

***Posudek na disertační práci Mgr. Květy Koryčanové "Vývoj a validace ELISA soupravy pro stanovení alergenních proteinů vaječného bílku".***

Předložená práce se zabývá aplikací analytických metod pro reálné aplikace/analýzy, konkrétně vývojem soupravy pro detekci proteinů vaječného bílku. Právě z pohledu aplikačního výzkumu se jedná o perspektivní práci.

Úvodem musím konstatovat, že vlastní zpracování disertační práce je na velmi dobré úrovni. Vlastní práce je založena na celkem 5 publikacích, kde je uchazečka spoluautorkou. Až na jednu výjimku (časopis Food Chemistry) se nejedná o časopisy s vysokým Impact faktorem (0,675 a 1,120). Ve dvou případech je uchazečka na prvním místě autorů, ve většině případů se jedná o publikace s mnoha autory (dokonce až 14). Toto je samozřejmě pochopitelné, pokud se jedná o aplikační výzkum.

Z formálního hlediska je práce jasně a přehledně členěna, podává srozumitelný úvod do problematiky a použité metody jsou podrobně popsány.

Je třeba vyzdvihnout, že se autorce podařilo úspěšně vyvinout a validovat nový kit/soupravu pro kvantitativní stanovení proteinů vaječného bílku s výrazným aplikačním/komerčním potenciálem

V práci se objevuje pouze minimální množství nesrovnalostí, které plynou z publikační nezkušenosti autorky.

Například:

Na str. 27 je v kapitole Extrakce pouze uvedeno, že extrakce existují. Může autorka tuto myšlenku, v rámci obhajoby, více rozvinout?

Str. 29 – rozhodně se nedá obecně říci, že „kapilární elektromigrační metody jsou považovány za jedny z....nejcitlivějších analytických separačních metod“. Skutečně se uvádí citlivost až v zeptomolech, ale pro dosažení této citlivosti se musí se vzorkem něco udělat. Ví autorka, co?

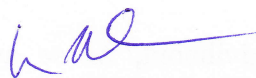
Jak jsem již konstatoval, tak většina prací autorky je dílem širokého autorského kolektivu. Může tedy uchazečka konkretizovat, jaká přesně byla její úloha v jednotlivých pracech, krocích výzkumu? Je uvedena jako první autorka u 2 publikací, u 2 je zhruba

uprostřed širokého autorského kolektivu a u publikace s nejvyšším Impact faktorem (Food Chemistry, IF=3,391) je 4. autorkou z pěti.

Závěrem bych rád konstatovat, že disertantka představila svoji tvůrčí schopnost samostatně vědecky pracovat. Jazyková a formální úroveň splňuje kritéria disertační práce. Téma práce je aktuální. Vytyčené cíle byly splněny. Práce přinesla nové poznatky a má reálný aplikační výstup, což lze rozhodně označit za její výrazný klad.

Konstatuji tedy, že disertantka splnila požadavky standardně kladené na disertační práci v oboru a prokázala schopnost tvůrčí vědecké práce a její práci doporučuji přijmout k obhajobě.

V Praze dne 2. července 2015



prof. Ing. Ivan Mikšík, DrSc.  
Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.  
Václavská 1083  
14220 Praha 4

## **Posudek:**

Předložená disertační práce Ing. Květy Koryčanové „**Vývoj a validace ELISA soupravy pro stanovení alergenních proteinů vaječného bílku**“ se zabývá vývojem a validací metody, která slouží ke stanovení proteinů vaječného bílku. Tyto proteiny jsou jednou skupinou alergenních proteinů z celkem 14 skupin proteinů, které jsou výrobci potravin dle současné legislativy povinni uvádět na etiketách potravinářských výrobků a tím chránit spotřebitele trpící alergií na tyto bílkoviny před alergickými reakcemi. Toto pravidlo platí i pro nebalené potraviny a pro provozovny společného stravování.

