

## Oponentský posudek disertační práce Mgr. Marcely Vejsově „Laboratorní diagnostika kandidových infekcí“

Předložená disertační práce je svým charakterem původní, zaměřená prakticko-metodologicky, má celkem 142 stran včetně 45 tabulek, 14 grafů a 39 obrázků.

Její název „Laboratorní diagnostika kandidových infekcí“ však zcela přesně nekoresponduje s jejím obsahem, protože do prezentovaných studií jsou zařazeny i kmeny *Aspergillus*.

### Formální a jazyková úroveň zpracování

Práce je z celkového pohledu dobře koncipována, má vhodně zvolené řádkování, umožňující pohodlné čtení textu. K přehlednosti však příliš nepřispívá zařazení části tabulek až na samý konec práce, zvláště když ostatní jsou spolu s grafy a obrázky umístěny přímo do textu.

Je psána dobrou češtinou, avšak místy s překlepy a někdy i gramatickými chybami, převážně v interpunkci. Ojedinele se vyskytují terminologické chyby (nozokominální místo nozokomiální, dysparenurie místo dyspareunie). Stylistická úroveň textu je z celkového pohledu vyhovující, některé formulace jsou však neobratné a poněkud zavádějící, např. „Materiál na mykologické vyšetření...musí být zaslán rychle nebo zchlazený“ (str. 46) nebo „...vyšší antifungální účinek vorikonazolu na kvasinky (a zvláště *Aspergillus*), včetně *non-albicans* druhů...“ (str. 113). Některé zase považují za nevhodné z hlediska odborné terminologie (např. „nekontaktní invaze“ (str. 32) nebo „vláknité plísňe“ (str. 111), „invazivní myceliová vlákna“ (str. 28), jiná slovní spojení jsou zase značně neobvyklá (např. „lidské integumenty“ – str. 50, „retardované mycelium“ nebo „izolativní rozočkování“ – str. 109). Na čtenáře dále působí poněkud rušivě místy se vyskytující větná skladba vzniklá doslovným překladem anglického textu např. (např. S výjimkou *C. glabrata*, všechny humánně patogení kmeny měly tendenci... – str. 119) stejně jako vyslovené „anglizmy“, např. slovo „intrinzní“. Koncovky názvů enzymů by měly být podle současného doporučení –asa, nikoli –áza (např. na str. 43 *glukan-syntáza*). Poněkud nesystematické je i používání zkratk, uvedených v seznamu na začátku práce.

### Teoretická část

Autorka, jistě s relativně malými zkušenostmi, zvolila svým záměrem charakterizovat stav problematiky v poměrně široké oblasti lékařské mykologie značně obtížný přístup, kterého s však zhostila z celkového pohledu velmi dobře. Na druhé straně zde však postrádám alespoň zmínku o současné taxonomii kandid a v té souvislosti skutečnost, že řada druhů *de facto* již do rodu *Candida* nepatří (*C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. pelliculosa* atd.), i když v klinické mykologii jsou (a jistě i budou) stále uváděny v naprosté většině jen názvy anamorf. Dále se v práci vyskytují starší synonymické názvy některých kvasinek (*Blastoschizomyces capitatus* místo *Dipodascus capitatus*, *Trichosporon beigeli* místo *Trichosporon asahii*). Rovněž názvy „mukormykóza“ (např. str. 35) a „mukory“ v obecném smyslu označení pro zygomycety (str. 45) považují za obsolentní. Na str. 12 by měl být jako jediný správný mikrobiologický výraz uvedeny „tyčinky“, nikoli „tyčky“. Dále, uvedení komerčních názvů antimykotik (i když jen v závorce za generickými názvy) i některých dalších preparátů nepovažují v této části práce za příliš vhodné, neboť generické/základní názvy jsou podle mého názoru dostatečně informativní a v některých případech existuje komerčních názvů příslušného generika více, než je uvedeno. Mimoto některé názvy firem nejsou aktualizovány (např. již neexistující Sanofi Diagnostics Pasteur – str. 52) a jejich specifikace je formálně nejednotná (někde jen název firmy, jinde firma+stát, jinde firma+stát+město, např. str. 76). V případě půdy CHROMagar *Candida* (str. 55) je chybně uveden výrobce, kterým je francouzská firma CHROMagar Microbiology.

