

Prof. Dr. Kónya József

egyetemi tanár
az MTA doktora

Debreceni Egyetem
Klinikai Központ
Orvosi Mikrobiológia

Tárgy: MTA doktori
disszertáció bírálatára adott
válaszok

Tisztelt Professzor Úr!

Ezúton is szeretném megköszönni, hogy disszertációm bírálatára szóló felkérést elfogadta, és kérdéseivel, észrevételeivel segítette munkámat.

Válaszaimat az Ön kérdéseinek sorrendjében és azok megismétlésével részletezem:

Professzor Úr rövidítésekre utaló kritikai megjegyzésére a következő választ adom. Nagyon köszönöm az észrevételt, valóban két különböző jellegű rövidítést alkalmaztam. Mindenhol a Linné elven elnevezett fajok rövidített nevét használtam kivéve a rágcsálók esetében. Itt egy három betűs nevezéktant alkalmaztam, ami az ökológiai tanulmányok során megszokott. Minden esetben (pl.: terepi mintavételezés, adatbázis kezelés, stb) ezt a három betűs „kódot” használjuk. Mivel munkánk nagyon szoros együttműködésben történt a Pécsi Tudományegyetem ökológiai munkacsoportjának kisemlősökkel foglalkozó részlegével, a hosszú évek közös munkája alatt teljesen átvettük ezt a nevezéktant. Számunkra ennek alkalmazása így (sajnos) rutinszerűvé vált. Mentségemre legyen szólván, hogy a „Rövidítések jegyzékében” ezen három betűs kódokhoz rendelt fajneveket ismertettem. Ennek ellenére Professzor Úr felvetésével egyetértek, a jövőben jobban figyelek erre.

A hordozásra vonatkozó megállapítással kapcsolatban a következőt válaszolom. Teljes mértékben egyetértek Professzor Úr által leírtakkal, sajnos azonban sok esetben egyáltalán nincsenek még szakirodalmi adatok a hordozás/terjesztés egyértelmű igazolására. Nagyon sok vírus esetében (pl. denevérek által hordozott vírusoknál) a nukleinsav kimutatás szintjén sikerült a kórokozót kimutatni, a vírust azonban nem lehetett izolálni. Disszertációmban is maximálisan igyekeztem ezt ismertetni.

Az „elsőség leírására” vonatkozó észrevételre adott válaszom. Egyetértek Professzor Úrral, ezért a disszertációban is megpróbáltam a lehető legnagyobb óvatossággal és alázattal megfogalmazni ezeket az eredményeket. Minden esetben alkalmaztam a „hazánkban”, „régióban” vagy célzottan az adott országra vonatkozóan (pl.: „Szerbiában”) helyhatározókat. Ennek esetleges elmaradásáért elnézést kérek. Köszönöm az észrevételt, a jövőben sokkal körültekintőbben fogok eljárni az ilyen kérdésekben.

1. „A hantavírusokra kidolgozott szerológiai tesztekben a különböző rágcsálók szerológiai vizsgálatára milyen másodlagos ellenanyagot (konjugátumot) alkalmaztak? A módszertani fejezetben említett, xenospecifikusnak tekinthető anti- egér IgG konjugátumot? Vagy minden rágcsálóra fajspecifikusat? Akár az előbbi, akár az utóbbi megoldást választották, hogyan győződtek meg arról, hogy a vizsgálati rendszer megfelelő és közel azonos érzékenységgel és specificitással detektálja a különböző rágcsáló fajok ellenanyagát?”

Válasz: A szerológiai tesztekben a Dako cég által gyártott HRP-vel konjugált, kecskében termeltetett anti-egér IgG antitestet használtunk 1:1500-as hígításban. A szakirodalmi adatok alapján ez a legelterjedtebben használt antitest. Számos publikáció megerősíti, hogy mind az egérfélék, mind pedig a hörcsögfélék családjába tartozó rágcsálók szerológiai tesztelésére is alkalmas (Escutenaire és mtsai., 2000; Heyman és mtsai., 2002; Hardestam és mtsai., 2008; Hughes és mtsai., 2014). Érdekes és fontos adatot publikált Sadkowska-Todys és munkatársai 2015-ben, amely szerint a kereskedelmi forgalomban is kapható egér hantavírus ELISA teszt is kimutatta a hantavírus ellenes antitesteket hörcsögfélékben.

