



Oponentský posudek magisterské diplomové práce

Autorka: Bc. Jana Müllerová

Název: Detekce zoonotických virů v biologických vzorcích z Arktidy

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

Konzultant: RNDr. Jana Elsterová

Oponentský posudek vypracovala: Mgr. Jaroslava Lieskovská PhD., Přírodovědecká

fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Předložená diplomová práce se zabývá detekcí zoonotických virů v biologických vzorcích z Arktidy, konkrétně z Gronska a Svalbardu. Obsahově je členěná do tří částí dle jasně definovaných cílů, na detekci arbovirů, metaanalýzu viru ptačí chřipky z arktické oblasti a detekci protilátek proti viru ptačí chřipky v sérech racků tříprstých sesbíraných v oblasti Svalbardu. Práce svým zaměřením významně přispívá k rozšíření znalostí o výskytu virů v polárních oblastech, které jsou v dnešní době zvláště důležité i v souvislosti se změnou klimatu a rozvojem migrace. Navíc výsledky, které autorka získala, mohou sloužit ke srovnání s podobně zaměřenými studiemi v budoucnu.

Předložená práce má rozsah 81 stran a dle zvyklostí je členěná na literární úvod, cíle, práce, materiál a metody, výsledky, diskuzi, závěr a seznam literatury. Rozsah a vzájemný poměr jednotlivých částí je přiměřený a logická struktura práce vyhovující. V literární rešerši, v rozsahu 21 stran, nás autorka uvádí do studované problematiky. Nejprve popisuje zoonózy a možné způsoby přenosu zoonotických nákaz. Pak následuje část věnovaná popisu arbovirů, jejich klasifikaci a stručné charakteristice jednotlivých čeledí, které byly již v minulosti detekovány v některých polárních oblastech. V další části autorka popisuje virus ptačí chřipky, jeho kategorizaci, strukturní charakteristiku a důvody jeho variability. Následuje kapitola o výskytu a šíření tohoto viru v souvislosti s migrací ptactva. Zpracování této části práce je velice zdařilé, autorka opravdu zajímavou a čtivou formou uvádí relevantní informace vzhledem k její experimentální části. Práce je stylisticky na dobré úrovni, s akceptovatelným počtem překlepů.

Kapitola Materiál a metody je sepsána na 12 stranách, je přehledně členěná a doplněná několika tabulkami a obrázky. Objevuje se tady několik nepřesností, a i když se autorka odvolává na postupy v elektronických přílohách, chybí některé důležité informace např. o množství použitého materiálu v real-time RT-PCR (více v připomínkách).

Cíle jsou 3 a jsou výstižně formulovány.

Kapitola výsledků je logicky členěná dle daných cílů. Celkem je obsažena na 17 stranách a obsahuje 10 přehledných obrázků a 4 tabulky. Popisky k obrázkům jsou přehledné a dostatečně výstižné. Líbilo se mi zpracování výsledků metaanalýzy dle jednotlivých kategorií na základě PCR prevalence a seroprevalence.

Část diskuse je poměrně rozsáhlá. Autorka na 7 stranách diskutuje své výsledky, nabízí vysvětlení příčin negativního zachytu arbovirů v sledovaných oblastech. Rovněž výsledky metaanalýzy komentuje s navržením příčin pozorovaných změn.



Závěrečná část shrnuje získaná data a takto odpovídá na stanovené cíle. Kapitola citace obsahuje přes 140 zdrojů. Seznam literatury je psán jednotným stylem s drobnými chybami.

Připomínky a otázky:

- V kapitole Materiál a metody chybí několik základních informací. Není celkem jasné, jestli jste používala vždy RT-qPCR nebo qPCR. Předpokládám, že v případě určování detekčního limitu byla provedena qPCR. Dále chybí informace o použitém přístroji (cykléru) a o počtu cyklů. Tabulka 3 na str. 26 obsahuje nesprávně uvedené koncentrace primerů a dUTP. Kapitola 3.2.3 by měla být nazvána spíše „real-time RT-PCR“ a ne „Reverzní transkripce (RT-PCR)“.
- Proč se do RT-qPCR reakce přidává DNA templát (str. 26)? Proč se do RT-qPCR reakce přidává dUTP?
- V diskusi připouštíte, že snížená kvalita RNA může ovlivnit výsledky. Vysvětlujete, že absence ribozomální 28 S podjednotky na agarózovém gelu se dá u hmyzu očekávat. Myslíte si, že kvalita RNA z komárů byla tedy dostatečná? Jaké množství RNA jste běžně získala po izolaci z 10 komárů?
- Určovala jste detekční limit pro záchyt jednotlivých arbovirů pomocí ředící řady přečištěného DNA amplikonu získaného z pozitivních kontrol. Byla provedena PCR analýza z ředící řady a pak byly vzorky nanášeny na gel (uvedeno na str. 28), na str. 37 znovu postup popisujete no bez PCR analýzy. Uveďte na správnou míru. Jak koresponduje určený detekční limit s množstvím RNA ve Vašich vzorcích?
- Obrázek 20 není dostatečně srozumitelný. Prosím vysvětlíte.
- Vzhledem na dosud známe informace o výskytu flavivirů v arktické oblasti předpokládám, že jste ve Vašich vzorcích očekávala přítomnost Tuleňího viru. Práce, na kterou se odvoláváte při výběru primerů, se týkala TBE viru. Bylo nějakým způsobem ověřeno, jestli použité primery zachytí Tuleňí virus?
- Výsledky Vaší metaanalýzy ukázaly, že k infekcím s AIV dochází především na zimovištích nebo po dobu migrace. Mohla byste nám říct, kde jsou přibližně lokalizovány místa zimovišť ptáků zahrnutých do metaanalýzy?

Závěrem konstatuji, že předložená diplomová práce je na dobré úrovni, srozumitelně sepsaná, stylisticky bezchybná a experimentálně exaktně provedena. Autorka prokázala schopnost pracovat s literaturou, kriticky vyhodnocovat své výsledky a dávat je do souvislosti se známými fakty. Práce splňuje všechny předpoklady kladené na diplomovou práci na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity, a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 16. 5. 2018.

Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D.

.....
podpis



ÚSTAV BIOLOGIE OBRATLOVCŮ AVČR, v.v.i.

LABORATOŘ MEDICÍNSKÉ ZOOLOGIE

Klášteří 212, CZ-691 42 Valtice, Česká republika

Telefon: ++420-519352961 Fax: ++420-519352387 e-mail: rudolf@ivb.cz



Věc: Oponentský posudek magisterské diplomové práce uchazečky Bc. Jany Müllerové, posluchačky Katedry molekulární biologie a genetiky, Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Studentka Bc. Jana Müllerová předložila k posouzení diplomovou práci s názvem „**Detekce zoonotických virů v biologických vzorcích z Arktidy**“. Hlavním cílem diplomové práce bylo sledovat prevalenci zoonotických virů v oblasti Arktidy, dílčími cíly potom zjištění prevalence arbovirů přenášených komáry druhu *Aedes nigripes* z oblasti Grónska a Svalbardu, sérologické vyšetření racků tříprstých (*Rissa tridactyla*) na protilátky k viru ptačí chřipky (AIV) včetně zjištění H subtypu a metaanalýza dat o výskytu ptačí chřipky u migrujícího ptactva v polárních oblastech. Výzkum zoonotických virů je v době globalizace velmi aktuálním tématem, zejména z pohledu jejich možné introdukce do nových oblastí včetně Evropy. Většina prací se logicky zaměřuje na viry, které se endemicky vyskytují v oblastech tropů (např. nedávná emergence flaviviru Zika nebo koronaviru MERS), avšak oblasti severní bývají neprávem opomenuty, i když v důsledku globalizace včetně změn klimatických (nárůst teploty) či socio-ekonomických (migrace lidí a zvířat - jako potenciálních rezervoárů virů) může docházet k zavlečení nových agens i do odlehklých severních oblastí včetně Arktidy či Antarktidy. Navíc monitoring vektorů (především klíšťat a komárů) je klíčový z pohledu tzv. epidemiologické surveillance, která je cíleným nástrojem pro odhad rizik, která nákazy představují pro zdraví zvířat a lidí a také slouží pro nastavení nezbytných preventivních či kontrolních opatření. Vzhledem k tomu, že téma výskytu virů v polárních oblastech bylo v minulosti spíše opomíjené, každý pokus o získání relevantních dat může přinést překvapivý či dokonce průlomový výsledek. Nelze opomenout ani skutečnost, že sběr biologického materiálu v polárních oblastech je velmi náročný z logistického pohledu i při uchování vzorků pro další transport a následném zpracování v laboratoři na druhém konci světa. Tedy každý byť i zdánlivě 'negativní' výsledek je z tohoto pohledu velmi cenným střípkem k pochopení mozaiky složitých ekologických vztahů v polárních biotopech.