Práce má 114 stránek, 6 příloh (vlastní publikace), 104 literárních odkazů. K práci je přiložena brožurka shrnující dizertační práci i se seznamem publikací autorky.

Dizertační práce je uvedena kapitolou **Úvod**, kde je popsán současný stav v problematice alergií včetně potravinových alergií a potřeba mít k dispozici rychlou a spolehlivou analytickou metodu pro stanovení legislativou daných potravinových alergenů.

**Teoretická část** se začíná kapitolou **Potravinové alergie a Potravinové alergený**. Zde je popsána problematika potravinové alergie, vývoj v této oblasti jak z hlediska medicíny, tak legislativy. Jsou zde popsány hlavní potravinové alergený, které jsou na seznamu daném legislativou s výjimkou měkkýšů, včelího bobu (lupiny) a oxidu siřičitého a siřičitanů.

Další kapitola **Analytické metody pro detekci a stanovení obsahu potravinových alergenů** podrobně popisuje jednotlivé analytické metody, které je možné pro stanovení potravinových alergenů použít (průtoková cytometrie, nefelometrie a turbidimetrie, elektromigrační metody, chromatografické metody, hmotnostní spektrometrie, Western blotting, imunochromatografie, polymerázová řetězová reakce, biosenzory a imunochemické metody). Některé tyto metody byly testovány, ale nenašly praktické uplatnění. V současné době jsou pro rutinní stanovení potravinových alergenů využíván metody imunochemické metody. Další kapitola je věnována validaci imunochemických metod a legislativě v oblasti potravinového práva.

Vlastní **experimentální část** je věnována:

1. Přípravě protilátky (příprava antigenu, imunizace, testy sér)
2. Izolaci protilátek, přípravě pevné fáze a konjugátu
3. Vývoji a optimalizaci metody (příprava kalibrátorů, optimalizace jeho množství, ředění, optimalizace inkubační teploty a doby extrakce)
4. Definitivnímu protokolu a validaci soupravy

Validace metody zahrnuje stanovení řady faktorů, které jsou pro validaci metody potřebné (limit detekce, limit kvantifikace, opakovatelnost stanovení, správnost, zátěžové testy)

Na závěr validace bylo provedeno srovnání s konkurenční soupravou a mezilaboratorní testování, kterého se zúčastnilo 11 laboratoří a to tuzemských i zahraničních.

V kapitole **Výsledky** jsou podrobně popsány výsledky vývoje metody (testy sér, příprava pevné fáze a konjugátu) a optimalizace metody. Dalšími výsledky jsou výsledky věnované validaci vyvinuté metody (analytická a funkční citlivost, limit detekce, limit kvantifikace, testování specifity soupravy, opakovatelnost, správnost, zátěžové testy). Srovnání soupravy bylo provedeno srovnáním se soupravou Tepnel Biosystems. Velmi významné jsou výsledky kruhového testu, které bylo publikováno formou článku ve významném zahraničním časopise.

**Závěr:** Předložená disertační práce Ing. Květy Koryčanové je na velmi vysoké úrovni a prokazuje vynikající odbornou úroveň autorky. Výsledky této práce byly přeneseny do praxe, souprava je komerčně dostupná. Velmi oceňuji kruhový test, jehož příprava, komunikace s partnery a vyhodnocení byly jistě velmi náročné. Množství citované literatury je velké, formální úroveň práce je velmi dobrá. Práce je v daném oboru srovnatelná s pracemi v zahraničí a pokrývá důležitou problematiku analytické chemie, kterou je žádoucí řešit a zlepšovat právě ve vztahu k rostoucím počtu pacientů trpícím různými potravinovými alergiemi.

**Disertační práce obsahuje všechny náležitosti tak, aby mohla být přijata jako podmínka řízení k získání titulu PhD. Práci jednoznačně doporučuji k obhajobě.**

Přes vysoce kladné hodnocení si dovoluji mít pár drobných připomínek, které však nesnižují kvalitu práce. Jedná se spíše o drobné nedostatky, doporučení a upřesnění:

Str. 15: je uvedeno slovo „alergóza“. S tímto slovem jsem se osobně nesetkala, v této souvislosti se běžně používá slovo „alergie“. Prosím, jestli by mohla autorka upřesnit blíže, kde se toto v literatuře vyskytuje.

Str. 17: je zde uveden výčet legislativních dokumentů vztahujících se k potravinovým alergenům ( literatura pod čísla 8, 9, 10 a 11). Pokud by měl být výčet mapující vývoj legislativy úplný, měla by zde být uvedena ještě Směrnice Komise 2007/68/ES. Možná by nebylo na škodu uvést, že všechny tyto dokumenty již byly nahrazeny Nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011. Toto Nařízení je v dizertační práci zmiňováno v jiné části.

Str. 19: 1. odstavec, řádek 4 – překlep ve slově „ovomucoid“

Str. 20: slovo „tvaroh“ nahradit výrazem „kaseinová frakce“. Slovo „tvaroh“ je spíše používáno pro potravinářský produkt.

Str. 29: odstavec 2.3.1.5 – překlep ve slově „elektroosmóza“

Str. 30: 2. odstavec – prosím o vysvětlení tvrzení, že MS překonává nevýhody ELISA a PCR metod, protože se zaměřuje na alergen, ne na DNA. ELISA metody se také zaměřují na stanovení alergenu. Nejde jen o chybu ve formulaci???

Str. 37: je přerušeno pořadí citací literatury

Str. 40: 3. odstavec – překlep u slova „aptamer“

Str. 48: kapitola 3.4.2.2. – osobně bych použila místo slova „výživný“ spíše „výživový“

Str. 52: kapitola 3.5.4.3 – slovo „odvrhnutá“ je běžně používané slovo v této souvislosti?

Str. 53: ředění kalibrátorů – jedná se o ředění roztoků, je potom v pořádku uvedení koncentrace v mg/kg správné??? Vychází se z roztoku 1 mg/ml; je zde odkaz na kapitolu 3.3.1, kterou jsem nenašla. Prosím o upřesnění přípravy kalibrátorů

Str. 54: v kapitolách 3.6.3. a 3.6.4 prosím upřesnit dávkování konjugátu; konjugát je dle návodu ředěn 80x (str. 55); v textu je uvedeno „ do jamek bylo dávkováno 200  $\mu$ l konjugátu v množství 0,5  $\mu$ l až 2,5  $\mu$ l na jamku“. Příliš nerozumím postupu, pokud ředím konjugát 80x, tak mi vychází ředění 2,5  $\mu$ l koncentrátu a 197,5  $\mu$ l ředicího pufru pro 200  $\mu$ l (toto množství na jamku jsme používali běžně při ELISA stanovení).

Str. 57: kapitola 3.8.1. poslední věta: Za pomoci této kalibrační závislosti byla jako neznámý vzorek vyhodnocena vazebnost .....

Str. 69: opět v souvislosti s konjugátem: 2. Odstavec – konjugát byla použit v ELISA stanovení v koncentracích 0,5  $\mu$ l..atd. na jamku . Ne v množství ????

Str. 70: překlep ve slově „Ponceau S“

Str. 76: stanovení LOD a LOQ je počítána jako trojnásobek a desetinásobek průměrné směrodatné odchylky pro nulový kalibrátor (stanovení nulového kalibrátoru bylo 20x)???? Prosím vysvětlit k čemu prakticky slouží analytická a funkční citlivost.

Str. 77: kapitola 4.5.3 – roztoky byly připraveny v koncentracích v mg/kg??? Ne v mg/l??


Str. 79: kapitola 4.5.4.2 – nemá být „o koncentraci 5,4 mg proteinů vaječného bílku/ml“???

Str. 92: jen přepsat větu pod tabulkou: Výsledky uvedené v tabulce 34 neprokazují, že se kapalné komponenty ponechané 180 minut stát při laboratorní teplotě odpařují

Ve slově Britský malé „b“.

