

MTA doktori értekezés opponensi bírálatára adott válasz

Jelölt: dr. Gyuranecz Miklós

Az értekezés azonosítója: dc_1740_20

Az értekezés címe: A brucellózis és a Q-láz járványtanának vizsgálata

Hivatalos bíráló: Dr. Pál Tibor, az MTA doktora

Tisztelt Bíráló!

Köszönöm, hogy elvállalta MTA doktori értekezésem bírálatát, és az abban megfogalmazott támogató véleményt. Köszönöm a minden részletre kiterjedő alapos bírálatot. A kritikai észrevételeket elfogadom. Továbbá mindenekelőtt köszönöm, hogy észrevételeivel és kérdéseivel új tudományos kutatások elvégzésére sarkall.

Észrevételekre adott válaszok:

- 1) Már készítettem az MTA doktori értekezésem a mycoplasmatológiai kutatásaimból, amikor egy Állatorvos-tudományi Bizottsági (ÁTB) Ülésen, melyen egy kiváló kutatási eredményekkel rendelkező kolléga, 39 cikken alapuló értekezésének megvitatása során heves vita bontakozott ki arról, hogy a 39 cikk közül az egyik a PhD hallgatója disszertációjában is szerepelt. Elképedve figyeltem a történeteket, és a bizottság konklúzióját, hogy aggályosnak tartotta, hogy a jelölt ennek a publikációnak az eredményeit is beépítette az MTA doktori értekezésébe. Egyetértve Önnel én is úgy gondolom, hogy inkább pozitívumnak kellene tekinteni azt, ha valaki témavezetői tevékenységet is végez. Arról nem is beszélve, hogy a PhD hallgató kutatómunkájában a témavezetőnek megkerülhetetlen szerepe és érdeme van (kutatási ötlet és terv, anyagi háttér megteremtése, cikk írása, javítása, gyakran még nagyobb mennyiségű laboratóriumi munka is, stb.). A fent említett ÁTB Ülés után az Agrártudományok Osztályának több akadémikusát és MTA doktorát is felkerestem a problémával kapcsolatban, akik megerősítették, hogy tényleg nem lehetnek azok az MTA doktori értekezésem új tudományos eredményei, mint amik a PhD hallgatóim dolgozatainak is új tudományos eredményei. Így amíg az iskolateremtés a habitusvizsgálat során elvárt/pozitívan értékelt tulajdonság, addig az MTA doktori disszertáció elkészítése során egy nem várt hátrány, és fejtörést okozó probléma. Volt olyan akadémikus, aki azt tanácsolta, hogy ezt úgy tudom áthidalni, hogy az adott kutatásból mást emelek ki új tudományos eredménynek, mint amit a PhD hallgatóm. Véleményem szerint azonban egy kutatásnak, publikációnak alapvetően egy új tudományos eredménye van, és talán nem is lett volna szerencsés ilyen megoldáshoz folyamodni. A 2019. szeptember 1-jétől hatályos doktori ügyrend az alábbiakat tartalmazza:

1. Ugyanazon tudományos megállapítás „saját új eredményként” két különböző disszertációban nem szerepelhet, azaz az MTA doktori disszertációnak tudományosan és etikailag is önállóan meg kell állnia a helyét.
2. Az MTA doktori pályázat elbírálása során a pályázó végzett PhD hallgatóinak nyilatkozata szükséges a társszerzős publikációkban közölt tudományos eredmények megoszthatóságáról, és annak mértékéről.
3. Össze kell hasonlítani az MTA doktori pályázat bírálata során a benyújtott MTA doktori téziseket és a pályázó végzett PhD hallgatóinak téziseit, mely az Országos Doktori Tanács (www.doktori.hu) honlapjának segítségével elektronikusan megvalósítható.

Szerencsére volt mihez nyúlnom a gazdag kutatói pályafutásomból, és így választottam értekezésem témáivá a brucellózist és a Q-lázat.

- 2) A fajnevek dőlttel szedésének elmaradása a képaláírások esetében tudatos döntés eredménye. A képaláírások esetén a Magyar Állatorvosok Lapja szerkesztésmódját követtem, miszerint a képaláírás szövegét dőlt betűvel szedtem, míg a benne szereplő fajneveket pedig nem szedtem dőlt betűvel.
- 3) A dolgozat tördelése során sokat gondolkoztam a különböző változatokon. A két altéma külön oldalon való kezdését is kipróbáltam. Végül az összképet tekintve, beleértve a táblázatok és képek elhelyezkedését is, a benyújtott verziót találtam a legjobbnak.
- 4) A doktori szabályzat a doktori mű terjedelmét 80-150 oldalban határozza meg. Az elmúlt időszakban 2 MTA doktori védésen vettem részt, ahol a jelöltek azért kaptak kritikát, mert az értekezésük 150 oldal terjedelmű, tömény, nehezen emészthető dolgozat volt. Mivel a dolgozatom csak részletesen publikált tudományos eredményeken alapul, amik szabadon hozzáférhetőek, és így a részletek iránt érdeklődők számára elérhetőek, ezért úgy gondoltam, hogy tanulva kollégáim hibáiból inkább egy könnyebben emészthető doktori művet készítek.
- 5) Hasonlóan Önhöz bennem is felmerült, hogy egy 40-50 oldalas összefoglaló tanulmányt és a hozzá tartozó publikációk másolatát nyújtom be doktori értekezésként. A doktori szabályzat ezt engedélyezi, és régebben több ilyen MTA doktori értekezés is született az Agrártudományok Osztályán. Egyeztetve több MTA doktorával és akadémikussal viszont azt a tájékoztatást kaptam, hogy ez manapság csak egy elviekben létező opció, az Agrártudományok Osztálya az ilyen doktori művek elkészítését már nem igazán preferálja.

Kérdésekre adott válaszok:

- 1) A *B. ovis* és a *B. canis* egyaránt R telep típusú *Brucella* faj, hasonló felületi antigénekkal. Régóta ismert, hogy szerológiai próbákban keresztreakciót adnak (Alton, 1988), így emlékeim szerint ezt természetesnek vettük, és nem próbálkoztunk meg a kimerítéssel. Sőt ezt a keresztreakáló tulajdonságot használtuk ki az immunhisztokémiai vizsgálat során, amikor a *B. canis* ellen termelt hiperimmun savót alkalmaztuk a *B. ovis* fertőzött szövettani metszeteken.
- 2) Az immunhisztokémiai vizsgálatot elsősorban a kórbonctani vizsgálat részének tekintem. Laboratóriumi vizsgálatra küldött hulla, vetélt magzatburok, stb. esetén fontos kiegészítő, megerősítő diagnosztikai vizsgálat lehet közvetlenül a patológus kezében. Ráadásul előnye, hogy a formalinos fixálás révén a zoonotikus kórokozó a továbbiakban nem jelent már veszélyt a vizsgálatot végző emberre. Élő állat vizsgálata vagy komplex (bakteriológia, molekuláris biológia, szerológia) laboratóriumi háttérrel rendelkező intézetek esetében azért az immunhisztokémiai vizsgálat szerepe másodlagos, elsősorban kiegészítő jellegű, vagy gyakorlatilag nem releváns (élő állat).
- 3) A *B. suis*-sal fertőzött mezei nyulakra a *Francisella tularensis*-szel kapcsolatos nagy volumenű mintagyűjtéseink során, mint „kutatási melléktermékekre” akadtunk rá, és dolgoztuk fel tudományos szempontból. Azóta ezek a kutatások véget értek, tömegesen nem vizsgálunk mezei nyulakat, laboratóriumi diagnosztikai vizsgálatra a vadásztársaságok gyakorlatilag nem küldenek mezei nyulakat, így újabb *B. suis* pozitív állatokat sem sikerült azonosítanunk.
- 4) Leírták, hogy az Omp31 elvesztése a *B. ovis* mellett egyes *B. abortus* és *B. melitensis* (Rev.1) törzseknél sem okoz virulencia veszteséget. Feltehetően a *B. ovis* esetében az Omp25/Omp31 család más tagjai (pl. Omp22 és Omp25) a fontosabbak a virulencia szempontjából (Caro-Hernández és mtsai, 2007).
- 5) Cikkünk publikálásakor reménykedve vártam, hogy mekkora visszahangot vált ki, hogy egy természetes Omp31 deléciós mutáns törzset izoláltunk. Sajnos az érdeklődés elmaradt. Ennek oka valószínűleg az volt, hogy az Omp31-et célzó vakcina fejlesztések megmaradtak az alapkutatás szintjén (Cassataro és mtsai., 2007). Napjainkban elsősorban a *B. melitensis* Rev.1 vakcina törzsét használják a *B. ovis* elleni immunizálásra is (OIE, 2015). Ami a mindkét *Brucella* fajjal endemikusan fertőzött, fejlődő országokban egy kézenfekvő megoldás. A *B. melitensis*-szel nem fertőzött (többnyire fejlett) országokban pedig vagy mentesítéssel védekeznek a *B. ovis* ellen, vagy nem foglalkoznak a betegséggel a juh ágazat állapota és/vagy mérsékelt gazdasági súlya miatt.