Určité (ovšem nikoli zásadní) výhrady mám ke způsobu zpracování kapitoly „Onemocnění způsobená kvasinkami“, zde je však třeba vzít v úvahu, že autorka nemá medicínské vzdělání.

Na druhé straně však považuji za nutné podotknout, že většina pramenů, na něž se v této části odvolává, je již staršího data a pochází v naprosté většině jen od několika převážně českých autorů. K atraktivitě této kapitoly by podle mého názoru významně přispěla stručná charakterizace některých recentních zajímavých kazuistik z oblasti kandidových infekcí. Dále mi není jasné, jak si autorka představuje v klinické praxi stanovení katérové kandidémie na základě formulace (viz str. 32): „... – pokud není katétr vyjmut – je koncentrace kandid v hemokultuře odebrané z katétru desetkrát vyšší než ze současného odběru z periferní žíly“, když složení hemokultivačního média slouží primárně k pomnožení mikroorganismů. Navíc citace, na kterou se autorka odvolává (Haber 1999) není v seznamu literatury uvedena.

V kapitole zabývající se laboratorní diagnostikou bych s autorkou určitě polemizoval o počtu izolátů kvasinek netvořících chlamydospóry, kterých je údajně třetina. Postrádám literární odkaz, který by uvedené tvrzení podpořil, podle mých vlastních, v tomto ohledu značně rozsáhlých zkušeností, je možno prokázat chlamydospóry nejméně u 90 % izolátů, což je v souladu např. s údajem McGinnise (Laboratory Handbook of Medical Mycology, Academic Press, New York, 1980). Pro jejich mikroskopický průkaz je navíc přehlednější a zcela postačující 100násobné zvětšení (str. 77). V části textu zabývající se interpretací nálezů v lokalitách osídlených fyziologickou mikroflórou (str. 50) by bylo vhodné zmínit posuzování kvantity kvasinek v kontextu množství průvodní bakteriální flóry. U popisu kolonií kvasinek mi není jasné, zda jde o kultury, které autorka využila ve svých studiích (v tom případě by se mi tato část textu jevila logičtější v metodice) nebo jde-li o obecné charakteristiky, (pak jsou ovšem morfologické varianty zejména u některých druhů pestřejší než je uvedeno).

V části o komerčních soupravách pro testování citlivosti k antimykotikům považuji za vhodné podotknout, že YeastOne panely jsou již nějakou dobu u nás dostupné (distributorem je firma BioVendor) a že právě tato souprava se mi jeví z hlediska spektra systémových antimykotik nabízených k testování v nejnovější verzi panelu jako nejvhodnější pro srovnávací účely, protože autorkou připravená mikrodiluční bujónová metoda zahrnovala pouze starší z nich.

### **Zaměření a uspořádání studie**

Téma práce bylo vhodně zvoleno, získané poznatky jsou aplikovatelné do běžné diagnostické praxe laboratoří lékařské mykologie. Práce přináší řadu originálních výsledků a nové přístupy, které jsou, zvláště ve studiích zaměřených na testování citlivosti k antimykotikům, využitelné v dalším vývoji metodiky v této oblasti. Studované soubory i jejich druhová struktura jsou dostatečně reprezentativní. Oceňuji i přístup založený na ověřování předem definovaných hypotéz. Domnívám se však, že k přehlednosti provedených experimentů by významně přispělo, kdyby byl zvolen jeden soubor kmenů, se kterým by bylo provedeno kompletní testování a nikoli čtyři do jisté míry vzájemně nezávislé studie, zvláště proto, že autorka celou práci zřejmě prováděla v laboratořích školitele a protože technicky jde o relativně jednoduché metody. Dále se domnívám, že vzhledem k celkové koncepci a použitým technikám by bylo vhodnější, kdyby byly experimenty omezeny pouze na kvasinkovité mikroorganismy, jak ostatně bylo - vzhledem k názvu práce - zřejmě původně zamýšleno.

U studie 1 si nejsem jistý, kterou verzi média CandiSelect™ autorka vlastně použila. Půda, která diferencuje pouze *C. albicans* (a na níž ostatní druhy rostou jako bílé kolonie) vyráběla francouzská firma Sanofi Diagnostics Pasteur. Nadnárodní korporace Bio-Rad Laboratories, která původního výrobce později převzala, podle mých informací již delší dobu vyrábí výhradně verzi CandiSelect4, která diferencuje ještě *C. tropicalis*, *C. glabrata* a *C. krusei*. Ve fotodokumentaci na str. 56 se hovoří o CandiSelect4 a zbarvení kultur *C. albicans* (spíše fialové) tomu odpovídá, ale ve výsledcích na str. 84 se hovoří o „charakteristických modrých koloniích“ a o diferenciaci pouze uvedeného druhu, což bylo typické pro první verzi CandiSelectu.

## Metodika

Postup experimentů je přesně definován, jednotlivé postupy jsou přehledně rozčleněny a až na několik výjimek specifikovaných dále jsou i dobře popsány. Na str. 72 je uvedeno, že ke kultivaci houbových kmenů byl použit Sabouraudův agar s chloramfenikolem (není uvedena koncentrace), na str. 75 při popisu přípravy uvedené půdy však již toto antibiotikum zmíněno není, i když je jasné, že v základním složení média být nemůže, bylo-li, jak se zdá, připraveno v laboratoři z dehydrovaného základu. Vzhledem k tomu, z jakých klinických vzorků byly všechny testované kmeny izolovány, není mi zcela jasné, proč byla zvolena teplota 27°C pro kultivaci a „pasážování“ aspergilů. I když z vlastní zkušenosti vím, jaké mléčné médium autorka ke konzervaci izolátů zřejmě použila, vzhledem k tomu, že zatím nejde o obecně preferovanou metodu jejich uchovávání, pro čtenáře méně znalého této problematiky by bylo užitečné název a použitou koncentraci média přesně specifikovat. Na str. 76 není zcela jasné, kdo je vlastně výrobcem AST agaru.

V části o testování citlivosti by bylo vhodné popsat, jak autorka prováděla „resuspendaci“ konidií vláknitých hub. Dále bych doporučoval blíže charakterizovat princip stanovení Spearmanova korelačního koeficientu, než pouze konstatovat, že jím byla vyjádřena lineární souvislost mezi studovanými metodami, ideální by bylo citovat jeho použití v obdobně zaměřených studiích. U specifikace stupňů neshod (str. 81) si nejsem jist, za jakým účelem uvádí autorka v závorkách anglické překlady: např. velká neshoda (angl. major error), když dále používá (včetně zkratk) výhradně české názvy (pokud by uvedené hodnocení vycházelo z nějaké anglicky psané práce, postrádám její citaci).

## Výsledky

V této části je třeba velmi ocenit úsilí autorky o jejich zpracování z různých úhlů pohledu včetně podrobného statistického vyhodnocení. Z hlediska jejich praktické využitelnosti považuji za přínosné zejména zkušenosti s testováním na AST agaru, který příležitostně využíváme i u nás a poznatky prezentované autorkou, zejména rychlejší hodnocení výsledku při porovnání s jinými médii, tak mohu potvrdit.

Vlastní text mi však z celkového pohledu připadá značně stručný, zejména čtenář ne zcela znalý statistických metod se „ztrácí“ v řadě tabulek, z nichž část je navíc až na konci práce. Na některé z nich (12, 15, 18) doprovodný text vůbec neodkazuje. Po obsahové stránce mi není zcela jasné, jaký praktický/taxonomický význam má u testu klíčních hyf kvantitativní hodnocení mikromorfologických forem kultur (klíční hyfy/pseudohyfy – str. 78), stejně jako sledování rozdílů mezi výskytem pseudohyf a pseudomycelia, v diskusi jsem žádný rozbor na toto téma nenašel. V metodice navíc není rozdíl mezi pseudohyfy a pseudomyceliem definován. U hodnocení klíčních hyf se neshoduje údaj v textu: „U dvou kmenů *C. tropicalis* byla v séru zaznamenána tvorba klíčních hyf...“ s údajem v tab. 8. Nevysvětlené disproporce v počtu testovaných izolátů se mi zdají být také u studie 3, která by měla zahrnovat celkem 149 kultur (viz tab. 6). V metodické části ani v diskusi se mi nepodařilo najít údaj, který by uváděl, které izoláty jednotlivých druhů a proč byly vyloučeny z hodnocení, neboť počty kmenů v tabulkách 13 a 14 dávají součty 143, resp. 148 izolátů, v tab. 16 a 17 je nižší počet izolátů u *C. albicans* i non-*albicans* kandid. Dále, text druhého odstavce na str. 86 stejně jako v prvních dvou v podkapitole 5.2.1. (str. 87) by bylo podle mého názoru vhodnější zařadit do metodické části.

