

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

Mgr. Jan Tkadlec, Ph.D.

Datum:

25. 8. 2020

Autor:

Bc. Aneta Valtová

Název práce:

Metody charakterizace perzistentního stavu po působení vybraných antibiotik u *Staphylococcus aureus*

Cíle práce:

1. Stanovit míru schopnosti perzistovat u klinických izolátů *S. aureus* od pacientů s CF po působení různých antibiotik zavedenou metodou stanovení CFU a zjistit, zda dochází ke změně v rámci chronologických izolátů v čase a porovnat tuto schopnost u izolátů se vznikajícími adaptačními mutacemi.
2. Pomocí průtokové cytometrie sledovat změny vitality buněk na základě změn membránového potenciálu u klinických izolátů *S. aureus* od pacientů s CF po působení různých antibiotik.
3. Sledovat změny genové exprese u genů, v kterých byly u chronologických izolátů nalezeny adaptační mutace, které korelovaly se změnou schopnosti perzistovat. Těmito geny byly: *hyp* (gen pro protein s hypotetickou funkcí), *glmU*, *agrA*, *rnaIII*
4. Otestovat dosud nezavedenou metodu pro sledování vyrůstání z perzistentního stavu na základě kontinuálního měření OD.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 86 stran

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO

Je napsán srozumitelně? ANO

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO

Přehled uvádí čtenáře vhodně do problematiky práce. Autorka použila 132 citací včetně prací z posledních let. Údaje jsou citovány dostatečně.

Výtku bych měl k formální stránce citací.

Např. citace Levin a Roten 2006 je jednou uvedena správně a jindy jen jako Levin 2006.

Yaakov et al 2017, Vogwill et al 2016, a dalších uvedeno v textu pouze jako Yaakov, 2017, Vogwill 2016. Review nejsou v rejstříku označena.

Kapitola 2.3 by mohla být rozdělena do několika podkapitol, toto rozdělení je i v textu naznačeno.

Str 22 práce Schwerdt et al 2018 – chybně uvedeno 3000 pacientů, v práci se jedná o „patient years“ tedy součet jednotlivých let, kdy byli pacienti infikováni, pacientů bylo 283.

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito?

Autorka použila kultivační metody (křivky hynutí, testování citlivosti k ATB), molekulárně biologické metody (izolace nukleových kyselin, elektroforéza, sledování genové exprese pomocí RT- qPCR) a průtokovou cytometrii.

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

U většiny kapitol experimentální části dává stanovený cíl smysl, ale u části kapitol stanovuje autorka cíl daných experimentů stylem: u kapitoly 5.2. Určení MIC je cílem určení MIC. To je zbytečné a bylo by vhodnější objasnit, k čemu například v případě MIC byla tato hodnota využita.

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO

Mezi jednotlivými experimenty se mění počet testovaných izolátů, z mého pohledu není dostatečně vysvětleno, proč určitý izolát nebyl analyzován danou metodou. U FC vynechán izolát 38C, u genové exprese jen izoláty od jednoho z pacientů a ne všechny.

Autorka používá v grafech směrodatnou odchylku, ale datům by prospělo podrobnější statistické zhodnocení, aby bylo vidět, jestli jsou zjištěné rozdíly významné.

V kapitolách 5.4. a 5.4.1. bylo měřeno v triplicátech v grafech a tabulkách to ale není patrné.

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO

Diskuze je spíše povrchní a často sklouzává k opakování výsledku, které se autorka snaží interpretovat. Její interpretace ale často nejsou moc přesvědčivé ani příliš podložené citacemi jiných studií.

Např. str 75: „...primoizoláty mají u obou pacientů delší dobu zdvojení oproti pozdějším izolátům“ ...“To by se dalo vysvětlit tak, že adaptovanější izoláty získávají vyšší odolnost proti působení antibiotik.“, protože“...“izoláty z chronických infekcí jsou odolnější“ – odolnost nutně neznamená kratší dobu zdvojení.

Str 72 (začátek). Autorka diskutuje validitu výsledků použité metody stanovení křivek hynutí: „...adaptované izoláty hůře vyrůstají.“ Z celého následujícího odstavce vůbec není jasné, co chce říct.

