



Oponentský posudek na diplomovou práci: Detekce a charakterizace kmenů viru Usutu (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) v populacích kosa černého (*Turdus merula*)

Autor: Tomáš Kašpar

Vedoucí práce: Mgr. Václav Hönig, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Martin Palus, Ph.D.

Oponent: Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D.

Předložená práce se zabývala detekcí a charakterizací kmenů viru Usutu v populacích kosa černého na území České republiky. V posledních letech byl zaznamenán zvýšený výskyt úmrtí tohoto pěvce a vzhledem k podobné situaci v okolních zemích je zjištění, zda úmrtí může souviset s flavivirovou infekcí, konkrétně s infekcí virem Usutu důležité. Předložená práce dokumentuje několik případů, ve kterých může být úhyn kosa černého asociován s infekcí virem Usutu. Na základě získané nukleotidové sekvence z genomické virové RNA byla provedena fylogenetická analýza, která poukázala na genetickou variabilitu, distribuci a rozšíření kmenů viru Usutu přítomných v Čechách. Dosažené výsledky tvoří významnou část publikace s názvem: Multiple lineages of Usutu Virus in blackbirds and mosquitoes in the Czech Republic, která vyšla v minulém roce (2019) v časopise *Microorganisms*.

Diplomová práce je členěná dle obvyklých zvyklostí. Literární úvod čítá 11 stran a představuje obecné charakteristiky flavivirů, včetně popisu morfologie, replikační strategie či klasifikace. O rozsahu hostitelů a vektorů viru Usutu, tkáňovém tropismu, či geografickém rozšíření pojednává další kapitola. Přehled je dostačující, čtivý, bez formálních či významných faktických chyb. Popis replikační strategie viru by bylo vhodné doplnit obrázkem. Na straně 10, kde je výčet funkcí virových nestrukturních proteinů, není uvedena správná citace.

Cíle práce jsou 4 a jsou jasně formulovány.

Následuje kapitola Materiál a metody obsažená na 9 stranách. Popis analyzovaných vzorků a jednotlivé metody použité při práci jsou detailně popsány. Více méně umožňují zopakování popsanych analýz. K této části mám dvě malé připomínky:

1. chybí vzorec, podle kterého je počítán titr viru při plakové titraci;
2. je zvykem psát typ a výrobce použitých přístrojů, tato informace chybí u fluorescenčního mikroskopu, který byl použit na vizualizaci viru.

Výsledky jsou prezentovány na 13 stranách a doplněné celkem 3 tabulkami a 8 obrázky. Tyto jsou jasně popsány a samo-vysvětlující. Pozitivně hodnotím např. použití různobarevného rozlišení jednotlivých linií viru Usutu při fylogenetické analýze, čímž se zvyšuje přehlednost získaných výsledků. V obrázcích 8 a 9, kde je graficky znázorněno

množství stanoveného viru po infekci buněčné linie PS a C6/36 z 9 izolátů, chybí standardní odchylky a není uvedeno, jestli byl experiment zopakován. Měla by být rovněž doplněna informace, o jakou virovou linii se v testovaných vzorcích jedná, čísla izolátu by se měla přiřadit k označení použitému ve fylogenetické analýze.

Diskuse je velmi dobře napsaná. Přítomnost detekovaných virových linií na území Česka je rozebírána v kontextu geografie okolních států a možného přenosu viru do Česka ze sousedních endemických oblastí. Zjištění o genomické variabilitě nalezených izolátů jsou diskutována s jinými podobně zaměřenými pracemi a srovnávána se zahraniční literaturou. Oceňuji, že závěrem této kapitoly autor předkládá návrhy dalších experimentů, čím nastiňuje směřování budoucího výzkumu.

Závěr rekapitulující dosažené výsledky tvoří poslední stranu před seznamem literatury čítajícím pozoruhodných 104 citací.

Přílohou diplomové práce je již zmíněná publikace, ve které je diplomant 3. autorem.

Chybí seznam zkratk.

Otázky:

1. Na straně 10 uvádíte enzymatické aktivity a některé regulační aktivity NS proteinů (bez citace). Uvedte, které flavivirové NS proteiny interferují jakýmkoliv způsobem s interferonem.
2. Jakým způsobem jste rozlišovali negativní vzorky (na virovou genomickou RNA) od vzorků s degradovanou RNA?
3. V diskusi zmiňujete, že ve vašich třech nalezených sekvencích byly detekovány dvě substituce (v proteinu E a v NS5), které jsou na základě jiných studií asociované se změnou tropizmu a zvýšenou neuroinvazivitou v lidském těle. Znamená to, že virus Usutu může potenciálně představovat vážné riziko pro člověka? Jak reálné je dle Vašeho názoru toto riziko s ohledem na přirozené hostitele a vektory viru Usutu?
4. Uvedte příklad dalších nukleotidových substitucí nebo oblastí flavivirového genomu determinujících jejich virulentnost.
5. Do jaké míry jste se podílel na psaní článku?

Na závěr konstatuji, že předložená práce je ucelená, obsahově a formálně na vysoké úrovni a ve všech směrech splňuje požadavky kladené na diplomovou práci na Přírodovědecké fakultě Jihočeské university. Diplomovou práci doporučuji k obhajobě a navrhuji známku 1.

V Českých Budějovicích dne 15. 1. 2020

Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D.

