

## OPONENTSKÝ POSUDEK

na disertační práci „Development and validation of methods for rapid detection of  $\beta$ -lactamases using MALDI-TOF mass spectrometry for the early detection of infectious disease agents and their antibiotic resistance“, kterou předkládá Ing. Veronika Pašková.

Předloženou disertační práci jsem s velkým zájmem prostudoval a dávám o ní následující oponentský posudek.

Disertační práce je kompilací několika částí, které na sebe logicky navazují a tvoří jeden přirozený celek, který je podle mého názoru radostí číst. V úvodu autorka, Ing. Veronika Pašková, popisuje vývoj beta-laktamových antibiotik, mechanismy jejich účinku a současně definuje nejdůležitější mechanismy bakteriální rezistence. Následně pokračuje kapitolami zaměřenými na:

- vývoj a validaci testů pro rychlou detekci aktivity karbapenemázy u *Enterobacterales* a *Pseudomonas aeruginosa*,
- validaci komerčního automatického programu pro detekci kmenů MRSA,
- molekulárně-epidemiologickou charakteristiku gramnegativních karbapenemáza-pozitivních enterobakterií izolovaných ve zdravotnických zařízeních v České republice.

Považuji za nutné zdůraznit, že výše uvedené kapitoly jsou uvedeny ve formě pěti článků uveřejněných výhradně v časopisech s impakt faktorem (všechny s IF více než 1, jeden s IF 4,076). Již tato skutečnost svědčí o kvalitě výsledků získaných v průběhu doktorského studia Ing. Veroniky Paškové. Vzhledem k náročnosti oponentního řízení v tzv. „impaktových časopisech podle WOS“ je zcela nezpochybnitelné, že tato disertační práce nejen že splňuje, ale jednoznačně překračuje kritéria na disertační doktorskou práci.

Dalším potvrzením vysoké odborné úrovně je citační ohlas uvedených článků dle WOS, který k 3. listopadu 2020 dosáhl v součtu hodnoty 44. Jsem přesvědčen, že již tato skutečnost je dostatečným důvodem pro pozitivní hodnocení předložené disertační práce a rád bych pogratuloval Ing. Veronice Paškové a jejímu školiteli doc. Ing. Jaroslavu Hrabákoví, Ph.D. k uvedeným výsledkům.

Nicméně je vhodné, byť v tomto případě vzhledem k výše uvedenému možná nadbytečné, uvést klasický posudek, což činím v následujícím textu.

### **I. K aktuálnosti zvoleného tématu**

Zvolené téma „Development and validation of methods for rapid detection of  $\beta$ -lactamases using MALDI-TOF mass spectrometry for the early detection of infectious disease

agents and their antibiotic resistance“ je velmi aktuální a řešení této problematiky představuje důležitý přínos nejen pro rozšíření poznání v teoretické oblasti, ale především pro klinickou praxi. Hlavní význam spočívá v aplikaci získaných poznatků v antibiotické léčbě bakteriálních infekcí a současně v prevenci šíření odolnosti bakterií k antibakteriálním přípravkům.

## II. Ke zvoleným metodám disertační práce

K řešení zvolených cílů použila autorka nejmodernější metodické postupy, včetně velmi sofistikovaných molekulárně-biologických metodik, přičemž použila zásadně těch postupů, které byly pro vyřešení úkolu neoptimálnější a nejpřesnější.

Konstatuji, že celková metodologická struktura disertační práce zcela vyhovuje řešení zvoleného problému.

Tabelární a obrazová dokumentace je na místě, přesně a výstižně osvětluje metodické postupy i vlastní výsledky práce.

Výběr citovaných pramenů je bohatý, dobře volený a svědčí o vynikajícím rozhledu autorky ve studované problematice.

## III. K vlastním výsledkům disertační práce

Jsem zcela přesvědčen, že získané výsledky jsou velmi hodnotné a přispívají k poznání v oblasti rezistence enterobakterií ke karbapenemům nejen v podmínkách České republiky, ale i v mezinárodním měřítku. Považuji za vhodné zdůraznit, že významný přínos spatřuji i v oblasti prevence šíření těchto nebezpečných multirezistentních bakterií. Neméně zajímavým a v klinické mikrobiologii dobře využitelným výsledkem je test pro detekci *Enterobacteriales* a *Pseudomonas aeruginosa* produkujících karbapenemázy pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF. Samozřejmě má svůj význam i zjištění, že komerční automatický program pro identifikaci MRSA pomocí MALDI-TOF hmotnostního spektrometru není vhodný pro běžné použití v rutinní mikrobiologické praxi.