Velmi nerovnoměrně pracuje s literaturou občas např. na stránkách 73 a 74 je jen po 1 citaci ale například na straně 70 je velmi podrobně (šest citací) dokladováno konstatování že se u *S. aureus* vyskytují mutace v *agr*, že jsou u chronických izolátů a že mohou ovlivnit virulenci.

Na str 69 autorka uvádí: “První a nejvýznamnější takové studie se ukázaly jako velmi slibné (Fridman, 2014; Van den Berg, 2016).“, ale chybí diskuze výsledků těchto studií.

Autorka porovnává své výsledky s prací své předchůdkyně Hany Kotkové (str. 72), práce ale v seznamu literatury chybí.

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Formální stránka je velkou slabinou předkládané práce a významně snižuje její kvalitu. Autorka se často vyjadřuje nepřesně a nevědecky a práce obsahuje poměrně značné množství překlepů a chyb (z nepozornosti?) př.:...“nzký membránová potenciál“ (str 73), „pacienti léčeny“(str 76) a podobně mnohokrát. Dále také str. 25. „Endopeptidáza AgrB...rozpoznává C-terminální sekvenci v genu pro thiolakton AIP.“ atd.

Autorka místy nerozlišuje v označení mezi názvem genu a proteinu. Např. tabulka 1 str 45, uvádí mutace v mutL a mutS ale mutace v Agr a SigB.

Opakovaně se vyjadřuje nejednoznačně. Například některé věty budí dojem, že se výsledky vztahují k pacientovi: „schopnost perzistovat se u prvního pacienta po roce zvýšila o dva řády“. „U druhého pacienta se schopnost perzistovat nezměnila.“

Dále: „Prvotní problém, kterému výzkumníci čelí je fakt, že jich je jen velmi malá část populace, méně než 1 %.“ - ale myšleni jsou asi perzistori?

Autorka používá termíny např. adaptace, bez bližšího určení co je tím myšleno, př. „nejvíce adaptovaný izolát“, čímž zjevně myslí v chronologickém pořadí nejpozději získaný izolát od daného pacienta. Podobně věta: „schopnost perzistovat stoupá s adaptací izolátu“.

Grafy č 5-8 jsou velmi nepřehledné a není snadné se v nich orientovat.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Ke splnění cílů, jež si předsevzala, provedla autorka:

1. stanovení křivek hynutí po působení tří druhů antibiotik u 7 chronologických izolátů od dvou pacientů s chronickou infekcí. V porovnání s primoizolátem byla u pozdějších izolátů od prvního pacienta úroveň perzistence vyšší, což korelovalo s přítomností mutací v genech ovlivňujících perzistenci (*agr*, *glmU*). U izolátů od druhého z pacientů se mezi izoláty míra perzistorů příliš nelišila. Výsledky se tedy nedají příliš zobecnit.
2. Izoláty od prvního z pacientů autorka analyzovala pomocí průtokové cytometrie, a zjistila, že získané výsledky se nedají jednoznačně korelovat s mírou perzistence.
3. Dále stanovila expresi vybraných genů v průběhu křivky hynutí a zjistila, že se míra exprese studovaných genu liší jak mezi chronologickými izoláty, tak dle použitých antibiotik a délce jejich působení.
4. Na závěr se autorka pokusila k analýze perzistence využít metodu kontinuálního měření růstu v mikrotitrační destičce. Přímou k analýze perzistence se metodu použít příliš nepodařilo, ale u testovaných izolátů zjistila autorka korelaci mezi mutací v genech *agr* systému a růstovou rychlostí a také rozdíl v délce lag fáze v závislosti na typech použitého antibiotika.

Přes velké nedostatky ve formálním zpracování práce a nepřesvědčivou diskuzi výsledků, se domnívám, že autorka nepochybně odvedla velké množství experimentální práce, jejíž zajímavé výsledky, věřím, mají (po důkladné analýze) potenciál být publikovány v odborném periodiku.