- 6) A *B. canis* törzsek multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) vizsgálatának idején még azt az időszakot éltük, amikor párhuzamosan, egymással versenyezve 3 MLVA rendszer is fejlesztés alatt állt a világ különböző laboratóriumaiban. Mindhárom rendszer a maga gyermekbetegségeivel, erősségeivel, gyengeségeivel küzdött. A *B. canis* törzsek tipizálását arizonai vendégkutatói időszakom alatt végeztem el, az ottani laborhoz kötődő módszerrel (Huynh és mtsai., 2008), illetve annak tovább finomított változatával. Ez a rendszer az általunk feltett kérdés megválaszolására többé-kevésbe megfelelőnek bizonyult. A filogenetikai és molekuláris-epidemiológiai vizsgálatokhoz azonban idővel bebizonyosodott, hogy az európai laborok által fejlesztett, és a markerek súlyozásával is operáló MLVA rendszer (Al Dahouk és mtsai., 2007; Le Flèche és mtsai., 2006) sokkal alkalmasabb. Így a későbbi vizsgálataink során már mi is ezt az MLVA módszert alkalmaztuk. Így ma ezt az európai MLVA rendszert javasolnám pl. két kennelel izolált *B. canis* törzsek közötti járványtani kapcsolat felderítésére. (A klasszikus multi-locus sequence typing /MLST/, a legtöbb baktérium fajjal ellentétben nem rendelkezik elegendő felbontó képességgel egy adott *Brucella* fajon belüli törzsek összehasonlító genetikai vizsgálatához.)
- 7) Amikor a *B. canis* esetet diagnosztizáltuk, akkor hosszú ideig még azt sem tudtuk, hogy mivel állunk szemben. Például pár hétig azt hittük, hogy *B. suis* fertőzésről van szó. A munka hazai jelentőségét az adta, hogy elsőként mutattuk ki a *B. canis* jelenlétét Magyarországon. De nemzetközileg a publikáció azért váltott ki nagy visszhangot, és eredményezett magas idézettséget, mert elsőként írtuk le, és mind a mai napig referenciaként szolgál a diagnosztikai laboratóriumok számára, hogy milyen módszerek segítségével lehet egy *B. canis* fertőzést diagnosztizálni. Így a kérdésre válaszolva az eset diagnosztizálása idején fel sem merült még, hogy az egyes baktérium telepeket tipizáljuk kutatási célból. Természetesen néhány évvel később, amikor az USA-ban az MLVA vizsgálatokat végeztem, akkor eljátszottunk mi is a gondolattal, hogy milyen jó lett volna, ha annak idején ilyesmi eszünkbe jutott volna.
- 8) Azt feltételezzük, hogy egyes *B. suis* törzsek inkább adaptálódhattak a mezei nyulakhoz, mint a vaddisznóhoz/házi sertéshez. A genetikai vizsgálatunk eredményei mellett ezt a hipotézist erősíti az a generációkon átívelő szakmai vélekedés is, hogy az extenzíven tartott házi sertés állományokra elsősorban a vaddisznók jelentenek járványtani veszélyt a brucellózis szempontjából, nem pedig a mezei nyúl.
- 9) Európai szinten nagyobb léptékben hasonlítottuk össze a törzseket, és ilyen szinten a magyar törzsek is egy relatíve jól körülhatárolható genetikai csoportot alkottak, legközelebbi rokonsági kapcsolatot mutatva az egyéb közép-európai (német, svájci) törzsekkel. Mivel a magyar törzseknek tudtuk a pontos földrajzi és időbeli eredetét, ezért ezeket elemeztük lokális szinten is. Az intenzív természetes és mesterséges eredetű országon/régióon belüli vaddisznó/sertés mozgás valószínűleg fontos szerepet játszik abban, hogy ilyen kisebb léptékben vizsgálva már nem tudunk időbeli és földrajzi összefüggést kimutatni a hazai sertés és vaddisznó eredetű törzsek genetikai vizsgálata során.

- 10) A tevé eredetű *B. melitensis* törzsek genotipizálási eredményeinek publikálása óta is évente kapunk különböző eredetű *B. melitensis* törzseket diagnosztikai célú genotipizálásra a Közel-Keletről. A téma érzékenysége való tekintettel részletesen nem számolhatok be az eredményekről, de mutatunk ki ok-okozati összefüggéseket a különböző állati, köztük tevé és emberi brucellózis esetek között.
- 11) Világszerte a szarvasmarha állományokból és szarvasmarha eredetű tejtermékekből a *C. burnetii* ST20-as genotípusát, illetve annak mikrovariánsait mutatják ki (Sulyok és mtsai, 2014). Jelenlegi ismereteink szerint ez a genotípus nem, vagy legalább is mérsékelten humán patogén. Nagy Q-láz járványokról, tömeges emberi megbetegedésekről nem számoltak be a szakirodalom az ST20-as genotípushoz kötődően. Mérsékelt humán patogenitása azonban lehet, ami talán függ a felvett csíraszámától is, mert a PhD hallgatóm és a Nemezeti Népegészségügyi Központ (NNK) munkatársai tavaly a hazai szarvasmarha telepeket ellátó állatorvosok között végzett szerológiai felmérő vizsgálat során nagy arányban mutattak ki szeropozitivitást, többször igen magas titer értékekkel, ami krónikus humán Q-láz fertőzésre utalhat, és egészségügyi kezelést, nyomon követést igényelne. Ezért javasoljuk is a szarvasmarha telepen dolgozó emberek üzemorvosi vizsgálatába felvenni az évenkénti Q-láz szűrővizsgálatot. A kereskedelmi forgalomban kapható tejtermékek a pasztórizálás hatására természetesen nem tartalmaznak élő kórokozót, csak PCR detektálásra alkalmas DNS-t. De a nyers tehéntej fogyasztással kapcsolatban is afelé hajlik ma a tudomány, hogy ez nem jelent jelentős közegészségügyi kockázatot a *C. burnetii* fertőzés szempontjából. A kiskérődzőkben; juhban és kecskében előforduló genotípusok sokkal fertőzőbbek az emberre nézve. A humán járványok általában ezekhez a genotípusokhoz kötődnek, pl: kecske-Hollandia, ST33 (Tilburg et al., 2012a,b) és juh-Vókány, ST18.
- 12) A zártan, intenzíven tartott tejelő tehenészetekben a kullancs nem játszik szerepet a Q-láz járványtanában. Az extenzíven tartott állatok, mint pl. a juhok, kecskék, húsmarhák vagy vadállatok között azonban a kullancs vektor szerepet tölthet be. Erre volt jó példa az etióp zebukról származó kullancsok vizsgálata, amikben 10%-nál magasabb *C. burnetii* PCR pozitivitást tudtunk kimutatni. Egyes feltételezések szerint a kullancs passzázs révén a *C. burnetii* virulenciája is fokozódhat. A kullancs közvetítette emberi Q-láz fertőzések azonban igen ritkák, gyakorlatilag elhanyagolhatóak (Skultety és mtsai., 2017, NNK tájékoztatás).

