

Oponentský posudek na bakalářskou práci Kristýny Brožové

Studium prevalence *Giardia intestinalis*

Předložená bakalářská práce Kristýny Brožové se zabývá problematikou prevalence parazita *Giardia intestinalis* u lidí a různých druhů zvířat. Jelikož se jedná o parazita se zoonotickým potenciálem, jde o aktuální téma.

Bakalářská práce je stylisticky dobře zpracována, je čtivá a přehledná. Práce čítá 43 stran včetně seznamu literatury. Úvod na 11 stranách je pěkně strukturovaný, srozumitelný, přiměřeně dlouhý, a obsahuje všechny nezbytné informace. Cíle práce jsou jasně formulovány a splněny. V dílčích cílech práce chybí experimentální infekce zvířat. Dosažené výsledky na 6 stranách jsou srozumitelné a dobře členěné. Diskuse na úctyhodných 7 stranách je přehledně zpracována a opírá se o vlastní výsledky. Seznam použité literatury čítá 10 stran původních i recentních publikací.

Práce obsahuje nevelké množství gramatických chyb a překlepů. Jelikož se jedná o bakalářskou práci zaměřenou na konkrétního parazita a jeho diagnostiku včetně diagnostiky mikroskopické, uvítala bych v Úvodu v kapitole 1.1. ještě obrázek s morfologií a popisem struktur u obou vývojových stádií. V kapitole III. Materiál a metody postrádám v podkapitole 3.1.2. specifikaci semikvantitativního hodnocení intenzity infekce (tj. kolik cyst představují 1-4 křížky), a odkaz na příslušnou literaturu k této problematice, jelikož jsou výsledky dle této metody zhodnoceny v kapitole Diskuse. V kapitole 3.2.2. chybí množství DNA použité k PCR (namísto objemu je zde uvedeno znaménko „x“). Ani v kapitole Cíle práce, ani v metodice v kapitole 3.3. není uvedeno, proč byly prováděny experimentální infekce pískomilů. Jelikož se jedná i o velmi krátkou kapitolu, působilo to na mě zprvu jen jako „výkřik“, který s bakalářskou prací patrně nesouvisí. Až ke konci kapitoly Diskuse na straně 30 se poprvé jen tak „mezi řečí“ lze dozvědět, proč vlastně tato infekce proběhla a k čemu měla sloužit.

Zadání bakalářské práce nebylo zvoleno úplně šťastně. Hodnocení prevalence by mělo být interpretováno s opatrností, a vždy vztaženo ke konkrétnímu počtu celkem vyšetřených jedinců či vzorků. Velkou úlohu přitom hraje vybraný soubor vyšetřovaných jedinců, kritéria výběru jedinců, vlastnosti jedinců, a lokalita/území (velikost, charakter), na kterém bylo šetření prováděno.

Proto nelze výsledky (kapitola 4.1.) interpretovat tak, že prevalence zvířecích vzorků činila 4,9 %, a poté sloučit dohromady výsledek získaný vyšetřením lidských a zvířecích vzorků a tvrdit, že celková prevalence tedy činí 1,3 %. Již sloučení všech skupin zvířat v jedinou je diskutabilní. Chápu, že pro účely bakalářské práce to postačuje, nebylo by to však možné v odborném článku. V celé bakalářské práci není uveden původ analyzovaných vzorků (ani v Přílohách, kam se tyto informace běžně uvádějí), takže již nevíme, zda se prevalence 4,9 % u zvířat, případně 0 % u lidí, týká celé České republiky, nebo jen několika oblastí, případně pouze jihočeského kraje. I proto je jakákoliv procentuální interpretace zavádějící. V diskusi Kristýna Brožová uvádí srovnání prevalence v industrializovaných a rozvojových zemích, avšak pouze v procentech. Například: „V Německu byla dle práce Sagebiel et al. (2006) zjištěna prevalence 1,5 %, v Portugalsku se pak ukázala prevalence vyšší, a to 6,8 % (Júlio et al. 2012). Naopak v Argentině Minvielle et al. (2008) detekovali prevalenci 72 %“. Zásadní

nedostatek této části diskuse spatřuji v tom, že zde není uveden celkový počet vyšetřených a pozitivních jedinců, ke kterým se dané procento vztahuje, ani zda se jednalo o nějaký konkrétní region v těchto zemích. Nevíme tedy například, zda se v případě Německa jednalo o vyšetření 150 jedinců, z nichž byli 2 pozitivní (což by přibližně odpovídalo prevalenci zjištěné v bakalářské práci studentky), nebo o vyšetření 1000 jedinců, z nichž bylo pozitivních 15. Rovněž v případě Argentiny mohlo jít o 72 pozitivních jedinců ze 100 vyšetřených. Je ve člancích Sagebiel et al. (2006), Júlio et al. (2012) a Minvielle et al. (2008) počet vyšetřených jedinců uveden?