## Diskuse

V diskusní části práce je třeba vyzdvihnout zejména podrobný rozbor vlastních výsledků a technických aspektů použitých metod. Postrádám však širší aktivní polemiku s obdobně zaměřenými pracemi, kterých je v publikačních databázích celá řada. Na str. 109 by bylo vhodné podpořit citací tvrzení, že klíční hyfy je schopna tvořit např. i *C. parapsilosis*, neboť uvedená schopnost je obecněji v povědomí jen u *C. tropicalis*. Prezentace řady grafů (3-14) až

v této části je poněkud neobvyklá, přirozenější by bylo podle mého názoru jejich zařazení do výsledkové části s tím, že by je zde bylo možné diskutovat.

### Seznam literatury

Citované práce jsou vhodně zvoleny, zejména z oblasti antimykotik jde o recentní významné publikace. Jak už jsem však již opakovaně naznačoval v předchozích statích, celkový počet literárních citací by mohl být významně vyšší, což by jistě přispělo k dalšímu zvýšení kvality této disertační práce.

### Otázky na autorku:

1. V teoretické části práce zmiňujete u kvasinek pojmy „dimorfismus“ a „switching fenomén“. Zajímalo by mne, jak byste oba pojmy definovala, jak spolu souvisí a jaký je mezi nimi faktický rozdíl?
2. Při charakterizaci patogenetických mechanismů invazivní kvasinkové infekce uvádíte jako typickou tvorbu hyf/pseudohyf a SAP. Měl bych proto dotaz, jaké jsou nejdůležitější předpokládané faktory virulence u medicínsky stále významnějšího druhu *C. glabrata*, která *in vitro* vyrůstá jen ve formě blastospor a geny pro SAP u ní údajně chybí?
3. Ve své práci uvádíte, že stanovení *in vitro* citlivosti houbových patogenů k antimykotikům je dnes součástí rutinního laboratorního testování. Jaký je váš názor na vhodnost rutinního testování citlivosti klinických izolátů kvasinek k antimykotikům ve světle stále problematické korelace *in vitro-in vivo*? Jakou strategii testování považujete v současném stavu vývoje metodik za optimální?
4. K diagnostické části mám čtyři stručné podotázky:
  - a. Ve své práci porovnáváte chromogenní média CandiSelect a HiCrome Candida Agar. Proč jste ve své studii nepoužila původní Rambachův CHROMagar, který je z hlediska morfologických i barevných odlišností kolonií jednotlivých druhů podle mého názoru nejspolehlivější a z vývojového hlediska může být považován za jakýsi zlatý standard? Důvody by neměly být jen ekonomické, v naší laboratoři máme uvedené médium zařazené do spektra půd pro rutinní vyšetřování každého materiálu zaslaného na cílené mykologické vyšetření i pro identifikaci kvasinkových kultur předaných z bakteriologie.
  - b. Byla při identifikaci *C. albicans* nějak zohledněna možná záměna s *C. dubliniensis*?
  - c. Podle jakého schématu jste prováděla identifikaci kvasinek ve Vaší laboratoři připravenými auxanogramy (obr. 25) a (případně) zymogramy?
  - d. Proč jste testování citlivosti diagnostickými proužky Etest neprováděla na RPMI agaru, který je jejich výrobcem v současné době doporučován jako v podstatě jediná alternativa (viz aktuální verze CIS 005), zvláště když jste toto médium použila pro diluční bujónovou metodu? Je k dispozici nějaká publikovaná studie, která by prokázala srovnatelné hodnoty MIC u jednotlivých systémových antimykotik pomocí Etestu na RPMI, MH a případně AST agaru?

### Závěr:

Přes výše uvedené připomínky mohu konstatovat, že předložená disertace splnila stanovené cíle a má také všechny předpoklady odborné práce daného typu. Proto ji doporučuji k obhajobě.

V Olomouci 4. června 2009

Doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D.  
Ústav mikrobiologie LF UP a FNOL  
Hněvotínská 3  
775 15 Olomouc