Az ELISA tesztünk fejlesztésekor egyfelől ilyen jellegű, kereskedelembe kapható ELISA teszt célzottan rágcsálók vizsgálatára nem volt elérhető, másfelől a rekombináns fehérje létrehozása a hosszútávú kísérleteket is figyelembe véve a kutatás finanszírozás szempontjából kedvezőbb volt. Ennek megfelelően sajnos az általunk kidolgozott vizsgálati rendszert a különböző rágcsáló fajok egyedi ellenanyagszintjére nem tudtuk tesztelni, így csak az akkor hozzáférhető szakirodalmi adatokra támaszkodhattunk. Mindazonáltal, próbáltuk a lehető legjobban meghatározni az általunk fejlesztett, rekombináns fehérje alapú teszt specificitását és szenzitivitását. Ennek érdekében mind a Dobrava-Belgrade hantavírus (DOBV), mind pedig a Puumala hantavírus (PUUV) esetében gyári human hantavírus ELISA kitekkel végeztünk összehasonlítást (Reagent Dobrava-Hantaan IgG EIA, valamint Hantavirus IgG, and IgM DxSelect™ ELISA kit, Focus Diagnostics) klinikailag igazolt DOBV és PUUV fertőzött betegek valamint egészséges emberek szérum mintáival. Ezen vizsgálatok alapján azt kaptuk, hogy ELISA tesztünk érzékenysége a DOBV és PUUV esetében 100% illetve 90,9%-os volt, míg a teszt mindkét antigén vonatkozásában 95%-os specificitással rendelkezett.

2. *„Nem alacsony-e a kistrágcsálókban a 12% körüli hantavírus szeropozitivitás egy valódi endémiás hordozáshoz képest? Nem különbözik lényegesen az akkcidentális expozíciót jelző humán eredményektől! A kistrágcsálók szöveteiben a genomi nukleinsav kvalitatív kimutatása nem nyújt információt, hogy Bevezetésben is követelményként említett „nagy mennyiségben” perzisztál-e ott a vírus. Ki lehet-e zárni azt az epidemiológiai/ökológiai szempontból lényeges lehetőséget, hogy az emberhez hasonlóan, a vizsgált kis rágcsálókban is akkcidentális expozíció zajlik valamilyen egyéb fertőző forrásból?”*

Válasz: Az irodalmi adatok alapján elmondhatjuk, hogy a rágcsálók hantavírus pozitivitását számos tényező befolyásolhatja. Nyilvánvalóan egyenes arány van a rágcsálók gradációja és a fertőzöttség között. A rágcsáló gradációt több tényező együttesen határozza meg, ezek közül a legfontosabbak a rágcsálók élőhelye, egyedszáma, kora, neme, valamint az éghajlati tényezők és ebből adódóan a táplálék elérhetősége (Jonsson és mtsai., 2010; Khalil és mtsai., 2014). Belga, német és finn kutatók foglalkoznak főleg időbeli hantavírus fertőzés dinamizmus vizsgálatával melyek alapján elmondhatjuk, hogy a hantavírus fertőzöttség mértéke eltérő (átlagosan 6% és 50% közötti értékek) az egyes vizsgált években. Ezen belül szezonális eltérés is megfigyelhető, mely eredmények adódhatnak az előbb említett tényezők közül. Ennek megfelelően a 12% a nemzetközi szakirodalomban is publikált adatoknak megfelel, nem tekinthető kirívóan alacsonynak (Escutenaire és mtsai., 2000; Heyman és mtsai., 2002; Reil és mtsai., 2017; Voutilainen és mtsai., 2016). Számos tanulmány vizsgálja a rágcsálók fertőzöttségét a human hantavírus fertőzésekkel összefüggésben, melyekből kitűnik, hogy a rágcsálók közötti nagyobb fertőzöttséget mért években a humán fertőzések száma is emelkedett. Ennek ellenére a humán fertőzések mértéke, százalékos aránya a legtöbb esetben nem éri el a gazdaszervezet szeroprevalencia értékeit (Heyman és mtsai., 2001; Tersago és mtsai., 2011; Weber de Melo és mtsai., 2015).

Valóban igaz, hogy a rágcsálók szöveteiben a genomi nukleinsav kvalitatív kimutatása nem nyújt információt a vírus mennyiségére vonatkozóan. Ebben maximálisan egyetértek Professzor Úrral. A disszertáció elkészítése után még további kísérleteket folytattunk, amik a

szöveti kimutathatóságot is érintik. Úgy tűnik, hogy a vírus kimutatására (természetes úton fertőzött rágszáló esetében) a vese illetve a máj a legalkalmasabbak. Részben megkezdjük, részben pedig tervezzük a kvantitatív módszerek alkalmazását is a vírusok vizsgálatában, ezek eredményeinek értékelése azonban még folyamatban van.

