



Oponentský posudek magisterské diplomové práce Markéty Rehbergerové:

Vývoj Toscana viru ve flebotomech

Magisterská diplomová práce Bc. Markéty Rehbergerové, se zabývá ověřením kompetence k přenosu fleboviru Toscana u několika druhů flebotomů coby potenciálních alternativních vektorů. Zvolené téma je zajímavé jak po stránce základního výzkumu, tak prakticky, z hlediska odhadu rizika infekce pro lidské populace v oblastech výskytu prokázaných a alternativních vektorů.

Práce je napsána pečlivě, čtivě, a pokud mohu soudit, tak pěknou, srozumitelnou angličtinou. Ani po formální a obsahové stránce není práci prakticky co vytknout. Po experimentální stránce zahrnuje celou řadu poměrně komplikovaných experimentů s živými flebotomy, úctyhodné množství vzorků a několik různých metod pro jejich zpracování a analýzu.

V krátkém úvodu autorka vysvětluje z jakých indicií vychází hypotéza, že se kromě druhů flebotomů v současnosti považovaných za kompetentní k přenosu virus Toscana (TOSV) na cirkulaci viru podílejí i jiné druhy, jejichž kompetenci se rozhodla testovat. Následuje definice cílů práce a literární rešerše. Ta postihuje všechny hlavní aspekty řešené problematiky (obsáhlá kapitola je věnována fyzickým bariérám infekce, diseminaci arbovirů ve vektorech a jejich přenosu, dále je uveden přehled flebotomy přenášených patogenů se zaměřením na viry a zejména pak fleboviry, až po detailní informace přímo k TOSV). V případech, kdy je málo dostupných informací přímo k flebotomům, si autorka zručně vypomáhá paralelami z více studovaných interakcí komárů s jimi přenášenými viry. Jedinou drobnou připomínku bych měl ke struktuře. Kapitulu o fyzických bariérách bych zařadil až za obecné kapitoly týkající se flebotomů a flebovirů. V aktuální struktuře se například čtenář až zpětně dozvídá, že fleboviry mají 2 nestrukturní proteiny, o jejichž potenciální funkci v infekci vektora se ale poměrně rozsáhle mluví v kapitole předchozí.

Metodická část je taktéž zpracována srozumitelně a se smyslem pro důležité detaily. Složitější experimenty jsou shrnuty formou přehledných schémat. Experimenty byly provedeny v potřebném množství nezávislých opakování a na odpovídajícím počtu jedinců. Vzhledem k počtu variant a komplikovanosti experimentů se z mého pohledu jedná o úctyhodné množství zpracovaného materiálu. Oceňuji i přítomnost kontrol inkulace a jeho stability, zpětný odběr vzorků z krmítek pro stanovení případně sekretovaného viru během sání. Kromě různých modifikací infekčních experimentů s flebotomy, používala autorka pro analýzu získaného materiálu metody pro stanovení titru viru (test ředění koncového bodu, plaková titrace), izolaci RNA a RT-PCR pro stanovení přítomnosti virové



RNA. Metodika je doplněna o odpovídající statistické testy, ovšem jen pro křivky přežití flebotomů. Bylo by vhodné doplnit statistické testování i k výsledkům prevalence a titrů. Kapitola výsledky je taktéž zpracována přehledně. Překvapivě se nepodařilo infikovat zástupce *Phlebotomus perniciosus* ani jedním z testovaných kmenů, přestože se jedná o druh považovaný za kompetentního vektora TOSV. Nicméně byla prokázána infekce virem a jeho diseminace u *Ph. tobbi* a *Ph. sergenti*. K prezentaci výsledků bych měl několik poznámek. Z mého pohledu chybí statistické testování rozdílů u prevalencí a titrů virů, u grafů titrů virů by bylo vhodné vyznačit detekční limit metody a používat logaritmické měřítko pro osu y, u grafů prevalence viru na úrovni jednotlivců by bylo pěkné zobrazit v grafech i výsledky pro vzorky odebrané v den 0, do tabulky 11 by pro lepší orientaci bylo vhodné doplnit i výsledky obou RT-PCR, aby bylo možné rovnou porovnat výsledek stanovení titru viru a PCR pro daný den po infekci a typ vzorku.

V kapitole diskuze autorka správně zasazuje výsledky do kontextu již publikovaného výzkumu, nabízí možná a přesvědčivě působící vysvětlení neúspěšné infekce *Ph. perniciosus* a správně identifikuje limity vlastních experimentů u úspěšně infikovaných druhů flebotomů s diseminovanou infekcí (absenci průkazu zpětného přenosu viru) a navrhuje možné postupy pro doplnění těchto experimentů. Celkově tedy práce i přes negativní výsledky u infekce *Ph. perniciosus* přináší hodnotné dále využitelné výsledky: identifikaci potenciálních alternativních vektorů, která navíc odpovídá geografické distribuci klinických případů mimo areál výskytu aktuálně prokázaných kompetentních vektorů.

Autorku bych rád požádal na odpovědi na následující otázky:

1. Proč jsou některé citace v textu označené hvězdičkou?
2. Na str. 6 se zabýváte potenciální rolí nestrukturních proteinů v překonání střevní bariéry. Zmiňujete dva experimenty, které byly provedené s mutovaným virem Rift Valley. Nemohlo dojít k tomu, že delece prostě obecně snížili replikační schopnost viru bez jakéhokoli vztahu k přechodu střevní bariéry? Napadl by vás doplňující experiment, který by mohl potvrdit opravdu funkční roli nestrukturních proteinů?
3. Prosím o vysvětlení za jakým účelem byla amplifikována mRNA house-keeping genů? Pouze pro kontrolu izolace a přepisu RNA? Proč byly použity pouze na negativní kontroly a ne na ověření RT-PCR negativních výsledků u vzorků z infekčních skupin, kde byla, pokud správně chápu, RNA izolována jinou metodou?
4. Bylo by možné z vašich výsledků a zkušeností nějakým způsobem odhadnout jaké množství virových částic do sebe skutečně flebotomové mohli dostat (v zásadě tedy jaký objem té či oné potravy zkonzumují během sání)? Bylo by možné odhadnout běžnou úroveň virémie u lidí nebo jiných potenciálních hostitelů a porovnat?

Výše uvedené komentáře a připomínky nepovažuji za nijak závažné a rozhodně významně nesnižují úctyhodné množství odvedené laboratorní práce ani celkovou kvalitu



zpracování diplomové práce jako celku. Domnívám se, že diplomová práce Bc. Markéty Rehbergerové s přehledem splňuje požadavky obvykle kladené na diplomové práce v biologických oborech na přírodovědeckých fakultách a s klidem ji doporučuji k obhajobě. Obhajoby se bohužel vzhledem k plánované zahraniční cestě nemohu zúčastnit, nicméně po pečlivém přečtení práce bych navrhoval diplomovou práci hodnotit stupněm výborně (1).

V Českých Budějovicích, 24.8.2022

Mgr. Václav Hönig, PhD.

Laboratoř arbovirologie
Parazitologický ústav BC, AVČR
Braníšovská 31
370 05, České Budějovice