- 13) Tudomásom szerint hazánkban az NNK laboratóriuma végez egyedül humán Q-láz diagnosztikát alapvetően savó mintákból mikro-immunfluoreszcencia (MIF) teszttel, kisebb részben PCR vizsgálattal. Az előbbi speciális labor háttérrel és valamilyen szintű gyakorlatot is igényel. Nem vagyok jártas a nagyobb kórházi laboratóriumok felszereltségét illetően, de talán a MIF vizsgálatok meghaladják a lehetőségeiket. Mivel a bakteraemia csak rövid ideig áll fenn az emberben, ezért a vérből végzett PCR vizsgálat rutin diagnosztikára nem alkalmazható. Az állategészségügyben alkalmazott ELISA tesztek (pl.: ID Screen® Q Fever Indirect Multi-species kit, IDVet Inc., Grabels, Franciaország), az anti-emplős konjugátum révén emberi mintákon is használhatóak, de akkreditált vizsgálatként a közegészségügyben ezek nem alkalmazhatóak.
- 14) A dolgozatban szereplő vizsgálatok többségét pályázati anyagi támogatás nélkül végeztük, ami több esetben limitálta a vizsgálatba bevonható minták számát. Ezek között a minták között tényleg nem igazán találtunk olyan mintát, amiben a *C. burnetii* magas csíraszámban (alacsony Ct érték) volt jelen. Az elmúlt két évben azonban jelentős gyógyszerügyi támogatás mellett egy PhD hallgatómmal több mint 1000 különböző eredetű szarvasmarha mintát sikerült feldolgozni (tej, alom, vetélt magzatburok, stb.), és közel 50 magas kópiaszámot tartalmazó mintát azonosítani. Felmerül a *C. burnetii* oktani szerepe a korai embrió vesztésben és magzatburok visszatartásban is (Dobos és mtsai., 2020a,b). A szarvasmarha és kiskérődzők szerepére az emberi fertőzések forrásaként szeretnék a 11. pontban adott válaszomra hivatkozni.

Köszönöm, hogy elvállalta értekezésem bírálatát, a pozitív bírálatot, a konstruktív kérdéseket, és tisztelettel kérem ez utóbbiakra adott válaszaim elfogadását.

Budapest, 2021. február 4.

Köszönettel,



dr. Gyurancz Miklós

Hivatkozások

Al Dahouk, S., Le Flèche, P., Nöckler, K., és mtsai. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *J Microbiol Meth.* 2007; 69:137-145.

Alton GG, Jones Lois M, Angus RD, és mtsai. Techniques for the Brucellosis laboratory, INRA, Paris, France, 1988.

Caro-Hernández P, Fernández-Lago L, de Miguel MJ, és mtsai. Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infect Immun.* 2007; 75:4050-4061.

Cassataro J, Pasquevich KA, Estein SM és mtsai. A DNA vaccine coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B. ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev.1 vaccination. *Vaccine.* 2007; 25:5958-5967.

Dobos A, Gyuranecz M, Albert M. A *Coxiella burnetii* előfordulásának aránya a magzatburok-visszatartásban, tejelő szarvasmarha-állományokban. *Magyar Állatorvosok Lapja.* 2020; 142:593–597.

Dobos A, Gábor G, Wehmann E, és mtsai., Serological screening for *Coxiella burnetii* in the context of early pregnancy loss in dairy cows. *Acta Vet Hung.* 2020; Online ahead of print.

Le Flèche P, Jacques I, Grayon M, és mtsai. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 2006; 6:9.

OIE: World Organization for Animal Health: 2015, Ovine epididimitis (*Brucella ovis*), chapter 2.7.9. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE, Paris, France.

Skultety L, Mertens K, Havlicek V, és mtsai. *Q Fever*, 2017;1–24.

Sulyok KM, Kreizinger Z, Hornstra HM, és mtsai. Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants and human in Hungary: indication of various genotypes. *BMC Vet Res.* 2014; 10:107.

Tilburg JJ, Roest HJ, Buffet S, és mtsai. Epidemic genotype of *Coxiella burnetii* among goats, sheep, and humans in the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2012a; 18:887-889.

Tilburg JJ, Rossen JWA, van Hannen EJ, és mtsai. Genotypic diversity of *Coxiella burnetii* in the 2007–2010 *Q fever* outbreak episodes in The Netherlands. *J Clin Microbiol* 2012b; 50:1076-1078.