



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Děkanát, Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc

V Olomouci 20. června 2019

Zápis o konání obhajoby disertační práce v oboru Lékařská mikrobiologie

RNDr. Pavlína Lysková, odborná pracovnice v laboratorních metodách Zdravotního ústavu v Ústí nad Labem, studentka kombinované formy doktorského studijního programu *Lékařská mikrobiologie* na LF UP v Olomouci.

Téma práce: „Testování citlivosti kryptických druhů *aspergilů* ze sekce *Fumigati* a *Nidulantes* mikrodilučními standardizovanými metodikami“

Obhajoba se konala v Olomouci dne 20. června 2019 v 10:00 hod.

Komise:

předsedkyně: doc. MUDr. Dagmar Koukalová, CSc. ✓

místopředseda: prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D. ✓

členové: prof. MUDr. Daniela Kotulová, Ph.D. ✓

prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc. ✓

prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc. ✓

RNDr. Petr Petráš, CSc. ✓

doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc. ✓

Oponenti:

doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc. ✓

Oddělení klinické mikrobiologie Thomayerovy nemocnice v Praze

doc. MUDr. Filip Růžička, Ph.D. *opponent*

Mikrobiologický ústav LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Školitel: doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D. ✓

Předseda komise přednesl stručnou charakteristiku uchazeče, hodnocení školitele a vedoucího školicího pracoviště. Poté uchazeč vyložil podstatný obsah své disertace. Oponenti přednesli své posudky. Ve vědecké rozpravě vystoupili: viz příloha – zápis o diskusi.

Hlasování se účastnilo 7 ... členů komise. Kladně hlasovalo 7 ... členů, záporně 0 ... členů, neplatných lístků bylo odevzdáno 0 ...

Usnesení:

Přítomní členové komise tajným hlasováním rozhodli, že **RNDr. Pavlína Lysková** obhájila/neobhájila* disertační práci a doporučili/nedoporučili* udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

.....
doc. MUDr. Dagmar Koukalová, CSc.
předsedkyně komise

Oprava připomínek – posudky

A. Doc. Růžička

- ✓ Chybějící dodavatelé RPMI 1640 a MOPS – Merck (pův. Sigma Aldrich)
- ✓ **Příloha P1 nesedí počty testovaných kmenů** – omylem použita původní zdrojová tabulka všech testovaných kmenů, některé izoláty však nakonec nebyly zařazeny do celkových výsledků (nejčastěji protože kmen slabě sporuloval a proto nebylo možné dosáhnout požadovaného zákalu suspenze konidií..)

A. felis (27) navíc uvedeno tzn. netestováno:

IFM 54303 = CCF 4570

CCF 4172 (F47)

CCF 5616 (Felix Hayes D)

CCF 5614 (14/4138, Theodore Baird)

CCF 5618 (Luigi Croker)

CBS 130249 = DTO 155-G3 = CCF 5621 (1207/05, Snoopy Hoebes)

DTO 131-F6 = CCF 5626 (8651/09, Kipp)

A. udagawae (17) navíc uvedeno tzn. netestováno:

IFM 46973T = CBS 114217T = KACC 41155T = CCF 5672

IFM 5058 = CCF 4662

IFM 51744 = CCF 4671

IFM 54131 = CBM-FA-0697 = CCF 4663

CCF 4479 = CMF ISB 2189 (F70)

CMF ISB 2509 = CCF 5636 (F20)

CCF 5638 (3C8, Percy)

DTO 166-D6 = CCF 5639 (11.3356, Milo)

A. aureolus (3) navíc uvedeno tzn. netestováno:

IHEM 22515 (RV 71215)

- ✓ **Kde byly použity kmeny označené jako *Aspergillus* sp. a outgroup?** – *Aspergillus* sp. = *A. acrensis*; izoláty označené jako outgroup byly použity pro vytvoření dendrogramu

Připomínky a náměty pro diskusi

1) Proč autorka použila **geometrický průměr**? Nebyla by vhodnější hodnota pro charakteristiku souboru **medián** či **modus**?

