

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: RNDr. Martina Saláková, Ph.D.

Datum: 25.5.2017

Autor: Bc. Kateřina Kunteová

Název práce:

**Paralelní detekce virových agens v patogenezi autoimunitních onemocnění**

### Cíle práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo zavést metody pro souběžné stanovení přítomnosti genotypů skupiny lidských adenovirů, enterovirů a vybraných bakteriofágů na velkém souboru jedinců pomocí amplikonových knihoven a sekvenování nové generace Illumina. Navržené metodické přístupy pro genotypování adenovirů, enterovirů autorka otestovala na panelu vzorků, u nichž byl znám genotyp díky klasickému Sangerovu sekvenování a následně použila pro detekci jednotlivých typů u pozitivních vzorků s neznámým genotypem.

### Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 102

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

V seznamu zkratk chybí některé české názvy, jsou pouze anglické názvy. Což pak vede k tomu, že UTR je jednou označena jako netraslatovaná oblast a jednou jako nepřekládaná oblast. Řada zkratk uvedených v textu v seznamu chybí (např. NCBI, TNF, HVR, IRES.), naopak řada zkratk ze seznamu není použita v textu (APC, BLAST, ELISA, FRET, GADA, ICA...)

### Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO

Je napsán srozumitelně? ANO

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO

Literární přehled na 27 stranách s 17 obrázky a 2 tabulkami je zpracován velmi dobře a zahrnuje aktuální poznatky. Pouze v kapitolách charakterizace vybraných skupin virů autorka rozděluje detekci virů na senzitivní detekci, která detekuje celé spektrum typů jednotlivých virových rodin, a detekci s určením typu pro určení jednotlivých virových genotypů. Označení senzitivní detekce pro obecnou metodu detekce všech typů virů považují za zavádějící, detekce určená k typování také musí být citlivá a musí identifikovat všechny genotypy ve vzorku.

Některé citace uvedené v textu chybí v seznamu literatury, např. Gonzales and McElvania, 2018; Lin et al., 2004; Chizhikov et al., 2002, v přehledu nesouhlasí odkazy na obrázek v textu s čísly obrázků (od odkazu na obrázek 1.3.).

### Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito? Analýza sekvencí, návrh primerů, příprava knihovny pro NGS, kontrola a kvantifikace knihovny, NGS a vyhodnocení

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

V kapitole 2.3., zabývající se obecně návrhem primerů, autorka používá označení „začátek“ a „konec“ primerů, lépe používat označení 5' a 3' konec. Informace o množství magnetických kuliček pro odstranění nespecifických amplikonů a primerů-dimerů u adenovirů je pouze v legendě pod obrázkem elektroforézy, ne v textu. Obrázky elektroforéz by bylo lépe uvést ve výsledkové části, protože se jedná o dílčí výsledek při optimalizaci metody NGS než v kapitole metody.

### **Experimentální část:**

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? Výhrady

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO

Ve výsledkové části jsou veškeré informace pouze v tabulkách či obrázcích a v legendách k obrázkům a grafům, což velmi ztěžuje orientaci a přehled ve výsledcích. Text ve výsledcích tvoří pouze několik vět uvádějících jednotlivé kapitoly. Některé výsledky si tak čtenář může zkusit odhadnout z grafu, nebo pokud jsou uvedena čísla, tak sám vypočítat, anebo spočítat barevné a prázdné puntíky, jako například % HAdV typů na obrázku 3.1 nebo % genotypů enterovirů, bakteriofágů, počet genotypů identifikovaných u jednoho jedince v různých odběrech stolice (3.2., 3.6.) atd. Na tento způsob prezentace výsledků pak ale také doplácí i sama autorka, která se ve výsledkové části dopouští řady nepřesností. Uvádím zde jen několik příkladů: v tabulce 2.2. v materiálech je počet vzorků ze studie MIDIA 254 HAdV pozitivních, ve výsledkovém obrázku 3.1. pak 259 v grafu, pokud sečteme čísla genotypů z legendy pak dokonce 263. V následující tabulce 3.5. jsou výsledky qPCR ze stejné studie a zde už je 618 celkových zachycených adenovirových infekcí, aniž by bylo jasné, jak se k tomuto číslu došlo. Liší se celkový počet vzorků v kohortě (2430 str. 73 a 77, vers. 2673 str. 59), na obrázku 3.1 nejprevalentnější typ HAdV 2, v tabulce 3.6 nejvíce identifikovaných infekcí je u typu HAdV 5, atd.