Str. 97/98: Přípomínka ke vzorku č. 2. V textu je napsáno, že u něho byla ve dvou laboratořích stanovena falešná **pozitivita**???? (hodnoty 1,0 a 1,4 mg EWP/kg), přitom u ostatních bylo stanoveno  $> 0,5$  mg EWP/kg. Dále je ve stejném odstavci napsáno, že výsledky vzorků, kde byl obsah EWP vyšší než poslední kalibrátor (také vzorek č.2) nebyly zařazeny do statistického vyhodnocení(v pořádku). Nejvyšší bod kalibrace má hodnotu 15 mg/kg a v tabulce je uvedeno číslo 0,5. V tabulce je zřejmě chyba.

V Praze, dne 25.6.2015

  
Ing. Dana Gabrovská, Ph.D.

# OPONENTNÍ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

## “Vývoj a validace ELISA soupravy pro stanovení alergenních proteinů vaječného bílku”

(Ing. Květa Koryčanová)

Předložená disertační práce se zabývá velice aktuální problematikou, a sice přítomností a stanovením alergenů v potravinách. V posledních letech došlo nejen k zakotvení pravidel pro označování a přítomnost alergenů v legislativě, ale také k významnému rozvoji metod stanovení alergenů a předložená disertační práce je významným příspěvkem v této oblasti. Práce popisuje, vedle teoretické části, vývoj a validaci ELISA soupravy pro stanovení alergenních proteinů vaječného bílku.

V teoretické části práce jsou přehledně a srozumitelně shrnuty stávající informace týkající se potravinových alergií a také metod pro jejich stanovení. K této části mám následující připomínky a dotazy:

- kap. 2.1, str. 17, 1. odstavec – citované předpisy (směrnice ES) již neplatí, byly nahrazeny jiným předpisem; zajímalo by mne jakým? – obdobně i strana 42, 3. odstavec;
- kap. 2.2.5., str. 21, 1. odstavec, 1. věta – namísto „ingredience“ by bylo vhodnější použít český výraz; zajímalo by mne, jaký výraz by uchazečka navrhovala použít;
- kap. 2.2.10., str. 25, 1. odstavec, 1. věta – namísto „karbohydrátové“ by bylo vhodnější použít český výraz; zajímalo by mne, jaký výraz by uchazečka navrhovala použít;
- kap. 2.2. - v uvedené kapitole teoretické části chybí podkapitoly, týkající se některých v legislativě zakotvených potravinových alergenů – zajímalo by mne, které alergeny zde chybí a z jakého důvodu;
- kap. 2.4.1., str. 40 – ve výčtu chybí některé podstatné dokumenty a normy týkající se validace metod (ISO 5725, Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004 apod.);
- kap. 2.4.2., str. 41 – namísto „Přesnost“ by mělo být, podle platné terminologie, uvedeno „Preciznost“

Experimentální část shrnuje provedené experimenty při vývoji, přípravě a validaci ELISA soupravy. Přesto, že jsou zde uvedeny všechny podstatné informace, mám k této části následující připomínky a dotazy:

- kap. 3.4.1., str. 47 – v textu není uvedeno, zda použité proteiny byly podrobeny tepelné zátěži či nikoli;
- kap. 3.6.2., str. 53 – chybí přesně složení zvoleného pufru (1xPBS s 1%BSA a 0,03% thimerosalu, pH 7,0), resp. není jasné, co znamená 1xPBS; experimentální závěr, tj. který pufr byl vybrán jako nejvhodnější, by pravděpodobně mělo být uvedeno až v části 4. Výsledky a diskuse;
- kap. 3.8.2., str. 57 – v Experimentální části by bylo vhodnější pouze popsat způsob stanovení meze stanovitelnost a detekce, konkrétní zjištěné hodnoty by pravděpodobně bylo vhodnější uvést v kapitole 4. Výsledky a diskuse
- kap. 3.8.2., str. 57 – v kapitole je uvedeno, že meze stanovitelnost a detekce byly odhadnuty ze směrodatné odchylky reprodukovatelnosti ( $s_R$ ), avšak v části 4.7. na straně 100 jsou uvedeny jiné hodnoty; z jakého důvodu?
- kap. 3.8.5., str. 58 – název parametrů („opakovatelnost ve stanovení“ – intra-assay a „opakovatelnost mezi stanoveními“ – inter-assay) a popis experimentů pro jejich stanovení uvedený v kap. 3.8.5.1. a 3.8.5.2. není příliš srozumitelný – nebylo by možné nalézt pro tyto parametry vhodnější termíny? – obdobně článek 4.5.4.1. a 4.5.4.2.

Z části věnované výsledkům a diskusi je zjevné, že v rámci dizertační práce bylo provedeno značné množství experimentů. Jednotlivé výsledky jsou v práci uvedeny přehledně a výstupy jsou srozumitelné. Přesto bych k této části měl několik připomínek a dotazů:



- kap. 4.5.1., str. 76 - v posledním odstavci je uvedeno, že LOD (0,08 mg/kg) a LOQ (0,28 mg/kg) byly stanoveny na základě měření analytické citlivosti, avšak v kapitole 3.8.2. je uvedeno, že LOQ a LOD byly odhadnuty ze směrodatné odchylky reprodukovatelnosti ( $s_R$ ); navíc v části 4.7. na straně 100 jsou uvedeny jiné hodnoty LOD a LOQ; prosím o vyjasnění;
- kap. 4.5.3., str. 78, Tabulka 20 – není jasné, jakým způsobem byly vypočteny hodnoty výtěžnosti v posledním sloupci tabulky, resp. poslední dvě hodnoty jsou pravděpodobně vypočteny chybně;
- kap. 4.5.6., str. 83-84 – v kapitole není uvedeno, jaké byly zjištěny hodnoty zkřížené reaktivity pro kuřecí maso, podle mého názoru by bylo vhodné toto zde uvést;
- kap. 4.7., str. 97, Tabulka 38 – hodnoty ve sloupci u vzorku 2, uvedené jako >0,5 by pravděpodobně měly být >15 (viz příslušný článek z JAOAC v příloze);
- kap. 4.7., str. 99-100, Tabulky 41 a 42 – některé parametry v tabulkách jsou chybně pojmenovány – „Opakovatelnost a směrodatná odchylka“, „Opakovatelnost“, „Reprodukovatelnost“ - jak mají být uvedené parametry pojmenovány správně?
- kap. 4.7., str. 100, poslední věta – namísto „Pravděpodobnostní stupeň...“ má být spíše „Hladina významnosti...“;

V přílohách práce je pak připojeno šest původních publikací, uveřejněných v recenzovaných časopisech, které se týkají problematiky stanovení alergenů a jsou převážně založeny na ELISA principu. V jedné z uvedených publikací je uchazečka uvedena jako první autor.

Celkově lze konstatovat, že předložená disertační práce je, i přes výše uvedené výhrady a připomínky, zpracována na dobré formální i odborné úrovni. Vyvinutá souprava je funkční a byla plně validována. Práci lze považovat za cenný příspěvek k problematice metod pro stanovení alergenů. Také celkový rozsah práce, množství realizovaných experimentů a publikační aktivity lze považovat za dostatečné. Cíle disertační práce, tak jak jsou uvedeny na straně 14, byly splněny. Vzhledem k tomu, že uchazečka prokázala schopnost samostatné výzkumné a vědecké práce a předložila řadu původních výsledků, **doporučuji** v souladu s §47 odst. 4 zákona č.111/1998 Sb. a v souladu se Studijním a zkušebním řádem University Pardubice **přijmout její disertační práci k obhajobě.**

Ing. Petr Cuhra

V Praze dne 14.6.2015