Odpověď: GM byl použit, protože v literatuře v obdobných pracích téměř všude stanovují GM, MIC50 a MIC90, proto považují použití stejných parametrů za nejvhodnější, aby byla data srovnatelná. Navíc mi připadá, že hodnota je velmi vypovídající a je z ní patrné, zda testovaný soubor vykazuje spíše nižší či vyšší MIC. Hodnota může být samozřejmě skreslená pokud jsou dohromady zpracovány wild-type a non-wild type kmeny.

Medián podle definice odpovídá hodnotě **MIC50** (pro nalezení mediánu daného souboru stačí hodnoty seřadit podle velikosti a vzít hodnotu, která se nalézá uprostřed seznamu. Pokud má soubor sudý počet prvků, obvykle se za medián označuje aritmetický průměr hodnot na místech $n/2$ a $n/2+1$).

Modus je hodnota, která se v daném statistickém souboru vyskytuje nejčastěji (je to hodnota znaku s největší relativní četností). Stanovení modu by mohlo být přínosné, avšak v publikacích obdobného typu se nestanovuje.

2) Prosím o **statistickou analýzu výsledků**, že **rozdíly či shoda mezi metodami nebyly náhodné**, případně korelaci obou metod. Prosím také o **podrobnější rozbor rozdílů mezi oběma metodami**.

Po poradě se statistiky byly stanoveny následující parametry:

Procento shody obou metod

Spearmanův korelační koeficient – pro posouzení míry závislosti zjištěných koncentrací

p-hodnota pro Wilcoxonův párový test - pro porovnání koncentrací obou metod

Výsledky pro *Viridinutans*

Shoda EUCAST a YO po 48 hod

	agreement48		Spearman's r	Wilcoxonův párový test p
	procento	99% CI pro shodu		
amfotericin B	85,6%	73,6% - 93,6%	0,214	0,007
itrakonazol	36,7%	24,0% - 50,7%	0,263	0,015
posakonazol	70,0%	56,2% - 81,6%	0,348	<0,0001
vorikonazol	74,4%	60,9% - 85,3%	0,340	<0,0001

Korelační koeficienty byly všechny významně nenulové, hodnoty korelačních koeficientů odpovídají slabé pozitivní korelaci.

Wilcoxonův párový test prokázal signifikantní rozdíly mezi koncentrací EUCAST a YO48 pro všechna ATM.

Při **porovnání procenta shody** s rovnoměrnou distribucí (tj. náhodnou shodou) bylo prokázáno, že v **případě ITR jde pouze o náhodnou shodu** obou metod. V **případě ostatních ATM je shoda metod statisticky významná**.

Shoda EUCAST a YO po 72 hod

	agreement72		Spearman's r	Wilcoxonův párový test p
	procento	99% CI pro shodu		
amfotericin B	91,1%	80,6% - 97,1%	0,263	0,626
itrakonazol	56,7%	42,6% - 70,0%	0,167	<0,0001
posakonazol	87,8%	76,3% - 95,0%	0,366	<0,0001
vorikonazol	93,3%	83,5% - 98,3%	0,286	0,0001

Korelační koeficienty byly kromě korelace pro ITR významně nenulové, hodnoty korelačních koeficientů odpovídají slabé pozitivní korelaci.

Wilcoxonův párový test prokázal kromě AMB signifikantní rozdíly mezi koncentrací EUCAST a YO72.

Při porovnání procenta shody s rovnoměrnou distribucí bylo prokázáno, že v případě ITR jde pouze o náhodnou shodu obou metod. V případě ostatních ATM je shoda metod statisticky významná.

Výsledky pro *Nidulantes*

Shoda EUCAST a YO po 48 hod

	agreement48		Spearman's r	Wilcoxonův párový test p
	procento	99% CI pro shodu		
amfotericin B	65,4%	54,0% - 75,7%	0,273	<0,0001
itrakonazol	75,3%	64,5% - 84,2%	0,246	<0,0001
posakonazol	88,9%	79,9% - 94,8%	0,210	0,0001
vorikonazol	100,0%	96,4% - 100%	0,625	<0,0001

Korelační koeficienty byly kromě korelace pro POS všechny významně nenulové, hodnoty korelačního koeficientu u AMB a ITR odpovídají slabé pozitivní závislosti mezi výsledky obou metod, hodnota korelačního koeficientu u VOR odpovídá středně silné pozitivní závislosti.

