



BIOLOGY CENTRE ASCR

Institute of Parasitology

address: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

IBAN – CZ22 0710 0000 0000 0552 7231 | SWIFT CODE – CNBACZPP | VAT No.: CZ60077344

phone: +420 387 775 403 | fax: +420 385 310 388 | www.paru.cas.cz | e-mail: paruv@paru.cas.cz

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Martiny Šloufové “ qPCR diagnostika střevního prvoka *Blastocystis* sp. v souboru vzorků od zdravých lidí ”

Ve své diplomové práci se Martina Šloufová snažila optimalizovat metodiku qPCR pro přesnější stanovení prevalence *Blastocystis* sp. u vybraných vzorků stolice asymptomatických lidí. Dále se pomocí NGS snažila o zjištění smíšených infekcí více subtypů *Blastocystis* sp. Hned na úvod musím konstatovat, že se se zadaným úkolem vypořádala velmi dobře a zejména fungující qPCR, která umožňuje také stanovit míru infekce, je určitě velmi důležitým výstupem nejen pro tuto diplomovou práci ale zejména pro Laboratoř parazitární terapie, která tuto metodu bude dále využívat ve svých projektech.

Úvod je sepsán přehledně a výstižně, čtenář je dobře uveden do dané problematiky. Do úvodní kapitoly nicméně mohla být zařazena fotodokumentace (světelná nebo elektronová mikroskopie) blastocyst, aby měl čtenář představu, jak studovaný organismus ve skutečnosti vypadá. Také jsem trochu postrádal doplnění informací o diverzitě a geografické distribuci blastocyst o fylogenetické vztahy jednotlivých subtypů (třeba i s ilustrativním stromkem z literatury), bylo by zajímavé posoudit, které subtypy jsou si příbuznější a jak evolučně vznikaly. V úvodní kapitole 1.2 jsou vypočteny faktory ovlivňující prevalenci *Blastocystis* sp. včetně druhu diagnostické metody – přísně vzato, diagnostická metoda neovlivňuje prevalenci, jen její zachycení. Hlavním cílem práce je zavedení a optimalizace qPCR protokolu pro diagnostiku *Blastocystis* sp. V úvodu práce je nicméně popsána zavedená qPCR různými metodami s odkazem na několik literárních zdrojů. Přesnější by bylo tedy definovat hlavní cíl jako zavedení a optimalizace qPCR ve vaší laboratoři. V metodické části je jen několik nepřesností, např. koncentraci TaqMan sondy nelze určit z udané hodnoty - 1μl ředěné v poměru 1:20 (výchozí koncentrace?), u polymerázy by se měl udávat počet jednotek a ne objem v mikrolitrech. Výsledky jsou srozumitelně prezentovány, v tabulkách lze snadno nalézt podrobná data. Vyskytla se zde pravděpodobně jen jedna chyba/nejasnost – více v otázce č. 3. Diskuze se mi líbila, autorka se snažila vhodně diskutovat dosažené výsledky s publikovanými daty. Snad jen nepřesné vyjádření na straně 29, že real-time PCR neumožňuje určit jednotlivé subtypy. Toto není úplně přesné tvrzení, protože pokud využíváte TaqMan probu a navrhnete ji do místa, které se liší mezi jednotlivými subtypy, tak byste měla dosáhnout specifčnosti pro jednotlivé subtypy a bylo by tedy možné použít qPCR pro diagnostiku – ale to by samozřejmě vyžadovalo design specifických TaqMan prob pro jednotlivé subtypy a mnohem více analyzovaných qPCR reakcí. Takže chápu, že je praktičtější vzorky sekvenovat. Po formální stránce je vše v pořádku, práce obsahuje minimum překlepů (jeden je bohužel v nadpisu kapitoly v diskuzi) a má úctyhodný počet odkazů na literaturu svědčící o dobrém literárním přehledu studentky (jen mě překvapily názvy časopisů s malými písmeny na začátku slov kromě prvního slova).

K práci mám následující připomínky a dotazy:

- 1) Řazení blastocyst do jednotlivých subtypů je na základě SSU rDNA sekvencí – jsou tyto sekvence v rámci jednotlivých subtypů 100% identické, nebo existuje i variabilita na úrovni sledovaného (barcode) úseku tohoto genu?



- 2) Byl stupeň kolonizace (10^0 – 10^1 nízká intenzita kolonizace, 10^2 – 10^3 střední intenzita kolonizace, 10^4 – 10^5 vysoká intenzita kolonizace) definován podle nějakých reálných hodnot dříve pozorovaných v lidských vzorcích?
- 3) V textu na straně 23 je v posledním odstavci podle mě chybně uvedeno, že počet vzorků pozitivně identifikovaných pouze na základě qPCR je 12. Podle mé interpretace McNamarova testu v tabulce 4 a podle tabulky 5 je jich 14. Nebo se mýlím? V Tabulce 5, která porovnává citlivost cPCR a qPCR, bych čekal i zahrnutí vzorků pozitivně identifikovaných pomocí cPCR a negativních na základě qPCR.
- 4) Jaký může být důvod, že nevyšlo NGS i u několika vzorků s relativně nízkou Ct hodnotou?
- 5) Nesouhlasil bych úplně s jediným vysvětlením nízkého záchytu (13%) blastocyst v práci Poirier et al. (2011) a vyššího záchytu (29%) v předložené diplomové práci. Tento rozdíl autorka vysvětluje použitím méně citlivé SYBR Geen metody Poirierem et al. Jaké by mohly být další důvody pro vámi zjištěnou jinou hodnotu prevalence *Blastocystis* sp.?

Diplomovou práci Martiny Šloufové považuji za výbornou a doporučuji ji vřele k obhajobě.

V Českých Budějovicích, 13. 5. 2022

RNDr. Ivan Fiala PhD.

Biology Centre of ASCR, Institute of Parasitology

Branišovská 31, České Budějovice, 37005

Czech Republic