Výsledky byly prezentovány ve formě pěti publikací v časopisech s impakt faktorem a tuto skutečnost považuji za vhodné znovu zdůraznit. Náročnost recenzního řízení v těchto odborných periodických jednoznačně potvrzuje vysokou kvalitu a klinickou významnost získaných výsledků. Jedná se o následující práce:

1. Rotova V, Papagiannitsis CC, Skalova A, Chudejova K, Hrabak J. Comparison of imipenem and meropenem antibiotics for the MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity. *Journal of Microbiological Methods*. 2017;137:30-33. IF 1,184, 19 citací dle WOS
2. Paskova V, Chudejova K, Sramkova A, Kraftova L, Jakubu V, Petinaki EA, Zemlickova H, Neradova K, Papagiannitsis CC, Hrabak J. Insufficient repeatability

- and reproducibility of MALDI TOF MS based identification of MRSA. *Folia Microbiologica*. 2020;65:895-900. IF 1,730
3. Rotova V, Papagiannitsis CC, Chudejova K, Medvecký M, Skalova A, Adamkova V, Hrabak J. First description of the emergence of *Enterobacter asburiae* producing IMI-2 carbapenemase in the Czech Republic. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2017;11:98-99. IF 1,276, 4 citace dle WOS
  4. Paskova V, Medvecký M, Skalova A, Chudejova K, Bitar I, Jakubu V, Bergerova T, Zemlickova H, Papagiannitsis CC, Hrabak J. Characterization of NDM-encoding plasmids from *Enterobacteriaceae* recovered from Czech hospitals. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:1549. IF 4,076, 21 citací dle WOS
  5. Papagiannitsis CC, Paskova V, Chudejova K, Medvecký M, Bitar I, Jakubu V, Zemlickova H, Jirsa R, Hrabak J. Characterization of pEncl-30969cz, a novel ColE1-like plasmid encoding VIM-1 carbapenemase, from an *Enterobacter cloacae* sequence type 92 isolate. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2018;91(2):191-193. V doktorské práci uveden IF 1,82, ale 5-letý IF je 2,363

#### IV. Připomínky oponenta

K předložené disertační práci mám dvě formální připomínky a čtyři dotazy. Připomínky však v žádném případě nesnižují vysokou vědeckou hodnotu předložené práce. Dotazy pak vyplývají ze skutečnosti, že mne výsledky velmi zaujaly a rád bych řešená témata diskutoval při vlastní obhajobě.

##### A) Připomínky

1. V abstraktu autorka uvádí účinnost testu hydrolýzy imipenemu a meropenemu pro detekci *Enterobacterales* a *Pseudomonas aeruginosa* produkujících karbapenemázy pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF se závěrem, že validace potvrdila vysokou senzitivitu a specifitu obou testů na oba kmeny. V tomto případě použití termínu „kmeny“ není přesné, neboť se jedná o řadu druhů patřících do *Enterobacterales* a druh *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Formulace typu „...grampozitivních bakterií, jako jsou *Staphylococcus* a *Streptococcus*... nejsou zcela správně uvedeny. Je vhodnější uvést české ekvivalenty, tedy stafylokoky a streptokoky nebo *Staphylococcus* spp. a *Streptococcus* spp.

##### B) Dotazy

1. Autorka zahrnuje inhibitory bakteriálních beta-laktamáz mezi antibiotika, což není až tak časté a úplně to neodpovídá definici antibiotika jako látky s antibakteriálním účinkem. Jaký je důvod pro toto zařazení? Osobně bych do výčtu beta-laktamových antibiotik zahrnul jejich kombinace s inhibitory bakteriálních beta-laktamáz.

2. Může dojít v průběhu léčby meropenemem u enterobakterie s produkcí karbapenemázy, ale s MIC v kategorii S/I dle EUCAST k hyperprodukcí karbapenemázy a selhání léčby? Jaký je důvod z pohledu klinické medicíny pro detekci karbapenemáz ve světle stávajících doporučení EUCAST, které jsou založeny především na hodnotách MIC?
3. Bohužel, nerozumím zcela přesně větu v závěru autoreferátu „Dlouhá historie a rozsáhlá literatura výzkumu beta-laktamázy by mohla naznačovat, že tato problematika postrádá substanci pro vědecký objev“. Prosím o bližší vysvětlení.
4. Autorka uvádí, že špatná reprodukovatelnost identifikace MRSA pomocí MALDI TOF je nepravděpodobná z důvodu snížené exprese *psm<sub>mec</sub>*. Jak lze tedy tento výsledek vysvětlit?

## V. Závěr

Ing. Veronika Pašková ve své disertační práci jednoznačně prokázala, že umí vědecky pracovat, tj. definovat závažný problém, racionálně si vymežit cíle studia, teoreticky i metodicky řešenou problematiku zvládnout a určit význam výsledků pro další poznání v teorii i praxi. Navíc je nutné ocenit, že získané výsledky byly publikovány v prestižních odborných časopisech s impakt faktorem.

Z výše uvedených důvodů navrhuji s plnou odpovědností, aby předložená disertační práce byla připuštěna k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby udělit Ing. Veronice Paškové akademický titul Ph.D.

V Olomouci dne 4. listopadu 2020

Prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.  
Ústav mikrobiologie LF UP v Olomouci