

OPONENTSKÝ POSUDEK

DOKTORSKÉ DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Venduly HUSIČKOVÉ

Téma: Identifikace a typizace bakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz .

Doktorská práce Mgr. Venduly Husičkové relativně dosti rozsáhlá práce čítající 121 stran textu včetně literatury a seznamu tabulek, obrázků a grafů. Celá studie je velmi výstižně doplněna o 30 tabulek, 5 grafů a 10 obrázků, které jak z hlediska metodického, tak i vzhledem k získaným výsledkům, jsou ukázkou racionálního přístupu autorky k řešenému problému. K práci je přiložena bohatá (156) především zahraniční literární dokumentace a i vlastní publikace a přednášková aktivita. Jde především o kolektivní publikace vztahující se přímo k řešenému problému (3 publikace v časopisech s impakt faktorem a 4 publikace v časopisech s recenzním řízením bez impakt faktoru). Přednášková aktivita (5) byla uskutečněna především ve spolupráci s jinými pracovníky.

Zvolené téma.

Zvolené téma vychází z problematiky, která se již dlouhodobě řeší na tomto pracovišti .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 u hospitalizovaných pacientů (jednotky intenzivní péče novorozenecké oddělení) , tak i v komunitě. Kromě dnes již rutinně zavedených fenotypických metod doplňuje autorka svou práci o metody genetické (PCR).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 problematiky detekce bakteriální rezistence. Zvláštní úsek je věnován biochemické podstatě vzniku rezistence a molekulárně genetickým metodám, které se používají na monitorování šíření ESBL a Amp C. Metodicky je práce rozdělena do pěti základních kroků.

1. Výskyt nejčastějších enterobakterií s produkcí širokospektrých betalaktamáz v nemocničním prostředí a jejich fenotypová analýza
2. Tataž analýza v komunitě.
- 3 Genetická analýza širokospektrých beta- laktamáz
- 4.Stanovení identity bakteriálních izolátů s produkcí širokospektrých beta- laktamáz
- 5.Stanovení PMQR genů u ESBL pozitivních izolátů *Klebsiella pneumoniae*

Souhrnně lze tedy říci, že metodicky řešila autorka stávající problematiku na 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 analyzovaly výskyt ESBL a AmpC beta-laktamáz u enterobakterií izolovaných z klinického materiálu hospitalizovaných osob.

- prevalence ESBL pozitivních kmenů nezařazených zařízení Olomouc, Ostrava a Zlín činila 7%. Nejčastěji byly zastoupeny kmeny *klebsiell* a *E.coli*.
- na novorozeneckém oddělení Olomouc byly prokázány ESBL a AmpC pozitivní kmeny u 3,6% resp. 1,1%. Nejčastěji byly izolovány kmeny *E.coli* a *Enterobacter spp.*
- celková prevalence ESBL a Amp C širokospektrých betalaktamáz získaných z gastrointestinálního traktu pacientů v FNOL se pohybovala u ESBL okolo 8% a u AmpC v 0,3%. Dominovaly kmeny *Klebsiella pneumoniae*.
- v prostředí jednotek intenzivní péče byly izolovány 4 kmeny ESBL pozitivní a 7 kmenů AmpC pozitivních. Šlo opět většinou o kmeny *klebsiell*.
- prevalence ESBL a AmpC pozitivních kmenů činila v komunitě 3,2% resp. 1,1%.
- genetická analýza prokázala, že nejčastější betalaktamázou ESBL byl typ CTX-M. Multiplex PCR rovněž prokázal AmpC pozitivní izoláty u novorozenců.
- stanovení identity potvrdil šíření rezistentních izolátů mezi pacienty, ale přenos z prostředí na pacienty prokázán nebyl. .

Výsledky jednoznačně poukázaly na význam komplexního studia včetně 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 tyto otázky

- 1 Jak si autorka představuje uplatnění aplikace a využití především genetických metodik v současné klinické mikrobiologii?

2. Jaké jsou terapeutické možnosti u infekcí vyvolaných enterobakteriemi s produkcí širokospektrých beta – laktamáz?
3. Vzhledem k provedeným genetickým analýzám rád bych se zaptal na úroveň rezistence klinicky významných enterobakterií k fluorochinolonům?

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

doporučuji, aby Mgr. Vendule Husíčkové byl na základě paragrafu 47 Zákona o vysokých školách č.111/98 Sb.

udělen titul Ph.D.

V Mělníku dne 10.8.2012

Doc.MUDr Otto Lochmann,CSc.

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Venduly Husičkové na téma „Identifikace a typizace bakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz“.

Předložená disertační práce obsahuje 121 stran textu včetně literárních odkazů, seznamu tabulek, obrázků, grafů, zkratk a přehledu publikovaných výsledků.

