

OPONENTSKÝ POSUDEK

na disertační práci „Genotypizace vybraných kandidátních markerů rezistence proti lentivirovým infekcím malých přežvýkavců Lentiviry malých přežvýkavců.

Autorka disertační práce: Ing. Barbora Farková

Školitel: prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.

Oponent: Doc. MVDr. Josef Illek, DrSc. Dipl. ECBHM.

Disertační práce řeší aktuální téma zaměřené na problematiku lentivirových infekcí malých přežvýkavců, konkrétně na genotypizaci vybraných kandidátních markerů rezistence. Je sepsána v rozsahu 150 stran a je požadovaným způsobem členěna. Význam práce spočívá v nezbytnosti udržení dobrého zdravotního stavu v chovech ovcí a koz. Zvyšující se zájem o chov ovcí s cílem produkce jehněčího masa a rostoucí zájem o rozvoj chovu koz s cíle produkce mléka a jeho zpracování na mléčné výrobky, o který je značný zájem vyžaduje, aby zdravotní situace byla na dobré úrovni a chovy byly prosté lentivirových infekcí. Předložená disertační práce směřuje k těmto cílům..

Autorka disertace na základě studia vědeckých prací významných autorů zpracovala fundovaný přehled literatury týkající problematiky lentivirů. Zabývá se klasifikací, strukturou a životním cyklem lentivirů, popisuje genomickou strukturu SRLV a charakterizuje přenos infekce. Stručně se vyjadřuje k problematice infekcí lentiviry u lidí. (HIV). Podrobněji se zabývá problematikou lentivirových infekcí u hospodářských zvířat a to problematikou výskytu onemocnění medi-visna u ovcí, problematikou artritidy a encefalitidy koz, infekční anemií koní a virem imunodeficiency skotu. Značnou pozornost věnuje i genové rezistenci.

Zpracování literárního přehledu je velmi kvalitní Vychází ze studia vědeckých prací významných světových a domácích autorů.

Téma práce je aktuální a bylo reakcí na požadavek chovatelů malých přežvýkavců řešit problematiku lentivirových infekcí. Z uvedeného důvodu byl řešen výzkumný projekt, jehož výsledkem jsou 2 disertační práce, **ověřená technologie** „Systém prevence a profylaxe lentivirových infekcí malých přežvýkavců!“, **certifikovaná metodika** „Metodika odběru a zpracování vzorků, serologického a molekulárního stanovení lentivirivého onemocnění ovcí a koz“, vědecká publikace v časopise s IF a několik odborných publikací.

Disertační práci tvoří soubor publikovaných prací. 1. Vědecká publikace s IF zveřejněná v Acta Veterinaria Brno 2018, 2 odborné publikace zveřejněné v časopise Veterinářství (2018, 2019), certifikovaná metodika a ověřená technologie.

Cíle práce a metodiky jsou uvedeny v jednotlivých publikacích, rovněž tak i **výsledky**, jejich hodnocení a **diskuse**. Ing. Barbora Farková je členem autorských kolektivů publikovaných prací. Vědecké i odborné práce prošly náročným oponentním řízením a proto k nim nemám připomínky.

Za pozitivní a velmi přínosné považuji zpracování certifikované metodiky „Metodika genotypizace ovcí a koz- detekce markerů geneticky podmíněné rezistence k SRLV. Metodika představuje soubor optimalizovaných návodů molekulární analýzy využitelných v diagnostice a je uplatněna prostřednictvím Svazu chovatelů ovcí a koz (SCHOK).

Další významnou publikací je ověřená technologie „Systém prevence a profylaxe lentivirových infekcí malých přežvýkavců“. Ověřená technologie obsahuje metodiku odběru vzorků krve, jejich uchování a zpracování, metody serologického vyšetření, postupy pro molekulární detekci virové NK, metodu izolace DNA ovcí a koz. V práci jsou uvedena doporučení pro chovatele s cílem omezit rozšiřování onemocnění maedi-visna ovcí a virové artritidy a encefalitidy koz v chovech. Uvedené publikace odpovídají požadavkům kladeným na způsob zveřejňování vědeckých a odborných poznatků. V jednotlivých publikacích jsou uvedeny výsledky sledování, které jsou v diskusi konfrontovány s jinými autory. Závěry jsou stručné a shrnují dosažené výsledky. Seznam použité literatury je součástí každé publikace a je i uveden na konci disertace.