Wilcoxonův párový test prokázal signifikantní rozdíly mezi koncentrací EUCAST testu a YO48.

Při porovnání procenta shody s rovnoměrnou distribucí bylo prokázáno, že **nejde pouze o náhodnou shodu obou metod.**

Shoda EUCAST a YO po 72 hod

	agreement72		Spearman's r	Wilcoxonův párový test p
	procento	99% CI pro shodu		
amfotericin B	50,6%	39,3% - 61,9%	0,263	<0,0001
itrakonazol	87,7%	78,5% - 93,9%	0,348	<0,0001
posakonazol	91,4%	83,0% - 96,4%	0,217	0,448
vorikonazol	100,0%	96,4% - 100%	0,707	<0,0001

Korelační koeficienty byly kromě korelace pro ITR významně nenulové, hodnoty korelačního koeficientu u AMB a ITR odpovídají slabé pozitivní závislosti mezi výsledky obou metod, hodnota korelačního koeficientu u VOR odpovídá středně silné pozitivní závislosti.

Wilcoxonův párový test prokázal kromě POS signifikantní rozdíly mezi koncentrací EUCAST a YO72.

Při porovnání procenta shody s rovnoměrnou distribucí bylo prokázáno, že v případě AMB jde pouze o náhodnou shodu obou metod. V případě ostatních ATM je shoda metod statisticky významná.

3) V souvislosti s autorčíným doporučením „Jejich identifikace však může být důležitá, protože některé z nich vykazují odlišný profil citlivosti ...“, viz str. 54, bych se chtěl zeptat jaké metody a postupy by autorka doporučila použít k odlišení kryptických druhů v rámci rutinní laboratorní diagnostiky?

Pro odlišení je v rutinní laboratoři nejvhodnější použít následující metody:

- a. Pro odhalení zástupců sekce *Fumigati*, testování růstu při 48°C a více roste *A. fumigatus* s. *stricto* (neroste-li, může se jednat o kryptický kmen; Alcazar-Fuoli et al., 2008)
 - b. Při ne zcela typickém vzhledu kolonií při porovnání s hlavním zástupcem (např. spíše sterilní bílé až šedavé mycelium zástupců sekce *Fumigati* oproti typické modrozelené, silně sporulující kolonii *A. fumigatus*)
 - c. Při podezření na neobvyklou rezistenci v porovnání s hlavním zástupcem
- ⇒ **Pokud izolát splňuje alespoň jeden z výše uvedených bodů, pak je na místě uvažovat o molekulárním dourčení izolátu**

B. Doc. Čermák

1) Jaký je Váš názor na detekci aspergilů PCR metodami přímo z klinického vzorku, jakým způsobem hodnotit pozitivní nálezy

PCR detekce přímo z klinického materiálu bude přínosná zejména u **primárně sterilních materiálů** (např. tkáň, krev). U nesterilních materiálů bude přínos omezený (např. sputum, BAT), protože se může jednat o kontaminaci nebo o přechodnou kolonizaci. Při hodnocení nálezu záleží také na typu pacienta (např. vysoce rizikový neutropenický pacient). Bude také přínosný po zahájení terapie, když předpokládáme, že původce po léčbě již nevyroste.

U bioptického vzorku je doporučeno provádět PCR detekci při pozitivní mikroskopii (nález hyf).

PCR je vhodné do kombinace s dalšími biomarkery jako je GM, BG.

PCR on bronchoalveolar lavage or cerebrospinal fluid

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment	Ref.
Patients undergoing allogeneic stem cell transplantation recipients not on mould-active prophylaxis	To diagnose IA	BAL PCR	B	II		[431]
Patients with pulmonary infiltrates and haematological malignancies and prolonged neutropenia	To diagnose IA	BAL PCR	B	II	Methodically different in-house assays, better performance in patients without antifungal treatment, PCR and galactomannan: increases specificity	[353,411,430,432–452]
ICU patients, mixed populations	To diagnose IA	BAL PCR	B	II	Commercially available <i>Aspergillus</i> PCR assays with good performance data	[81,88,450,453–455]
Patients with haematological malignancies	To diagnose CNS aspergillosis or meningitis	CSF PCR	B	II	113 CSF samples from 55 immunocompromised patients sensitivity 100%, specificity 93% (retrospective)	[415,456–459]

Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; IA, invasive aspergillosis; ICU, intensive care unit; QoE, Quality of evidence; SoR, Strength of recommendation.

