

## **Oponentský posudek disertační práce Ing. Davida Šilhy „Studie výskytu *Arcobacter* spp. v prostředí a vlivy působící na jejich přežívání“**

Studium vlastností původců alimentárních onemocnění je stále významnou vědeckou oblastí, kterou studují mnohé týmy mikrobiologů u nás i v zahraničí. Obzvláště velká pozornost je věnována nově popsaným původcům, mezi které náleží např. i bakterie rodu *Arcobacter*. Předkládaná disertační práce se zabývá vhodnými metodami detekce a identifikace arkobakterů včetně studia jejich vlastností. Bez uvedených znalostí nelze účinně sledovat jejich výskyt v potravinách, u potravinových zvířat, ale i v prostředí a studovat zdroje a cesty šíření a nemohou být přijata účinná opatření omezující jejich výskyt v potravním řetězci.

Disertační práce shrnuje výsledky dosažené v oblasti metod detekce, identifikace a také výskytu arkobakterů v různých potravinových maticích, vodě i environmentálních vzorcích. Studie je významná zejména proto, že v současnosti neexistují harmonizované metody pro detekci a identifikaci tohoto agens, ani nejsou příliš detailně popsány možné zdroje infekce pro člověka. Práce se dále zabývá vybranými vlivy prostředí na přežívání sledovaných bakterií (teplota, přežívání na různých kovových materiálech, odolnost vůči vysychání) a dalšími vlastnostmi arkobakterů např. odolností vůči některým desinfekčním látkám, antimikrobikům a látkám přírodního charakteru.

V úvodní části práce jsou zahrnuty informace dostupné z odborné literatury týkající se dané problematiky. Při zpracování jednotlivých kapitol vycházel disertant z literárních podkladů 244 zejména zahraničních autorů, což svědčí o pečlivé vědecké přípravě. V této části práce jsou přehledně uvedeny informace o taxonomickém zařazení, detekčních i identifikačních metodách, ale také o výskytu, patogenitě a vlastnostech arkobakterů a metodách jejich sledování.

V experimentální části jsou popsány kultivační techniky, molekulárně biologické metody a metoda hmotnostní spektrometrie využívané k identifikaci a charakterizaci sledovaných potravních patogenů.

Výsledky lze rozdělit do následujících částí ad1) Optimalizace izolace arkobakterů, ad2) Prevalence arkobakterů ve vzorcích potravin a prostředí, ad3) Vliv prostředí na přežívání arkobakterů (teploty, vysychání) a ad4) Vliv antibakteriálních látek (desinfekčních, antimikrobik, přírodních látek).

Diskuse k získaným výsledkům porovnává poznatky získané v této práci s poznatky dalších autorů.

Součástí disertační práce jsou fotografie dokumentující růst arkobakterů na různých kultivačních médiích, grafy dokumentující přežívání bakterií za sledovaných podmínek a přílohy s tabulkami uvádějícími spektrum analyzovaných vzorků a výsledky detekce a druhového zařazení arkobakterů.

Některé výsledky již byly zveřejněny v tuzemských nebo zahraničních časopisech s IF, u třech publikací je disertant uveden jako první autor. Další rukopis byl zaslán do redakce k oponentnímu řízení.

K disertační práci mám následující dotazy či komentáře:

