

Oponentský posudek na diplomovou práci Markéty Stejskalové „Vývoj bakterií rodu *Asaia* ve flebotomech a jejich vliv na přenos leishmanií“

RNDr. Petra Procházková, PhD

MIKROBIOLOGICKÝ ÚSTAV, Akademie věd České republiky, v. v. i., Laboratoř buněčné a molekulární imunologie

Studentka Markéta Stejskalová vypracovala svou diplomovou práci na Katedře parazitologie Přírodovědecké fakulty UK pod vedením RNDr. Magdalény Jančářové PhD. Toto pracoviště se přenosem parazitů krev-sajícím hmyzem tradičně zabývá a výsledky tohoto pracoviště jsou četně publikovány prestižními časopisy.

Předložená diplomová práce je členěna odpovídajícím způsobem a je doplněna schémata, grafy, obrázky a tabulkami. Po stručném uvedení tématu a cílů práce následuje přehledná literární rešerše podávající srozumitelné informace o vývoji a fyziologii flebotomů, o jejich střevním mikrobiomu s důrazem na bakterie rodu *Asaia*, o fyziologii a vývoji leishmanií, které flebotomové přenášejí, a především o možné interakci některých bakterií s leishmaniemi, které mohou ovlivňovat jejich vývoj či přenos. Diplomová práce je napsána čtivým stylem, i když se autorka nevyvarovala několika překlepů, chybějících písmen a především špatného použití interpunkce.

Metodická část je velice pěkně a podrobně napsána tak, aby umožnila reproduibilitu popisovaných pokusů. Oceňuji schématická znázornění experimentů, které usnadňují jejich pochopení. Vyskytuje se v ní několik nejasností, jako neuvedení jedné složky Acetobacter-glukanobacterového média či nedefinování moči pro přípravu kultivačního média leishmanií. Dále bych v práci uvítala obrázek či schéma experimentu „sání krve skrz membránu“, neboť pro „parazitické“ laiky je tato metoda neznámá a znázornění aparátu by usnadnilo jeho představu.

Vlastní výsledková část je pěkně a srozumitelně zpracována a správně dokumentována, a výsledky jsou dobře statisticky zpracovány. V první části práce autorka kultivovala dva druhy bakterie *Asaia* sp. a sledovala úspěšnost infekce samic flebotomů. Zajímavé je nalezené snížení počtu pozitivních samic flebotomů po sání krve, naznačující inhibici či dokonce eliminaci této bakterie krví hostitele. Z provedených experimentů vyplývá, že bakterie *Asaia* sp. se nepřenáší transovariálně, a že se vyskytuje pouze na povrchu snůšek. Překvapivé je zjištění, že ačkoliv se bakterie *Asaia* sp. přenášejí skrze různá larvální stadia, nebyly detekovány u dospělců, indikující jejich eliminaci v době kuklení. Je škoda, že autorka analyzovala pozitivitu flebotomů či snůšek a larev pouze běžnou PCR a nevyužila možností kvantitativní PCR, kdy by například použití plasmidů obsahujících část genu pro bakterii *Asaia* sp. umožnilo vytvořit standardní křivky a tím stanovit konkrétní množství této bakterie ve vzorku, resp. množství její 16S rDNA. V druhé části práce se autorka zabývala koinfekcí bakterií *Asaia* sp. a *Leishmania major* s důrazem na stanovení vlivu bakterií *Asaia* sp. na intenzitu a lokalizaci infekce leishmaniemi a na zastoupení jejich morfologických forem ve flebotomech a naopak i na stanovení vlivu leishmanií na intenzitu infekce bakteriemi *Asaia* sp. Z provedených experimentů vyplývá, že oba zkoumané druhy bakterie *Asaia* sp. snížily intenzitu infekce leishmaniemi 8. den po podání krve. Toto zjištění by mohlo vést k využití této bakterie či jejích proteinů k potenciálnímu ovlivnění přenosu patogenů hmyzími vektory.

Ve výsledkové části je jen několik nejasností. U grafu 3.7 bych doporučila znázornit nalezené významnosti pro snazší orientaci v grafu. Dále, tabulka a graf 3.9. jsou trochu nejasné z důvodu uvádění absolutních hodnot a pak procent lokalizace infekce. Není zcela na první pohled jasné, ze kterých hodnot se dělala statistická analýza.

Závěr diplomové práce obsahuje věcnou a výborně zpracovanou diskuzní část obsahující shrnutí výsledků autorky a jejich porovnání s literaturou.

K diplomové práci nemám žádné koncepční nebo závažné připomínky, nicméně bych ráda položil několik otázek k diskusi:

- Amplifikují použité primery všechny druhy bakterie *Asaia* sp. či pouze některé z nich, potažmo druhy používané v popisovaných experimentech?
- V této práci, ale již v předešlých pracích, bylo zjištěno, že po sání krve klesá počet *Asaia* sp. pozitivních flebotomů. V diskuzi je vysvětlení naznačeno, nicméně, jak si autorka vysvětluje tento pokles? Je známo, co konkrétně z krve hostitele tento pokles výskytu *Asaia* sp. bakterií způsobuje?
- Autorka píše, že ačkoliv se bakterie *Asaia* sp. přenášejí larválními stádii, tyto bakterie nepřežijí proces kuklení. Počty pozitivních jedinců byly určovány jak kultivací na agarových plotnách, tak pomocí PCR. Jak může být vysvětleno, že po vylíhnutí pozitivních larev nebyl detekován žádný pozitivní dospělec? Čím může proces kuklení tyto bakterie zničit? A jak si autorka vysvětluje nepřítomnost alespoň mrtvých bakterií *Asaia* sp. u těchto dospělců, které by odhalila metoda PCR?
- V tabulce 3.10. jsou absolutní hodnoty zastoupení různých morfologických forem *L. major*, ale není zde provedena žádná statistická analýza, ani nejsou rozdíly v jejich výskytu u *Asaia* sp. pozitivních a negativních jedinců vysvětleny či diskutovány. Lze nějak vysvětlit evidentně zvýšené počty metacyklických promastigotů u neinfikovaných phlebotomů?
- Je nesmírně zajímavé, jak jsou různé bakterie schopné ovlivňovat růst a vývoj různých parazitů. Jaké jsou vyhlídky využití získaných dat, že bakterie *Asaia* sp. může zmírnit intenzitu infekce leishmaniemi? Plánuje autorka v tomto směru další experimenty?
- Je technicky možné „vychovat“ germ-free flebotomy, které by neobsahovaly žádné mikroorganismy? Následné monokolonizace konkrétními bakteriálními druhy by mohly výrazně posunout míru znalostí o interakci mezi hmyzími vektory, parazity a mikroby.

Lze konstatovat, že předložená diplomová práce představuje pečlivé strukturované dílo prokazující laboratorní zdatnost a metodickou i literární připravenost autorky. Proto mohu jednoznačně doporučit diplomovou práci Markéty Stejskalové k obhajobě.