Ke zpracování tématu jako takového nemám nejmenší připomínky, pouze bych byla zdrženlivější při interpretaci prevalence ve výsledcích a v diskusi; téma by bylo možné jednoduše nazvat „Detekce *Giardia intestinalis*“, čímž by byl tento problém/nedostatek vyřešen, jelikož práce pojednává především o hodnocení senzitivity a specifity jednotlivých metod pro detekci *G. intestinalis*.

Velmi oceňuji to, že Kristýna Brožová ve své práci použila a zvládla pracovat s velkým množstvím nejrůznějších diagnostických metod a postupů (koprologické vyšetření trusu, mikroskopie, metody molekulární biologie, práce s kulturami parazita, experimentální infekce zvířat), které jsou časově náročné, a zcela tak přesáhla požadavky kladené na bakalářské práce na PřF JU.

K práci mám následující dotazy:

1. Z jakého důvodu jste pro vyšetření na přítomnost *G. intestinalis* nepoužila všech 411 dříve získaných vzorků? Nemohla se prevalence s případným zvýšením množství vyšetřených vzorků změnit? Jakým způsobem jste vybírala vzorky, které budou a nebudou vyšetřeny?
2. V kapitole I. uvádíte, že „V USA je ročně giardií infikováno kolem 20 tisíc lidí, zatímco celkově ve světě je to ročně kolem 280 milionů lidí.“ Opravdu se v USA jedná o tak nízký počet? Z jakého důvodu byly ke srovnání vybrány právě USA a Malajsie, a proč je v jedné větě prevalence v USA vyjádřena konkrétním číslem, zatímco v Malajsii je uvedena v procentech?
3. Na straně 7 uvádíte, že výpovědní hodnota koproskopických metod pro detekci giardiózy může být ovlivněna i zkušeností diagnostika. V čem spočívá tato záludnost?
4. V kapitole 1.5. se zabýváte problematikou terapie giardiózy. Do jakých skupin patří léčiva, která zmiňujete (tj. tinidazol, metronidazol a albendazol), a jakým mechanismem působí? Znáte i nějaké obchodní názvy léčiv z těchto skupin, které se používají například v naší republice? A jak je to s terapií u zvířat? Poslední dvě věty této kapitoly si odporují. Mohla byste je více vysvětlit?
5. Na straně 14 uvádíte, že zbylou část vzorku jste zamrazili pro případné pozdější použití. Nepopraskají cysty giardií mražením?
6. Při purifikaci PCR produktů z gelu pomocí kitu dochází k velkým ztrátám. Z jakého důvodu jste nepoužila dnes již běžně užívanou enzymatickou purifikaci PCR produktů, která má mnohem vyšší efektivitu, a navíc je i časově úspornější? Nemohla

by to být i jedna z příčin, proč se některé produkty nepodařilo osekvenovat v požadované či očekávané kvalitě?

7. Jakým způsobem proběhla volba rozpětí teplot gradientu (tj. 55-56 °C) pro otestování nejvhodnější teploty annealingu? Mám tím na mysli, proč jste nepoužili například rozpětí teplot 48-60 °C (nebo jiné)?
8. Ve výsledcích v kapitole 4.2.2. píšete, že „PCR pro geny BG a SSU rRNA neprokázaly dostatečnou specifitu pro zachycení přítomnosti *G. intestinalis* v pozitivním vzorku trusu“. Co ukazovaly tyto sekvence se smíšeným signálem, tj. jaké taxony byly zjištěny BLAST analýzou těchto sekvencí?
V gradientové PCR vyšly u každého genu pozitivní PCR produkty o požadované velikosti při několika různých teplotách (viz Obr. 4-6). Dali jste osekvenovat všechny tyto produkty?
9. Zkoušela jste PCR vzorku psa, který byl koproskopicky pozitivní na přítomnost giardií, opakovaně, než jste ho prohlásila za PCR-negativní?
10. Cílem práce bylo zjistit prevalenci *G. intestinalis* u zdravých lidí v ČR. Definujte termín „zdravý člověk“, a podle jakých kritérií jste takové lidi do své studie vybírala?

I přes vznesené připomínky práci považuji za kvalitní, oceňuji zejména její zpracování a množství použitých metod, a jednoznačně ji **doporučuji** k obhajobě.

Kvičera

MVDr. Jana Kvičerová, Ph.D.

V Českých Budějovicích, 13. května 2019