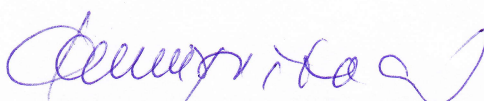
- Byla u zavedených a optimalizovaných metod PCR použita interní kontrola? Proč je její použití v rutinní praxi tak významné?
- Bylo použito několik kultivačních postupů určených k detekci arkobakterů z různých matric. Byla výtěžnost metod statisticky porovnávána? Liší se spektrum detekovaných druhů arkobakterů v závislosti na použitém médiu?
- Při testování rezistence k antimikrobikům byl zjištěn nezvykle vysoký počet rezistentních kmenů arkobakterů. Aby bylo možné potvrdit vhodnost použití hodnotících kritérií pro kampylobaktery i k určení rezistence u arkobakterů, bylo by vhodné ověřit i genetickou podstatu rezistence. Byly v testovaném souboru detekovány i kmeny multirezistentní?
- Při sledování působení rostlinných extraktů na růst arkobakterů byly použity zejména etanolové extrakty. Etanol však inhibuje růst bakterií, a to i v nižších koncentracích. Byla u použitých extraktů a jejich ředění známá jeho koncentrace?
- Kapitola „Efekt vysychání na přežívání arkobakterů na různých materiálech“ nepochybně souvisí i s použitým typem kovu (kuponů). Bylo sledováno, zda některé materiály působí na růst bakterií inhibičně, případně urychlují tvorbu nekultivovatelných buněk (VBNC)?
- Jaký má disertant pohled na možné zavedení legislativních limitů pro arkobaktery v potravinách, případně v jakých?

Předloženou prací a zveřejněnými publikacemi prokázal disertant schopnost vědecky pracovat a získané výsledky vhodným způsobem interpretovat a prezentovat.

Doktorská práce Ing. Davida Šilhy je zpracována v obvyklém rozsahu, je vyhovující po formální i odborné stránce. Pro lepší přehlednost bych jako oponent přivítala uvedení cílů práce, detailnější popis pracovních postupů i výsledků a dále doplnění plných textů již zveřejněných rukopisů zaměřených na sledovanou problematiku. K práci nemám další zásadní připomínky.

Závěrem svého posudku mohu konstatovat, že disertační práce Ing. Davida Šilhy splňuje požadavky kladené na disertační práce dle § 47, odst. 4, zákona č.111/1998 Sb., o vysokých školách a doporučuji ji přijmout k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení doporučuji udělení akademického titulu Ph.D.

V Brně dne 3.10.2015

  
Doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D.

## Posudek disertační práce

Autor práce: Ing. David Šilha

Název práce: Studie výskytu *Arcobacter* spp. v prostředí a vlivy působící na jejich přežívání

Předložená disertační práce popisuje experimentální práce související s bakteriemi rodu *Arcobacter* a to jak jejich izolace a identifikace s využitím analytických technik (MALDI-TOF MS, PCR), tak testování vlivů různých fyzikálních podmínek a přítomnosti chemických látek. V teoretické části autor představil všechny známé zástupce rodu a věnoval se dostupným informacím o jejich klasifikaci, výskytu v potravinách, tvorbě biofilm aj. Veškerou problematiku, které se autor věnuje ve svých experimentech, má důsledně zpracovanou v teoretické části. Jednotlivé experimenty, jejich metodiku a výsledky má přehledně rozděleny do kapitol a čtenář se v nich velice dobře orientuje. Tento fakt zdůrazňuji proto, že se autor ve své práci věnoval poměrně širokému spektru experimentů od izolací, kultivací přes metody přežívání na površích materiálů, vlivu chemických látek (antibiotik, dezinfekčních prostředků) až po tetování vliv teplot na přežívání arkobakterů. Vzhledem k tomu, že někteří zástupci rodu *Arcobacter* patří mezi lidské patogeny, jsou výsledky těchto studií bezesporu přínosem. Navíc, touto problematikou se v České republice zabývá velice málo pracovišť (pokud vůbec nějaké), a proto považuji za přínosné zejména zjištění prevalence arkobakterů „na našem dvorku“. Pro běžného konzumenta je jistě zajímavé se dovědět, že pitím piva si nijak nepomůžeme, co se přežívání těchto bakterií týká. O vědecké významnosti výsledků prezentovaných v této disertační práci svědčí i jejich publikování v recenzovaných odborných časopisech (4 záznamy v databázi Scopus, z toho 2 na Web of Science).

