

Dr. Lakos András MTA doktora pályázatának

bírálata

A doktori értekezés címe:

Kullancsok által terjesztett fertőzések: Lyme borreliosis, kullancsencephalitis, TIBOLA

Dr. Lakos András 1991-ben nyerte el kandidátusi fokozatát a „Lyme borreliosis Magyarországon” című értekezésével 1986 és 1990 között közölt 12 magyar és angol nyelvű közleményében leírtak alapján. Mindannyian tudjuk, hiszen követtük Dr. Lakos András gyógyító és kutató munkáját, hogy elsők között volt, aki Magyarországon elkezdett foglalkozni ezzel a kórképpel, mely klinikai tünetei alapján és a mikrobiológiai diagnosztika vonatkozásában sem akkor, de még ma sem tartozik a könnyen diagnosztizálható kórképek közé. Jelen MTA doktori pályázata (doktori értekezése) részben folytatása a Lyme borreliosis témakörbe tarozó kutatásainak, részben két további kullancs által terjesztett kórképpel kapcsolatos kutatásainak összegzése. Tehát arra a kérdésre, hogy a jelölt a korábbi tudományos fokozat megszerzését követően végzett tudományos kutatásainak eredményeiről számol-e be a doktori értekezésben (illetve a 1990 óta megjelent további 50 magyar és külföldi folyóiratban közölt közleményében) egyértelműen a válasz: IGEN.

Dr. Lakos András doktori értekezése nem követi a hagyományos doktori értekezések szerkezetét, inkább egy átfogó képek kíván adni egy kutató szerteágazó tevékenységéről, amit összefog a kullancsok által terjesztett különböző kórokozók által okozott infekciók klinikai, epidemiológiai és diagnosztikai kérdései iránti érdeklődés és ezen a területeken végzett kutató munka. A részletes tartalomjegyzéket és a rövidítések listáját is magába foglaló 147 oldalból álló értekezést egy 319 releváns irodalmi hivatkozások listája egészíti ki (benne 78 saját elsőszerzős közlemény, tanulmány, meghívott előadás absztraktja). A bevezetőként szolgáló ELŐSZÓ jól rávilágít egy olyan klinikus munkásságára, aki nem elégedett meg a Lyme borreliosis szero-diagnosztikájának számos hiányosságával, hanem a klinikai tünetek figyelembevételével kritikusan értékelte a hagyományos / gyári kitékkel végzett vizsgálatok eredményeit és saját maga által fejlesztett és értékelt diagnosztikus módszereket vezetett be annak érdekében, hogy korrekt diagnózis alapján lehessen dönteni a feltételezett kórokozóról, az antibiotikum kezelés szükségességéről, időtartamáról és hatékonyságáról. Emellett kutatásokat folytatott két másik kullancsok által terjesztett kórokozó okozta kórképpel

kapcsolatban. A Flavi vírusok családjába tartozó kullancsencephalitis vírus okozta kórkép epidemiológiájával, klinikai tüneteivel és diagnózisával (főleg a *Borrelia burgdorferi* által okozott neuroborreliosistól való elkülönítés lehetőségeivel). A disszertáció harmadik része egy, a szerző által elsőként leírt, *Rickettsia* sp. okozta új kórképről a szintén kullancs által terjesztett TIBOLA-ról szól.

Az értekezés nagy részét kitevő (90 oldal) a Lyme borreliosis klinikumával, epidemiológiájával, diagnosztikájával és terápiájával foglalkozó rész tematikailag 4 altémára osztható:

Az első rész (10-39 oldal) a Lyme borreliosis klinikumát, epidemiológiáját, a diagnosztikai lehetőségeket és a terápiát írja le a Magyarországon észlelt esetek (9450 észlelt beteg) és a szerológiai szűrővizsgálatok (2641 erdészeti dolgozó) alapján. ***Bár el lehet fogadni azt az állítást, hogy a diagnosztizált Lyme kórban szenvedő betegek területi eloszlása és a szeropozitivitást mutató erdészeti dolgozók területi megoszlása megegyezik Magyarországon, jobb lett volna azonban ha a két ábra (I/1 és I/2) azonos módon készült volna ennek bizonyítására.***

A klinikum leírása nem csak képekkel bőségesen illusztrált, illetve részletes, de minden egyes kórkép leírása után a diagnosztikus kritériumok megfogalmazására is sor került táblázatos formában, mely külön kiemelendő támpontot nyújt a társszakmák illetve bármely klinikus számára, aki Lyme borreliosis gyanújával észlel beteget.

A diagnosztika vonatkozásában a jelölt saját tapasztalata alapján értékeli az egyes diagnosztikus eljárásokat a direkt mikroszkópos kimutatáson, a tenyésztésen keresztül a PCR-rel történő kimutatásig. ***Sajnálatos, hogy itt a jelölt nem tér ki a mások által azonos módszerrel végzett vizsgálatok eredményére összehasonlítva a saját tapasztalataival.*** Az immunszerológiai módszerek alkalmazhatóságának leírására kerül a legtöbb hangsúly, hiszen ezen a területen végezte a jelölt a legtöbb kutatómunkát, saját „kit” fejlesztést. Ebben a részben nem csak a szerológiai módszerek értékelésének nehézségeit elemzi az egyes *B. burgdorferi* által okozott kórképekben, de bizonyítja - különböző saját tanulmányira hivatkozva - a párhuzamos mintákban történő szerológiai válaszok számszerű értékelésének, a Western-blot módszer összehasonlító értékelésének fontosságát a diagnosztikában. Különösen fontos ez differenciál diagnosztikai szempontból gyakorlatilag minden a *B. burgdorferi* okozta kórképnél az erythema migrans-tól a generalizált infekció okozta idegrendszeri és ízületi tünetekkel járó kórképekig.

A terápia vonatkozásában közel 10 000, általa diagnosztizált és kezelt Lyme borreliosisban szenvedő beteg adatait értékelve hasznos terápiás javaslatot ad a különböző

kórképek formájában jelentkező *B. burgdorferi* infekciók antibiotikum kezelésére. Csak támogatni lehet azt a konklúzióját, hogy „csak megalapozott diagnózis esetén szabad az antibiotikum kezelést megkezdeni. A téves Lyme diagnózis káros következménye a többször ismételt, felesleges antibiotikum-kezelés mellett az, hogy a valódi diagnózis megállapítása esetleg helyrehozhatatlan késlekedést szenved, - és ez akár a beteg halálához is vezethet.”

A második, harmadik és negyedik része a Lyme borreliosisal foglalkozó fejezetnek összefügg, hiszen egy érzékeny Western-blot módszer hazai fejlesztését, majd a diagnosztikában való alkalmazásának speciális összehasonlító módszerét, valamint egy automata reader fejlesztését tárgyalja. ***Úgy gondolom, hogy ha egy fejezetben kerültek volna tárgyalásra elkerülhető lett volna bizonyos információk ismétlése elsősorban a Lyme szero-diagnosztika hiányosságaira és az ebből adódó téves eredmény kiadására vonatkozóan.*** A Western-blot kit fejlesztésének részletes leírása és a kit használhatóságának beteg savókkal és kontrol savókkal való értékelése meggyőző. ***Kár, hogy az ebben a fejezetben említett ELISA IgG és IgM típusú ellenanyag vizsgálatok végzésére vonatkozóan semmilyen adatot nem találtam, hogy milyen kittel történtek ezek a vizsgálatok?*** Különböző, más szerzők Western-blot módszerrel végzett vizsgálatainak értékelése alátámasztja a jelölt megállapításait a 60kD-os és a 41kD-os fehérjékkel szemben kapott álpozitivitás vonatkozásában, valamint hogy a kontroll csoportba tartozók álpozitivitása nehezíti az eredmények értékelését. A jelölt az általánosan elfogadottól eltérően a „band”-ek intenzitását szemikvantitatív módon értékeli, figyelembe véve azt a leltben is. Így objektivizálja az egyébként mások szerint is szubjektívnek tartott Western-blot módszert. A COMPASS, azaz comparative immunoblot assay tulajdonképpen a valódi vagy feltételezett Lyme megbetegedés során különböző időpontokban levett szérum minták összehasonlító Western-blot vizsgálatát teszi lehetővé kezelt és bizonyos okok miatt kezeletlen esetek is értékelésre kerültek. Az értékelést képfeldolgozó számítógépes program segíti és automata immunoblot reader fejlesztésére is sor került. A dolgozat ezen részében a jelölt az összehasonlító immunoblot vizsgálattal számos (összesen 9) kérdésre kereste a választ elsősorban a Lyme borreliosis szerológiai diagnosztika ellentmondásait kívánta feloldani, illetve annak negatív következményeire felhívni a figyelmet.

Az összehasonlító immunoblot assay hatékonyságát 32 eset dokumentált leírásával bizonyítja. A módszer nem csak a szerológiai javulás, illetve a kezelés következményeként beálló mikrobiológiai gyógyulás követésének lehetőségét adja meg, de lehet a *B. burgdorferi* túlélését, a Lyme borreliosis relapszusát követni valamint számos más felmerülő kérdés megválaszolására is használni. A közel 100 000 immunoblot vizsgálat és 10 000

összehasonlító immunoblot assay elvégzése, valamint a jelölt 3 éve kooperációban a Mayo klinikával végzett munkája lehetőséget nyit további statisztikai elemzésekre is a jövőben.

Végül a terhességi Lyme borreliosis kérdéskörével foglalkozik az értekezés első részének utolsó fejezete, mely bizonyos mértékben az esetek leírásánál is már bemutatásra került (3 kismama és magzata COPASS vizsgálata). 124 terhes nő adatait dolgozta fel, akik igazolt Lyme borreliosisban szenvedtek terhességük alatt és ezzel a legnagyobb ilyen típusú statisztikai értékelésre alkalmas beteganyagon mutatta ki, hogy a kezeletlen *B. burgdorferi* fertőzés magzati károsodáshoz vezethet.

Az értekezés második nagy témaköre a kullancsencephalitissel foglalkozik (16 oldalon). A kórokozóra vonatkozó tudnivalók, a diagnosztika (differenciál diagnosztika) és az epidemiológiai adatok ismertetése után 193, a László kórházban észlelt és az OEK Vírusosztályán diagnosztizált eset klinikai adatait elemzi két időszakra osztva az észlelt betegeket. A statisztikailag is értékelt tünettan azt mutatta, hogy a súlyos tünetekkel járó kullancsencephalitis esetek száma csökkent már azt megelőzően, hogy az esetek előfordulási gyakorisága csökkent volna. Az esetek országos elosztását is értékelve összefüggést talált az egyes nagy vadak élőhelyének előfordulásával és azt is igazolta, hogy ez megegyezik a Lyme borreliosis területi megoszlásával is. A szerző részt vett a kullancsencephalitis megelőzésére kifejlesztett „Encepur” oltóanyag klinikai kipróbálásában is 107 önkéntes immunológiai reakcióját, valamint az oltással összefüggő oltási reakciók értékelésével. A vizsgálat fő erőssége az önkéntesek megválasztásában az volt hogy időskorúak, diabéteszesek és alkoholisták reakcióját is értékelték, hogy az átlag populációra kapjanak adatokat. A gyorsított adagolási sémával már 21 napra 100%-os védettséget kaptak.

Az értekezés harmadik nagy témája a TIBOLA mint kórkép leírása, diagnosztikai lehetőségei, epidemiológiai értékelése és nem utolsósorban a Lyme borreliosistól való elkülönítése. Az észlelt betegek leírása (sajnálatos módon) több külön tanulmány formájában történt. ***Könnyebb lett volna az értékelőnek, ha a TIBOLA esetekre vonatkozó adatokat egy közös táblázatban összefoglalta volna a jelölt.*** Az első 27 észlelt beteget követően a már 86 beteget tartalmazó tanulmány részletesen írja le a TIBOLA tünettanát és a vektor a Dermacentor kullancs területi előfordulását. Kollaboráció útján, valamint a jelölt saját részletes, az elszennvedett kullancscsípés beszerzésének helyére vonatkozó adatok értékelésével feltérképezte a *Rickettsia* fertőzést közvetítő kullancs elterjedtségét, valamint a TIBOLA esetek területi elosztását. A TIBOLA és a Lyme borreliosis szezonáltságában és kor-megoszlásában észlelt különbségek jól igazolják a kórokozó, valamint a vektor különbözőségét. A betegekre vonatkozó részletes adatfelvétel tette lehetővé hogy 202

TIBOLA-ban szenvedő beteg értékelése során rámutasson ezen kórképpel kapcsolatban a lovakkal való találkozás fontosságára. Az általa felfedezett és elnevezett kórkép jelenlétét ma már több országban igazolták és együttműködésben D. Roult munkacsoportjával számos molekuláris módszerrel végzett vizsgálat is alátámasztja a kórokozó eltérő voltát a Lyme borreliosistól.

