



Oponentský posudek magisterské diplomové práce

Autorka: Bc. Tereza Liduchová

Název: Detekce virových zoonóz v biologických vzorcích z polárních oblastí

Vedoucí práce: prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc., Hon. D. Sc., dr. h. c.

Konzultant: RNDr. Jana Elsterová

Oponentský posudek vypracoval: RNDr. Martin Selinger, Ph. D.

Předložená diplomová práce Bc. Terezy Liduchové se zabývá detekcí dvou zoonotických virů v biologických vzorcích z oblastí Svalbardu a Grónska. Konkrétně se jedná o komáry přenášený Sindbis virus (SINV; *Togaviridae*) a virus chřipky typu A (IAV; *Orthomyxoviridae*). V případě SINV bylo otestováno necelých 8000 jedinců komára rodu *Ochlerotatus nigripes* a v případě AIV bylo otestováno 100 orofaryngeálních stěrů a 100 stěrů kloaky racka tříprstého (*Rissa tridactyla*). Téma předložené diplomové práce navazuje na předchozí výzkum pracovníků Centra polární ekologie JU, zejména pak na diplomovou práci RNDr. Jany Müllerové a zabývá se velice aktuálním tématem klimatických změn a s tím související rozšíření vybraných zoonotických virů v oblasti Arktidy.

Práce má rozsah 90 stran a je standardně členěna na literární úvod, cíle práce, metodiku, výsledky, diskuzi, závěr a seznam citované literatury. Jako přílohy jsou přiložena potřebná povolení pro odběr vzorků. U anotace bych upozornil na používání jednotného čísla pro slovo research.

Úvodní literární rešerše je rozepsána na 23 stran a mé dojmy z ní jsou rozporuplné. Na jedné straně se jedná o přehledný a logicky uspořádaný text poskytující základní informace o zoonotických virech s detailnějším zaměřením na arboviry a virus chřipky, který je vhodně doplněn obrázky, schémata a tabulkami. Při detailnějším pohledu jsou ale znát menší nedostatky, a to zejména v doslovném překladu anglických originálů, který buďto ústí v poněkud kostrbatá slovní spojení anebo v několika případech dokonce nedává smysl (např. stránka 19 „...přechod na fenotyp viru HPAI je dosažen zavedením základních aminokyselinových zbytků...“ kde v originále článku se měl pojem „basic amino acids“ přeložit jako bazické aminokyseliny a ne základní). Množství a kvalita citovaných zdrojů v rámci literárního přehledu je na velmi dobré úrovni, neodpustím si však jednu připomínku – autorka na můj vkus používá relativně vysoké množství nepřímých citací v případech, kdy by bylo vhodnější uvést původní vědeckou publikaci (např. strana 8 – Marchi *et al.*, 2018 by mohlo být nahrazeno Mavale *et al.*, 2010 (CHIKV) či Leon *et al.*, 1987 (DENV)).

Cíle jsou jasně a přehledně formulovány do pěti bodů.

Kapitola Materiál a metody zahrnuje celkem 16 stran a přehledně popisuje jednotlivé experimentální metody. Kapitulu vhodně doplňují tabulky uvádějící podrobnější



informace o použitých primerech a sondách, složení reakcí a popis jejich časového profilu. Velice kladně hodnotím relativně široké spektrum metod, které bylo v práci tohoto zaměření použito. V rámci této kapitoly mám jen 3 menší připomínky:

- 1) v kapitole 3.1.2 nejsou uvedeny koncentrace jednotlivých antibiotik/antimykotik a zároveň postrádám citování původních vědeckých článků k původu linií BHK-21 a C6/36 (opět nepřímé citace)
- 2) v kapitole 3.2.1.1. postrádám několik důležitých informací (např. množství přidané virové suspenze, příprava buněčné suspenze a izolace RNA – viz bod Otázky)
- 3) v kapitole 3.2.2.6. není uvedena koncentrace carbenicilinu v agarových plátnách.

