

Oponentský posudek disertační práce Ing. Magdalény Chromé na téma „Charakteristika bakteriálních patogenů, včetně genů rezistence, pomocí PCR a analýzy křivky tání“.

Předložená disertační práce obsahuje 136 stran textu včetně literárních odkazů, seznamu tabulek, obrázků, grafů, zkratk a přehledu publikovaných výsledků.

Téma práce navazuje na publikace diplomantky a práce jejího školitele, pana profesora Koláře. Sledování rezistence k antibiotikům u patogenních bakteriálních kmenů na molekulární úrovni patří v současné době k velmi důležitým a moderním směrům v klinické mikrobiologii. Stanovení genů zodpovědných za rezistenci bakterií k antibiotikům nám pomáhá pochopit a vysvětlit problémy, které v posledních letech nastaly v oblasti antibiotické terapie. Rovněž má velký význam mezioborový v oblasti epidemiologické. Přináší zásadní poznatky v oblasti vzniku a šíření bakteriální rezistence. Na poli molekulárně biologických metod představuje detekce genů rezistence velmi složitou problematiku, náročnou jak po stránce materiální, technologické, tak i z hlediska požadavků na erudici a schopnosti pracovníků. Lze říci, že se jedná o jeden z prioritních směrů současného vývoje jak mikrobiologie jako takové, tak zejména klinické mikrobiologie. Ústav mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci patří k předním pracovištím v České republice, které se touto problematikou zabývají. Svědčí o tom i granty, které v této oblasti získali a byly i základem posuzované disertační práce. Velmi přínosná je rovněž spolupráce s dalšími významnými zdravotnickými zařízeními v moravském regionu a spolupráce s laboratořemi veterinární mikrobiologie. Zadáni předložená práce je široce pojaté, svojí koncepcí i získanými prioritními výsledky má velký význam nejen pro obor lékařské mikrobiologie, ale i pro obory epidemiologické a veterinární medicíny.

Cíle práce byly stanoveny na základě publikovaných studií ve světové literatuře. Zahrnují analýzu bakterií z humánní i veterinární oblasti, vlastní metodiku detekce širokospektrých betalaktamáz i epidemiologickou analýzu pomocí molekulárních metod. Postup řešení vytyčených problémů je metodický a přesný. Použité metody jsou odpovídající pro získání adekvátních výsledků jak v oblasti detekce betalaktamáz, tak i v oblasti epidemiologické analýzy. Všechny čtyři cíle stanovené v zadání práce byly splněny.

Získané výsledky jsou přesně, metodicky popsány a v několika případech představují prioritní data pro Českou republiku. Za nejdůležitější považuji část týkající se detekce širokospektrých betalaktamáz pomocí multiplex PCR a následné analýzy křivky tání DNA. Získání dat pomocí ověřených špičkových metodik je zajisté přínosné, zejména v případě prioritních dat. Autorka se kromě toho pustila i do vývoje nové metodiky, kterou odzkoušela i v praxi. Tuto činnost považuji za nejprínosnější, ať již jsou výsledky více či méně pozitivní. Svědčí to o tom, že autorka je schopna samostatné vědecké práce a aktivního řešení problémů.

Formální stránka

Práce je důsledně a naprosto systematicky členěna na hierarchii jednotlivých kapitol, které často představují jen několik vět. Je to jistě didakticky správné, leč čtenář, který není zběhlý v problematice se v množství kapitol obtížně orientuje a musí listovat v jinak naprosto přesném obsahu. Členění práce odpovídá standardnímu členění vědeckých prací. Přes obsáhlou publikační aktivitu autorky je znát mládí a menší zkušenost autorky. Některé části textu jsou méně srozumitelné nebo příliš stručné (např. popis metody HRM s. 17, která je pro práci klíčová). To samé platí pro popis výsledků, kde by si některé tabulky a grafy zasloužily podrobnější vysvětlení. Tabulky 20 a 21 nejsou jednoznačně popsány, z textu není zcela jasné, jak se zjistila přítomnost enzymu TEM-1. Na obrázcích 28 – 33 není popis barev jednotlivých křivek. V diskuzi téměř každá kapitola (např. 5.11.1, 5.1.2, 5.2.1) začíná popisným textem, který patří svým obsahem do úvodu.