### **Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? NE

Diskuse je opravdu diskusí, autorka porovnává své výsledky s dalšími pracemi, moc ale nepomáhá k lepšímu pochopení některých výsledků, protože se zde v některých případech objevují jiná čísla než ve výsledkové části (např. počet identifikovaných genotypů HAdV, % smíšených infekcí jsou velmi nízká).

### **Závěry (Souhrn)**

Jsou výstižné? ANO

### **Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):**

Dobrá jazyková úroveň, text s minimem překlepů, velmi pěkná grafická úroveň. Oceňuji použití schématu 2.7. pro snadnější orientaci v postupu práce.

### **Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Stanovené cíle diplomové práce byly splněny. Autorka zavedla metodiku NGS pro

genotypizaci lidských adenovirů a enterovirů a tuto metodiku validovala na panelu vzorků o známém genotypu. Vyzkoušela také, že daná metoda je schopná identifikovat dva fylogeneticky různě podobné genotypy ve vzorku s různou virovou náloží. Daná metodika byla vyzkoušena na klinických vzorcích stolice malých dětí, které byly pozitivní pomocí qPCR a je tak připravená pro výzkum vlivu střevních virových infekcí na vznik a vývoj autoimunitních onemocnění jako je diabetes 1. typu či celiakie. Autorka dále otestovala stejný metodický přístup pro studium vybraných bakteriofágů u vzorků stolic dětí z Evropy, Afriky a Asie, a i když výsledky nebyly shodné s publikovanými, daná metodika jistě velmi dobře poslouží při studiu mikrobiomu u dětských pacientů s autoimunitním onemocněním. Objem práce autorky je velký, příprava knihoven takového množství vzorků je velmi náročná, stejně tak samotné sekvenování a vyhodnocení výsledků NGS, proto je velké škoda, že autorka nevěnovala dostatečnou pozornost prezentaci svých výsledků a výsledkovou část vytvořila pouze z tabulek a obrázků a nevyvarovala se tak nepřesností a chyb. Práci doporučuji k obhajobě.

### **Otázky a připomínky oponenta:**

Hlavní připomínky již byly uvedeny.

Otázky na autorku:

Jak probíhala optimalizace jednotlivých kroků? Museli jste optimalizovat PCR reakce, množství magnetických kuliček nebo vše vyšlo podle očekávání napoprvé a podle firemního protokolu?

Byla prováděna kontrola a normalizace všech vzorků před indexací?

Tabulka 3.1 obsahuje procento čtení daného vzorku na NGS pro každý vzorek. U některých vzorků bylo procento malé (jeden vzorek dokonce jenom 6% pro daný genotyp HAdV) a nekorespondovalo s množstvím virové nálože ve vzorku zjištěné pomocí qPCR. Jaké sekvence obsahoval zbytek čtení v NGS analýze? U výsledků směsných vzorků s HAdV už bylo 90 – 99% čtení z NGS k oběma typům. Jak si vysvětlujete rozdílné procento čtení NGS u vzorků s jednotlivými typy a u směsných vzorků. Podobně i u některých enterovirů, i když tam dosahovalo % čtení NGS vyššího čísla pro většinu vzorků.

Můžete přiblížit, jak probíhalo vyhodnocení NGS?

Jakou hloubku čtení jste považovali pro jednotlivé vzorky za dostačující pro určení genotypu?

Jak byla stanovena kvantita bakteriofágů na obrázku 3.10.? Jaké kritérium bylo použito pro kvantitu slabá/střední/silná?

Jaké závěry vyvozujete z kapitoly 3.3. která ukazuje fylogenetické stromy? Je nějaký genotyp adenovirů či enterovirů více variabilní? Dochází k nukleotidovým změnám (především u enterovirů) u jedinců pozitivních na jeden genotyp ve více odběrech?

Ve výsledcích je patrná sezónnost u enterovirů pomocí qPCR detekce. Je u nejčastěji zastoupených genotypů adenovirů a enterovirů také patrná sezónnost nebo různá věková distribuce?

Jak probíhala izolace nukleových kyselin ze vzorků stolic? Jakým způsobem by se dal vzorek

obohatit pro lepší výsledky NGS, či jaký postup zvolit např. u jiného materiálu, kde nemusí být dostatečné množství viru?

I když byl v jedné skupině při studiu přítomnosti bakteriofágů malý počet jedinců, lišil se výskyt jednotlivých skupin bakteriofágů v obou geograficky rozdílných skupinách?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: