

**Posudek na magisterskou práci Bc. Kristýny Brožové na téma
„Průzkum výskytu oportunního prvoka, *Giardia intestinalis*, u zdravých lidí a jejich
zvířat v ČR s použitím qPCR“**

Předložená magisterská práce vychází z bakalářské práce autorky z roku 2019 zabývající se studiem prevalence *Giardia intestinalis*, kdy autorka vyhodnocovala sensitivitu a specifitu několika protokolů konvenční PCR. Předložená práce plně zapadá do komplexní studie řešené na pracovišti školitele a úzce souvisí s úspěšně obhájenou magisterskou prací Zuzany Lhotské „Studium střevních prvoků rodu *Blastocystis* v mikrobiomu člověka“, jejíž výsledky byly následně publikovány v impaktovaném časopise *Frontiers in cellular and infection microbiology* (Lhotská et al. 2020).

Magisterská práce je tradičně rozdělena do hlavních kapitol úvod, cíle, materiál a metodika, výsledky, diskuze, závěr a seznam použité literatury, které obsahují celou řadu podkapitol. Celkový rozsah práce činí 45 stran.

Úvodní část diplomové práce je zpracována přehledně, přičemž čtenáře postupně seznámí s životním cyklem giardií, jejich genetickou diverzitou a hostitelskou specifitou a klinickými příznaky onemocnění s ohledem na diverzitu mikrobiomu střeva. V neposlední řadě autorka uvádí literární přehled výskytu *Giardia intestinalis* u lidí, psů a koček a diagnostických metod používaných v laboratorní praxi. Zde si neodpustím připomínku, že v přehledu výskytu giardií v různých částech světa postrádám použitou metodu vyhodnocení, která by dala čtenáři možnost posoudit validitu uváděných výsledků. Nelze přece přímo porovnávat výsledky získané koprologickým vyšetřením s výsledky molekulárních metod.

Cíl práce je jasně formulován do jednoho hlavního bodu, jmenovitě zjištění výskytu *Giardia intestinalis* u lidí bez klinických obtíží pomocí qPCR. Tento hlavní cíl je následně rozdělen do čtyř dílčích chronologicky řazených bodů, jejichž postupné splnění bylo nezbytné ke splnění hlavního cíle.

Kapitola materiál a metody obsahuje soupis použitého materiálu a metod používaných během řešení vytyčené problematiky, přičemž největší pozornost je věnována metodě qPCR.

Výsledky jsou podrobně zpracovány a víceméně odpovídají jejich členěním vytyčeným dílčím cílům.

V diskuzi autorka hodnotí své výsledky a konfrontuje je s výsledky ostatních autorů zabývajících se prevalencí *Giardia intestinalis* u lidí a zvířat, porovnává senzitivitu použitých metod a posuzuje korelaci výskytu giardií s vybranými faktory, jako jsou životní styl, kontakt se zvířaty, pohlaví a věk.

Závěr shrnuje nejdůležitější výsledky, které odpovídají jednotlivým vytyčeným cílům práce.

K autorce mám několik věcných dotazů:

- 1. Byly vzorky trusu/stolice před izolací DNA váženy, aby bylo možno vyjádřit počet cyst na gram? To samé platí u sestrojené kvantifikační křivky, kde autorka uvádí počet trofozoitů na vzorek.**
- 2. Proč autorka k sestrojení kvantifikační křivky pro qPCR použila čisté trofozoity, přičemž pro diagnostickou qPCR byly používány vzorky trusu obsahující, předpokládám, převážně cysty giardií? Nebylo by lepší použít cysty i k sestrojení křivky?**

3. **Poslední otázka se týká izolace DNA z cyst giardií. Z výsledků je zřejmé, že konvenční PCR byla schopna amplifikovat pouze vzorky s vyšším množstvím cyst (potvrzeno i flotační metodou), přičemž vzorky s nižším obsahem cyst zachytila pouze qPCR. Porovnávala autorka úspěšnost izolace DNA a následné amplifikace PCR/qPCR při mechanickém rozbíjení vzorků a bez něj za použití stejného izolačního kitu?**

Závěr: Předložená magisterská práce splňuje vytyčené cíle. Svědčí o schopnosti autorky pracovat s vědeckou literaturou, provádět řadu laboratorních postupů a ze získaných výsledků vyvozovat závěry.

Předložená diplomová práce Bc. Kristýny Brožové splňuje veškeré požadavky kladené na diplomové práce na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a přes veškeré mé výtky **ji doporučuji k obhajobě.**

V Českých Budějovicích, 4. 1. 2022

RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.