I přes značnou pozornost, kterou autorka práci věnovala, jsou v textu občas překlepy (s. 16, 17, 19, 52, 99), schází slovíčko nebo se vyskytují nestandardní znaky. Pro danou tematiku je charakteristické množství různých zkratk. Seznam zkratk je rozsáhlý, některé v něm ale nejsou uvedeny (např. "ISCR" s.21, "RNAI" s. 43, tab. 18). Tyto připomínky ale nepovažuji za podstatné a rozhodně nesnižují celkovou úroveň práce. Jazykovou stránku textu si vzhledem k mým znalostem slovenštiny nedovoluji hodnotit.

Práce s literaturou je na vysoké úrovni, všechna zásadní tvrzení jsou doložena celkem 133 recentními odkazy na národní i mezinárodní literaturu. Po formální stránce jsou odkazy rovněž bezchybné.

Je třeba ocenit, že Ing. Magdaléna Chromá je autorkou či spoluautorkou celkem devíti prací v recenzovaných časopisech, z toho 3x v časopisech s impact faktorem. Dále 11x

hlavním autorem a 5x spoluautorem přednášek a posterů s abstraktem na významných domácích i zahraničních odborných kongresech a konferencích.

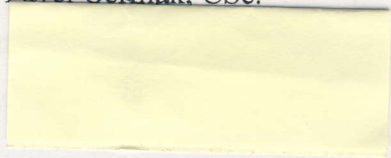
Předloženou disertační práci **doporučuji** k obhajobě a předkladatelce by měl být na základě úspěšné obhajoby udělen akademický titul doktor ve zkratce Ph.D. dle §47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

K předkladatelce práce mám tři dotazy:

1. Co je metoda fingerprinting? V práci je uvedena na str. 21 mezi metodami na typizaci. Jak se liší například od metody RFLP?
2. Jaký je rozdíl mezi metodou DNA mikročipů a metodou microarray, která se začíná používat v mikrobiologické diagnostice a bývá rovněž označována jako čipová metoda (např. systém Infiniti distribuovaný firmou BioVendor).
3. Jakým způsobem byly získány zdravé osoby pro detekci enterobakterií s produkcí širokospektrých betalaktamáz, jaká byla kritéria, byl to reprezentativní vzorek populace?

V Praze dne 25.3.2011

Doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.



OPONENTSKÝ POSUDEK

DOKTORSKÉ DISERTAČNÍ PRÁCE

Ing. Magdalény CHROMÉ

Téma: Charakterizace bakteriálních patogenů, včetně genů rezistence, pomocí PCR a analýzy křivky tání

Doktorská práce Ing. Magdalény Chromé je relativně dosti rozsáhlá práce čítající 137 stran textu včetně souhrnu, literatury a seznamu tabulek, obrázků a grafů. Celá studie je velmi výstižně doplněna o 33 tabulek 39 obrázků, které jak z hlediska metodického, tak i vzhledem k získaným výsledkům, jsou ukázkou optimálního a racionálního přístupu autorky k řešení problému. K práci je přiložena bohatá (133) literární dokumentace a i vlastní publikace a přednášková aktivita. Jde především o vlastní, nebo kolektivní publikace vztahující se přímo k řešení problému (3 publikací v časopisech s impakt faktorem, 5 publikací v časopisech s recenzním řízením bez impakt faktoru). Pozoruhodná je i přednášková aktivita (16) především ve spolupráci s jinými pracovníky.

Zvolené téma.

Zvolené téma je vysoce aktuální. Změny v bakteriální ekologii jsou v poslední době charakterizovány, kromě jiného, zvýšeným výskytem rezistentních enterobakterií. Tyto kmeny mohou být původci řady závažných infekčních komplikací, které bývají velmi obtížně terapeuticky zvládnutelné.

Celá studie řeší problematiku enterobakterií s produkcí širokospektrých betalaktamáz (ESBL a AmpC) a to jak v humánní, tak i v animální sféře. Kromě dnes již rutinně zavedených metod doplňuje autorka svou práci o genetické metody. Jde nejen o PCR, ale i o analýzu křivky tání DNA při genetické charakteristice ESBL-pozitivních izolátů. Práce je doplněna o epidemiologickou analýzu ESBL-pozitivních izolátů z jednotek intenzivní péče. Současně byla u těchto izolátů provedena charakteristika genů kódujících produkci těchto enzymů.

Studie řeší velmi aktuální otázku týkající se výskytu ESBL pozitivních enterobakterií a to především za pomoci moderních genetických metod. Je přínosem především pro vlastní obor, který musí být připraven cíleně řešit infekční komplikace vyvolané těmito kmeny.

Postup řešení problému a použité metody

V úvodu podává autorka zcela vyčerpávající odpověď na otázku týkající se vzniku a mechanismů rezistence k antibiotikům, a problematiku detekce bakteriální rezistence. Zvláštní úsek je věnován molekulárně genetickým metodám, které se používají na monitorování šíření ESBL a Amp C a určení horizontálního přenosu determinant rezistence.

Metodicky je práce rozdělena do čtyř základních kroků.

1. Analýza enterobakterií s produkcí širokospektrých betalaktamáz v humánní populaci
2. Těžiště analýza v animální populaci.
- 3 Využití genetických metod (PCR a křivky tání) při charakterizaci ESBL-pozitivních izolátů a konečně
4. Epidemiologická analýza ESBL pozitivních kmenů *E.coli* na JIP.

Těžiště celé studie jsou metodické postupy týkající se genetických vyšetření u ESBL pozitivních kmenů. Jednalo se o multiplex PCR

analýzu křivky tání

elektroforetickou separaci produktů amplifikace

metoda přímé sekvence

Pro epidemiologickou typizaci kmenů produkujících širokospektré betalaktamázy byla použita metoda pulzní gélové elektroforézy.

Souhrnně lze tedy říci, že metodicky řešila autorka stávající problematiku na velmi vysoké úrovni. Pokud mohu posoudit jako klinický mikrobiolog jsou použité genetické metody jedinečné. Logistická i odborná úroveň pracovního postupu jednoznačně přispěla k splnění stanoveného cíle celé studie.

Získané výsledky

Dosažené výsledky prokázaly výskyt ESBL a AmpC betalaktamáz u enterobakterií izolovaných z klinického materiálu u nemocných i zdravých osob. A to:

- u kmenů *Klebsiella pneumoniae* byl prokázán výskyt ESBL pozitivních kmenů v 19% na JIP
- na hematologickém oddělení bylo prokázáno 7 kmenů *Kl.pneumoniae* s produkcí AmpC širokospektrých betalaktamáz
- celková prevalence ESBL a Amp C širokospektrých betalaktamáz získaných z gastrointestinálního traktu se pohybovala okolo 1%.
- velmi zajímavý byl průkaz jednonukleotidové mutace ve specifických pozicích vedoucí k nadprodukci AmpC.
- byla prokázána přítomnost ESBL a AmpC enzymů u drůbeže.

Byla navržena metoda využívající multiplex PCR a analýzy tání s vysokým rozlišením umožňující amplifikaci třech *bla* génů v jedné reakci a následnou identifikaci přítomných betalaktamáz.

Výsledky jednoznačně poukázaly na význam moderních genetických metod pro průkaz jednotlivých faktorů rezistence. V tom vidím velké pozitivum i příslib do budoucnosti mikrobiologického vyšetřování.

Ve všech bodech, které si autorka zadala, splnila dizertační práce svůj cíl. Za velmi významnou považuji především tu skutečnost, že poukázala na význam genetických metod při sledování rezistence na antimikrobní látky.

Vlastní práce je na velmi dobré vědecké úrovni. Celé její uspořádání má pevný řád a logickou následnost. O publikační aktivitě jsem se již zmínil.

Na kandidátku mám jako klinický mikrobiolog jedinou otázku.

Jak si autorka představuje uplatnění aplikace a využití těchto metodik v klinické praxi?

Na základě předložené práce a získaných výsledků, které beze zbytku splnily stanovené cíle

doporučuji, aby Ing. Magdaléně Chromé byl na základě paragrafu 47 Zákona o vysokých školách č.111/98 Sb.

udělen titul Ph.D.

V Mělníku dne 8.2.2011

Doc.MUDr.  Lochmann, CSc.