Závěr práce je logickým shrnutím získaných výsledků. V rámci sledování bylo vyšetřeno 2801 vzorků krve ovcí a 609 vzorků krve koz z 21 stád. Serologická prevalence MVV u ovcí činila 17,71% a prevalence CAEV u koz činila 13,79%. Genetická analýza polymorfismu v kandidátním genu TMEM 194 potvrdila u ovcí výskyt všech 3 genotypů, u koz pouze jeden (E35)

Na základě získaných výsledků bylo navrženo doporučení pro další výzkum a optimalizaci laboratorních diagnostických metod a doporučení zásad prevence uvedených onemocnění malých přežvýkavců pro chovatele.

K práci nemám negativní připomínky, ale považuji za vhodné, aby se autorka vyjádřila k následujícím otázkám.

- 1) Práce je velmi rozsáhlá a převyšuje požadavky na doktorskou disertační práci. Je to kolektivní práce. Jaký podíl na práci má autorka disertace.
- 2) Jaký je výskyt virové artritidy koz ve sledovaných chovech?
- 3) Jaké jsou zásady prevence lentivirových infekcí malých přežvýkavců?

Závěr.

Disertační práci „Genotypizace vybraných kandidátních markerů rezistence proti lentivirovým infekcím malých přežvýkavců“ kterou zpracovala a předkládá k obhajobě ing. Barbora Farková hodnotím velmi kladně.

Autorka prokázala výborné teoretické i praktické znalosti, dobrou orientaci ve vědecké a odborné literatuře a schopnost samostatné vědecké práce.

Disertační práce má vysokou odbornou úroveň, rozšiřuje vědecké poznání oboru a přináší nové poznatky v oblasti infekčních onemocnění malých přežvýkavců. Práce má značný význam pro vědní obor i pro chovatelskou praxi. Disertační práci doporučuji přijat k obhajobě a po úspěšném řízení doporučuji, aby ing. Barboře Farkové byl udělen akademický titul „PhD“.

Brno 30.8. 2022


Doc. MVDr. Josef Illek, DrSc., Dipl.ECBHM
FVL VFU Brno

Věc: Oponentský posudek na disertační práci

Oponent: Doc. MVDr. Pavel Novák, CSc.
Lažánky 19
664 71 Veverská Bitýška

Název disertační práce: „Genotypizace vybraných kandidátních markerů rezistence proti lentivirovým infekcím malých přežvýkavců“

Autor: Ing. Barbora Farková
Školitel: prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
Školící pracoviště: Zemědělská a technologická fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Na základě Vaší žádosti ze dne 15.8.2022 o vypracování oponentského posudku na doktorskou disertační práci předloženou Ing. Barborou Farkovou zpracovanou v rámci doktorského studijního programu na Katedře genetiky a biotechnologií Zemědělské a technologické fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích zaujímám k výše uvedené práci následující stanoviska.

Předložená doktorská disertační práce má rozsah 162 stran. Disertační práce je členěna do jednotlivých kapitol: skládá z 1 strany s anglickým a 1 strany s českým souhrnem, 1 strany obsahu, 2 stran úvodu, 33 stran literární rešerše, 5 stran komentáře k publikovaným výsledkům, 101 stran kopií publikovaných prací, 2 stran závěru, 10 stran přehledu použité literatury, 1 strany se seznamem obrázků a 1 strany přílohy s přehledem proteinů viru HIV-1 a jejich funkce.

Přehled použité literatury zahrnuje celkem 108 literárních pramenů, z toho je téměř 89 % prací od zahraničních autorů.

1. Aktuálnost zvoleného tématu

Téma disertační práce – „Genotypizace vybraných kandidátních markerů rezistence proti lentivirovým infekcím malých přežvýkavců“ – je aktuální mimo jiné proto, že lentivirová onemocnění malých přežvýkavců jsou v současnosti zahrnuta do Metodiky kontroly zdraví zvířat a nařízených vakcinací pro chovy zařazené v kontrole užitkovosti. Kontrolní programy jsou založeny na sérologickém screeningu s následným vyřazením sérologicky pozitivních zvířat z chovu.

Literární přehled autorka rozdělila do čtyř hlavních částí. V první části této kapitoly popisuje lentiviry z ohledem na jejich klasifikaci, životní cyklus, strukturu, generační přenos a schopnost infekce. Ve druhé části této kapitoly věnuje pozornost HIV, tj. infekci, kterou lentiviry vyvolávají v humánní populaci. Za zásadní, s ohledem na obsahovou náplň vlastní práce, považuji zařazení kapitoly souhrnně pojednávající infekci hospodářských zvířat způsobených lentiviry, a to maedi-visna ovcí, viru artritidy a encefalitidy koz, infekční anémie koní a viru imunodeficiency skotu. Tato část doktorské disertační práce vyúsťuje do otázek genové rezistence vůči viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) a lentivirům malých přežvýkavců (SRLV). Rozsah zpracované literární rešerše svědčí o úrovni znalostí a orientaci autorky v dané problematice, což vytváří solidní základ pro vlastní řešení doktorské disertační práce.

2. Splnění vytyčeného cíle

Cílem této doktorské disertační práce byl screening výskytu lentivirových infekcí u malých přežvýkavců v České republice a genotypizace vybraného kandidátního markeru včetně nalezení genotypu souvisejícího s možností genové rezistence.

Předložené výsledky obsáhly vytyčený cíl.

3. Materiál a metody zpracování

Doktorská disertační práci Ing. Barbory Farkové je zpracována ve formě komentovaného souboru tří publikací ve vědeckých a odborných recenzovaných periodických, dvou certifikovaných metodik a jedné ověřené technologie, které vznikly v rámci řešení projektu NAZV QJ 1610096 „Program zdravotní kontroly lentivirových infekcí malých přežvýkavců s využitím nových metod časné laboratorní diagnostiky a markerů geneticky podmíněné rezistence k infekci jako selekčního kritéria“:

Barták, P., Šimek, B., Václavek, P., Čurn, V., Plodková, H., Tonka, T., Farková, B., Vernerová, K., & Vejčík, A. (2018). Genetic characterisation of small ruminant lentiviruses in sheep and goats from the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno*, 87(1), 19–26.

Tonka T., Čurn V., Šoch M., Vejčík A., Vernerová K., Farková B., Štoidl P., Barták P., Šimek B., Václavek P., & Plodková, H. (2019). Srovnání incidence lentivirových infekcí u ovcí a koz s rozdílným genotypem genu transmembránového proteinu TMEM154. *Veterinářství*, 69(5):377-380.

Stehlíková D., Vernerová K., Čurn V., Tonka T., Farková B., Vejčík A., Barták P., & Václavek, P. (2018). Využití metody LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) pro molekulární diagnostiku lentivirů malých přežvýkavců. *Veterinářství*, 68(5), 340-345.

Metodika genotypizace ovcí a koz – detekce markerů geneticky podmíněné rezistence k SRLV (certifikovaná metodika).

Metodika odběru a zpracování vzorků, serologického a molekulárního stanovení lentivirového onemocnění ovcí a koz (certifikovaná metodika).

Systém prevence a profylaxe lentivirových infekcí malých přežvýkavců (ověřená technologie).

4. Výsledky disertační práce a jejich diskuze

Výsledky doktorské disertační práce jsou prezentovány ve formě komentáře k výše uvedeným publikacím.

Při porovnání výsledků práce s vytyčenými reálnými cíli mohu konstatovat, že se doktorandce podařilo vytyčené cíle naplnit.

Komentář k publikacím poskytuje ucelený obraz o výsledcích dosažených v rámci zpracování doktorské disertační práce a jejich srovnání s výsledky, dosaženými na jiných pracovištích.

V průběhu zpracování doktorské disertační práce bylo zpracováno 2 801 vzorků krve ovcí a 609 vzorků krve koz odebraných u chovatelů v rámci celé České republiky. Poté byla u stád, kde byl zachycen výskyt sérologicky pozitivních zvířat, provedena genotypizace a amplifikace zkoumané sekvenční DNA pomocí PCR (Polymerase chain reaction) analýzy. Při správné amplifikaci daného úseku následovala sekvenční analýza.

Molekulární analýzou polymorfismu v kandidátním genu TMEM154 byl prokázán výskyt tří genotypů SRLV. Z toho u ovcí se podařilo identifikovat všechny tři genotypy genu TMEM154. Výskyt sérologicky pozitivních byl statisticky významně vyšší u zvířat

s rizikovým genotypem. Z důvodu možné mutace viru a vzniku nového subtypu genotypu A je pravděpodobnost větší adaptace viru pro napadení a infekci jedinců s více rezistentním genotypem.

U koz byl prokázán pouze jeden genotyp, takže zde s největší pravděpodobností nelze najít marker související s rezistencí proti SRLV infekcím.

Vazba na příslušný genotyp potvrzující vyšší rezistenci nebo náchylnost k onemocnění nebyla prokázána s očekávanou přesností; pravděpodobně z důvodu dalších mutací viru a překonání dříve publikované vazby genotypu K35 s rezistencí k SRLV. Nicméně v této skupině genotypů se genotyp K35 jeví jako potenciální marker, jelikož v analyzované skupině se projevuje trend vyšší odolnosti proti onemocněním způsobeným SRLV u jedinců s tímto polymorfismem.

Prezentované výsledky potvrzují u sérologicky pozitivních zvířat větší výskyt rizikových genotypů E35 a E35K. Naopak genotyp K35, který by podle dřívějších výzkumů měl souviset s odolností, se u sérologicky pozitivních zvířat vyskytoval nejméně. Ovšem jeho větší podíl u pozitivních zvířat ukazuje na možnou mutaci viru a adaptaci na napadení zvířat s genotypem, který byl považován za rezistentní.

V České republice byl dosud zachycen výskyt 2 z 5 možných genotypů SRLV (genotyp A a B) a distribuce různých subtypů u ovcí a koz. Největší rozdíly vykazovaly sekvence u genotypu A, kde jedna skupina izolátů vykazovala možnost zařazení do zcela nového subtypu.

5. Přínos práce společenské praxi a pro další rozvoj vědy

Celkově výsledky dosažené v rámci zpracování doktorské disertační práce Ing. Barbory Farkové prokázaly reálné možnosti včasné diagnostiky viru maedi visna (MVV) v chovech ovcí a viru artritidy a encefalitidy (CAEV) v chovech koz.

Aspirantka prokázala způsobilost pro systematickou vědeckou práci. Předkládaná doktorská disertační práce je výsledkem systematické teoretické přípravy aspirantky, která vyústila ve formulaci reálných cílů práce a publikace dosažených výsledků ve vědeckých a odborných recenzovaných periodících, zpracování dvou certifikovaných metodikách a jedné ověřené technologii, které jsou součástí této doktorské disertační práce.

Významným v předkládané práci se jeví především:

- systematické zpracování literárního přehledu jako solidního základu pro vlastní práci;
- genotypizace vybraného markeru souvisejícího s možností genové rezistence;
- možnost přímého využití dosažených výsledků v chovech ovcí a koz.

Z formálního hlediska doktorská disertační práce Ing Farkové umožňuje přehlednou orientaci, vyznačuje se účelným využitím moderních technických, dokumentačních i výrazových prostředků.

K práci nemám zásadních připomínek. Při jejím studiu vyvstává ještě několik otázek:

1. Které faktory mají vliv na šíření viru maedi visna (MVV) v chovech ovcí a viru artritidy a encefalitidy (CAEV) v chovech koz?
2. Která preventivní a profylaktická opatření mají podle názoru autorky zásadní význam při ozdravení stád malých přežvýkavců od lentivirových onemocnění?
3. Je možné, na základě výsledku plošného monitoringu zdravotního stavu odhadnout časovou dynamiku vývoje epizootologické situace v chovech ovcí a koz?

6. Závěr

Po prostudování a zhodnocení doktorské disertační práce mohu konstatovat, že se autorce podařilo dosáhnout vytyčeného cíle.

V souladu s platnými předpisy pro studium v doktorských studijních programech Zemědělské a technologické fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích **doporučuji** doktorskou disertační práci „Genotypizace vybraných kandidátních markerů rezistence proti lentivirovým infekcím malých přežvýkavců“ autorky Ing. Barbory Farkové k obhajobě, a po jejím úspěšném průběhu **doporučuji** udělit Ing. Barbořey Farkové akademický titul

„Philosophiae doktor“, (ve zkratce Ph.D., uváděné za jménem).

Doc.MVDr. Pavel Novák, CSc.
Výzkumný ústav živočišné výroby v.v.i.
Praha Uhřetěves

V Lažánkách dne 7.9.2022

Oponentský posudek na disertační práci
„Genotypizace vybraných kandidátních markerů rezistence proti lentivirovým
infekcím malých přežvýkavců“

Doktorand: Ing. Barbora Farková

Školitel: prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.

Školící pracoviště: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta zemědělská a technologická

Disertační práce Ing. Barbory Farkové se věnuje studiu výskytu lentivirových infekcí u malých přežvýkavců, jmenovitě u ovcí a koz, a dále pak detekci genotypu genu *TMEM154* souvisejícího s potenciální rezistencí u těchto druhů.

Z hlediska zhodnocení tématu ho považuji za vysoce aktuální, protože choroby nejen dědičné, ale i infekční jsou významným problémem snižujícím efektivitu chovu zvířat a výzkumy v této oblasti jsou žádoucí a smysluplné. Nutno však uvést, že tato problematika také patří k nejnáročnějším vzhledem k polygennímu charakteru vnímavosti na infekce.

