



ZÁPIS O OBHAJOBĚ DIZERTAČNÍ PRÁCE DSP

Jméno studenta: Ing. Barbora FARKOVÁ
Narozen(a): 24. 1. 1989 v Českých Budějovicích
Studijní program: Biotechnologie
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Forma studia: Kombinovaná
Školící pracoviště: KZVE FZT JU v Č. Budějovicích

Datum a místo konání zkoušky: 15. 9. 2022, FZT JU

Zkušební termín č.: 1

Název dizertační práce:

Genotypizace vybraných kandidátních markerů rezistence proti lentivirovým infekcím malých přežvýkavců

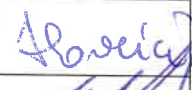
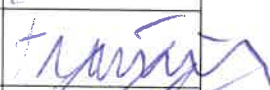
Výsledek obhajoby:

Prospěl(a)

Neprospěl(a)

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	doc. Dr. Ing. Zdeněk Havlíček; Mendelova univerzita v Brně, AF	
Členové:	doc. MVDr. Pavel Novák, CSc.; VÚŽV Praha (oponent)	
	doc. MVDr. Josef Illek, DrSc.; VFU Brno (oponent)	OMLUVEN
	prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.; Mendelova univerzita v Brně, AF (oponent)	
	prof. MVDr. Daniela Lukešová, CSc.; ČZU v Praze	ONLINE
	prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.; FZT JU v Č. Budějovicích	
	prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.; FZT JU v Č. Budějovicích	
	prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.; FZT JU v Č. Budějovicích	
	doc. Ing. Michael Rost, Ph.D.; FZT JU v Č. Budějovicích	OMLUVEN
Školitel:	prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.; FZT JU v Č. Budějovicích	



OBHAJOBA DIZERTAČNÍ PRÁCE DSP PROTOKOL O HLASOVÁNÍ

Jméno studenta: Ing. Barbora FARKOVÁ
Narozena: 24. 1. 1989 v Českých Budějovicích
Studijní program: Biotechnologie
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Forma studia: Kombinovaná

Výsledek hlasování:

Počet členů komise: 9
Počet platných hlasů: 7

Počet přítomných členů komise: 6 + 1 online
Kladných: 7
Záporných: 0

Počet neplatných hlasů: 0

Zkušební komise:

		Podpis:
Předseda:	doc. Dr. Ing. Zdeněk Havlíček.; Mendelova univerzita v Brně, AF	
Členové:	doc. MVDr. Pavel Novák, CSc.; VÚŽV Praha (oponent)	
	doc. MVDr. Josef Illek, DrSc.; VFU Brno (oponent)	
	prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.; Mendelova univerzita v Brně, AF (oponent)	
	prof. MVDr. Daniela Lukešová, CSc.; ČZU v Praze	ONLINE
	prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.; FZT JU v Č. Budějovicích	
	prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.; FZT JU v Č. Budějovicích	
	prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.; FZT JU v Č. Budějovicích	
	doc. Ing. Michael Rost, Ph.D.; FZT JU v Č. Budějovicích	



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Otázky oponentů k obhajobě disertační práce

**Genotypizace vybraných kandidátních markerů rezistence
proti lentivirovým infekcím malých přežvýkavců**

Autorka práce: Ing. Barbora Farková

Vedoucí práce: prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.

České Budějovice
2022

Otázky od doc. MVDr. Pavel Novák, CSc.

1. Které faktory mají vliv na šíření viru maedi visna (MVV) v chovech ovcí a viru artritidy a encefalitidy (CAEV) v chovech koz?

Pokud se nákaza v chovu vyskytne je prakticky nemožné zabránit jejímu šíření. Proto jako nejdůležitější se jeví prevence zanesení onemocnění do stáda. Největší riziko hrozí při nákupu nových jedinců a importu ze zahraničí.

Při zavlečení infekce do stáda, je třeba dodržovat zásady hygieny a zootechnická opatření a nakažené jedince ze stáda odstranit.

V nakažených stádech se proto podíl nakažených ovcí zvyšuje s jejich věkem. Pětileté a starší mohou být nakažené téměř všechny, dvouletých může být pozitivní třeba jen čtvrtina. Proto vhodným nástrojem je zvýšená brakace a vyřazování starších jedinců.

2. Která preventivní a profylaktická opatření mají podle názoru autorky zásadní význam při ozdravení stád malých přežvýkavců od lentivirových onemocnění?

Hlavní prevencí je zamezení zanesení viru do stáda. Pokud se v chovu vyskytne je prakticky nemožné zabránit jejímu šíření.

