

Akademia Techniczno-Humanistyczna

Wydział Nauk o Zdrowiu

Bielsko Biała

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Zofii Czubasiewicz pt. "Użyteczność diagnostyczna niektórych testów komercyjnych do wykrywania zakażeń *Borrelia burgdorferi*" wykonanej pod kierunkiem profesora Bogdana Mazura

Kierunki rozwoju medycznej diagnostyki laboratoryjnej obejmują poszukiwanie nowych parametrów diagnostycznych, coraz bardziej czułych i swoistych metod oznaczeń, sposobów automatyzacji tych metod i działań na rzecz coraz wyższej jakości organizacji procesu diagnostycznego. Producenci dostarczają gotowe zestawy diagnostyczne, w których ulotki informują najczęściej o bardzo korzystnych parametrach metody, dlatego rzadko w rutynowym laboratorium, z uwagi także na koszty i pracochłonność takiego postępowania, przeprowadza się badania porównawcze zestawów proponowanych przez różnych producentów. Wymaga to wniknięcia nie tylko w strukturę zestawu ale także w sposoby przygotowania jego podstawowych składników, w interpretację wyników i ocenę zakresu wyników dla danej populacji. Przesłana do recenzji praca mgr Czubasiewicz dotyczy takich właśnie badań, przy czym należy podkreślić, że promotor tej pracy jest nie tylko diagnostą o olbrzymim doświadczeniu ale także wybitnym specjalistą z dziedziny immunologii, którego dorobek badawczy dotyczy w wielu przypadkach podstaw metodycznych w diagnostyce laboratoryjnej.

Odkryta w latach osiemdziesiątych *Borrelia burgdorferi* jest patogenem stwarzającym szczególnie trudne problemy diagnostyczne. Wykazuje dużą zmienność fenotypową i genotypową, trudno się hoduje, w zakażonym organizmie lokuje się w miejscach z których trudno pozyskać materiał diagnostyczny. Stąd najbardziej dostępną i powszechnie zalecaną metodą diagnostyczną jest wykrywanie przeciwciał w surowicy chorego. Postępowanie diagnostyczne zalecane przez gremia ekspertów obejmuje dwa etapy badań: oznaczenie tzw. całkowitych przeciwciał klasy IgM i IgG, najczęściej metodą ELISA a następnie wykrycie swoistych przeciwciał przeciw poszczególnym antygenom bakterii metodą Western blot, co uwiarygodnia wstępny wynik badania.

Pytania, które zadała sobie Doktorantka, to: czy oferowane przez producentów zestawy do wykrywania przeciwciał przeciw *Borrelia burgdorferi s. lato* metodami Western blot dostarczają podobnych i użytecznych diagnostycznie wyników oraz jaki zestaw przeciwciał przeciwko użytym w testach antygenom charakteryzuje odpowiedź na zakażenie w badanej

populacji. Uważam, że tak sformułowany cel pracy jest nie tylko ciekawy badawczo ale przede wszystkim jest bardzo użyteczny, zwłaszcza w obecnej sytuacji epidemiologicznej kiedy wzrasta liczba wykrywanych zakażeń i oferowanych przez laboratoria badań w kierunku *Borrelia burgdorferii*.

Cel pracy poprzedza 23 stronicowy Wstęp, który obejmuje opis gatunków krętków z rodzaju *Borrelia*, epidemiologię boreliozy łącznie ze skrótowym opisem postaci chorób wywoływanych przez te krętki. Bardzo ważnym rozdziałem jest część poświęcona strukturze antygenowej *Borrelia* a następnie przeglądowi metod diagnostycznych.

Materiałem do badań były próbki surowicy 1819 osób, mieszkańców województwa śląskiego, u których przeprowadzono wstępne badanie na obecność przeciwciał klasy IgM i IgG przeciw *Borrelia burgdorferi s. lato* zestawami ELISA firmy Euroimmun. Spośród badanych próbek wybrano do dalszych badań zestawami do metody Western blot firm Microgen i Viramed, 96 próbek do badań na obecność przeciwciał klasy IgM i 194 na obecność przeciwciał klasy IgG. Na 96 próbek do testu IgM Western blot 64 w teście ELISA IgM oznaczono jako dodatnie, 15 jako ujemne i 17 jako wątpliwe. Na 194 próbki przewidziane do testu IgG Western blot w teście ELISA IgG 142 oznaczono jako dodatnie, 42 ujemne i 10 graniczne. Następnie Doktorantka przedstawiła metodykę oznaczeń dla testów ELISA IgM i IgG firmy Euroimmun i metodykę badań zestawami firm Microgen i Viramed do testów Western blot IgM i IgG. W zestawach firmy Microgen dla wykrywania przeciwciał klasy IgM i IgG użyto antygenów rekombinowanych *Borrelia burgdorferi s.lato* a w zestawach firmy Viramed antygenów natywnych *Borrelia afzeli*, *B.burgdorferi s.stricto* i rekombinowany antygen VlsE.

Z przeprowadzonych oznaczeń obydwoma zestawami Western blot dla przeciwciał klasy IgM otrzymano istotnie więcej wyników dodatnich aniżeli metodą ELISA IgM firmy Euroimmun. Podobna sytuacja dotyczyła przeciwciał IgG, które zestawami Western blot wykrywano częściej aniżeli testem ELISA IgG. Doktorantka wykazała także istotne różnice w częstości wyników dodatnich między zestawami firmy Microgen i Viramed w przeciwciałach klasy IgM oraz brak istotnych różnic w częstości wyników dodatnich w przeciwciałach klasy IgG. Przeprowadzone badania wykazały, że testem ELISA IgM i IgG część wyników to wyniki fałszywie ujemne i fałszywie dodatnie. Natomiast testami Western blot dla przeciwciał klasy IgM zgodność wyników dodatnich wynosiła 88,7% a dla przeciwciał klasy IgG 97,16%. Porównując odpowiedź immunologiczną na antygeny zastosowane w obydwu badanych zestawach w klasie IgM wykazała zgodność jedynie dla antygeny VlsE a w klasie IgG dla antygeny VlsE, p41 i OSpC.

Doktorantka przeprowadziła również analizę korelacji między wynikami testów wykrywających przeciwciała metodą Western blot oraz zestawami ELISA. We wszystkich przypadkach wartości współczynnika korelacji były istotne statystycznie, ale wartości współczynnika „r” między testami ELISA a Western blot dla przeciwciał klasy IgM wynosiły około 0,3 co świadczy o słabej zgodności wyników. Dużo lepsze były wyniki obliczeń dla

testów wykrywających przeciwciała IgG, „r” wyniosło ponad 0,6. Autorka wykazała także dobrą zgodność między wynikami testów metodą Western blot, lepszą dla testów wykrywających przeciwciała IgM aniżeli IgG, wskazuje to na znacznie lepszą jakość wyników oznaczeń tą metodą.

Interesującym fragmentem pracy są wyniki analizy odpowiedzi immunologicznej na poszczególne antygeny, okazało się, że w zestawie Microgen na 16 zastosowanych antygenów rekombinowanych w próbkach surowic stwierdzono przeciwciała tylko dla 9, natomiast w zestawach Viramed, w których użyto antygenów natywnych u wszystkich badanych osób wykryto przeciwciała przeciw tym antygenom. Sugeruje to lepszą odpowiedź na antygeny natywne i ograniczenie zestawu antygenów rekombinowanych.

W dyskusji Doktorantka po analizie uzyskanych wyników dochodzi do wniosku, że ze względu na duży odsetek wyników fałszywie dodatnich i ujemnych konieczne jest w każdym przypadku podejrzenia zakażenia *Borrelia* wykonanie równoległych oznaczeń testami ELISA i Western blot. Proponuje również odpowiedni do charakteru odpowiedzi immunologicznej na antygeny *Borrelia burgdorferi s.lato* wśród badanej populacji zestaw antygenów dla wykrycia przeciwciał klasy IgM i IgG. Określenie zakresu odpowiedzi immunologicznej na poszczególne antygeny *Borrelia burgdorferi s.lato* ma podstawowe znaczenie dla diagnostyki zakażenia a w niektórych przypadkach pozwala na określenie gatunku patogenu. Wnioski kończące rozprawę podsumowują otrzymane wyniki, brakuje mi jednak wniosku zawartego wcześniej w dyskusji, a stwierdzającego konieczność przeprowadzenia jednoczesnego oznaczenia obydwu klas przeciwciał metodami ELISA i Western blot. Rozprawę kończą streszczenia w języku angielskim i polskim oraz spis 60 pozycji piśmiennictwa.

Uwagi recenzenta :

- w wykazie skrótów powinien znaleźć się skrót PMR
- na str 7 należy dodać, że uwaga o zmianie kształtu i liczby wici stwierdzona przez Aristowskiego i Hoeltzera w 1929 r dotyczyła szczepów *Spirocheta obermeieri*
- na str 9 przy wymienianiu gatunków *Borrelia* Doktorantka pomyliła kolejność, w pierwszym zdaniu powinno ich być 14 a drugim 7
- Doktorantka nie rozróżnia pojęć : zestaw, test, badanie i stosuje je zamiennie
- w tytułach tabel 4.8,4.9,4.10,4.11 powinno być „ liczba reakcji dodatnich z poszczególnym antygenem”.

Posumowanie :

Rozprawa doktorska mgr Zofii Czubasiewicz dotyczy istotnego zagadnienia jakości testów diagnostycznych wykrywających zakażenie *Borrelia burgdorferi*. Rosnąca w ostatnich latach liczba osób chorujących na boreliozę wymaga rzetelnej diagnostyki laboratoryjnej. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę ustalają kierunek tej diagnostyki i wskazują na konieczność dostosowania testów do charakteru odpowiedzi immunologicznej na zakażenie w danej populacji. Praca charakteryzuje się dobrym warszatem badawczym a wyniki przeprowadzonych badań mają bardzo istotne znaczenie praktyczne. Piśmiennictwo dotyczące badań jakości/ użyteczności immunologicznych testów diagnostycznych w diagnostyce boreliozy jest skąpe, dlatego podjęcie takich badań ma istotne znaczenie dla krytycznej oceny oferowanych przez producentów zestawów. Uważam, że rozprawa doktorska mgr Czubasiewicz spełnia takie zadania, dostarcza ważnych informacji jak należy prowadzić diagnostykę zakażeń *Borrelia burgdorferi* i sugeruje rozwiązania dotyczące konstrukcji zestawów diagnostycznych do metody Western blot. W związku z powyższym mogę stwierdzić, że praca doktorska mgr Zofii Czubasiewicz pt. Użyteczność diagnostyczna niektórych testów komercyjnych stosowanych do wykrywania zakażeń *Borrelia burgdorferi* spełnia warunki określone w art.13 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595 z póź.zm.) i wnoszę do wysokiej Rady Wydziału lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym o dopuszczenie mgr Zofii Czubasiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Andrzej Wiczkowski