Téma práce navazuje svým zaměřením na práce jejího školitele, pana profesora Koláře a dalších pracovníků Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Sledování rezistence k antibiotikům u patogenních bakteriálních kmenů patří v současné době k velmi důležitým a moderním směrům v klinické mikrobiologii. Výzkum v této oblasti probíhá zejména na molekulární úrovni. Jeho výsledky nám pomáhají pochopit a vysvětlit problémy, které v posledních letech nastaly v oblasti antibiotické terapie v souvislosti se stoupající rezistencí na antibiotika. Rovněž mají velký význam mezioborový, zejména v oblasti epidemiologie. Zde umožňují detailně sledovat cesty šíření rezistentních bakteriálních kmenů. 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. Předložená disertační práce dokladuje zvládnutí velmi složitých metodik molekulární detekce genů rezistence. Zároveň předkládá jejich využití k získávání konkrétních údajů o výskytu vybraných mechanismů rezistence v souborech bakteriálních patogenů získaných ze vzorků z Fakultní nemocnice v Olomouci, Fakultní nemocnice v Ostravě a Krajské nemocnice T. Bati ve Zlíně. Téma práce hodnotím jako velmi aktuální, řešící současné zásadní problémy klinické mikrobiologie. Lze říci, že se jedná o jeden z prioritních směrů aplikovaného výzkumu, který zasahuje do problematiky antibiotické terapie a tím pádem má vliv na většinu lékařských oborů. Jako další oblast, ve které je práce velmi aktuální, je epidemiologie a zejména v posledních letech se formující oblast nemocniční epidemiologie. Zde práce ukazuje cestu k přesnému získávání informací, které byly dosud jen velmi obtížně získatelné. Velmi přínosná je rovněž spolupráce s dalšími významnými zdravotnickými zařízeními moravského regionu. Zadání předložené práce je široce pojaté, což už je zřejmě standardem pro pracoviště školitele. Získané výsledky jsou prioritní a v dané oblasti není v České republice pracoviště, které by se touto problematikou zabývalo na takovéto úrovni.

Cíle práce byly stanoveny na základě publikovaných studií ve světové literatuře. Zahrnují typizaci bakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz izolovaných z různých

souborů klinických a z nemocničního prostředí. Typizace byla zaměřena na vybrané geny zodpovědné za produkci širokospektrých beta-laktamáz, PMQR genů zodpovědných za rezistenci na fluorochinolony u producentů betalaktamáz a na stanovení identity nebo míry podobnosti bakteriálních kmenů nesoucích výše uvedené geny rezistence. Postup řešení vytyčených problémů je metodický a přesný. Použité metody jsou odpovídající pro získání adekvátních výsledků jak v oblasti detekce betalaktamáz, tak v oblasti analýzy pro epidemiologické účely. Všech šesti cílů stanovených v zadání práce bylo splněno.

Získané výsledky jsou přesně, metodicky popsány a představují ve většině případů prioritní data pro Českou republiku. Za nejdůležitější považuji komplexní využití moderních metodik pracoviště, z nichž některé byly předmětem experimentální činnosti jejích kolegů (Ing. M. Chromé) pro zpracování reprezentativních souborů bakteriálních kmenů a získání výsledků využitelných v praxi. Práce je názornou ukázkou, jak má vypadat koncepčně vedená vědecká práce postupně na sebe navazujících témat a posléze i výsledků. Velmi důležité jsou rovněž výsledky podobnosti bakteriálních izolátů, které mají vysoký význam pro stanovování preventivních hygienicko-epidemiologických opatření. V rozsáhlé diskuzi autorka 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. Odborný rozsah práce a tím i počet kapitol je tak velký, že je pro čtenáře někdy obtížné udržet kontinuitu (v části metodické a ve výsledcích), zejména když kapitoly 3.4.1. (s. 32) a 3.6.2. (s. 38) mají stejný název. Autorka věnovala formální stránce opravdu velkou pozornost, prakticky se nevyskytují překlapy, výtku mám pouze k popisu tabulky č. 28, kde není zcela jasné, že se jedná o procenta. Jazyková stránka práce je rovněž na vysoké úrovni. Uvedené nedostatky nepovažuji za podstatné a rozhodně nesnižují celkovou úroveň práce.

Práce s literaturou je na vysoké úrovni, všechna zásadní tvrzení jsou doložena celkem 156 recentními odkazy na národní i mezinárodní literaturu. Po formální stránce jsou odkazy rovněž bezchybné.

Je třeba ocenit, že Mgr. Vendula Husičková je autorkou či spoluautorkou celkem sedmi prací v recenzovaných časopisech, z toho 3x v časopisech s impact faktorem. Dále 5x 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 předkladatelce práce mám tři dotazy:

1. V práci je poprvé na straně 9 a poté opakovaně při různých příležitostech deklarováno šíření bakteriálních izolátů. Osobně považuji za izolát bakteriální kmen, který jsem izoloval nějakou metodou v laboratoři. V tom případě by se izoláty šířily z laboratoře do populace. Co autorka považuje za izolát, popřípadě upřesnit, co se šíří v populaci a mezi pacienti, v nejhorším případě z které laboratoře?
2. V tabulce 30 na s. 72 je uváděna rezistence kmenů *K. pneumoniae* ke kolistinu. Byla tato rezistence ověřena dalšími metodami? Byla spojena s rezistencí na další antibiotika?
3. Pro detekci betalaktamáz byly použity vlastní metodiky. To je z různých důvodů pro rutinní laboratoř problematické. Jsou již k dispozici nějaké komerční metody pro rychlou diagnostiku? Jaká je citlivost současných metod, bylo by možné stanovit producenta ESBL přímo z klinického vzorku, tak jak to je dnes možné například u detekce rezistentních kmenů *M. tuberculosis*?

V Praze dne 6.9.2012

Doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.