Zásadní prevencí je včasná diagnostika a nákup testovaných zvířat, po půlroce jedince otestovat znova. Dalším možným způsobem se jeví nákup jedinců s odolným genotypem.

Teoreticky možný je přenos kontaminovaným dojícím strojem, neuklizenými placentami či použitím nesterilních jehel či nástrojů k veterinárním úkonům. Tudíž je třeba dodržovat zásady hygieny a správné zootechnické praxe.

Maedi-visna je neléčitelná nemoc a zvířata, u kterých se objeví příznaky nemoci, jsou časem utracena nebo uhynou.

Ozdravení zamořeného stáda nemusí být jednoduché. Podíl pozitivních zvířat se dá snížit zvýšenou brakací a snížením počtu starších ovcí ve stádě. Testování každé tři až šest měsíců a vyřazení pozitivních ovcí a jejich potomstva vede časem k úspěchu. Odstavení jehňat hned po narození a jejich umělý odchov na mlezivu a mléku od zdravých bahnic také funguje, ale je organizačně náročné. Tato jehňata navíc stejně nesmí být ustájená v blízkosti mateřského zamořeného stáda.

Zvířata ze stád prostých nákazy se nesmí potkat či míchat se stády s neznámou nákazovou situací. Rizikem je i zapůjčování plemenných beranů.

3. Je možné, na základě výsledku plošného monitoringu zdravotního stavu odhadnout časovou dynamiku vývoje epizootologické situace v chovech ovcí a koz?

Časová dynamika je závislá na managementu stáda a vyřazování starších jedinců a brakaci ve stádě.

Existují hypotézy, že při objevení pozitivního jedince ve stádě se do 2 let nakazí 60 % stáda.

Otázky od doc. MVDr. Josef Illek, DrSc., Dipl. ECBHM

1. Práce je velmi rozsáhlá a převyšuje požadavky na doktorskou disertační práci. Je to kolektivní práce. Jaký podíl na práci má autorka disertace.

V rámci mé práce jsem se podílela na odběru vzorků ve 2 chovech a dále jsem dle výsledků sérologického vyšetření třídila, vybírala a identifikovala vzorky k vlastní genotypizaci. V rámci laboratorní práce jsem se podílela na návrhu primerů a dále jsem navrhovala a zkoušela teplotní profil v gradientové PCR pro jejich následné použití pro PCR analýzy. Zkoušela jsem i několik analýz na průkaz provirové DNA.

V rámci genotypizace jsem u většiny vzorků izolovala DNA pomocí metody chelex, kontrolovala čistotu izolátů a dále analyzovala metodou PCR, úspěšnost analýzy se prokazovala pomocí gelové elektroforézy. U všech úspěšně amplifikovaných vzorků jsem dále připravovala vzorky na jejich přečištění a přípravu na odeslání k sekvenační analýze, kterou prováděla komerční společnost. Pro všechny vzorky jsem zadávala objednávku pro analýzu, odesílala a následně zpracovávala výsledky sekvenování, zadávala do tabulek a souborů a následně vyhodnocovala.

2. Jaký je výskyt virové artritidy koz ve sledovaných chovech?

Z analýzy sérologického vyšetření vzorků odebraných v rámci projektu provedeného metodou ELISA, kde bylo odebráno celkem 609 vzorků krve u koz, bylo 84 zvířat pozitivních, 5 vzorků bylo suspektních a 520 negativních. Z těchto výsledků vychází prevalence onemocnění 13,79 %. Při rutinním testování v rámci Metodiky kontroly zdraví zvířat a nařízené vakcinace vydávané pro každý rok SVÚ vychází prevalence onemocnění nižší.

3. Jaké jsou zásady prevence lentivirových infekcí malých přežvýkavců?

Hlavní prevencí je zamezení zanesení viru do stáda. Pokud se v chovu vyskytne je prakticky nemožné zabránit jejímu šíření.

Zásadní prevencí je včasná diagnostika a nákup testovaných zvířat, po půlroce jedince otestovat znova. Dalším možným způsobem se jeví nákup jedinců s odolným genotypem. Teoreticky možný je přenos kontaminovaným dojícím strojem, neuklizenými placentami či použitím nesterilních jehel či nástrojů k veterinárním úkonům. Tudiž je třeba dodržovat zásady hygieny a správné zootechnické praxe.

Maedi-visna je neléčitelná nemoc a zvířata, u kterých se objeví příznaky nemoci, jsou časem utracena nebo uhynou.