Práci doporučuji k obhajobě, hodnocení navrhuji dobře, za rozhodující pokládám, pokud

autorka dokáže svou práci přesvědčivě prezentovat a přesvědčí o své orientaci v tématu, poté nevyklučují zlepšení hodnocení.

Otázky a připomínky oponenta:

Připomínky:

Výsledky str. 44: autorka uvádí, že jeden z kandidátních genů s potenciálním vlivem na míru perzistence studovaných izolátů gen *glmU* se účastní dle jiné studie syntézy lipidu A. Autorka opomněla zmínit že v dané citované práci se zabývali *E. coli*. Případně dokáže vysvětlit jaká je souvislost mezi syntézou lipidu A a perzistencí u grampozitivní bakterie jako je *S. aureus*?

U WGS dat, ze kterých autorka vychází, nejsou uvedeny žádné podrobnosti, například aspoň jaká technologie sekvenování byla použita.

Výsledky str. 44: metody *spa*-typizace a MLST byly použity pro určení příbuznosti izolátů od stejného pacienta:

- A) v práci nejsou tyto výsledky prezentovány;
- B) tyto metody zejména MLST nemají dostatečnou rozlišovací schopnost, pro vyloučení reinfekce jiným kmenem,
- C) vzhledem k dostupnosti celogenomových dat studovaných izolátů by bylo vhodnější příbuznost izolátů dokládat přesnější analýzou vycházející z WGS.

Str. 45: V tabulce 1 u ATB citlivosti chybí, jaká antibiotika byla testována, je zde uvedeno pouze „citlivý“. V tabulce 1 také chybí mutace v genu *hyp* zmíněném v textu. U určení MIC v tabulce 2 chybí interpretace výsledků, tj. jestli naměřené hodnoty znamenají citlivý nebo rezistentní, a chybí také kritéria pro interpretaci. Navíc jednotky koncentrace ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ATB neodpovídají použité metodě (mg/L).

Str. 51 v celé kapitole o výsledcích z průtokové cytometrie se kromě popisku u obrázku neobjeví termín průtoková cytometrie.

Str. 71 – autorka diskutuje změnu MIC k vankomycinu z 1 na 2 u chronologických izolátů od jednoho z pacientů

- a) Neuvádí jednotky
- b) Takováto změna (1 ředění) je na hranici významnosti z pohledu technické spolehlivosti metody. Bylo stanovení opakováno? Hodnota 2 mg/l je stále v rozmezí definující citlivost k vankomycinu.
- c) Toto zvýšení vysvětluje autorka přítomností rezistentních buněk, které: „...se mohou skrývat v průběhu křivek hynutí a mohou se v ní odhalit až v delším čase po působení antibiotika.“ A dále: „Přítomnost rezistentních buněk může celkově zvyšovat míru perzistence v kvantitativních testech“. Co to jsou ty rezistentní buňky?

Otázky:

1. V diskuzi na str. 69 autorka jako jednu z překážek studia perzistence uvádí: „...neexistuje srovnávací kmen, který by byl opravdu prokazatelně perzistentní oproti neperzistentním buňkám.“ Tomuto tvrzení nerozumím. Chápu perzistenci jako vlastnost (stav dormance), kterou vykazuje část populace daného kmene. Jaké by

měly být vlastností prokazatelně perzistentního kmene?

2. Příčina chronické infekce u pacientů s cystickou fibrózou souvisí také s faktory na straně pacienta, které tato nemoc způsobuje. Mohla by autorka popsat tyto příčiny chronicity infekce u CF pacientů?
3. Na straně 22 uvádí autorka, že se SCV fenotyp velmi často nachází u pacientů s respiračními onemocněními. Mohla by autorka uvést příklady respiračních i jiných infekcí mimo infekce spojené s CF, kde se s SCV setkáváme. Vznik SCV je také spojen s terapií určitými druhy antibiotik věděla by autorka, o která ATB se jedná a jaký je mechanismus selekce SCV?
4. Perzistence je spojená s pomalým nebo zastaveným růstem. Růstová rychlost se obvykle stanovuje v laboratorních podmínkách. Jaká je ale růstová rychlost bakterií (např. *S. aureus*, *E. coli* a dalších) v přirozených podmínkách jejich výskytu?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: