

Prof. dr hab. med. Urszula Demkow

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Recenzja pracy doktorskiej

Mgr Dagmary Borkowskiej-Tatar pt: "Ewaluacja testu QuantiFeron-TB Gold Plus w diagnozowaniu latentnego zakażenia prątkiem gruźlicy i poszukiwanie nowych alternatywnych biomarkerów".

Przy sprawnie działającym układzie immunologicznym kontakt z prątkami gruźlicy nie zawsze skutkuje rozwojem choroby. Odmiennością zakażenia prątkiem gruźlicy od innych zakażeń jest ograniczone ryzyko przejścia zakażenia w zachorowanie. Od wielu lat wykrywanie i ewentualne leczenie latentnego zakażenia jest celem badań i zainteresowań wielu naukowców. W krajach o najlepszej sytuacji epidemiologicznej szczególną uwagę zwraca się na osoby z utajonym zakażeniem prątkami i w odpowiednim postępowaniu z takimi osobami upatruje się szansę na eradykację gruźlicy.

Terminem zakażenie latentne lub utajone określane jest stan, w którym obserwujemy pozytywną reakcję skórną na tuberkulinę lub inne antygeny prątka albo pozytywny wynik testu IGRA, bez towarzyszących objawów klinicznych i radiologicznych charakterystycznych dla czynnej postaci gruźlicy.

Kraje o niskiej zapadalności na tę chorobę prowadzą dość rygorystyczne badania kontaktów i profilaktyczne leczenie osób zakażonych. Sytuacja epidemiologiczna Polski daje możliwość rozważenia wdrożenia działań analogicznych do tych, jakie stosowane są w krajach o niskiej zapadalności na gruźlicę. Głównym zadaniem miałyby być poszerzenie puli osób, które podlegałyby badaniom i ewentualnemu profilaktycznemu leczeniu. Praca doktorska dotyczy zatem bardzo aktualnego i ważnego problemu oraz ma istotne znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne.

Przedstawiona praca ma typowy układ rozpraw na stopień doktora nauk medycznych. Starannie przygotowany maszynopis pracy liczy 178 stron, jest podzielony na 14 rozdziałów, opatrzony jest 22 czytelnymi rycinami, oraz 34 tabelami i zawiera zestawienie 238 pozycji piśmiennictwa. Praca jest napisana poprawnym językiem naukowym, ułatwiającym zrozumienie treści i śledzenie myśli Autorki. Badania prowadzono w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie.

Cele pracy są jasne. Zasadniczym celem przeprowadzonych badań było porównanie automatycznej i manualnej metody oznaczania poziomu interferonu gamma w krótkotrwałych hodowlach leukocytów krwi obwodowej oraz poszukiwanie nowych potencjalnych wczesnych biomarkerów latentnego zakażenia prątkiem. W ostatnich latach rośnie zainteresowanie poszukiwaniem nowych biomarkerów, które umożliwiłyby skuteczne odróżnienie LTBI od aktywnej choroby zatem wybrany temat ma istotne implikacje merytoryczne.

Wstęp dobrze uzasadnia genezę pracy doktorskiej. We wstępie Doktorantka przedstawiła podstawowe informacje dotyczące gruźlicy, w tym dane epidemiologiczne, informacje kliniczne, biologię prątka, przebieg zakażenia *M. tuberculosis*, oraz przebieg odpowiedzi immunologicznej na antygeny prątka. Autorka szczegółowo opisała dostępne metody wykrywania latentnej postaci gruźlicy i ich ograniczenia. Obecnie WHO zaleca stosowanie następujących metod: próba tuberkulinowa, QuantiFeron-TB Gold Plus metodą ELISA i automatyczną, T-SPOT.TB oraz Wantai TB-IGRA, a także trzy nowe testy skórne: Diaskintest, Cy-Tb oraz C-TST.

W rozdziale „metody” wyczerpująco opisane zostały techniki laboratoryjne stosowane w pracy. Test QFT-Plus jest testem ELISA, oceniającym poziom IFN- γ wydzielonego przez limfocyty T po stymulacji specyficznymi antygenami prątka gruźlicy ESAT-6 i CFP 10. Test Liaison QFT-Plus jest testem zautomatyzowanym, opartym na tej samej zasadzie. Do detekcji IFN- γ stosuje się bezpośredni test chemiluminescencyjno-immunologiczny (CLIA). Oznaczenie stężeń cytokin w próbkach osocza wykonano za pomocą system Bio-Plex 200. Metoda wykorzystuje technologię Luminex xMAP łączącą właściwości klasycznego testu ELISA z przepływową cytometrią fluorescencyjną. Podstawą oznaczenia są fluorescencyjne kulki magnetyczne opłaszczane odpowiednimi przeciwciałami, z których każda zawiera unikalną kombinację barwników fluorescencyjnych.

Zwraca uwagę bardzo profesjonalnie przeprowadzona analiza statystyczna. Testy statystyczne są odpowiednio dobrane do stawianych pytań oraz do charakteru badanych cech i liczebności badanych grup.

Wyniki i ich omówienie są przedstawione wyczerpująco i jasno. Zrozumienie tego fragmentu rozprawy ułatwiają ryciny i tabele.

Analizie poddano 5443 wyniki testów IGRA wykonanych w ciągu 7 lat w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc. Ostatecznie do analizy zakwalifikowano 712 pacjentów w wieku od 1 miesiąca do 87 lat z medianą 39 lat. Dzieci stanowiły 34,3% badanych, a dorośli 65,7%. Rozkład płci w badanej grupie wynosił 52,9% mężczyzn i 47,1% kobiet.

Doktorantka wykazała, że dodatni wynik testu QFT-Plus istotnie częściej występował u kobiet i dzieci niż u dorosłych mężczyzn. Takie wyniki są zaskakujące w świetle danych wskazujących, że mężczyźni częściej chorują na gruźlicę niż kobiety, a dzieci chorują wyjątkowo rzadko. Taka obserwacja mogła być powiązana z doborem grup badanych. Problem ten Doktorantka podejmuje w dyskusji pracy. Większość dzieci z analizowanej populacji pochodziła z domowego kontaktu z chorymi na gruźlicę. Dzieci zgłoszone do KRG miały istotnie wyższe wartości IFN- γ w próbkach antygenowych testu QFT-Plus niż dorośli. Test QFT-Plus charakteryzował się wyższą czułością diagnostyczną (94,6%) u dzieci niż u dorosłych (76,5%) przy zbliżonej swoistości (ok. 60%). Trafność diagnostyczna testu była wyższa u dzieci niż u dorosłych. Te obserwacje również wymagają szerszego komentarza. Ponieważ u dzieci granica pomiędzy zakażeniem a zachorowaniem jest wyjątkowo płynna, być może niektóre z badanych dzieci mogłyby być zakwalifikowane jako osoby z czynną gruźlicą, jakkolwiek dzieci na ogół nie prątkują, a zatem w tych przypadkach nie udawało się potwierdzić obecności aktywnej choroby.

Dodatni wynik testu był związany z ponad siedmiokrotnie wyższym ryzykiem rozwoju aktywnej postaci gruźlicy ($RR = 7,2$) co potwierdza przydatność QFT-Plus do identyfikacji osób z LTBI o wysokim ryzyku progresji. Autorka wykazała również, że interferon jest produkowany zarówno przez limfocyty CD4+ i CD8+.

Testy QFT-Plus i Liaison QFT-Plus były zgodne w 89,5%. Test ten może zatem stanowić wartościową alternatywę dla pracochłonnego testu QFT-Plus, zwłaszcza w laboratoriach analizujących duże liczby próbek.

Ciekawym aspektem badań była analiza profili cytokinowych. Wykazano, że łączna ocena stężeń IL-7 i IFN- γ umożliwia bardzo skuteczne różnicowanie LTBI od aktywnej gruźlicy. Opracowany model diagnostyczny osiągnął AUROC 98,1%, czułość 94,6% i swoistość 96,5%. Ponadto stwierdzono, że stężenia MIG/CXCL9 były istotnie wyższe u chorych na gruźlicę niż u osób z LTBI i zdrowych.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka własne spostrzeżenia konfrontuje z doniesieniami zawartymi w bardzo obszernym piśmiennictwie. Większość wyników pracy pozostaje w zgodności z obserwacjami innych autorów. Nietypową obserwacją jest wysoki odsetek dzieci z dodatnim wynikiem testu IGRA w badanej grupie. Autorka słusznie uważa, że jest to wynik odpowiedniego doboru grupy badanej, gdzie wśród badanych dzieci dominowały dzieci z kontaktu z osobą chorą. Bardzo ważnym, wnioskiem z powyższych obserwacji jest fakt, iż dzieci z dodatnim wynikiem testu IGRA powinny podlegać chemioprophylaktyce gruźlicy, ze względu na wysokie prawdopodobieństwo rozwoju aktywnej postaci choroby. Ciekawym elementem pracy była również analiza nowych, potencjalnych biomarkerów latentnej postaci gruźlicy. Doktorantka zaproponowała panel cytokin. Niestety jedynie stężenie MIG/CXCL9 było różne w grupie chorych na gruźlicę i osób zdrowych. Taki wynik nie jest zaskoczeniem. Cytokiny są autakoidami i w przypadku minimalnych zmian zapalnych na ogół nie rosną we krwi obwodowej. Znaczący wzrost poziomu mediatorów zapalenia we krwi obserwuje się jedynie w przebiegu ciężkich, uogólnionych zakażeń. Prawdopodobnie warto poszukiwać swoistych markerów w krótkotrwałych hodowlach limfocytów stymulowanych antygenami prątka, jak to jest obserwowane w przypadku interferonu gamma.

Pracę kończy 7 wniosków, które są logicznie sformułowane i są konsekwencją analizy wyników uzyskanych przez Autorkę. Doktorantka sugeruje, że warto poszukiwać przydatnych klinicznie markerów i ich kombinacji jako nowych markerów diagnostycznych. Ponieważ wszystkie metody wykrywania latentnego zakażenia prątkiem gruźlicy oraz różnicowania utajonego zakażenia od aktywnej postaci mają istotne ograniczenia, dlatego poszukiwanie nowych, dokładniejszych biomarkerów jest w pełni uzasadnione. Doktorantka słusznie zauważa, że niezbędna będzie standaryzacja oznaczeń i wypracowanie wartości referencyjnych.

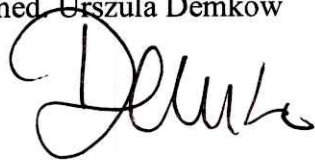
W podsumowaniu recenzji chciałabym podkreślić znaczenie przedstawianych w pracy zagadnień. Bardzo wartościowe jest zwrócenie uwagi na konieczność koncentracji działań w kierunku eliminacji ukrytego zakażenia prątkiem, szczególnie w krajach, w których zapadalność na tę chorobę radykalnie się zmniejsza. Przedstawiona do recenzji praca stanowi oryginalny dorobek naukowy Doktorantki. Autorka wykonała wiele pracochłonnych eksperymentów i dokonała ciekawych obserwacji. Rozprawa jest dowodem pracowitości, umiejętności planowania i realizowania badań naukowych przez Doktorantkę. Świadczy o zdolności do samodzielnego rozwiązywania postawionych sobie celów badawczych, o umiejętności krytycznej interpretacji wyników badań na tle właściwie wykorzystanego piśmiennictwa naukowego oraz logicznego wnioskowania. Przedstawiona do oceny praca

doktorska niewątpliwie zachęca do stawiania dalszych pytań dotyczących opisywanego zagadnienia a wyniki pracy wartę są szerokiego rozpowszechnienia w środowisku medycznym.

Stwierdzam, że praca mgr Dagmary Borkowskiej-Tatar pt: "Ewaluacja testu QuantiFeron-TB Gold Plus w diagnozowaniu latentnego zakażenia prątkiem gruźlicy i poszukiwanie nowych alternatywnych biomarkerów" odpowiada kryteriom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk medycznych.

Przedstawiam zatem Radzie Naukowej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr Dagmary Borkowskiej-Tatar do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W mojej opinii praca pozwoliła na istotne pogłębienie istniejącej wiedzy o diagnostyce latentnego zakażenia prątkiem gruźlicy i stanowi ważny krok prowadzący do zahamowania rozprzestrzeniania się choroby, dlatego zwracam się także z wnioskiem o wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab n. med. Urszula Demkow

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Demkow', written over the printed name.