Hned na úvod si neodpustím spíše formální poznámku k názvu díla a celkové koncepci práce. Název práce působí líbivě, ale možná trochu klamně, neodráží totiž zcela vlastní náplň studie. Posluchačka se ve své práci zabývala arboviry a ptačí chřipkou, což je 'pouhá' (nikoliv nevýznamná) část patogenních agens vyskytujících se v polárních oblastech. Více zacílený název by práci slušel nepochybně více, i když tuším, že byl vybrán obecně z důvodu zahrnutí možné šíře výsledků z terénních sběrů a při zadání práce asi nebylo z počátku jasné, k jakým výsledkům se uchazečka v průběhu samotného řešení vlastně dostane - domněnka oponenta.

Diplomová práce má celkem 80 stran, je členěna do několika kapitol (Obecný úvod nebo-li vhléd do studované problematiky; Cíle práce; Materiál a metody; Výsledky; Diskuse; Závěr; Seznam zkratk, Citace, Přílohy). Seznam zkratk je dle oponenta nevhodně zařazen

až na konci práce. Přílohu práce tvoří Povolení na odchyt ptáků na Svalbardu a také vyšetření typizace chřipky SVS u sérologicky pozitivních racků tříprstých z kolonie Pyramiden.

Z formální pohledu je diplomová práce psána standardní formou, i když s relativně velkým počtem překlepů a používáním nevhodných formulací (např. přenos přes vektory, zoonózy přenášené kapénkami přes vzduch,...příkladem je virus ptačí chřipky, který se v historii několikrát opakoval,...živení se krví, přenášeny cestou přes horní cesty dýchací, k přenosu AIV může dojít přes stolici..., vzorky byly pomocí elektroforézy separaticky rozděleny,...).

K předkládané práci mám připomínky a dotazy, jejichž výčet předkládám.

Komentář k úvodu (literární rešerši):

Obecně lze konstatovat, že kvalita úvodu práce je rozdílná a liší se dle hlavních zkoumaných okruhů. Zatímco část věnovaná arbovirům je spíše povrchní a nesvědčí příliš o důkladné orientaci v dané problematice, část literární rešerše pokrývající ptačí chřipku je vcelku kvalitním podkladem pro další experimentální práci v Arktidě.

- str. 3 a 4 – kapitola o způsobu přenosu zoonóz je nesourodá, vybírá si jen některé druhy přenosu a ostatní opomíjí (např. přímým kontaktem apod.)
- kap. Arboviry – posluchačka si vybírá jen některé zástupce hematofágních členovců a ostatní opomíjí (např. flebotomy nebo pakomárce, tzv. tiplíky). **Pakomáři naopak arboviry nepřenášejí, protože nesají krev obratlovců!!!**
- není dostatečně reflektována úloha obratlovců (rezervoárů) v přenosu arbovirů
- v kapitolkách popisující nejvýznamnější komáři arboviry z různých virových čeledí není jmenována řada notoricky známých (např. Coltivirus koloradské klíšové horečky, alfaviry Onyong nyong, Chikungunya, Mayaro, Ross River, Barmah Forest, flaviviry dengue, Murray Valley či West Nile) i méně známých arbovirů (např. Nairovirus Soldado, Phlebovirus St Abb's Head, Orbivirus Cape Wrath, Bauline, Mykines, Tindholmur).
- kap. 1.2.2.. Vektoři ... formulace komáři *Aedes* nejsou nijak významně biotopově specifičtí není přesná stejně jako že nejsou hostitelsky zaměřeni. Jedná se převážně o mamalofilní druhy.
- kap. 1.2.2.3. nákaza larev komárů v kontaminované vodě je spíše přenosem raritním a v obecné části bych ho vůbec nezmiňoval (někdy se tento druh přenosu uvádí u tularemie viz. epidemie „water-borne“ tularémie ve Skandinávii)
- kap. 1.2.2.4. Mezihostitelský přenos – tato kapitola je napsána celkově velmi zmatečně a není patrné, zda jsou míněny arboviry či snad hlodavci jako vektoři-přenos močí a výkaly???
- kap. 1.2.3. Arboviry byly v polárních oblastech objeveny u mnoha druhů hostitelů...- avšak v kapitole nejsou jmenovány konkrétní druhy...
- v Tabulce 1 chybí řada důležitých informací o arbovirech přenášených komáři a klíšťaty (některá data o výskytu, hostitelích), i když je přehledně popsáno v řadě publikací/review např. Hubálek Z., Rudolf I. 2012. Tick-borne viruses in Europe. Parasitol. Res. 11: 9-36. nebo Hubálek Z., Halouzka J. 1996. Arthropod-borne viruses of vertebrates in Europe. Acta Sci. Nat. Brno. 30 (4-5): 1-95 a řada dalších.
- kap. 1.3. v úvodní větě chybí zmínka také o existenci chřipky typu D
- str. 16. chřipkové pandemie, které propukly u lidí, byly způsobeny různými subtypy AIV – nepřesná formulace

- první prokázaný lidský případ H5N1 v roce 1997 v Hong Kongu, nikoliv 1977 jak uvádí posluchačka
- chybí alespoň základní informace o dalších rizikových subtypech AIV pro člověka (H7N3, H7N7, H7N9, H9N2).
- str. 18 opět nevhodná formulace - ...antigenní zlom nastává často při mísení ptačího a lidského kmenu chřipky v praseti....

Komentář k metodické části:

- v metodice není uvedeno, kdo a podle jakého klíče prováděl determinaci komárů *Ae. nigripes* (až v diskusi...)
- není uvedeno, jakými typy pastí, v jakých časových intervalech či denním režimu byly dospělí komáři sbíráni a jak byly vzorkovány vodní plochy pro odběr larev a kukel
- Tissue Lyser pro homogenizaci vzorků pracuje na principu rychlého kmitání (vibrací, uváděno v Hz) železné kuličky, která drtí tkáň, ale posluchačka v práci uvádí otáčky? Proč?
- proč se sekvenovaly pozitivní vzorky (PCR kontroly), když šlo o sbírkové kmeny?
- proč nebyly vzorky stěrů z orofaryngu a kloaky vyšetřeny molekulárními metodami na daný subtyp viru nebo dále využity k izolačním pokusům?
- u obr. 9 a 10. chybí uvést autora snímků

Komentář k výsledkům:

Výsledková část přehledně shrnuje výsledky arbovirového vyšetření, vyšetření protilátek k AIV u racků tříprstých a zjištění H subtypu a podává ucelené informace o metaanalýze dat k výskytu protilátek a prevalenci AIV u migrujícího ptactva v Arktidě.

- str. 38 – jak si posluchačka vysvětluje bandy v jiné výšce než kontrola u *Phleboviru* v ředěních 10^0 a 10^{-1} a současně jak lze vysvětlit nízký detekční limit vzhledem k ostatním testovaným čeledím arbovirů?
- str. 43 může posluchačka naznačit, o jaké nespecifické směsi molekul šlo v případě sekvenace „potenciálních“ orbivirů (vzorky 14, 43 a 47)? v diskusi uvádí, že šlo o selhání PCR??? nebo amplifikace bez templátu???
- jaká byla skutečná role posluchačky u sběru dat pro metaanalýzu a jejím následném zpracování. Dle DP se na analýze podílela řada dalších kolegů. Z jakého počtu publikací se vycházelo při metaanalýze (u takovýchto studií to bývá zvykem uvádět).

Komentář k diskusi a závěru:

Diskuse i Závěr solidně komentují získané výsledky v porovnání s publikovanými daty a rozvíjí další možné směry výzkumu.

- v diskusi poprvé zmíněno, podle jakého klíče byli určeni komáři (patří do metodiky)
- v kapitole 5.1.2 mi chybí více rozvést roli klíšťat (především *Ixodes uriae*) v přenosu arbovirů v severních oblastech, významná role migrujícího ptactva, publikována řada studií viz úvod...

Obecné dotazy uchazeče:

1. Mohla by uchazečka blíže specifikovat pojmy jako vektor, hostitel či rezervoár v problematice arboviry přenášených nákaz?

2. Jaká jiná zoonotická agens (než v práci popisované arboviry a chřipka) se mohou vyskytovat v polárních oblastech včetně Arktidy či Antarktidy?

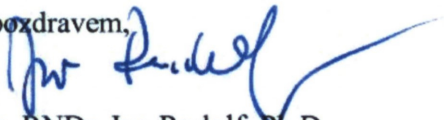
3. Jaký je osobní pohled uchazečky na velmi diskutovanou roli globálních klimatických změn v šíření vektorů nálezů právě s ohledem na introdukci virů do polárních oblastí?

Chtěl bych podotknout, že mé připomínky nesnižují poctivou práci odvedenou na DP a negativní výsledky vyšetření arbovirů nejsou jistě chybou uchazečky, ale jsou způsobeny řadou okolností, které přehledně komentovala v diskusi. Navíc část metaanalýzy o výskytu ptačí chřipky v polárních oblastech bude jistě kvalitním příspěvkem pro sestavení impaktované publikace.

Závěrem:

Předkládaná práce splňuje nároky kladené na diplomovou práci, a proto ji doporučuji k obhajobě.

S pozdravem,



doc. RNDr. Ivo Rudolf, Ph.D.

Ve Valticích dne 19.5. 2018 1