



Oponentský posudek doktorské dizertační práce RNDr. Šárky Vošahlíkové

Název práce: Molekulární epidemiologie a vlastnosti bakteriálních původců infekcí plic u pacientů s cystickou fibrózou

Předložená dizertační práce je zaměřena na studium epidemiologie infekcí způsobených bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a bakteriemi komplexu *Burkholderia cepacia* u pacientů Pražského centra pro léčbu cystické fibrózy (PCFC) pomocí moderních genotypizačních technik. Vzhledem k tomu, že infekce způsobené těmito a dalšími bakteriemi jsou u pacientů s cystickou fibrózou (CF) hlavní příčinou zvýšené morbidity a mortality, jedná se o téma vysoce aktuální.

Dizertační práce má 95 stran, je standardně členěna na souhrn, literární přehled, materiál a metody, výsledky, diskuzi, reference a přílohy. Nechybí v ní jasné vymezení cílů práce, které byly beze zbytku splněny. Literární přehled začíná krátkým pojednáním o CF, které je následováno obecnou charakteristikou bakterie *P. aeruginosa* a popisem klinického průběhu infekce s důrazem kladeným na epidemické kmeny. Další část je pak podrobně věnována obecné charakteristice, klasifikaci a epidemiologii komplexu *B. cepacia*. V závěru literárního přehledu jsou popsány metody detekce a typizace bakteriálních patogenů a situace v PCFC. Celý literární úvod v rozsahu 16 stran je vhodně strukturovaný, napsaný srozumitelně, bez logických nepřesností a pokrývá všechny oblasti, na které je zaměřena experimentální část dizertační práce. Počet literárních odkazů je na rozsah úvodu zcela dostatečný a v řadě případů jsou citovány i nejnovější práce vztahující se k danému tématu.

Výsledková část je rozdělena do tří samostatných, ale logicky na sebe navazujících celků. Toto dělení je striktně dodrženo také v metodické a diskuzní sekci, což významně přispívá k přehlednosti celé dizertační práce. První část experimentální práce je věnována studiu vlastností a klonálních vazeb izolátů *P. aeruginosa*. Získané výsledky vyloučily výskyt epidemického kmene *P. aeruginosa* mezi pacienty PCFC a navíc ukázaly nízký výskyt rezistence testovaných klinických izolátů *P. aeruginosa* k antimikrobním látkám. Ve druhé části experimentální práce byla zavedena metoda multilokusové sekvenční typizace, která umožnila jednoznačnou detekci a identifikaci bakterií komplexu *B. cepacia* přímo z klinického materiálu pacienta. Navíc bylo touto metodou možné zachytit koinfekci pacienta dvěma rozdílnými kmeny v rámci jednoho druhu. V poslední části experimentální práce bylo ukázáno, že variabilita makrorestrikčních profilů izolátů *B. cenocepacia* se shodným profilem stanoveným multilokusovou sekvenční typizací může být dána genomickými přestavbami vyvolanými přeskupováním inzerčních sekvencí. U

jednoho z analyzovaných izolátů pak bylo toto přeskupování pozorováno u inzerční sekvence *ISBcen20* v důsledku oxidativního stresu. Následná diskuze předkládaných výsledků v kontextu již známých literárních zdrojů je věcná a zcela adekvátní výsledkům práce. Úroveň zpracování výsledkové a diskuzní sekce je velmi dobrá, s minimem gramatických chyb, překlepů, nevhodných termínů, či nejasných formulací. Na konci práce jsou ve formě příloh uvedeny tři publikace vydané v recenzovaných časopisech „Research in Microbiology“ a „Journal of Clinical Microbiology“ s průměrným impaktním faktorem za pět let 2,978, resp. 4,214, které přehledně shrnují všechny výsledky uvedené v dizertační práci, což potvrzuje kvalitu a originalitu získaných dat.

K autorce mám následující dotazy:

1. Z jakého počtu vzorků byla u metody AFLP stanovena 85% hladina podobnosti (kap. 6.1.2, strana 39)?
2. V první části experimentální práce byla vyloučena přítomnost epidemického kmene *P. aeruginosa* mezi pacienty s CF, z nichž byly pro tuto studii odebrány vzorky v roce 2004. Výsledky navíc ukázaly nízký výskyt rezistence klinických izolátů *P. aeruginosa* k antimikrobním látkám. Změnila se nějak tato situace v PCFC za posledních 10 let?
3. Provádí se dnes v PCFC identifikace a typizace bakterií komplexu *B. cepacia* pomocí metody multilokusové sekvenční typizace zavedené v této práci rutinně? Pokud ano, doznala tato metoda od svého zavedení nějakých změn?
4. Proč byla při studiu vlivu oxidativního stresu na plasticitu genomu zvolena jiná koncentrace peroxidu vodíku u izolátu CZ1 (0,01%) a jiná koncentrace u izolátu J2315 (0,1%) (kap. 5.3.3, strana 36)? Byla reorganizace genomu v důsledku oxidativního stresu studována i u jiných izolátů?

Závěrem lze konstatovat, že zavedením celé řady nových molekulárních metod se autorce podařilo významně přispět k podrobné charakterizaci sbírky klinických izolátů *P. aeruginosa* a komplexu *B. cepacia* shromážděných v PCFC. Všechny získané výsledky byly navíc úspěšně publikovány v recenzovaných časopisech. RNDr. Šárka Vošahlíková tak jednoznačně prokázala své kvality jak v oblasti experimentální vědecké práce, tak v prezentaci a publikaci získaných výsledků. **Předložená dizertační práce splňuje podmínky uvedené v § 47, odstavce 4, zákona č. 111/1998 Sb., a proto ji doporučuji přijmout k obhajobě a jako podklad k udělení titulu Ph.D.**



V Praze dne 4. září 2014

Ing. Radim Osička, Ph.D.

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.