Mindhárom téma értékelése során kiemelendő a jelölt igen alapos adatgyűjtése: az észlelt betegekre vonatkozó adatok, a klinikai tünetek részletes dokumentálása és azok pontos adminisztrációja, a tünetek mellett a diagnosztikában használt szerológiai módszerek eredményeinek kritikus értékelése és regisztrálása, valamint a vektorokra vonatkozó adatok begyűjtése. A jelölt ezen munkamódszere tett lehetővé hogy tudományos igényű megállapításokat tegyen és akár a terápiára (elsősorban a Lyme borreliosis) akár ez epidemiológiára vonatkozóan a nemzetközi irodalomban is értékelt megállapításokat tegyen.

Új tudományos megállapítások , eredeti tudományos eredmények:

- Dr. Lakos András és mtsai. elsőként írták le Magyarországon a Lyme borreliosis részletes tünettannát és izolálták a borreliákat kullancsokból és betegek klinikai mintáiból.
- Magyarországról elsőként közölt a Lyme borreliosisról epidemiológiai adatokat és bebizonyította, hogy a kezeletlen terhesség alatti infekció a magzat elvesztéséhez, illetve magzati károsodáshoz vezethet.
- Klinikai vizsgálatokat végzett a Lyme borreliosisban használható antibiotikum kezelések területén és szerológiai vizsgálatokkal követve igyekezett optimalizálni az antibiotikum választást és az antibiotikum kezelés hosszát. In vitro vizsgálatokkal bebizonyította, hogy a kombinált antibiotikum kezelésnek nincs szinergén hatása és inkább növeli a borreliák szervezeten belüli túlélésének valószínűségét.
- A világon elsőként izolálta emberből egy újonnan felfedezett Lyme spirochetát a *Borrelia spielmanii*-t.
- Magyarországon először végzett epidemiológiai tanulmányokat a kullancs-encephalitissel kapcsolatban, illetve a kullancsencephalitis vakcina klinikai kipróbálásában is részt vett.
- Egy kullancs által terjesztett kórkép a tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA) mint új klinikai entitás első leírója és igazolta a gyermekek és lányok fokozott kockázatát, valamint a lovakkal való kontaktus fontosságát.

Kérdések:

1. Nagyon részletes leírás olvasható a Lyme kór szerodiagnosztikáját segítő Western-blot módszer saját fejlesztéséről. Érdekelne, hogy a hosszabb időn keresztül tartó alkalmazás során hogy biztosította (biztosítja) a saját fejlesztésű „kit” minőségét. Milyen „quality control” lépések előzték/ik meg egy-egy újabb sarzs használatát. Egyetlen sarzs készítése során hány vizsgálatra alkalmas blot gyártására van lehetőség?
2. Nem esik szó a dolgozatban arról, hogy milyen IgG és IgM kimutatási kit-et használt. Az is saját fejlesztésű ELISA kit volt (első lépcső a diagnosztikában) vagy gyári kit? Ha saját fejlesztés milyen összehasonlító vizsgálatok történtek?
3. A saját maga által gyártott Western-blot kittet milyen gyári kitekkel hasonlította össze? Ha volt ilyen összehasonlítás miért nem szerepel a dolgozatban? Ha nem volt miért nem végzett összehasonlító vizsgálatokat?
4. A saját automatizált számítógépes értékelést is lehetővé tevő fejlesztése időben hogy viszonyul a mai, kereskedelemben beszerezhető diagnosztikus rendszerekhez (pl. *recomLine* Borrelia IgG/IgM kit – Microgen Diagnostik)?
5. A klinikai tünetek megfigyelése mellett milyen diagnosztikus lépéseket ajánl a TIBOLA esetet észlelő háziorvosnak, bőrgyógyásznak, infektológusnak a *Rickettsia conorii* ELISA mellett? Hol érhető el ez a diagnosztika tudomása szerint?
6. A III/3 és III/13 ábra igen hasonlóan a TIBOLA és az azonos időszakban észlelt Lyme borelliosisban szenvedő betegek kor szerinti megoszlását mutatja kétféle ábrázolásban. Miért? Ugyan ez vonatkozik a III/2 és a III/14. ábrákra is.

Formai, szerkesztési megjegyzések:

Nem következetes a szerzős a Lyme borelliosis írásmódjában sok helyen mindkét szó nagybetűvel íródik (lásd az értekezés címe, I/1 ábra), máshol a második szó kisbetű (ez utóbbi megjelenést támogatja a bíráló)

Címben nem javasolt a rövidítés alkalmazása (114. oldal)

Könnyítené az értekezés olvasását, ha kevesebb lenne a rövidítés. Annak ellenére, hogy szakmabeliek vagyunk nehéz pl. az Lb-t Lyme borreliosisnak olvasni. Különösen zavaró, ha ez az ábrák aláírásában jelentkezik, vagy ha ragozott formában kell használni. Ugyan ez vonatkozik és talán még zavaróbb a Bb-ként rövidített *Borrelia burgdorferi* esetében, különösen hogy más *Borrelia* speciesek neve kiírva megjelenik (12 és 13 oldal).

Sok helyen a genus név ragozott alakja nagy betűvel van írva (12., 27. stb. oldal: Borreliáké, vagy Borreliák – ilyen esetben mindig kis betűvel kell írni a genus nevet)

I/27 ábra. Számozás hiányzik az egyes oszlopok tetején. Megértést, értékelést könnyítené.

I/29 és I/30 ábra: függőleges tengelyének megnevezése hiányzik.

I/31 ábra: A vízszintes tengelyen több fehérje jelzése nem látszik A fekete kocka kitakarás szerkesztési probléma vagy más funkciója van? Így a szöveg és az értékelés nehezen érthető.

I/32 ábra: Milyen ELISA-t alkalmazott (Lásd kérdések is)

I/3.4. fejezet (63-77 oldal): A jelölt különböző esetek ismertetése során igazolja a COMPASS módszer alkalmazásának hatékonyságát a Lyme korban szenvedő beteg tüneteiben bekövetkezett változások igazolására. Kár hogy az esetleírások során nem következetes az alkalmazott antibiotikum terápia megadásában (hol igen részletes, hol csak a dózis van megadva, de időtartam nincs (6. eset 65. oldal)

III/1.2. fejezet (120 oldal) : A bekezdés közepén olvasható mondat nem értelmezhető !! Az ebben a fejezetben leírtakat jó lett volna egy táblázatban összefoglalni a könnyebb érthetőség és az adatok könnyebb követhetősége érdekében.

III/2 és III/3 ábra : hiányzik a függőleges tengely megjelölése. A diagnosztizált betegek szám?

III/3 táblázat: nem tudni hogy kire vonatkozik a táblázat. Azokra aki TIBOLA tüneteivel kerültek megfigyelésre vagy az összes kullancs csípéses betegre. A táblázat nem informatív.

III/5 ábra: két kép alatt szerepel ugyan az a számozás. Lehet hogy ugyanazon betegről van szó vagy csak el lett számozva a kép?

III/1 táblázat: Miért vonta össze az azythromycin vagy co-amoxiclav. terápiában részesült betegek adatait? A szövegben a terápiára vonatkozóan leírtakat nem fedik a táblázatban megadott adatok. Javaslom a táblázat átszerkesztését megadva gyógyultak arányát is.

III/13 és III/14 ábra: Hiányzik a függőleges tengely megnevezése?

Mind ezek a formai és szerkesztési hibák nem kisebbítik a dolgozat tudományos eredményeinek értékét. Javaslom Dr. Lakos András akadémiai doktori disszertációjának nyilvános vitára tűzését és sikerese védelem esetén a disszertáció elfogadását.

Szeged, 2014 április 14.

Dr. Nagy Erzsébet
egyetemi tanár
az orvostudomány doktora