

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DIZERTAČNÍ PRÁCI

RNDr. Pavlína Lysková (2019): Testování citlivosti kryptických druhů aspergilů ze sekce *Fumigati* a *Nidulantes* mikrodilučními standardizovanými metodikami. Dizertační práce LF UP v Olomouci, 102 pp., včetně příloh

Předložená disertační práce se věnuje citlivosti kryptických druhů aspergilů sekce *Fumigati* a *Nidulantes* k antimykotikům. Analyzuje profily rezistence k antimykotikům u jednotlivých druhů a porovnává metody, které mohou být rutinně použity k testování citlivosti k antimykotikům u těchto agens.

Dizertační práce má standardní členění vědecké práce a je doplněna o řadu obrazových příloh a tabulek. Autorka vychází z rozsáhlého souboru literatury, který obsahuje 102 položek, vesměs recentních prací.

Ve stručném ÚVODU je na 19 stranách čtenář seznámen s rodem *Aspergillus*, a to včetně kryptických druhů, s klinickým významem těchto mikromycet a jejich rezistencí k antimykotikům. Dále se autorka věnuje problematice laboratorního testování citlivosti aspergilů k antimykotikům.

Autorka ve své práci využívá rozsáhlý soubor literárních zdrojů (102), včetně recentních prací. Citace jsou korektně uvedeny v kapitole Použitá literatura

CÍLEM práce bylo získat praktické zkušenosti s metodikou zjišťování minimální inhibičních koncentrací u aspergilů dle The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing a její porovnání s komerční soupravou YeastOne. Dále pak stanovení MIC vybraných antimykotik u méně obvyklých či kryptických druhů aspergilů.

MATERIÁL A METODY jsou podrobně popsány na 10 stranách. Postrádám informace o dodavateli některých chemikálií a médií, konkrétně RPMI 1640 a MOPS. Oceňuji rozsáhlou sbírku kryptických druhů aspergilů, které byly pro účely této práce shromážděny. Nesedí mi však počty kmenů testovaných v práci a počty kmenů uváděné v příloze, zejména v příloze P1. Které kmeny uvedené v této příloze byly tedy použity? Např. v příloze je uvedeno 35 kmenů *A. felis*, ale v samotné práci je otestováno pouze 27, podobně u dalších druhů *A. pseudoviridinutans*, *A. viridinutans*, *A. udagawae* aj. Kde byly v předložené práci použity kmeny ze skupin uvedených v příloze P1 jako „*Aspergillus* sp.“ a outgroup“?

VÝSLEDKY jsou uvedeny na 18 stranách, a jsou prezentovány zejména formou přehledných tabulek a grafů. Grafy č. 3–6 a dále grafy č. 11–14 by měly vyšší vypovídací hodnotu, kdyby v nich byly vyjádřeny další statistické parametry popisující jednotlivé soubory. Zejména bych ocenil popis rozptylu, např. kvantily a mezní hodnoty. Bylo by tedy vhodnější místo sloupcových grafů jen s jednou hodnotou použít krabicové grafy, případně u sloupcového grafu doplnit charakteristiky rozptylu. Při hodnocení výsledků bych vedle procenta shody ocenil podrobnější statistickou analýzu, včetně testových charakteristik. Zejména potvrzení, že rozdíly či shoda mezi metodami nebyly náhodné, případně korelaci obou metod. Také by bylo vhodné zařadit podrobnější rozbor diskrepancí.

V DISKUSI autorka na 8 stranách adekvátně komentuje dosažené výsledky, a to včetně srovnání s výsledky jiných autorů. Nakonec jasně formuluje ZÁVĚR.

Text obsahuje řadu drobných chyb, jako je např. nesprávné používání spojovníku a pomlčky (např. str. 32 „2-5“, str. 34 „1,5 – 8“), chybějící mezery za matematickými znaky (např. na str. 27 „n=17“ aj.), psaní mezery mezi číslem a °C (str. 30 „-70°C“ aj.) či mezi číslem a časovými jednotkami (např. na str. 33 „24h“). Je také třeba vysvětlit všechny používané zkratky, např. MOPS na str. 28. Navzdory těmto chybám je text srozumitelný.

HODNOCENÍ VLASTNÍ PRÁCE

Výsledky RNDr. Pavlína Lyskové jsou původní a přinášejí celou řadu důležitých poznatků. Pravděpodobně nejdůležitějším poznatkem předložené dizertační práce je potvrzení zvýšených hodnot MIC u některých druhů sekce *Fumigati*. Z praktického hlediska je cenné porovnání obou metod stanovení MIC u aspergilů a potvrzení skutečnosti, že komerční souprava YeastOne je vhodná k tomuto účelu.

O vědecké kvalitě předložené práce svědčí mimo jiné i fakt, že výsledky této práce jsou publikovány prestižním mykologickým časopisem *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Q1). RNDr. Pavlína Lysková publikovala v průběhu studia řadu článků, včetně osmi prací v impaktovaných časopisech (3 prvoautorské). Je škoda, že většina těchto publikací není do dizertační práce zahrnuta. Pak by bylo možno zpracovat dizertační práci jako komentovaný soubor prací a komplexněji seznámit recenzenta či čtenáře s celým záběrem odborných aktivit RNDr. Pavlína Lyskové.

PŘIPOMÍNKY A NÁMĚTY PRO DISKUSI:

- 1) Proč autorka použila geometrický průměr? Nebyla by vhodnější hodnota pro charakteristiku souboru medián či modus?
- 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.
- 3) V souvislosti s autorčím 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?