Kapitola Výsledků zahrnuje celkem 8 stran s 11 obrázky a 1 tabulkou. Z formální části se jí nedá téměř nic vytknout – kapitola je logicky uspořádána a dobře napsána, obrázky jsou v dostatečné kvalitě a přehledně popsány. Z experimentálního hlediska mám však několik připomínek:

- 1) Postrádám mapu vektoru pCR™4-TOPO
- 2) Nebyla provedena kontrola kvality izolované RNA z komářích vzorků
- 3) Autorka na straně 48 zmiňuje vztažení titru viru k množství RNA v kalibrační křivce; k tomuto procesu mám několik poznámek – viz část Otázky
- 4) vzhledem k povaze experimentu považuji za nedostatečné analyzovat přítomnost virové RNA v monoplíkátech (zejména u SINV, kde autorka analyzovala 27 vzorků)
- 5) dále považuji za relativně zásadní nedostatek přítomnost jakékoliv interní kontroly v rámci RT-qPCR analýz – viz část Otázky

Kapitola Diskuze zahrnuje 8 stránek, kde autorka analyzuje své výsledky ve vztahu k již publikovaným datům a zamýšlí se nad možnými příčinami negativních výsledků. Tuto kapitolu hodnotím velice kladně z hlediska formálního obsahu i práce s dostupnou literaturou a vlastní úvahou nad výsledky. Jen jedna malá technická připomínka – délka kapitoly je relativně dlouhá; její zkrácení by bylo možné vynecháním úvodních částí podkapitol 5.1. a 5.2., kde se autorka věnuje tématům, která jsou již uvedena v úvodním literárním přehledu, a z hlediska vlastní práce nemají přímou souvislost s dosaženými výsledky.

Otázky:

- 1) Jakým způsobem byla získána buněčná suspenze z BHK-21 a C6/36 buněk infikovaných SINV?
- 2) Jak si autorka vysvětluje přítomnost velikostně odlišných produktů RT-PCR na obrázku 20? Byla osekvenována i pozitivní kontrola?
- 3) Prosím o vysvětlení termínů „cytopatický efekt“ a „snížená vitalita“.
- 4) U obrázku 22 se mi jako velice zvláštní jeví separace velikostního standardu. Jedná se o ten samý standard, který byl použit u obrázku 20?
- 5) Proč je u obrázku č. 21 (plakové titrace) uveden pouze jeden časový interval (3 dpi), když buňky byly 2x pasážovány vždy po 3 dnech a časových intervalů je tedy více?
- 6) Proč nebyla provedena kontrola kvality RNA v rámci vzorků RNA z komárů? Jaký vliv mohla mít absence této kontroly na výsledky detekce?
- 7) Je možné vztahovat množství virové RNA v buněčné suspenzi k titru viru získaného pomocí plakové titrace?



8) Absence interní kontroly u RT-qPCR analýz může mít za následek falešně negativní výsledky. K čemu přesně interní PCR kontrola slouží a jaké interní PCR kontroly by mohla autorka ve své práci využít?

9) Na straně 58 ve druhém odstavci se autorka zmiňuje o druzích rRNA v rámci eukaryotické buňky. Je si jistá svým tvrzením, že existují pouze 28S, 18S a 5.8S rRNA?

10) Jaké druhy sekvencí byly identifikovány pomocí BLASTu v případě suspektních klonů SINV a IAV?

I přes výše uvedené připomínky je práce Terezy Liduchové na velice dobré úrovni; jedná se o zdařilou experimentální práci s komplexním a přehledným rozbořením problematiky výskytu vybraných virových zoonóz v Arktické oblasti. Autorka prokázala schopnost kriticky vyhodnocovat a diskutovat své výsledky v porovnání s již publikovanými daty. Z tohoto důvodu konstatuji, že předložená diplomová práce splňuje veškeré požadavky kladené Přírodovědeckou fakultou JU, a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 7.7. 2020

.....
RNDr. Martin Selinger, Ph.D.