A rágszálók akkidentális expozíciója tekintetében elmondható, hogy kisemlősök a fertőzést (hasonlóan az humán fertőzésekhez) közvetlen és közvetett úton is átadhatják egymásnak. Elsősorban a hímek agresszív magatartása miatt, valamint a harapások, vagy az exkrétumok útján bekövetkező fertőződés a leggyakoribb (Kariwa és mtsai., 1998; Bagamian és mtsai., 2012; Reil és mtsai., 2017). Egyéb fertőző forrásból származó átadást nem ismerünk, illetve ezt leíró tanulmányt nem találtunk.

3. *„A esetismertetés adatai alapján nem állítható fel a „fertőzés mimikálta a feregnyúlvány gyulladását” ok- okozati összefüggés (az egy esetből származó saját adatok nem zárják ki, nem is zárhatják ki a véletlen koincidenenciát), hanem a fertőzés akut hasi tünetegyüttesel társulása írható le, amelyre több példát is hoz a szakirodalomból. Lehetett-e mesenterialis lymphadenitis a háttérben, amely szintén okozhat akut hasi tünetegyüttest és számos fertőzésben része lehet a patogenezisnek?”*

Válasz: A koincidenia valóban nem zárható ki és az is igaz, hogy a hantavírus fertőzés akut hasi tünetegyüttesel társulhat. Mindazonáltal az elmúlt időszakban folyamatosan nyomon követtük az akut hantavírus esetek klinikumát is és minden esetben a klinikai tünetek nagyban megegyeztek egymással, amit a szakirodalom is alátámaszt. Ez volt az egyetlen este, ahol ezt a jelenséget láttuk, így mindenképpen érdekesnek találtuk a beteg részletesebb vizsgálatát. Hasonló eredményekre jutott Celikbas és munkatársai (2005), amikor a Krími-kongói vérzések vírus esetében írtak le hasonló jelenséget. Természetesen egyetértünk abban, hogy egy esetből nagyon nehéz egyértelmű következtetéseket levonni, így fontosnak tartjuk a téma további vizsgálatát a jövőben.

4. *„A Krími-kongói vérzések vírus ellenanyag immunfluoreszcens vizsgálatához használt transzgenikus CHO sejtvonalal kapcsolatos kérdések: A transzfektálási lépés után volt-e és milyen szelekció, valamint hány passzázsra keresztül az első ill. az utolsó felhasználásig? Mivel magyarázható, hogy csak a sejtek egy része „antigén pozitív”? Poliklonális sejtpopuláció infekciós heterogenitásával vagy expressziós heterogenitással? Az immunfluoreszcens ábrán jelet adó sejtek morfológiailag is különbözőnek tűnnek az „antigén negatív” sejtektől, ami felveti, hogy az alkalmazott vektor önmagában is okozhat elváltozásokat a gazdasejten. Sok retrovirális rendszerben pont azért vizsgálnák párhuzamosan kontroll (vagy üres) vektorral transzfektált sejteket, hogy a transzfektált gén specifikus hatását igazolják. A jelen projektben történt-e ilyen típusú kontrollálása az antigénnek vagy annak kizárása, hogy vektor eredetű hatások közvetlenül vagy közvetve interferálnának az immunfluoreszcens vizsgálattal?”*

Válasz: A CHO-sejtek tranziens transzfekcióját kalcium-foszfát és lipofekciós módszerrel egyaránt kivitelezettük. A transzfekciót követően szelekciós marker révén dúsítottuk a transzfektált sejteket (puromycin/hygromycin). A teljes műveletsor során törekedtünk a gyors kiértékelésre a passzázs számok alacsonyan tartása érdekében (a passzázsok száma 5 volt). A szelekciót követően is erősen heterogén maradt a transzfektált populáció, főként az egyes sejtekben található kópiaszámok tekintetében, mely következtében voltak alacsony, közepes és magas szinten expresszáló sejtek egyaránt, a tranziens transzfekció természetes velejárójaként. Mivel a szelekciós kémiai anyagok (puromycin/hygromycin) citotoxikus hatásúak, mely ellen bizonyos mértékben dózis-hatás függvényében a magas kópiaszámú és expressziós szintű sejtek védettebbek (bár lassabban osztódnak, de rezisztensebbek), főként az alkalmazott szelekciós nyomás heterogén populációra kifejtett heterogén mértékű hatásának

tudjuk be a morfológiai heterogenitást. Véleményünk szerint döntően ez utóbbi folyamat járult hozzá a heterogén morfológia kialakulásához a populáció szintjén, és kisebb mértékben az üres vektor hatása.

5. „Az értekezés ugyan kitér a legtöbb mintavételi eljárásra, a denevéreké sajnálatos módon hiányzik, amit azért lényeges megválaszolni, mert a vizsgált víruscsaládok enterális mintavételre utalnak és a-ragadozók, rovarrevők enterális mintáiból kimutatott genomiális nukleinsavszekvenciák esetén különösen fontos kizárni, hogy nem a nyersen elfogyasztott táplálékállatok valamelyike hordozta. A különböző denevérfajok és a picorna-, calici-, valamint parvovírusok közötti biológiai kapcsolat a Bevezetés és a hivatkozott szakirodalom alapján is bizonytalan, ritka és esetleges, valamint az sem ismert, hogy a gazdafaj melyik szervét érintené. A szerző által megfigyelt alacsony kópiaszám is inkább gyengíti annak lehetőségét, hogy ténylegesen a denevér hordozná az adott vírust. A jelen pontban észrevételezett vírus-gazda kapcsolatok feltárásában jelenleg hol tart a szakterület? Alternatív vizsgálati megközelítéssel jutott-e bárki közelebb annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy fertőző vírus szaporodik-e, ürül-e a vizsgált gazdafajokból vagy a genomiális nukleinsavszekvenciák kvalitatív kimutatásával, egymáshoz hasonlításával még a kérdésfelvetés szakaszában tartanak?”

Válasz: A kérdés igen fontos aspektusára világít rá a denevér-virológiai kutatásoknak, nevezetesen a vizsgálati paletta és lehetőségek erős limitációjára. Mivel az Európában honos 32 denevérfaj mindegyike védett, vagy fokozottan védett természetvédelmi státuszú, beleértve a természetes élőhelyek védelmét is, így igen nehézkes mélyreható mintavételi stratégiát kidolgozni. Az értekezés eredményeit is a kizárólagosan alkalmazható, non-invazív eljárások (székletgyűjtés) alapján szükséges taglalnunk. Európai viszonylatban rendkívül kevés adat áll rendelkezésre a különböző víruscsaládok szöveti eloszlásáról, néhány tanulmány, természetes úton elhullott denevérek metagenomikai adataiból szolgáltat vonatkozó információt (Negredo és mtsai., 2011; Dacheux és mtsai., 2014).

Ugyanakkor a denevérek szerteágazó filogenetikai kapcsolatai, egyedülálló diverzitása lehetővé teszi, hogy biogeográfiai léptékben, más földrészek rokon fajainak adataiból induljunk ki. Erről Teeling és munkatársai 2005-ös, a Science tudományos folyóiratban publikált tanulmányukban írnak. Ázsiában számos kutatás foglalkozik szövetminták vizsgálatával, így több víruscsoport esetén is rendelkezünk ilyen irányú bizonyítékokkal, a denevérek abszolút gazdaszerepére vonatkozóan. Ezen vírusok többsége hasonló rokonsági viszonyokat mutat az őket hordozó gazdaállathoz hasonlóan, reflektálva a hosszú ideje fennálló koevolúciós múltra. Ebben a tekintetben kutatócsoportunk is szerteágazó vizsgálatokat folytat, szoros együttműködésben denevér taxonómus kollégákkal. A *Picornaviridae* család esetében például számos érdekes aspektusát tártuk fel a denevérek és pikornavírusaik koevolúciós múltjának (Zeghibi és mtsai., 2019).

A denevérben történő replikáció egyértelmű bizonyítása talán a vírus izolálása lenne, ez azonban csak igen kevés esetben volt sikeres. Jelenleg a denevér-virológiának ez a másik nagyon limitáló tényezője.

Remélve, hogy opponens úr válaszaimat elfogadja, szeretném ismét megköszönni kérdéseit és áldozatos munkáját.

Tisztelettel és köszönettel: _____
Prof. Dr. Jakab Ferenc

Pécs, 2020. február 15.