ZÁVĚR

Domnívám se, že studentka prokázala své tvůrčí schopnosti a předkládá práci, která podle § 47 VŠ zákona 111/98 Sb. jednoznačně splňuje požadavky kladené v daném oboru na disertační práci. Práci proto doporučuji k obhajobě.



V Brně, 14. 5. 2016

Doc. MUDr. Filip Růžička, Ph.D.

Oponentský posudek disertační práce RNDr. Pavlína Lyskové na téma „Testování citlivosti kryptických druhů aspergilů ze sekce *Fumigati* a *Nidulantes* mikrodilučními standardizovanými metodami“.

Předložená disertační práce obsahuje 103 stran textu včetně literárních odkazů, seznamu tabulek, obrázků, grafů, zkratk a přehledu publikovaných výsledků.

Téma práce navazuje svým zaměřením na práce jejího školitele, pana docenta Petra Hamala a dalších pracovníků Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Lékařská mykologie nabývá stále větší důležitosti. Souvisí to s rozvojem medicíny a zvyšujícím se počtem pacientů se závažnými alteracemi imunologické odpovědi. Infekce způsobené vláknitými houbami mohou představovat u řady pacientů závažné život ohrožující komplikace. Z těchto důvodů je velmi důležité, aby se mikrobiologická diagnostika vláknitých plísní stala standardním a dostupným vyšetřením. Laboratoře provádějící rutinní diagnostiku ale narážejí na řadu problémů. Vzhledem k nízkému patogennímu potenciálu aspergilů a jejich ubikvitárnímu výskytu je velmi důležité správné vyhodnocení klinického významu nálezu vláknité plísňe ve vyšetřovaném klinickém vzorku. Autorka tuto problematiku rozebírá v „Úvodu do problematiky“ a uvádí kritéria, kdy je možné považovat nález za klinicky významný. Rovněž upozorňuje na značně komplikovanou systematiku rodu *Aspergillus* včetně problematiky kryptických druhů aspergilů a jejich správné identifikace. Jako zásadní vidí fenotypické stanovení citlivosti aspergilů na antimykotika metodami *in vitro*. Vedle kvalitativních diskových metod jsou to zejména kvantitativní metodiky stanovení inhibičních koncentrací. Byly vytvořeny standardní metody pro stanovení MIC a MEC pro testování vláknitých hub. Celosvětově ale dosud nebyly u řady druhů popsány rozmezí hodnot MIC a MEC a tím pádem ani nejsou k dispozici hodnotící kritéria. Svoji prací se autorka snaží přispět k řešení nastalé situace. Základem je zavedení standardizované metodiky EUCAST-AFST E.Def.9.3. a stanovení MIC rozsáhlého souboru převážně kryptických kmenů aspergilů touto metodou. Jako další srovnává výsledky standardizované metodiky s výsledky komerčního, v rutinní praxi používaného systému Sensititre YeastOne. Cíle práce byly stanoveny jednoznačně, s praktickými výstupy. Téma práce hodnotím jako velmi aktuální, řešící současné zásadní problémy klinické mykologie. Získané výsledky lze prakticky okamžitě aplikovat v rutinní mikrobiologické diagnostice.

Použité metody jsou odpovídající pro získání adekvátních výsledků. Práce dokladuje zvládnutí standardní metodiky EUCAST-AFT. Rozsah souboru umožnil i stanovení epidemiologických parametrů ECOFF MIC₅₀ a MIC₉₀.

Získané výsledky jsou přesně metodicky popsány a prezentovány množstvím tabulek a grafů. Ve většině případů představují prioritní data nejen pro Českou republiku, o čemž svědčí i jejich publikace v prestižním mikrobiologickém časopisu. Všechny cíle stanovené v zadání práce byly splněny.

V rozsáhlé diskuzi autorka porovnává výsledky své práce s publikovanými údaji. V případě neshody týkající se rozdílných výsledků standardizované a komerční metody stanovení MIC dokázala najít příčinu a správně ukazuje na nutnost změny hodnocení komerční metodiky. To považuji za velmi důležitý praktický přínos pro rutinní diagnostiku. Prokázala, že se dokonale orientuje v dané problematice a je schopna správně posoudit získané výsledky. Práce svědčí to o tom, že autorka je schopna samostatné vědecké činnosti a aktivního řešení problémů.

Formální stránka

Práce je důsledně a naprosto systematicky členěna na hierarchii jednotlivých kapitol. Členění práce odpovídá standardnímu členění vědeckých prací. Práce je napsána stručným, výstižným jazykem, výsledky jsou dokumentovány tabulkami, grafy i barevnými obrázky. Autorka věnovala formální stránce opravdu velkou pozornost, prakticky se nevyskytují chyby. Jazyková stránka práce je rovněž na vysoké úrovni.

Práce s literaturou je rovněž na vysoké úrovni, všechna zásadní tvrzení jsou doložena celkem 102 recentními odkazy na národní a zejména mezinárodní literaturu. Po formální stránce jsou odkazy rovněž bezchybné.

Je třeba ocenit, že RNDr. Pavla Lysková je autorkou či spoluautorkou celkem patnácti prací v recenzovaných časopisech, z toho 8x v časopisech s impact faktorem. Dále 14x hlavním autorem 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 předkladateli práce mám tyto dotazy:

1. Jaký je Váš názor na detekci aspergilů PCR metodami přímo z klinického vzorku, jakým způsobem hodnotit pozitivní nálezy.
2. Možnosti stanovení rezistence na antimykotika molekulárně biologickými metodami – je možné využít MALDI-TOF, popřípadě PCR detekci i přímo ze vzorku?

V Praze dne 23.5.2019



Doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.