Práce je psána na vysoké odborné úrovni a to jak prezentace výsledků, tak jejich diskuse s již publikovanými daty jiných autorů. Je psána přehledně, stylisticky na vysoké úrovni bez překlepů a gramatických chyb. Formální úprava odpovídá směrnici UPa č. 9/2012, stejně tak uvedené citace splňují příslušnou technickou normu.

I přes výše uvedená superlativa mám následující připomínky, dotazy a upřesnění:

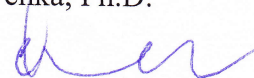
- str. 103, uvádíte termín *přesnost* (konkrétně stěrová metoda je nejméně přesná). Jak je definovaná u těchto metod *přesnost*?
- Obrázek 15 (str. 104), podle velikostí standardních odchylek je vidět, že rozdíly nemusí být významné. Bylo provedeno statistické hodnocení dat? Hodilo by se alespoň párové porovnání pro jednotlivé doby expozice. V textu dále uvádíte přežívání v % (16, 27 a 9 %), ale z grafů to není patrné. Jak jste zjistil (vypočítal) ona % přežívání? Nebylo by lepší aplikovat na data (KTJ/g vs. doba přežívání) nějaký matematický model a potom porovnávat jednotlivé parametry modelu?
- Tabulka 6, str. 107, není jasné, co znamenají čísla v tabulce. Dovídám se až z textu, že to jsou %.
- Tabulka 7, str. 108, jak byly vypočítány (zjištěny) hodnoty MIC? Není definováno ani u tabulky, ani v textu (metodice).

- Obrázky 17-18, str. 110, uvádíte průměrné hodnoty z 3 měření (jako v celé práci), nicméně v popisu metodiky k tomuto konkrétnímu experimentu uvádíte (str. 78), že byl prováděn v *dubletu 3x*. To pro mě znamená  $n = 6$ .
- Jednotky koncentrací buněk by v česky psané práci měl být KTJ/g, nikoliv CFU/g.
- Jak dlouho byly přírodní extrakty uchovávány při teplotě 4 °C, než byly použity k účelům experimentu? Byla doba skladování stejná pro všechny extrakty?
- Při experimentu s umělou inokulací dětské výživy etanolovým extraktem rakytníku byl sice prováděn slepý pokus, ale jen s přídatkem inokula. Neměl by tam být také přídatek 4,0 ml 96% etanolu?
- Obr. 19, str. 124, slovo *křivka* neplatí pro případ prostého propojení bodů. Křivka je vždy výsledkem aplikace nějaké matematické funkce, což by se v tomto případě také velice hodilo.
- Od kapitoly 4.8 máte špatně číslované obrázky (začínáte znovu od 1).
- U obrázků na str. 128, 130 a 131 chybí uvedení vlnové délky, při které byla měřena absorbance/úbytek absorbance.
- Proč jste nehledal vztah mezi přežíváním arkobakterů a obsahem fenolových látek, ABTS nebo DPPH?
- Obr. 28, 29 na str. 135, opět postrádám vysvětlení, jak byly zjištěny % přežívání, která uvádíte v textu.
- Citace v seznamu by měly být ukončeny tečkou (jedná se o věty).

**Předložená disertační práce přináší jednoznačně nové poznatky v oboru. Provedení a zpracování výsledků v kontextu s další studijní literaturou svědčí o schopnosti autora vědecky pracovat. Disertační práci Ing. Davida Šilhy proto doporučuji přijmout k obhajobě.**

V Pardubicích dne 21.07.2015

doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.  
oponent



## **Studie výskytu *Arcobacter* spp. v prostředí a vlivy působící na jejich přežívání**

Předložená disertační práce, byla vypracována na Katedře analytické chemie, Fakulty chemicko-technologické, Univerzity Pardubice, pod vedením školitelky Doc. Ing. Jarmily Vytrásové, CSc. Práce měla komplexní zadání, neboť cílem bylo nejen prověření přítomnosti výskytu bakterií rodu *Arcobacter*, dále pak testování jejich citlivosti k širokému spektru antimikrobiálních látek a schopnost přežívání v různých typech prostředí. Vyhovět těmto cílům vyžadovalo velké pracovní nasazení a také tomu odpovídá rozsah práce (181 stran včetně příloh). Zvolené téma bylo aktuálně vybrané – mapování výskytu nového potenciálního patogenu a studium jeho vlastností je stále velkou výzvou. *Arcobacter butzleri* je již od roku 2002 klasifikován jako nebezpečný pro lidské zdraví však stále uniká soustavnému sledování v potravinách.

Autor své výsledky rozčlenil na úvodní část mapující současný stav taxonomie a izolace rodu *Arcobacter*, dále pak uvedl široké spektrum faktorů a vlivů limitujících růst, včetně postupů pro fenotypovou detekci rezistence. Tato kapitola je velice rozsáhlá (45 stran). Pak následuje výčet metod a experimentálních postupů (20 stran). Výsledková část je členěna do osmi oddílů, které jsou vždy doprovázeny separátní diskusí. Je škoda, že autor nevypracoval závěrečnou samostatnou diskusí, která by vyhodnotila všechny aspekty práce.

Část 4.3 věnovaná efektu vysychání pokládám za kvalitně zpracovanou a originální. Rovněž vliv teploty je podrobně dokumentovaný a pouze pokládám za škodu, že nebyly alespoň u některých typických kmenů určeny *D* hodnoty (decimální redukce počtu mikroorganismů). Mám dotaz, zda v současnosti nejsou již tyto hodnoty naměřené? Je zajímavé, že výskyt arkobakterů je vyšší ve vzorcích jatečných mas a drůbeže, než ve stěrech z živých divokých zvířat (přílohy 3 a 4). Sledování vývoje zvýšené odolnosti k desinfekčním látkám opakovanými kultivacemi ve zvyšujících se koncentracích je logické a rostoucí odolnost mikroorganismů je realitou. Pro tyto studie by bylo ideální použití kultivace v chemostatu, kde je možno plynule po nárůstu vhodného počtu generací zvyšovat koncentraci testované látky.

Je známo, že u člověka jsou arkobaktery spojovány s enteritidami a septikemiemi. Pro posouzení jejich skutečné klinické závažnosti je nutné zhodnocení potenciálních virulenních faktorů. Dosud je však o mechanismech patogenity poměrně málo znalostí.

Mám následující dotaz: vzhledem k poměrně blízké fylogenetické příbuznosti k více známému patogenu, kampylobakteru a k jejich podobným klinickým projevům, chtěla bych vědět, co je známo o přítomnosti kampylobakterových známých genů virulence (možná jejich analogů) u arkobakterů, anebo mají tyto bakterie odlišné mechanismy k průniku do enterocytů.

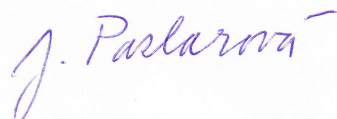
**Závěr:**

Předložená disertační práce Ing. Davida Šilhy „Studie výskytu *Arcobacter* spp. v prostředí a vlivy působící na jejich přežívání“ podává velmi kvalitní analýzu výskytu a vlastností nutných pro přežití u příslušníků rodu *Arcobacter*. Zadáání práce bylo náročné, ale autor se s úkolem zdařile vyrovnal.

Ing. David Šilha přesvědčivě dokázal schopnost a připravenost k samostatné činnosti v oblasti výzkumu nebo vývoje, podle § 47, odst. 4, zákona č.111/1998 Sb., o vysokých školách

Doporučuji proto komisi pro obhajoby Fakulty chemicko-technologické, Univerzity Pardubice, aby práci **Studie výskytu *Arcobacter* spp. v prostředí a vlivy působící na jejich přežívání** přijala po úspěšné obhajobě jako podklad k udělení titulu PhD.

V Praze 31. srpna 2015



Doc. RNDr. Jarmila Pazlarová, CSc.