Molecular diagnostics on biopsies

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment	Ref.
Biopsy with visible hyphae	To detect and specify a fungus	Broad-range PCR	A	II	High sensitivity (>90%) and high specificity (99%); various molecular-based techniques available	[61,463]
Biopsy with no visible hyphae	To detect and specify a fungus	Broad-range PCR	C	II	Sensitivity (57%) and specificity (96%); ability to distinguish other fungi; performance only in addition to other tests	[61,463]
Biopsy with visible hyphae	To detect and specify a fungus	Broad-range PCR on wax-embedded specimens	A	II	TaKaRa DEXPAT kit and QIAamp DNA mini kit detected fewer than 10 conidia/sample	[464,465]
Any	To detect and specify a fungus	Fresh tissue samples	B	II	<i>Aspergillus</i> PCR performance analysis yielded sensitivity/specificity rates of 86%/100% (79 patients, retrospective study)	[58]

Abbreviations: QoE, Quality of evidence; SoR, Strength of recommendation.

Ulmann et al., 2018

2) Možnosti stanovení rezistence na ATM molekulárně biologickými metodami – je možné využít MALDI-TOF, popř. PCR detekci i přímo ze vzorku?

S těmito metodami nemám žádné praktické zkušenosti.

Na rozdíl od kandid, triazolová rezistence u *A. fumigatus* je omezená a má za následek především mutace v genu *Cyp51A* (který je ekvivalentem k *Erg11*). Tyto „limitované“ mutace v *Cyp51A* mají za následek rezistenci k jednomu nebo více triazolovým ATM (VOR, ITR nebo POS), a dalo by se říct, že se dobře hodí pro molekulární detekci.

Komerční firmy nabízejí různé PCR metody pro detekci rezistence u ASFU (např. GALI AsperGenius detekce L98H; Tandemové repetice 34; T289A a Y121F).

Na druhou stranu je otázka, výtěžnosti těchto metod v ČR, kde byl dosud potvrzen pouze jediný rezistentní izolát ASFU (is. 26.10.2018 v lab. mykologie OPMM, Praha, ZUÚL). Vypadá to, že výskyt rezistentních kmenů v ČR je nízký.

V ČR zatím rutinní detekce rezistence u ASFU nejspíš nemá valný smysl. Bylo by potřeba zjistit epidemiologické přehledy, a vytipovat lokality se zvýšeným výskytem rezistentních izolátů. Dr. Hubka má studentku, která by se měla problematikou zabývat v praxi.

Rezistence se může vyvinout také v průběhu terapie.

Na druhou stranu byly popsány kmeny, které jsou rezistentní (mají zvýšené hodnoty MIC, které neodpovídají WT-izolátům), ale nenesou žádnou mutaci (takže se jedná o WT kmeny).

U aspergilů MALDI-TOF zkoušeno pouze pro CAS (Carolus et al., 2012). S dobrým výsledkem, avšak autoři uvádějí, že u aspergilů, vzhledem k malému množství testovaných izolátů, zejména pak rezistentních *A. fumigatus*, budou potřeba na toto téma ještě další studie.

Dotazy po obhajobě:

Prof. MUDr. Kotulová, CSc.

Na pracovišti paní profesorky ve výsledku rovnou uvádějí podle hodnoty MIC dávkování ATB, je toto možné i u ATM?

Velmi obtížná otázka. Na ATB pracovištích, na kterých jsem pracovala, se tato praxe neužívala a je možné, že u mykotických organismů, které jsou v případě vláknitých hub mnohobuněčné, to nebude zcela možné. I když teoreticky tam, kde se dostaneme na hodnotu I/SDD (terapie závislá na dávkování), by to možná šlo.

RNDr. Petráš, CSc.

Je možná identifikace kryptických druhů aspergilů na MALDI?

Určitě ano, některé typy MALDI umožňují vložit nový druh do databáze. Je možné požádat taxonoma MUDr. Mgr. Víta Hubku, PhD., který má kmeny spolehlivě určené, jistě by kmeny poskytl.