

Opponensi vélemény

Dr. Bakonyi Tamás

„Csípőszúnyogok közvetítette flavivírus fertőzések Európában”

című MTA doktori pályázatáról

Dr. Bakonyi Tamás „Csípőszúnyogok közvetítette flavivírus fertőzések Európában” címmel benyújtott MTA doktori pályázata aktuális kérdéseket vet fel a szúnyogok által közvetített előretörő fertőzések területén. Két vírus, az Usutu vírus és a nyugat-nílusi vírus epidemiológiáját és patogenitását vizsgálta korszerű módszerekkel.

A benyújtott munka 147 oldalon egységes szerkezetben foglalja össze a pályázó kutatásait. Az irodalmi áttekintés önmagában értékes szakmai anyag és a hivatkozott szakirodalom is megfelelő kört ölel fel. Az eredmények áttekintését megfelelő arányban teszik lehetővé táblázatok és ábrák. Külön kiemelendő mind a makroszkópos, mind a mikroszkópos fényképek demonstrációs értéke. Az értekezés jól követhető, bár néhány esetben a gondolatmenet követéséhez az alapo­zó közlemények segítségére volt szükség. Az értekezés értékét emeli, hogy a saját eredmények értékelésén túl a Megbeszélésben kitér olyan széles körű érdeklődésre számot tartó kérdésekre, mint a vizsgált vírusok genetikai órája ill. általános kórtani jelentősége.

Dr. Bakonyi Tamás első célként az Európában felbukkanó Usutu és nyugat-nílusi vírusok genetikai jellemzését tűzte ki, amit nukleotidszekvencia analízis módszerrel közelített meg. A vizsgálatok epidemiológiai és rokonsági szempontból megfelelő mértékben lefedték a lineáris RNS genomokat.

További célként számos állatfajban vizsgálta a fenti vírusok előfordulását, fertőzést ill. megbetegedést okozó képességét. Az utóbbit alapos patológiai elemzéssel támasztotta alá. Az észlelt vírustörzsek többnyire járványos halmozódásból származnak, aminek a mintagyűjtési torzító hatását utólag nehéz megítélni. Ezért különösen értékesek azok az eredmények, amelyek egészséges, élő vadmadarak szűréséből származnak.

Dr. Bakonyi Tamás munkásságában kiemelendő, hogy a megbetegítő képességet célzó vizsgálatai során a nukleinsav alapú módszerek mellett a klasszikus virológiai módszereket is széles körben alkalmazta. Diagnosztikai módszerek fejlesztését is célként jelölte meg.

A jelölt új eredményeinek a következőket tartom:

Kimutatta, hogy az Usutu vírus Közép-Európa szerte előfordul vadmadarakban és szúnyogokban.

Meghatározta az Usutu vírus fertőző- és szaporodóképességét laboratóriumi és haszonállatokban.

Kimutatta a járványos halmozódáshoz kapcsolódó szeropozititást a populációban

Kimutatta, hogy az állategészségügyi jelentőségű fertőzések hátterében a nyugat-nílusi vírus több genetikai vonala szerepet játszhat.

A nyugat-nílusi vírus jelenlétét igazolta különböző szúnyogfajokban.

Észrevételek, kérdések

Az Usutu vírussal kapcsolatos vizsgálatok 10-15 éves időtartamot ölelnek fel, amelynek a vége felé már más kutatócsoportok által meghatározott szekvenciákat is be tudtak vonni a filogenetikai analízisbe. Az értekezés a közlemények eredményeinek felsorolására szorítkozik további szintézis nélkül, ami többek között az Usutu vírustörzsek következtlen jelöléséhez vezetett. Például az első európai izolátum 939/01, AT2001, Vienna2001 és további két különböző génbaki azonosítóval (AY453411, NC_006551) is szerepel az értekezésben.

Idevonatkozó kérdés:

- Az Usutu vírustörzsek szekvenciája meglehetősen konzervatívnak tűnik, a törzsfák csekély különbségekre utalnak. Ilyenkor jól meghatározható egy konszenzus szekvencia ill. egy (NC_006551) vagy akár több referenciaszekvencia is. A jelenleg ismert szekvenciákat konszenzus vagy jól megválasztott referenciaszekvenciához illesztve azonosíthatóak-e genetikai vonal determináns nukleotid pozíciók vagy csak random *quasispecies* képződésről beszélhetünk, amelyek fokozatosan fejlődnek elkülönülő genetikai vonalakba?

Az értekezés új eredményként jelöl meg módszerfejlesztést mind a szerológia, mind a nukleinsav alapú kimutatás területén. Nem szerencsés, hogy ezek leírása a módszertani fejezetben, óhatatlanul elnagyolt formában található meg ahhoz, hogy a fejlesztés menetét, eredményeit meg lehessen ítélni.

Szerológiára vonatkozó kérdés:

- Az ellenanyagválasz biológiai hatékonyságát legjobban a legmunkaigényesebb vírusneutralizációs módszerrel lehet megbecsülni. A nagyobb áteresztő képességű, de még mindig munkaigényes hemagglutináció-gátló titer interpretálása, pozitív

határérték meghatározása hogyan viszonyult a vírusneutralizációs tesztben észlelt titer értékekhez?

Nukleinsav módszerekre vonatkozó kérdéskör:

- A Sanger szekvenálási érában elegáns megoldás volt, hogy a japán encephalitis komplex akkor ismert „teljes” szekvenciái alapján degenerált PCR primereket terveztek az akkor még ismeretlen Usutu szekvenciákra. A módszerfejlesztés további lépései azonban még felfedésre várnak. A „teljes” Usutu genomot átfedő szakaszokban amplifikáló oligonukleotid primereket „vírus-specifikus”-nak minősíti az értekezés. Melyik vírusra specifikusak? Az Usutura vagy az egész komplexre? A 2. táblázat dőlt betűvel szedett degenerált primer szekvenciái a lábjegyzet szerint az egész komplexre specifikusak, de mi a helyzet a többi „Usu...” jelölésű primerrel, amelyek minden egyes pozíciójában specifikusan egy adott bázis található? Ha csak az Usutu vírusra specifikusak, akkor milyen módszerrel tervezték meg őket, amikor még nem volt ismert az Usutu genom teljes szekvenciája és a degenerált primerekkel a genomnak csak kb. 60%-át lehetett amplifikálni? Ha a nem degenerált „Usu...” jelölésű primerek is olyan konszenzus primerek, amelyek az Usutu mellett a komplex más tagjaira is specifikusak, akkor miért volt szükség külön primerek alkalmazására az afrikai Usutu prototípus egyes szakaszain? A projekt során észleltek-e nukleotidvariációt olyan pozícióban, amelyre előzetesen amplifikáló vagy szekvenáló primert terveztek.
- A projekt során alkalmazott amplimer szekvenálás módszertani szempontból kettős szálú DNS szekvenálás, ahol a nukleotidvariációkat akkor tekintik biológiailag validnak, ha legalább 2 különböző (többnyire, de nem feltétlenül bidirekcionális) szekvenáló primerről induló Sanger szekvencia egyértelműen jelzi az eltérést. Ez különösen igaz a projektekben alkalmazott kapilláris szekvenálás esetén. Az Usutu primerek feltételezett lokalizációja (2. táblázat) alapján lehettek olyan szakaszok az Usutu genomban, amelyek bármely szekvenáló primertől túl messze estek vagy csak egy szekvenáló primertől lehetett őket megbízhatóan elérni. Összességében milyen arányban fordultak elő olyan nukleotidvariációk, amelyeket csak egy szekvenáló primerrel lehetett elérni és milyen módon verifikálták az ilyen helyzetű variációkat?
- A kifejlesztett TaqMan módszereket mely projektekben alkalmazták? Milyen spektrumot fednek le, komplexet, speciést, genetikai vonal(ak)at? A spektrum ismeretében milyen algoritmusban javasolt a gyakorlati alkalmazásuk?

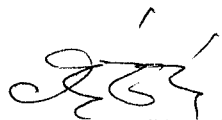
Az értekezés eredményként emeli ki a teljes genomszekvenciák meghatározását. Az alkalmazott metodológia valóban alkalmas az epidemiológiai jelentőségű genomrész(ek) teljes analizésére, ami Bakonyi doktor munkásságának gerincét adja. Ilyen kontextusban a „teljes” kifejezés helytálló. Ugyan az értekezés lényegét nem érinti, de meg kell jegyezni, hogy virológiai szempontból az alkalmazott módszerek és a bemutatott eredmények alapján viszont nem lehet levonni a teljes genom meghatározására vonatkozó következtetést legalább két okból;

- (i) amplimer szekvenálás esetén, az amplifikáló primer beilleszkedési helyén még akkor sem lehet biztosan megállapítani az eredeti szekvenciát, ha egyébként az ellenirányból végzett szekvenálás azt teljes mértékben lefedi. Linerális genom amplifikálása esetén tehát a két legszélső amplifikáló primer bekötődési helyén ilyen módszerrel nem lehet biztosan meghatározni az eredeti nukleinsavszekvenciát
- (ii) Az értekezés alapján nem lehet kizárni, hogy szélső primerek bekötődési helyétől terminális irányban is lehetnek nukleinsavszekvenciák. Vannak-e közvetlen bizonyítékok – és ha igen, milyenek – arra, hogy az Usutu vírusban az Usu1f primer első nukleotidja – egy adenin – tényleg ahhoz a nukleotidhoz illeszkedik, amelyik közvetlenül a cap struktúra után következik és hogy a Usu11014 3’ terminális reverz primer első – szintén adenin – nukleotidja ténylegesen a 3’ UTR utolsó nukleotidjához illeszkedik?

Összefoglaló vélemény

Dr. Bakonyi Tamás értekezése új ismeretekkel szolgál az Usutu és a nyugat-nílusi vírusok kórtani szerepéről, diverzitásáról és előfordulásáról a földrajzi környezetünkben. A fenti fertőzések előretörő jellege különös aktualitást kölcsönöz a vizsgálati területnek és az értekezésben felvetett tudományos kérdéseknek, amelyeket korszerű módszerek alkalmazásával válaszolt meg a jelölt.

A fentiek alapján támogatom Dr. Bakonyi Tamás számára az akadémiai doktori cím odaítélését.



Dr. Kónya József, egyetemi tanár

az MTA doktora