Ozdravení zamořeného stáda nemusí být jednoduché. Podíl pozitivních zvířat se dá snížit zvýšenou brakací a snížením počtu starších ovcí ve stádě. Testování každé tři až šest měsíců a vyřazení pozitivních ovcí a jejich potomstva vede časem k úspěchu. Odstavení jehňat hned po narození a jejich umělý odchov na mlezivu a mléku od zdravých bahnic také funguje, ale je organizačně náročné. Tato jehňata navíc stejně nesmí být ustájená v blízkosti mateřského zamořeného stáda.

Zvířata ze stád prostých nákazy se nesmí potkat či míchat se stády s neznámou nákazovou situací. Rizikem je i zapůjčování plemenných beranů.

Otázky od prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

1. Uveďte, které části uvedené v disertaci a příložených publikací jste konkrétně prováděla v rámci této kolektivní práce.

V rámci mé práce jsem se podílela na odběru vzorků ve 2 chovech a dále jsem dle výsledků sérologického vyšetření třídila, vybírala a identifikovala vzorky k vlastní genotypizaci. V rámci laboratorní práce jsem se podílela na návrhu primerů a dále jsem navrhovala a zkoušela teplotní profil v gradientové PCR pro jejich následné použití pro PCR analýzy. Zkoušela jsem i několik analýz na průkaz provirové DNA.

V rámci genotypizace jsem u většiny vzorků izolovala DNA pomocí metody chelex, kontrolovala čistotu izolátů a dále analyzovala metodou PCR, úspěšnost analýzy se prokazovala pomocí gelové elektroforézy. U všech úspěšně amplifikovaných vzorků jsem dále připravovala vzorky na jejich přečištění a přípravu na odeslání k sekvenční analýze, kterou prováděla komerční společnost. Pro všechny vzorky jsem zadávala objednávku pro analýzu, odesílala a následně zpracovávala výsledky sekvenování, zadávala do tabulek a souborů a následně vyhodnocovala.

2. Genotypování TMEM154 pomocí sekvenace je dosti drahé. Neexistuje levnější metodika pro tento test, případně neplánujete její vývoj? Pokud ne, popište teoretický metodický přístup, který byste zvolila.

Sekvenování nám dávalo jasnou představu o sekvenci sledovaného úseku.

Veškeré metody, kde je zapotřebí návrh speciálních fluorescenčních metod, jsou celkem drahé a náročné na provedení. Sondy jsou specifické a mají krátkou expirační dobu.

Restrikční místo v tomto úseku není.

KASP – uvažovaná metoda, ale v rámci kalkulace nákladů využití real time vycházelo finančně srovnatelně (ekonomičtěji by vycházelo při rutinním analyzování velkého počtu vzorků).

Jako nadějně se jevílo použití metody HRM (High Resolution Melting), kde materiál použitý pro analýzu není tak přísně specifický a vyžaduje použití přístroje, který většina pracovišť vlastní. Je to celkem ekonomická metoda, která je náročnější na optimalizaci, ale po jejím úspěšném nastavení je relativně jednoduchá.

3. V části práce zaměřené na genotypování píšete především o genotypech, nenašel jsem základní populační charakteristiku, tzn. frekvenci alel. Zajímavé je ale to, že při srovnání se zahraničními výsledky se mluví o frekvenci alel. Vysvětlete. S tím souvisí třeba i možnost výpočtu Hardyho-Weinbergovy rovnováhy. Bylo toto provedeno?

Výpočet:

Absolutní frekvence fenotypů: $E35 = 104$ $E35K = 287$ $K35 = 254$

Absolutní frekvence genotypů: $EE = 104$ $EK = 287$ $KK = 254$

$N = 645$

Relativní frekvence

$e = EE/N = 104/645 = 0,16$

$ek = EK/N = 287/645 = 0,45$

$k = KK/N = 254/645 = 0,39$

Absolutní frekvence alel na základě absolutní frekvence genotypů

Alely E

$$P = 2E + EK = 2 \times 104 + 287 = 495$$

Alely K

$$Q = 2K + EK = 2 \times 254 + 287 = 795$$

$$P + Q = 2N \rightarrow 495 + 795 = 2 \times 645 \rightarrow 1290 = 1290$$

Relativní frekvence alel - je možné vypočítat 3 způsoby, z absolutní frekvence genotypů, z absolutní frekvence alel, relativní frekvence genotypů.