Vlastní disertační práce má formu komentovaného přehledu publikovaných prací. Přehled literatury čítá 42 stran a věnuje se charakterizaci lentivirů z hlediska jejich klasifikace a struktury a dále pak obsahuje přehled infekcí u člověka a dále u zvířat. Zde za nejvhodnější nepovažuji zařazení subkapitoly „Uplatnění lentivirů v rámci léčby onemocnění“ do kapitoly Infekce lidí způsobovaná lentiviry, resp. kapitola mohla být nazvána lépe, obecněji. Poslední kapitola literárního přehledu se zabývá geny asociovanými se zvýšenou rezistencí k lentivirovým infekcím, a to především haplotypu uvnitř genu *TMEM154*.

Kapitola 5 je komentářem k publikovaným pracím. Ten obsahuje objasnění významu práce, dále metodický přehled, jak bylo v rámci experimentů a řešení projektu postupováno. Následuje popis a shrnutí získaných výsledků. Text je stručný, ale srozumitelný. Následuje část věnovaná diskuzi. Zde autorka uvádí, že zvířata genotypu E35K vykazují trend vyšší odolnosti k onemocnění. Vzhledem k závažnosti této části práce bych očekával uvedení tabulky, která by dané zjištění dokumentovala, včetně počtu analyzovaných zvířat pro dané skupiny (genotypy) a také uvedení statisticky relevantních dat, i když údaje jsou publikovány. Za další nedostatek považuji to, že u uvedených informací chybí odkazy na (svou) konkrétní publikaci, kde je problematika rozvedena, což mohlo být realizováno i zjednodušeně pomocí číselných odkazů.

Neznamená to, že jsem údaje nebyl schopen dohledat, ale autor vědeckého díla by měl vždy dbát na snadnou srozumitelnost a ověřitelnost svých závěrů.

Kapitola 6 je tvořena souborem vlastních publikovaných prací. Ten se skládá z jedné práce publikované ve vědeckém časopise s IF Acta Veterinaria Brno jako spoluautor, ze dvou prací publikovaných v časopise Veterinářství taktéž jako spoluautor a dvou certifikovaných metodik a jedné ověřené technologie.

Vzhledem k tomu, že se jedná o kolektivní práci, autorka měla v disertaci uvést, které části kolektivního díla konkrétně zpracovala. Tato informace je dnes již často vyžadována i v publikacích u renomovaných vědeckých časopisů.

V rámci vyhodnocení výsledku genotypování mi chybí údaj o frekvenci alel ve zkoumaném souboru, přičemž při srovnání se zahraničními populacemi ovcí (mimořádně velmi stručném) se srovnávají alely.

Závěr na dvou stranách shrnuje získané výsledky. Práce je zakončena doporučením pro boj s lentivirovými infekcemi (nejen) malých přežvýkavců, a to využití kombinace diagnostiky onemocnění pomocí sérologických a molekulárně-genetických metod, s čímž nelze než souhlasit.

K práci mám několik dotazů a připomínek:

- 1) Uveďte, které části uvedené v disertaci a přiložených publikací jste konkrétně prováděla v rámci této kolektivní práce.
- 2) Genotypování *TMEM154* pomocí sekvenace je dosti drahé. Neexistuje levnější metodika pro tento test, případně neplánujete její vývoj? Pokud ne, popište teoreticky metodický přístup, který byste zvolila.
- 3) V části práce zaměřené na genotypování píšete především o genotypu, nenašel jsem základní populační charakteristiku, tzn. frekvenci alel. Zajímavé je ale to, že při srovnání se zahraničními výsledky se mluví o frekvenci alel. Vysvětlíte. S tím souvisí třeba i možnost výpočtu Hardyho–Weinbergovy rovnováhy. Bylo toto provedeno?
- 4) Velmi důležitým faktorem v boji proti infekcím je budování přirozené imunity zvířat, tímto 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?

Závěr:

Autorka zpracovala velmi aktuální téma, prokázala potřebné teoretické znalosti, dále i praktické zvládnutí laboratorních metod a schopnosti vyhodnocení výsledků. Výsledky přiměřeně publikovala, i když dle mého názoru téma skýtalo větší možnosti publikování. S ohledem na aplikovaný charakter její práce je významné vyhotovení dvou certifikovaných metodik.

Studentka prokázala potřebné tvůrčí schopnosti pro získání titulu Ph.D. a splňuje základní kritéria vyžadovaná na disertační práci ve studijním programu Biotechnologie oboru Zemědělské biotechnologie. Proto doporučuji předloženou práci k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení udělení akademického titulu „doktor“.

V Brně, 7. 9. 2022



prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.
Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat
Agronomická fakulta
Mendelova univerzita v Brně
Zemědělská 1
613 00 Brno