



Klinika Pediatrii i Gastroenterologii
III Katedra Pediatrii Uniwersytetu Medycznego
Uniwersytecki Szpital Kliniczny
20-093 Lublin, ul. Prof. A. Gębali 6

☎ 81 71 85 420
81 74 31 353

e-mail: gastro@uszd.lublin.pl



Prof. dr hab.n.med. Elżbieta Pac-Kożuchowska
Kierownik Kliniki Pediatrii i Gastroenterologii
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin, dnia 24 września 2021r.

Ocena rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

lek. med. Anny Niezgody

**pt.: „ Ocena przydatności testu Westernblot IgM/IgG we wczesnej
diagnostyce toksoplazmozy wrodzonej”**

Toksoplazmoza to choroba odzwierzęca wywoływana przez pierwotniaka *Toxoplasma gondii*. Jest to jedna z najbardziej rozpowszechnionych chorób odzwierzęcych u człowieka. Szacuje się, że połowa kobiet ciężarnych w Polsce, przechorowała toksoplazmozę w przeszłości o czym świadczy miano swoistych przeciwciał. Wyróżnia się trzy główne drogi zakażenia toksoplazmozą: droga pokarmowa, droga przezłożyskowa oraz transfuzja krwi. Przebieg toksoplazmozy u osób z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym jest w większości skąpo albo bezobjawowy. Do groźnych następstw zakażenia *T.gondii* może dojść u osób z upośledzoną odpornością. Grupę pacjentów, u których zakażenie *T.gondii* ma poważne konsekwencje stanowią noworodki z wrodzoną postacią choroby. Do zakażenia płodu pierwotniakiem dochodzi drogą krwiopochodną przezłożyskową wtedy gdy ciężarna choruje na pierwotną toksoplazmozę. Wrodzona toksoplazmoza wiąże się przede wszystkim z zajęciem ośrodkowego układu nerwowego: mózgu i siatkówki oka u płodu. Bardzo ważna jest wczesna diagnostyka, aby przeprowadzić odpowiednie leczenie ciężarnej, a tym samym ograniczyć niekorzystny wpływ zakażenia na rozwijający się płód. W Polsce są

prorowadzone przesiewowe badania ciężarnych pod kątem pierwotnego zakażenia pierwotniakiem *T. gondii*. Takie postępowanie prowadzi do ograniczenia liczby ciężkich przypadków wrodzonej toksoplazmozy oraz pozwala wyselekcjonować grupę noworodków, które powinny być po urodzeniu przebadane w kierunku zakażenia tym pierwotniakiem. Należy podkreślić, że tylko 10% noworodków z wrodzoną toksoplazmozą prezentuje objawy choroby. A więc bez skryningu ciężarnych noworodki bezobjawowe, ale zakażone, nie są leczone, co może powodować poważne konsekwencje zdrowotne. Diagnostyka noworodków z podejrzeniem wrodzonej toksoplazmozy opiera się w praktyce na testach serologicznych, których czułość i swoistość jest w tej grupie wiekowej dość niska. Dlatego trwają poszukiwania dodatkowych metod wczesnej diagnostyki wrodzonej toksoplazmozy u dzieci po urodzeniu, aby odpowiednio wcześnie zastosować leczenie i zapobiec poważnym konsekwencjom.

Dokładnie zapoznałam się z przedstawioną mi do oceny rozprawą na tytuł doktora nauk medycznych lek. med. Anny Niezgody. Dotyczy ona oceny przydatności testu Westernblot IgM/IgG we wczesnej diagnostyce wrodzonej toksoplazmozy. Temat którego realizacji podjęła się Doktorantka uważam za niezwykle ważny pod względem poznawczym, naukowym i klinicznym.

Rozprawa napisana jest przez doktorantkę pod kierunkiem dr hab. n. med. Dariusza Gruszfelda, profesora IPCZD Kliniki Neonatologii Patologii i Intensywnej Terapii Noworodka Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”. Praca powstała w ośrodku z wieloletnim doświadczeniem w diagnostyce i leczeniu dzieci z wrodzoną toksoplazmozą.

Rozprawa została logicznie zaplanowana i napisana. Jest zawarta na 135 stronach wydruku komputerowego w formacie A 5. Układ pracy jest typowy w układzie i treści dla rozpraw. Składa się ze spisu treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykazu i objaśnienia używanych w pracy skrótów, wstępu, rozdziału wprowadzającego w zagadnienie, z celu pracy, przedstawienia materiału i metod,

części przedstawiającej wyniki, dyskusji oraz wniosków. W dalszej części znajduje się spis diagramów, ilustracji, rycin, tabel i wykresów oraz spis piśmiennictwa, który obejmuje 200 pozycji. W wykazie piśmiennictwa znalazły się opracowania istotne dla tematu rozprawy, w tym w przewadze publikacje z ostatnich lat. Dominują publikacje w języku angielskim, pojedyncze publikacje są w języku polskim, co wiąże się z faktem, że w polskim piśmiennictwie prace podejmujące ten niezwykle istotny problem są nadal nieliczne. Jako punkt końcowy umieszczono suplement.

Wstęp napisany nowocześnie, dostarcza czytelnikowi rzetelnej i skoncentrowanej wiedzy na temat toksoplazmozy wrodzonej. We wstępie pracy Autorka przedstawia rys historyczny badań nad *T.gondi*. Pokazuje też jak na przestrzeni lat zmieniały się badania nad tym pierwotniakiem. Doktorantka zwraca uwagę, że do chwili obecnej nadal nie wyjaśniono wszystkich mechanizmów zakażenia, w szczególności dotyczących immunologicznych koegzystencji pierwotniaka i żywiciela. Natomiast krokiem milowym w badaniach nad pierwotniakiem było skonstruowanie przez Sabina pierwszego testu wykrywającego swoiste przeciwciała *T. gondii*. Fakt ten umożliwił wykonywanie badań na szeroką skalę z użyciem testu w populacji ludzkiej i zwierzęcej. Z zakażenia o cechach choroby rzadkiej, o ciężkim przebiegu, toksoplazmoza została przedefiniowana jako powszechne zakażenie pasożytnicze u ludzi i zwierząt. W kolejnych punktach omawia epidemiologię, podkreślając, że pierwotniak *T. gondii* jest rozpowszechniony na całym świecie. Według danych WHO jest nim zakażona jedna trzecia ludności. Natomiast w kolejnym punkcie stwierdza, że *T. gondii* jest obligatoryjnym pasożytem wewnątrzkomórkowym. Pierwotniak występuje w trzech formach i każda z nich jest zakaźna w specyficznych dla siebie warunkach; najbardziej inwazyjną formą jest tachyzoit. Dokładnie omawia cykl życiowy *T.gondi*. Następnie przedstawia mechanizmy obronne żywiciela. Autorka podkreśla, że w odpowiedzi na inwazję pierwotniaka uruchamiana jest odpowiedź komórkowa i humoralna. Zwraca również uwagę na

występowanie trzech dróg zakażenia :pokarmowa, krwiopochodna i jatrogenna. Następnie omawia postacie kliniczne choroby, a więc toksoplazmozę nabytą i wrodzoną. Autorka podkreśla, że toksoplazmoza wrodzona to najbardziej istotna klinicznie postać w całej chorobotwórczości pierwotniaka. Zdefiniowana jest jako krwiopochodne przezłożyskowe zakażenie płodu, do którego dochodzi podczas pierwotnej toksoplazmozy ciężarnej. Bardzo rzadkie są zakażenia płodu przy reaktywacji toksoplazmozy przewlekłej u matki. Bezobjawowy przebieg pierwotnego zarażenia *T. gondii* u ciężarnych powoduje, że jedynie regularna kontrola serologiczna w czasie ciąży pozwala na wykrycie zagrożenia dla płodu. Nie w każdym przypadku pierwotnej toksoplazmozy ciężarnej dochodzi do zakażenia płodu. Transmisja przezłożyskowa *T. gondii* zależy od wielu czynników: wirulencji pierwotniaka, statusu immunologicznego matki, nasilenia parazytemii u ciężarnej, przepuszczalności łożyska, oraz okresu w którym doszło do zakażenia ciężarnej.

Ciężkość objawów klinicznych wrodzonej toksoplazmozy ściśle koreluje z wiekiem płodu w momencie zakażenia. W I trymestrze ciąży zakażenie może powodować poronienie lub ciężkie uszkodzenie płodu. W II trymestrze prowadzi do wielonarządowego uszkodzenia płodu; zakażenia płodu, do których dochodzi w III trymestrze są najczęściej bezobjawowe. Pierwotniak *T. gondii* wykazuje szczególne powinowactwo do ośrodkowego układu nerwowego i siatkówki oka. Problem wrodzonej toksoplazmozy nie dotyczy wyłącznie okresu noworodkowego, późne następstwa choroby dotyczą przede wszystkim narządu wzroku i mogą ujawniać się w dzieciństwie i w okresie dojrzewania. Doktorantka przedstawia metody diagnostyczne toksoplazmozy wrodzonej. W odpowiedzi na inwazję pierwotniaka uruchamiana jest odpowiedź komórkowa i humoralna. W odpowiedzi na inwazję pierwotniaka po 7-10 dniach pojawiają się swoiste przeciwciała klasy IgA i IgM. Ich stężenie szybko narasta do 4. tygodnia po zarażeniu, a następnie, po około miesięcznej fazie plateau, przeciwciała IgM powoli znikają z krążenia: są wykrywalne średnio przez 6 miesięcy do zarażenia,

mogą jednak utrzymywać się dużo dłużej, nawet przez lata. W klasie przeciwciał IgA stwierdza się ich obecność nawet 9 miesięcy od zarażenia. W związku z tym ani przeciwciała klasy IgM, ani IgA nie mogą być uważane za jednoznaczny wykładnik ostrej fazy zarażenia pierwotniakiem. Ma to niezwykle ważne znaczenie w diagnostyce ciężarnych podejrzanych o pierwotną toksoplazmozę. Swoiste przeciwciała klasy IgG obecne są od 3. tygodnia po zakażeniu i ich stężenie narasta w ciągu kolejnych 2-3 miesięcy, a następnie osiąga plateau i w wyższym lub niższym mianie, swoiste IgG są obecne w surowicy przez całe życie zakażonego osobnika. U ciężarnych narastające miano przeciwciał IgG w kolejno wykonanych testach serologicznych wskazuje pośrednio na infekcję nabytą mniej niż 2 miesiące wstecz pod warunkiem, że nie stosowano chemioprophylaktyki spiramycyną. Swoiste przeciwciała klasy IgE nie mają rutynowego zastosowania w diagnostyce: pojawiają się bardzo szybko po zarażeniu i szybko znikają z krążenia. W diagnostyce zakażenia *T.gondii* stosujemy metody pośrednie i bezpośrednie. Pośrednie metody laboratoryjne polegają na wykrywaniu swoistych przeciwciał klasy IgA, IgM, IgE oraz IgG, są to zarówno testy ilościowe jak i jakościowe. Pierwszym w historii badań nad toksoplazmozą był immunofluoroscencyjny test Sabina-Feldmana. Test wykrywa przeciwciała IgG i IgM i pozostaje złotym standardem w odniesieniu do czułości i swoistości innych testów; stanowi ostateczny test potwierdzenia. Do metod pośrednich w diagnostyce toksoplazmozy wrodzonej należy test Westernblot (WB), który pozwala na jakościową analizę przeciwciał. Ma to podstawowe znaczenie w odniesieniu do biernie przekazanych przez łożysko przeciwciał w klasie IgG –wykazanie w surowicy dziecka obecności przeciwciał IgG o innej specyficy antygenowej niż u matki stanowi podstawę do rozpoznania zakażenia u dziecka. Czułość i swoistość metody WB jest generalnie wysoka, w ostatnich latach zastosowano w testach mieszanek antygenów rekombinowanych zwiększając ich czułość i swoistość. WB jest stosowany we wczesnej diagnostyce toksoplazmozy wrodzonej jako test komplementarny do testów serologicznych. Z ograniczeń metody należy wymienić reakcję antygenów

z przeciwciałami naturalnymi, które z czasem pojawiają się w surowicy. Może to prowadzić do wyników fałszywie dodatnich, dotyczy to zarówno przeciwciał klasy IgM jak i IgG. Z tego powodu przyjmuje się, że WB w diagnostyce toksoplazmozy wrodzonej jest metodą mającą zastosowanie do 3. miesiąca życia. Do jakościowej analizy przeciwciał należy zaliczyć test awidności IgG (Avidity test). Bezpośrednie metody konwencjonalne polegają na identyfikacji pasożyta w tkankach i płynach ustrojowych: badanie histopatologiczne, hodowla tkankowa, inokulacja zwierząt laboratoryjnych. Podstawą bezpośredniej identyfikacji pasożyta jest metoda molekularna PCR. W ostatnich latach duże nadzieje wiąże się z nowymi testami opartymi na oznaczaniu stężenia $INF\gamma$. Doktorantka podkreśla, że nieprawidłowości w podstawowych badaniach laboratoryjnych nie mają charakteru patognomonicznego. U wszystkich noworodków ze zmianami w ośrodkowym układzie nerwowym oraz na dnie oka, a także z serokonwersją w III trymestrze ciąży powinno być wykonane nakłucie lędźwiowe oraz badanie płynu mózgowo-rdzeniowego. Natomiast badanie okulistyczne jest obligatoryjnym badaniem u wszystkich noworodków diagnozowanych w kierunku wrodzonej toksoplazmowy. Istotną częścią diagnostyki są badania obrazowe. W diagnostyce toksoplazmozy wykonuje się badanie ultrasonograficzne i rezonans magnetyczny. Następnie Autorka przedstawia wytyczne pomocne w rozpoznaniu toksoplazmozy wrodzonej. Kolejny punkty to leczenie toksoplazmozy wrodzonej : prenatalnie i postnatalnie, opieka długofalowa dzieci z wrodzona toksoplazmozą oraz profilaktyka pierwszo i drugorzędowa.

Lektura wstępu pozwala zrozumieć przesłanki do podjęcia tematu, który jest uzasadniony i dotyczy oceny przydatności testu Westernblot IgM/IgG we wczesnej diagnostyce wrodzonej toksoplazmozy.

Zgodnie z przyjętymi założeniami Autorka wyznaczyła główny cel pracy oraz cele dodatkowe. Głównym celem jest ocena przydatności testu Westernblot IgM/IgG we wczesnej diagnostyce wrodzonej toksoplazmozy. Natomiast cele

dotychczasowe to: 1. Ocena realizacji i efektów programu badań przesiewowych ciężarnych, prowadzonych zgodnie z obowiązującymi w Polsce rekomendacjami. 2. Zaproponowanie optymalnego schematu postępowania w diagnostyce pierwotnej toksoplazmozy ciężarnych oraz toksoplazmozy wrodzonej u noworodków.

Badanie miało charakter obserwacyjny prospektywny i było przeprowadzone w Klinice Neonatologii Patologii i Intensywnej Terapii Noworodka IPCZD w latach 2016-2019. Do badania zostało zakwalifikowanych łącznie 96 pacjentów. Były to noworodki urodzone z ciąż z potwierdzoną pierwotną toksoplazmozą ciężarnych oraz noworodki z ciąż z wysokim prawdopodobieństwem pierwotnej toksoplazmozy ciężarnych. Pacjenci zakwalifikowani do grupy badanej w 2017 i 2018 roku – łącznie 41 - realizowali program badania w ramach udziału w badaniu statutowym nr 242/16 (zgoda Komisji Bioetycznej na badanie 48/KBE/2016) prowadzonym w Klinice Neonatologii Patologii i Intensywnej Terapii Noworodka IPCZD. Pozostałe 55 noworodków było badanych w ramach planowej diagnostyki prowadzonej w Klinice. Nie załączono oryginału zgody Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań. Według zamieszczonej informacji zgoda Komisji Bioetycznej była tylko na przeprowadzenie badań u 41 noworodków (w ramach badań statutowych).

W każdym przypadku przeprowadzono szczegółowy wywiad ciąży, polegający na analizie oryginalnych, dostarczonych przez matkę, wyników testów serologicznych T. gondii, testu awidności (wykonywane w certyfikowanych laboratoriach na terenie województwa mazowieckiego). Na tej podstawie, zgodnie z kryteriami The European Research Network of Congenital Toxoplasmosis do badania kwalifikowano noworodki podejrzane o wrodzoną toksoplazmozę: • z ciąż z pierwotną toksoplazmozą ciężarnych – udokumentowana serokonwersja odczynów T. gondii • z ciąż z prawdopodobną pierwotną toksoplazmozą ciężarnych- dodatnie odczyny w klasie IgM i narastające miano przeciwciał w klasie IgG (2-3 krotnie) w kolejnych oznaczeniach lub • dodatnie odczyny

w klasie IgM i wysokie odczyny w klasie IgG (>300 IU/ml) z obecnością limfadenopatii lub stwierdzone III trymestrze ciąży. Dodatkowe informacje o przebiegu diagnostyki prenatalnej i leczenia uzyskiwano z dostępnej dokumentacji medycznej ciężarnej. Pacjenci zakwalifikowani do badania pozostawali pod opieką Kliniki Neonatologii Patologii i Intensywnej Terapii Noworodka Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” do ukończenia 12. miesiąca życia. W trakcie tej obserwacji wizyty kontrolne odbywały się co 3 miesiące. Na pierwszej wizycie oznaczano: morfologię krwi z rozmazem, AST, ALT, mocznik, kreatyninę, bilirubinę całkowitą i związaną. Badania miały na celu poszukiwanie nieswoistych objawów biochemicznych zarażenia T. gondii (niedokrwistość wrodzona, małopłytkowość, podwyższone transaminazy, hiperbilirubinemia czy cholestaza wewnątrzwątrobową). Parametry mocznika i kreatyniny oznaczano w celu określenia wydolności nerek, co miało istotne znaczenie u dzieci ze wskazaniami do leczenia. Na kolejnych wizytach w 3, 6, 9 i 12 miesiącu życia wykonano: morfologię krwi z rozmazem, AST, ALT, mocznik, kreatyninę, w celu monitorowania ewentualnych działań niepożądanych leczenia oraz oceny ogólnego stanu u pacjentów. Wszystkie oznaczenia wykonano w Zakładzie Biochemii IPCZD.

Test serologiczny Architect Toxo IgG wykonano z surowicy krwi obwodowej pacjentów w 1, 3, 6, 9 i 12 miesiącu życia. Test wykonany w 12. miesiącu życia był punktem końcowym obserwacji i ostatecznym potwierdzeniem rozpoznania toksoplazmozy wrodzonej.

W 1. miesiącu wykonano również badanie serologiczne z krwi obwodowej matki, celem porównania odczynów matczynych i dziecka.

Test Westernblot IgM i IgG wykonano w 1. miesiącu życia u 91 noworodków, a u 5. powyżej 30. doby życia.

U każdego pacjenta przeprowadzano następujące badania specjalistyczne:

1. Badanie okulistyczne : Ocenę przedniego odcinka i dna oka przeprowadzono w 1, 3, 6 i 12 miesiącu życia.

2. USG przeciemiączkowe w 1, 3 i 6 miesiącu życia. W przypadku stwierdzenia zmian patologicznych wykonywano rezonans magnetyczny.

Wrodzoną toksoplazmozę rozpoznano, gdy spełniony był przynajmniej jeden z warunków wytycznych opracowanych przez The European Research Network of Congenital Toxoplasmosis. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, stosując odpowiednio dobrane metody statystyczne.

Uzyskane wyniki Autorka przedstawiła szczegółowo w 20 tabelach i na 11 wykresach.

Doktorantka przedstawiła charakterystykę badanej grupy. Kryterium udowodnionej serokonwersji odczynów serologicznych w kierunku *T. gondii* w ciąży spełniło 58 pacjentów, prawdopodobną pierwotną toksoplazmozę ciężarnych rozpoznano u 38 pacjentów. Wszystkie zakwalifikowane do badania noworodki podzielono na 3 grupy, w zależności od okresu, w którym doszło do serokonwersji u matki (I, II i III trymestr). Łącznie w grupie serokonwersji w I trymestrze znalazło się 36 noworodków, w II trymestrze 41 noworodków, w III trymestrze 19. W tabeli nr 10 i 11 Autorka podaje charakterystykę grupy badanej. W tabeli nr 10 podany wiek ciążowy badanych noworodków to ≤ 36 tc + 6 dni oraz ≥ 37 tc. Noworodek donoszony, to noworodek, który urodził się w skończonym 37. tygodniu ciąży. Moim zdaniem zasadny był podział noworodków na dwie grupy, w zależności od długości trwania ciąży (donoszone i wcześniaki).

Następnie przedstawia częstość wrodzonej toksoplazmozy i ryzyko matczyno-płodowej transmisji *T. gondii* w populacji badanej. Stwierdza, że wrodzoną toksoplazmozę rozpoznano na podstawie „złotego standardu” tzn. przetrwania swoistych przeciwciał IgG w 12 miesiącu życia dziecka, łącznie u 45 pacjentów: 3 z grupy serokonwersji I trymestru, 26 z grupy serokonwersji II trymestru i 16 z grupy serokonwersji III trymestru. Ryzyko matczyno-płodowej transmisji pierwotniaka wyniosło dla całej populacji badanej 46,9%, a w poszczególnych trymestrach: 8,3% w I trymestrze, 63,4% w II trymestrze

i 84,2% w III trymestrze. Następnie charakteryzuje grupy z potwierdzoną i wykluczoną toksoplazmozą wrodzoną. Omawia także objawy kliniczne wrodzonej toksoplazmozy u badanych noworodków w zestawieniu z trymestrem serokonwersji i zastosowanym leczeniem prenatalnym. Objawy narządowe wrodzonej toksoplazmozy stwierdzono po urodzeniu u 22 pacjentów (48,9). Częstsze były zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym niż na dnie oka. U 11 noworodków objawy miały charakter izolowany: zmiany wyłącznie na dnie oka u 4 pacjentów, zmiany wyłącznie w OUN u 7 pacjentów. U pozostałych 11 noworodków objawy występowały jednocześnie w narządzie wzroku i w OUN. W dalszej części Doktorantka ocenia czułość i swoistość testu serologicznego w klasie IgM. Uzyskano łącznie 16 wyników dodatnich testu serologicznego w klasie IgM, a u 80 noworodków wynik testu w klasie IgM był ujemny. U 30 z nich (37,5%) rozpoznano wrodzoną toksoplazmozę na podstawie „złotego standardu” – zatem wynik testu serologicznego był fałszywie ujemny. W tej grupie u części z nich stosowano leczenie prenatalnie. W kolejnym rozdziale Doktorantka ocenia czułości i swoistości testu Westernblot IgM/IgG Test Toxoplasma WB IgG/IgM (LDBIO) wykonano u wszystkich 96 pacjentów zakwalifikowanych do badania. 41 oznaczeń wykonano Pracowni Serologii Zakładu Immunologii Doświadczalnej Instytutu „Pomnik- Centrum Zdrowia Dziecka”, a 55 oznaczeń w Zakładzie Parazytologii i Chorób Przenoszonych przez Wektory Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie. W wyniku przeprowadzonej analizy statystycznej Autorka nie wykazała istotnych różnic w liczebności grup badanych w każdej Pracowni ani wpływu miejsca wykonania testu na ostateczny wynik testu WB. Otrzymano 33 wyniki dodatnie, 11 wyników wątpliwych oraz 52 wyniki ujemne testu WB. Dodatni wynik WB otrzymano u 33 pacjentów: u 16 był dodatni wyłącznie w klasie IgM (IgM+ i IgG -), u 17 był dodatni w IgM i IgG (IgM+ i IgG+). Ostatecznie wrodzoną toksoplazmozę na podstawie „złotego standardu” potwierdzono u 30 pacjentów (90,9%). Wynik wątpliwy WB (IgM wątpliwy/ IgG-) otrzymano u 11 pacjentów. Wszystkie wyniki

testu WB z tym opisem dotyczyły odpowiedzi IgM, w żadnym przypadku z nie stwierdzono dodatniej odpowiedzi w klasie IgG. Następnie Doktorantka przedstawia zależność między wynikiem testu WB a czynnikami prenatalnymi i objawami klinicznymi wrodzonej toksoplazmozy. Stwierdza, że dodatni wynik testu WB w klasie IgM występował częściej w grupie pacjentów z serokonwersją w III trymestrze, natomiast WB dodatni w klasie IgG u pacjentów z serokonwersją w II trymestrze. Dodatnie wyniki testu WB korelują z objawowym przebiegiem zakażenia i dotyczy to zarówno zmian aktywnych, jak i przewlekłych pozapalnych. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka stwierdza, że:

1. Test WB IgM/IgG wykonany w 1. miesiącu życia charakteryzuje się wyższą czułością i swoistością w porównaniu z zastosowanym testem serologicznym. Swoistość obu metod jest porównywalna.
2. Dodatni wynik testu WB w klasie IgG zwiększa swoistość do 100%.
3. Ujemny wynik WB IgM/IgG pozwala z wysokim prawdopodobieństwem wykluczyć zakażenie *T. gondii* już w pierwszym miesiącu życia. Włączenie testu WB do diagnostyki wrodzonej toksoplazmozy ogranicza liczbę pacjentów leczonych niepotrzebnie.
4. Interpretując ujemny wynik WB IgM/IgG należy brać pod uwagę prenatalne leczenie P/S. Stłumienie odpowiedzi serologicznej u płodu może powodować fałszywie ujemne wyniki testu u noworodka. W opinii Doktorantki uzasadnieniem dla wprowadzenia testu WB do rutynowej diagnostyki noworodka z podejrzeniem toksoplazmozy wrodzonej była potrzeba wcześniejszego rozpoznania choroby i włączenia leczenia u dzieci zakażonych oraz ograniczenia liczby dzieci leczonych niezasadnie, tylko na podstawie przesłanek z wywiadu. Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka przedstawia korzyści wynikające z wprowadzenia do diagnostyki testu WB, a mianowicie: 1. Dodatni wynik WB dobrze koreluje ze „złotym standardem” i pozwala na wczesne rozpoznanie wrodzonej toksoplazmozy. 2. Zastosowanie testu WB w diagnostyce WT u noworodka ogranicza liczbę dzieci leczonych na podstawie obciążającego

wywiadu ciążowego. 3. Wysoka czułość i swoistości testu WB nie powinna zwalniać z 12. miesięcznej obserwacji pacjentów.

Kolejnym rozdziałem rozprawy jest Dyskusja, w której szeroko omówiono i przedyskutowano zagadnienie będące przedmiotem rozprawy doktorskiej. Dyskusja jest prowadzona bardzo dobrze i w uporządkowany sposób, pokazując wiedzę Autorki dotyczącą opracowanego zagadnienia i znajomość polskiego i zagranicznego piśmiennictwa. Doktorantka porównała wyniki prowadzonych badań z wynikami i spostrzeżeniami innych autorów, dając dowód umiejętności prowadzenia polemiki naukowej. Doktorantka oceniała przydatność testu WB IgM/IgG we wczesnej diagnostyce wrodzonej toksoplazmozy. Podkreśla, że metodę diagnostyki wrodzonej toksoplazmozy opartą na różnicowaniu przeciwciał matczynych i syntetyzowanych przez dziecko w odpowiedzi na zakażenie pierwotniakiem zastosowano w 1985 roku. Przez kolejne lata zmieniała się technika wyodrębniania i doboru specyficznych antygenów *T. gondii* oraz metody wykrywania reakcji przeciwciał w surowicy matki i dziecka z antygenami. Uwieńczeniem tych badań było opracowanie testów komercyjnych i standaryzowanych jak badany test Toxoplasma Westernblot LDBio (Lyon, France).

Test WB ma zastosowanie w diagnostyce toksoplazmozy wrodzonej w pierwszych 3. miesiącach życia. Metoda ta jest diagnostyczna do 1. miesiąca życia dla oceny przeciwciał klasy IgM oraz do 3. miesiąca dla przeciwciał klasy IgG. W literaturze podnosi się dodatkowo wartość powtarzanego badania WB i wskazuje na rosnącą z czasem czułość metody w odniesieniu do wykrywania przeciwciał IgG. Doktorantka porównując czułość i swoistość testu WB w swoich badaniach z badaniami autorów niemieckich, francuskich czy brazylijskich stwierdza dużą zgodność wyników.

Ideą wprowadzenia testu WB do diagnostyki wrodzonej toksoplazmozy u noworodka było różnicowanie przeciwciał matczynych, biernie przeniesionych

przez łożysko, od przeciwciał produkowanych przez dziecko. Zasadniczo metoda była tworzona w celu różnicowania przeciwciał w klasie IgG, których bierny transfer przez łożysko wyklucza użyteczność oznaczenia IgG w teście serologicznym u noworodka.

Doktorantka stwierdza, że o przydatności testu WB w diagnostyce wrodzonej toksoplazmozy świadczy porównanie czułości i swoistości metody w odniesieniu do czułości i swoistości testów serologicznych *T. gondii*. Czulość testów serologicznych w kierunku toksoplazmozy jest w grupie noworodków i niemowląt zasadniczo niska. Może to wynikać z faktu, że wytwarzanie przeciwciał swoistych przez płód i noworodka jest hamowane lub maskowane przez przeciwciała matczyne oraz prenatalne lub postnatalne leczenie P/S. Wykrycie przeciwciał produkowanych przez płód czy noworodka w dużej mierze pozostaje poza czułością metod serologicznych – czulość testu referencyjnego ISAGA dla przeciwciał IgM nie przekracza 60%.

W badaniach różnych autorów oraz w badaniu własnym wykazano znacząco wyższą czulość metody WB w porównaniu z testem serologicznym.

Przedstawione wyniki jeszcze raz potwierdzają zasadę, że czulość testów serologicznych w diagnostyce wrodzonej toksoplazmozy u noworodka jest zbyt niska, aby mogły one stanowić podstawę do wykluczenia choroby oraz uzasadniają wprowadzenie metody WB do rutynowej diagnostyki.

Następnie Doktorantka analizuje przyczynę uzyskania wyników wątpliwych. W przedstawionej pracy uzyskano 11 wyników wątpliwych testu WB – w każdym przypadku była to obecność u dziecka prążków IgM o tej samej specyficy antygenowej co u matki, jednocześnie wynik w klasie IgG był ujemny. Ostatecznie u 6. (54,5%) noworodków potwierdzono WT. Wg niektórych badaczy i ich kryteriów rozpoznania WT obecność IgM w badaniu WB w surowicy dziecka jest podstawą do rozpoznania wrodzonej toksoplazmozy. Autorzy innych prac podkreślają, że pacjenci z wątpliwym wynikiem testu powinni podlegać dalszej obserwacji. W swoich badaniach Autorka nie obserwowała wyników wątpliwych

WB w klasie IgG. Następnie przeanalizowała czynniki mogące wpływać na wątpliwy wynik testu WB IgM u badanych pacjentów. Tutaj wymienia czas wykonania testu, leczenie prenatalne P/S. W praktyce oznacza to, że u pacjentów z wątpliwym wynikiem WB należy powtórzyć test w 2. i 3. miesiącu życia, aby rozstrzygnąć wątpliwości diagnostyczne. Dzieci te powinny pozostawać w ścisłej obserwacji. Autorka podkreśla, że wielu badaczy zwraca uwagę na fałszywie ujemne wyniki WB oraz testów serologicznych u pacjentów leczonych prenatalnie P/S. Dotyczy to nie tylko odpowiedzi w klasie przeciwciał IgM, ale również w klasie IgG. Obserwacje te są zgodne z wynikami badania prowadzonego przez Doktorantkę: w grupie noworodków leczonych prenatalnie P/S 30% miało fałszywie ujemny wynik WB.

Z punktu widzenia klinicznego równie ważna jest wartość diagnostyczna ujemnego wyniku testu WB. Ujemny wynik WB może być podstawą do odstąpienia od leczenia P/S, co pozwala uniknąć działań niepożądanych leków. Wprowadzenie testu WB do rutynowej diagnostyki WT w pierwszych 3 miesiącach, pozwala więc nie tylko wcześniej postawić rozpoznanie, ale również uniknąć nadczynnych decyzji terapeutycznych. Doktorantka stwierdza w podsumowaniu tej części dyskusji, że wyniki przeprowadzonego badania są zgodne z danymi z literatury. Potwierdzono wyższą czułość testu WB w porównaniu z metodą serologiczną, co pozwala na wczesne rozpoznanie wrodzonej toksoplazmozy. Ma to szczególne znaczenie w przypadku zakażeń o przebiegu bezobjawowym. Dodatkowo ujemny wynik testu WB pozwala ograniczyć liczbę dzieci leczonych P/S jedynie na podstawie obciążających danych z wywiadu. Metoda Westernblot powinna być włączona do rutynowej diagnostyki wrodzonej toksoplazmozy u dzieci do 3. miesiąca życia. Następnie Doktorantka ocenia skuteczność badań przesiewowych ciężarnych, prowadzonych zgodnie z obowiązującymi w Polsce rekomendacjami. Stwierdza, że prowadzony w Polsce system badań przesiewowych u ciężarnych w kierunku zakażenia T. gondii jest daleki od optymalnego i wymaga ponownej weryfikacji zarówno jeśli chodzi o zaplanowanie badań u ciężarnych, określenie

kompetencji lekarzy specjalistów, jaki i stworzenie skutecznego systemu sprawozdawczości. Pozwoli to poprawić diagnostykę i leczenie dzieci oraz rzetelnie oszacować częstość choroby w Polsce. Kolejnym punktem dyskusji jest ocena prowadzonej diagnostyki prenatalnej wrodzonej toksoplazmozy w grupie badanych pacjentów.

Na podstawie danych z dokumentacji ciężarnych, należy uznać, że diagnostyka prenatalna wrodzonej toksoplazmozy jest prowadzona w sposób dość dowolny. Zbyt rzadko wykonywane jest badanie PCR T. gondii z płynu owodniowego. Dodatkowo interpretacja wyników jest utrudniona z uwagi na nieoptymalnie zaplanowane badania ciężarnych. Doktorantka przedstawia propozycję optymalnego schematu postępowania w rozpoznawaniu toksoplazmozy pierwotnej u ciężarnych oraz toksoplazmozy wrodzonej u noworodków.

Omawia znaczenie i nowatorski charakter badania, a także wyjaśnia ograniczenia przeprowadzonego badania.

Jako efekt przeprowadzonych badań Doktorantka przedstawia 4. wnioski, które odpowiadają celom pracy.

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji praca jest napisana poprawnie, ale z obowiązku recenzenta muszę jednak wnieść pewne uwagi:

1. Brak oryginału zgody Komisji Bioetycznej.
2. Za zgodą Komisji bioetycznej przeprowadzono badania u 41 noworodków w ramach badań statutowych, a czy była zgoda na badania u pozostałych 55 noworodków?
3. Nie znam określenia „opiekun prawy”. Właściwe określenie to – opiekun prawny.
4. W rozdziale: „Charakterystyka i liczebność grupy badanej” podano, że badania przeprowadzono u dzieci donoszonych., natomiast w tabeli nr 10 podany wiek ciążowy to ≤ 36 tc + 6 dni oraz ≥ 37 tc. Noworodek donoszony, to noworodek, który urodził się w skończonym 37. tygodniu

ciąży. Moim zdaniem zasadny był podział noworodków na dwie grupy w zależności od długości trwania ciąży (donoszone i wcześniaki).

5. W rozdziale metody badań powinno być sprecyzowane i czytelnie przedstawione jakie badania były wykonywane podczas kolejnych wizyt badanych pacjentów, a więc w 3, 6, 9, 12 miesiącu.
6. Korekta literówek, których nie ustrzegła się Autorka.

Są to oczywiście niedociągnięcia nie mające cech obniżających wartość pracy, a więc nie mogą mieć wpływu na moją końcową pozytywną ocenę.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. med. Anny Niezgody pt.: „Ocena przydatności testu Westernblot IgM/IgG we wczesnej diagnostyce toksoplazmozy wrodzonej” jest pracą nowatorską wnoszącą nowe wartości poznawcze. Doktorantka oceniła zasadność wprowadzenia testu WB do diagnostyki wrodzonej toksoplazmozy i podjęła próbę opracowania optymalnego schematu postępowania w diagnostyce pierwotnej toksoplazmozy ciężarnych oraz wrodzonej toksoplazmozy u noworodków. Stwierdzam, że praca w pełni odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk medycznych.

W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie o dopuszczenie lek. med. Anny Niezgody do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Elżbieta Pac-Kożuchowska
Kierownik III Katedry Pediatrii
i Kliniki Pediatrii i Gastroenterologii UM w Lublinie

Elżbieta Pac-Kożuchowska