Alely E

$$p = (2EE + EK)/2N = P/2N = e + 1/2ek = (2 \times 104 + 287)/1290 = 495/1290 = 0,16 + 0,45/2$$

$$p = 0,384$$

Alely K

$$q = (2KK + EK)/2N = Q/2N = k + 1/2ek = (2 \times 254 + 287)/1290 = 795/1290 = 0,39 + 0,45/2$$

$$q = 0,616$$

HW rovnováha

$$EE + EK + KK = 1$$

Očekávaná relativní frekvence genotypů

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 =$$

$$0,147456 + 0,473088 + 0,379456 \quad \times N (645)$$

$$\text{Absolutní očekávaná frekvence (m)} \quad 95,10912 \quad 305,14176 \quad 244,74912$$

$$\text{Absolutní pozorované} \quad 104 \quad 287 \quad 254$$

$$\text{Rozdíly (d)} \quad 8,89088 \quad 18,14176 \quad 9,25088$$

$$(x)^2 = \sum d^2 / m$$

$$\chi^2 = 0,831 + 1,079 + 0,35 = 2,26$$

$$\text{Tabulkové hodnoty } \chi^2_{(2; 0,05)} = 5,99 \quad \chi^2_{(2; 0,01)} = 9,21$$

$$\text{Vyhodnocení: } 2,26 < 5,99 < 9,21$$

Vypočtená hodnota χ^2 je menší než tabulková, tzn. existuje shoda mezi skutečnou a očekávanou frekvencí, **populace je v genetické rovnováze.**

4. Velmi důležitým faktorem v boji proti infekcím je budování přirozené imunity zvířat, jste se v práci příliš nezabývala. Nicméně mohla byste vyjmenovat základní faktory, které ji ovlivňují a na které by měl být pro zajištění zdravého chovu brán zřetel?

Přirozená obranyschopnost organismu může být posílena dodáním vhodných mikro a makroprvků. Především dbát na přísun a vyváženost vitamínů skupiny C, B a E a dále pak ke správné činnosti imunitního systému přispívají především dostatečné hladiny selenu a zinku v krmné dávce.

Určitě je vhodné dbát na welfare a pohodu zvířat, vyvarovat se zbytečným přesunům a stresovým situacím. Zvířata udržovat v kondici a zajistit jim dostatečný životní prostor. Interferony a cytokiny, které jsou součástí přirozené imunity, nemají potřebné mechanismy pro boj s lentiviry malých přežvýkavců.

Zápis z průběhu obhajob doktorských disertačních prací – OR Zemědělské biotechnologie

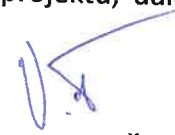
Ing. Barbora Farková

15.9.2022

Fakulta zemědělská a technologická Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích
pavilou M - místnost Vědecké rady FZT

- Zahájení provedl předseda komise – doc. Z. Havlíček (MENDELU Brno), představil komisi, oponenty a disertantku, její CV, publikační činnost a zapojení do řešení výzkumných projektů
- prof. Šoch přednesl doporučující stanovisko školitele
- B. Farková – ve své prezentaci představila problematiku disertační práce a prezentovala výsledky disertační práce
- Posudky oponentů:
 - 1. prof. Knoll
 - 2. doc. Novák
 - 3. doc. Illek (omluven, posudek představil předseda komise)
- Odpovědi na posudky oponentů:
 - disertantka zodpověděla otázky položené oponenty, zodpověděla i doplňující dotazy oponentů, vypracované odpovědi na otázky oponentů jsou přiloženy k materiálům z obhajoby
- Vědecká rozprava:
 - prof. Čítek – dotaz na vlastní podíl disertantky na projektu a prováděných analýzách
 - prof. Trávníček – dotaz se týkal výběru genu rezistence a další dotazy směřovaly k objasnění situace s lentivirovými infekcemi českých chovech
 - prof. Čítek – dotaz na gen rezistence, sílu rezistence a možnosti genomické selekce, resp. zda při jednostranné selekci na rezistenci nedochází k snížení genetické variability
 - prof. Kváč – dotaz na identifikaci kmenů virů a možnost zavlečení nových kmenů do našich chovů
 - prof. Knoll – dotaz na jasnou formulaci cílů práce
 - doc. Novák – vyzdvihl význam práce, dotaz na způsob získávání vzorků

disertantka zodpověděla všechny dotazy, členové komise i oponenti vyslovili souhlas s úrovní odpovědí
- doc. Havlíček – zhodnocení průběhu obhajoby, ocenil bohatou vědeckou rozpravu k disertaci i úroveň odpovědí a komise ocenila zapojení disertantky do řešení projektu, dále proběhlo hlasování a vyhlášení výsledků obhajoby


zapsal V. Čurn