým derivátům, tak k polyenovým antimykotikům. To, že uchazečka, potažmo tým, dokážou věci

dotáhnout do konce, je dokladováno ověřením nového testu na morčecím modelu, navíc ve spolupráci na prestižním americkém pracovišti, které potvrdilo klinickou užitečnost výsledků u rutinně používaných biologických vzorků (BAL tekutina, bioptické vzorky) s ohledem na přesnost a detekci časně fáze infekce.

Originální řešení bylo zvoleno při vývoji metody detekce původců mukormykózy, která kombinuje klasickou PCR metodu, ve které původně časově i finančně náročná sekvenace byla nahrazena analýzou křivek tání s vysokým rozlišením (HRM). Metoda byla validována pro vzorky tkání a BAL tekutinu tak, že umožnila stanovit kvantitativní nálož DNA mukormycet ve vzorcích, a tím zvýšit možnost odlišení aktivní infekce od kolonizace resp. kontaminace vzorku.

Nabyté zkušenosti s vývojem molekulárních metod využívající HRM analýzu vedly k vypracování na křivkách tání odvozené panfungální PCR metody, která umožnila rozšíření záběru zachytit méně obvyklé oportunní zástupce hub (*Fusarium*, *Scedosporium*), přitom podstatně urychlila celý proces identifikace (2 hod).

Druhou skupinou infekčních agens, na kterou se uchazečka zaměřila, byly herpetické viry, které u hematologických pacientů patří k vůdčí etiologii virových infekcí. Diagnostika těchto infekcí je o to složitější, že většina těchto virů je latentně přítomná v populaci a jednotlivé metodiky nemusí vždy poskytovat spolehlivé výsledky, zejména pokud jde o stanovení velikosti virové nálože, která rozlišuje počínající nebo již přítomnou infekci. Uchazečka prokázala, že při volbě cílového genu *UL123* je nutné vzít v úvahu přirozenou variabilitu cytomegalovirů, která může mít za následek, že část vzorků bude vykazovat falešně negativní výsledky reakce. Podobné důsledky variability genomu virů se mohou negativně projevit při léčbě antivirovými v případě mutace genů *UL54* a *UL97*, která vede u CMV k rezistenci na ganciklovir. Autorský kolektiv uchazečky analyzoval pomocí tří metod PCR kmeny CMV u pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT) a prokázal, že pacienti jsou osídleni heterogenní populací, ve které se mění zastoupení citlivých a rezistentních klonů CMV. Zároveň prokázali, že selektivní tlak antivirových může proporcí těchto kmenů ovlivňovat a jakmile pomine, rezistentní klon může být nahrazen klonem citlivým. To, pokud by se ověřilo na větším souboru pacientů, by mělo praktický dopad na léčbu CMV infekcí.

Rovněž studium viru Epstein-Barrové (EBV) poskytlo klinicky cenné informace. Ukázalo, že se v průběhu sledované periody (2007-2011) EBV infekce významně podílely (9%) na infekčních komplikacích HSCT pacientů ve FN Brno zejména v prvních 3 měsících po transplantaci a zároveň byla stanovena virová nálož (1000 kopií na  $\mu\text{g}$  DNA) pro zahájení antivirové terapie.

Z předložených výsledků práce je zřejmé, že uchazečka prokázala, nejen schopnost systematické práce při navrhování, realizaci a ověřování metod molekulárně biologické diagnostiky, ale že je si plně vědoma nejen předností, ale i limitů a úskalí tohoto přístupu, tedy předpokladů, které umožní postihnout diagnostiku oportunních infekcí vysoce rizikových pacientů v celé její šíři a snižují tak riziko zjednodušujících závěrů a interpretací. Přitom takové metody musí být relativně dostupné a přiměřeně nákladově efektivní.

Po formální stránce je text komentářů věcný, srozumitelný, prakticky bez překlepů, vytknout lze umístění nadpisů tabulek (u tabulky 3 na str. 17 navíc chybí nadpis úplně, místo něho jsou vysvětlivky; kromě toho metodu Kultivace bych nahradil, v případě virů, přesnějším Nepřímá kultivace), absence kurzívy při psaní genů, neúplné psaní diabetes mellitus (str. 11 a 14), „zdvojení“ ve smyslu druhů na str. 13, 13. řádek („sp.“ je u *Aspergillus* nadbytečné, vzhledem k uvození „několika druhů“), podobný problém na str. 15, 3. odst., kde v závorce buď ponechat samotný *Aspergillus* (míněno rod) nebo spp. (míněno více druhů), na str. 17, 2. odst. je zkratka IS bez vysvětlení, na str. 21, řádek 10 by zřejmě místo morbidita měla být

mortalita, nepřesný odkaz na str. 22 u příloh (správně Příloha 12 v odst. 1, Příloha 11 v odst. 3).

Po obsahové stránce bych uvítal zevrubnější obecný úvod k problematice diagnostiky invazivních infekcí, v případě diagnostiky aspergilózy nejsou zmíněny problémy s mezinárodní standardizací PCR; rovněž mi chybí jakákoliv zmínka o kryptokokových infekcích, dnes jednoznačně nejčastější příčině mortality houbové etiologie ve světě, vynechal bych „zcela“ na str. 16, 6. řádek v charakteristice rozdílu léčby invazivní aspergilózy a mukormykózy (minimálně kvůli liposomálnímu amfotericinu B).

Uvedené výtky jsou ve většině spíše podružné nesrovnalosti formálního charakteru a nikterak celkově nesnižují úroveň práce a úsilí uchazečky, její odbornou erudovanost a hodnotu závěrů, jednoznačně dokladovanou publikovanými výsledky a podanými patenty.


#### Dotazy oponenta k obhajobě habilitační práce

- 1/ Jsou publikované metody součástí doporučených postupů ve FN Brno a které?
- 2/ Podařilo se uvést do praxe detekci mutací genů pro ganciklovir v léčbě CMV infekcí, včetně případů předchozího selhání a následné změny rezistentního klonu na citlivý, tj. možnosti případného znovupoužití gancikloviru?
- 3/ Zaznamenali jste změnu spektra houbové etiologie po zavedení PCR metody pro diagnostiku mukormykózy a panfungální PCR kombinované s HRM analýzou?
- 4/ Na str. 10 zmiňujete, že G-negativní bakterie jsou zodpovědné za většinu fatálních infekcí. Jak si toto zjištění vysvětlujete?
- 5/ Jedním z úskalí detekce rezistence k antibiotikům pomocí molekulárních biologických metod je korelát identifikace genu s jeho expresí. Existují možnosti jak detekovat fenotyp rezistence jinak než klasickými metodami testování citlivosti na antibiotika?

#### Závěr

Habilitační práce Mgr. Martiny Lengerové, Ph.D. „*Včasná diagnostika oportunních infekcí pomocí molekulárně biologických metod*“ **splňuje** požadavky standardně kladené na habilitační práce v oboru Lékařská mikrobiologie.

V Hradci Králové dne 12. prosince 2016



.....  
podpis