

Oponentský posudek doktorské práce Ing. Mgr. Silvie Pavlíčkové Charakterizace kmenů *Escherichia coli* izolovaných z potravin

Uvedená doktorská práce se zabývá studiem nejprozkoumanějšího mikroorganismu na světě, což zdánlivě přináší řadu výhod (dostupnost ohromného množství vědeckých poznatků, výběr metod), ale skýtá jedno velké úskalí – nalezení originálního směru výzkumu.

Obě tyto skutečnosti jsou v práci Ing. Pavlíčkové dobře patrné: jak teoretická část, tak později diskuse jsou charakteristické záplavou dat o vlastnostech *E. coli*, a současně je zřejmé, že řada podobných studií byla již s bakteriemi tohoto druhu provedena. Hodnota díla Ing. Pavlíčkové by tak dle mého soudu měla spočívat v rozsahu práce a ve výběru vzorků. Zatímco rozsah práce je značný a účtyhodný, myslím si, že právě výběr vzorků pro izolaci kmenů *E. coli* mohl být proveden výrazně promyšleněji – skupiny vzorků považují za poněkud nesourodé (navíc geografický původ vzorků kuřat a zvěřiny není uveden, a přitom autorka sama uvádí, jak se může např. zastoupení fylogenetických skupin lišit dle výskytu, str. 46), a je tedy otázkou, co nám vlastně získaná čísla říkají.

Nicméně po pořádku k jednotlivým částem práce.

Teoretická část čtenáře seznamuje velmi detailně s vlastnostmi druhu a velmi dobře dokumentuje, kolik je toho již o bakteriích *E. coli* známo. Přes tato pozitiva však měla být tato část napsána (či zkontrolována) pečlivěji; některé formulace jsou nepřesné nebo nevhodné, uvádím jen výběr:

- s. 11: kmeny mohou mimo střevní trakt vyvolat intestinální infekce ?
- s. 19: geny kódované beta-laktamázu (!)
- s. 20: místo věty „Kmeny produkující úzké spektrum beta-laktamových enzymů“ zřejmě mělo být „Kmeny produkující beta-laktamázy s úzkým spektrem účinku“
- s. 22: Tyto bakteriální enzymy ... se stávají více rezistentními ...

V části věnované mechanismům bakteriální rezistence poněkud postrádám aktivní vyloučení protimikrobních látek z buněk (efflux), ale možná se u *E. coli* nevyskytuje...

V metodické části, jak již bylo uvedeno, chybí uvedení geografického původu vzorků kuřat a zvěřiny. Rozpor je zřejmý i v uvedení popisu vzorků z kuřat: v téměř celé práci je uváděno „z kuřat“ či „z kuřecího masa“ (např. s. 31), ale v příloze je uvedena „kuřecí kůže“. U zvěřiny není jasné, odkud byly prováděny výtěry. Údaje v µg, uvedené v Tab. 2, nejsou koncentrace, ale množství.

Osobně bych velmi uvítal, kdyby bylo v kap. Genotypizační metody uvedeno, jaké proteiny (a s jakou funkcí) kódují geny, uvedené na str. 43. Poznájí to jen specialisté (což já nejsem) a kromě genů pro beta-laktamázy jsou pro mne uvedené zkratky genů nicneříkajícími údaji.

K výsledkové části jsem se částečně vyjádřil v úvodním odstavci; v práci bylo získáno značné množství dat, což samo o sobě vytváří problém jak tolik údajů přehledně čtenáři podat. Autorka zvolila způsob, kde se různě prolínají její výsledky s diskusí a s citacemi výsledků jiných. Obecně asi lze tuto koncepci přijmout, nicméně nepovažuji za vhodné, že jsou některé části zahájeny hned diskusí a když tabulky či grafy s jejími výsledky jsou často uváděny až za textem a diskusí, mnohdy až na další stránce či listu. Určitou nepřehlednost lze dokumentovat např. na str. 60, kde jsou odděleně ve druhém a čtvrtém odstavci zřejmě popisovány stejné výsledky (výskyt genů pro faktory virulence), ale pokaždé trochu jinak, s odkazem na Přílohy 4 a 5, resp. na Tab. 7. Rovněž si myslím, že by bylo vhodné spojit Obr. 11 a 12 do jednoho grafu.

Co ve výsledkové a diskusní části výrazně postrádám, je absence diskuse ke dvěma zajímavým výsledkům. Tím prvním je na str. 58 nález genu kódujícího rezistenci k fluorochinolonům u kmenů, u kterých rezistence k ciprofloxacinu vůbec zaznamenána nebyla – toto přece není možné přejít mlčením. V širším kontextu pak také postrádám uvedení toho, zda i u jiných protibakteriálních látek byl zjištěn podobný jev či zda nález genů pro rezistenci byl u konkrétních kmenů vždy doprovázen rezistencí zjištěnou kultivačně (a naopak).

Druhým pozoruhodným výsledkem je na str. 75 a 76 zaznamenaný nejvyšší výskyt jak rezistence, tak i genů pro faktory virulence u skupiny slabě adherentních kmenů – také není diskutováno, zda může jít jen o náhodu či zda toto může mít nějakou genetickou či fyziologickou souvislost.

Závěrečné části práce shrnují, většinou jen obecně, získané výsledky; uvítal bych konkretizaci souvislostí, které jsou naznačeny (str. 92).

Celkově lze shrnout, že pozitivem práce je velké množství získaných dat; je patrné, že studentka zvládla řadu významných laboratorních technik pro popis konkrétních kmenů a také prostudovala velké množství literárních zdrojů. Své dotazy uvádím níže; po jejich zodpovězení souhlasím s udělením titulu Ph.D.

1. Existují vědecky podložené doklady o množení *E. coli* v půdním prostředí či ve vodách ?
2. V souvislosti s možným „přenosem genů rezistence do střevní mikroflóry člověka“ (str. 24) uveďte, jaká je termostabilita DNA při tepelných úpravách potravin, zejména při pečení a smažení.
3. Upřesněte původ vzorků kuřat a zvěřiny a také způsob odběru vzorků ze zvěřiny.
4. Uveďte funkci proteinů, kódovaných geny uvedenými na str. 43.
5. Lze nějak vysvětlit nález genu kódujícího rezistenci k fluorochinolonům u kmenů, u kterých nebyla zaznamenána rezistence k ciprofloxacinu?
6. Kromě případu genu kódujícího rezistenci k fluorochinolonům, byl vždy nález genu pro rezistenci u konkrétního kmene doprovázen reálnou rezistencí?
7. Je nejvyšší výskyt rezistence i genů pro faktory virulence u skupiny slabě adherentních kmenů náhodný či může mít tento jev biologickou podstatu ?

Ve Zlíně dne 23. srpna 2016
doc. Jan Růžička, Ph.D.