

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Tomasza Rosady
z Katedry Alergologii, Immunologii Klinicznej i Chorób Wewnętrznych

Collegium Medicum w Bydgoszczy

Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

wykonanej pod kierunkiem dr hab. n. med. Natalii Ukleji-Sokołowskiej, prof. UMK

**„Analiza uczuleń na komponenty alergenowe wybranych zwierząt futerkowych
na podstawie wyników testów molekularnych
ImmunoCAP ISAC oraz Allergy Xplorel-ALEX”**

Zwierzęta futerkowe mogą być przyczyną częstej postaci alergii powietrzno-pochodnej. Alergeny tych zwierząt są szeroko rozpowszechnione w środowisku, występują nie tylko w otoczeniu właścicieli zwierząt ale także wybranych grup zawodowych (weterynarze, rolnicy, hodowcy zwierząt, itd.). Dla osób uczulonych stanowi to realne ryzyko rozwoju chorób atopowych. Biologia molekularna umożliwia poznanie molekuł alergenowych odpowiedzialnych za rozwój ww. schorzeń. Zdecydowana większość molekuł należy do grupy lipokalin, które mogą być także przyczyną reakcji krzyżowych. Diagnostyka alergii na zwierzęta futerkowe może być oparta o badania podstawowe takie jak testy skórne punktowe i oznaczanie stężenia swoistych przeciwciał klasy E. Nie zawsze rutynowe badania umożliwiają ustalenie rozpoznania. W tych sytuacjach diagnostykę należy poszerzyć o badania molekularne i ewentualnie próby prowokacyjne. Najwięcej informacji dotyczących diagnostyki i częstości występowania alergii na zwierzęta futerkowe dotyczy popularnych zwierząt domowych - psów i kotów. Stosowane metody diagnostyczne muszą być na bieżąco modyfikowane pod kątem zmieniających się potrzeb chorych. Objawy, które dominują wśród pacjentów z alergią na zwierzęta dotyczą przede wszystkim: alergicznego zapalenia błony śluzowej nosa i spojówek, astmy atopowej, alergii pokarmowej czy alergicznego, kontaktowego zapalenia skóry. Niestety kontakt ze zwierzętami futerkowymi może wywołać reakcję zagrażającą życiu jaką jest wstrząs

Uklej

anafilaktyczny. Poza leczeniem objawowym zależnym od lokalizacji narządowej, rozważa się w wybranych przypadkach włączenie immunoterapii swoistej, przed którą niezbędne jest przeprowadzenie precyzyjnej kwalifikacji, opartej na diagnostyce molekularnej obejmującej testy multiparametrowe (ImmunoCAP ISAC, Allergy Xplorer – ALEX).

Biorąc pod uwagę powyższe, uważam, że zarówno wybór tematu jak i podjęcie badań przez lek. Tomasza Rosadę, jest ważne i uzasadnione.

Przedstawiona mi do recenzji praca obejmuje 263 strony, 78 rycin i 36 tabel. Piśmiennictwo obejmuje 95 pozycji literatury polskiej jak i zagranicznej, zdecydowana większość pochodzi z ostatniego dziesięciolecia. Praca ma typowy układ dla tego typu rozpraw i obejmuje wstęp przedstawiony w 4 pracach poglądowych, założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki, omówienie wyników, dyskusję i wnioski. Do pracy dołączone są także streszczenia w języku polskim i angielskim oraz oświadczenia współautorów dołączonych publikacji.

W części teoretycznej pracy doktorant przedstawił w sposób szczegółowy informacje dotyczące aktualnego stanu wiedzy na temat alergii na zwierzęta futerkowe. We wszystkich czterech pracach poglądowych zawartych we wstępie, doktorant jest pierwszym autorem. Prace zostały opublikowane w piśmiennictwie krajowym jak i zagranicznym. Stanowią one perfekcyjne opracowanie tematyki, której dotyczy rozprawa. Przygotowanie teoretyczne pozwoliło doktorantowi na założenie następujących celów badawczych:

- 1) Określenie częstości uczulenia na alergeny zwierząt futerkowych w badanej populacji.
- 2) Określenie zależności pomiędzy cechami demograficznymi badanej populacji, a uczuleniem na zwierzęta futerkowe.
- 3) Określenie dominujących komponent alergenowych w przypadku uczulenia na poszczególne zwierzęta futerkowe.
- 4) Określenie znaczenia reakcji krzyżowych w zakresie uczulenia na zwierzęta futerkowe.
- 5) Porównanie przydatności testów multiparametrowych ImmunoCAP ISAC/Allergy Xplorer – ALEX w diagnostyce alergii na zwierzęta futerkowe.
- 6) Usystematyzowanie pojęcia monosensytyzacji i określenie częstości jej występowania w aspekcie uczulenia na najpopularniejsze zwierzęta futerkowe.
- 7) Określenie ograniczeń w zastosowaniu testów multiparametrycznych w diagnostyce uczuleń na alergeny zwierząt.



Badanie miało charakter retrospektywny. Analizie poddano 1553 pacjentów, u których w latach 2012 – 2023, na podstawie badania podmiotowego i przedmiotowego lub innych badań pomocniczych, podejrzewano występowanie nadwrażliwości na różne alergeny, zarówno wziewne jak i pokarmowe, i z tego powodu zakwalifikowano ich do diagnostyki molekularnej opartej o testy multiparametryczne. Przeanalizowano podstawowe dane demograficzne badanej populacji w odniesieniu do wyników badań szczegółowej diagnostyki alergologicznej. Badania immunologiczne wykonano przy pomocy dwóch, bardzo czułych metod immunofluorescencyjnych: ImmunoCAP ISAC (Thermo Fisher Scientific) oraz Allergy Xplorer – ALEX1/ALEX2. W czasie, w którym wykonywano badania, producenci obu testów dokonali modyfikacji w zakresie składu alergenowego, co uwzględniono w analizie statystycznej uzyskanych wyników. Jako podwyższony/dodatni uznano stężenie asIgE $\geq 0,3$ ISU-E w ImmunoCAP ISAC i stężenie asIgE $\geq 0,3$ kU/l w Allergy Xplorer – ALEX, zgodnie z powszechną praktyką w badaniach naukowych oraz zgodnie z zaleceniami producentów testów. Z uwagi na temat badania spośród wszystkich otrzymanych wyników badań (grupa przystępujących do badania) wyselekcjonowano i poddano dalszej analizie statystycznej wyłącznie te, które posiadały dodatni wynik, tj. asIgE $\geq 0,3$ kU/l lub $\geq 0,3$ ISU-E, przynajmniej dla jednego alergenu zwierzęcego. Wszystkie badania zostały przeprowadzone w Pracowni Immunologiczno-Alergologicznej, działającej przy Klinice Alergologii, Immunologii Klinicznej i Chorób Wewnętrznych Szpitala Uniwersyteckiego Nr 2 im. dr Jana Bizuela w Bydgoszczy. Metodologia prowadzonych oznaczeń immunologicznych była zgodna z instrukcją producenta, wykonywana przez doświadczonego diagnostę laboratoryjnego, zgodnie ze standardami właściwymi dla określonej procedury. Na przeprowadzenie badania naukowego uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy (nr KB 297/2023 z dnia 11.07.2023r.).

Zarówno w analizowanych wynikach ImmunoCAP ISAC, jak i Allergy Xplorer – ALEX stwierdzono porównywalną częstość (39% vs 38%) występowania uczulenia na jakiegokolwiek zwierzę. Na podstawie analizy otrzymanych danych z ImmunoCap ISAC oraz Allergy Xplorer - ALEX wykazano, że najczęściej występuje uczulenie na kota (w ImmunoCAP ISAC 31% vs 30% w Allergy Xplorer - ALEX), następnie na psa (odpowiednio 22% vs 26%) oraz konia (odpowiednio 9% vs 10%). W prezentowanych wynikach podwyższone asIgE stwierdzano najczęściej dla następujących komponent alergenowych: Fel d 1 (25% w ImmunoCAP ISAC vs 27% w Allergy Xplorer - ALEX), Can f 1 (15% w ImmunoCAP ISAC vs 15% w Allergy

Xplorer - ALEX) oraz dla Fel d 4 i Can f 5 (po 12%) w ImmunoCAP ISAC, i Can f 6 (12%) w Allergy Xplorer - ALEX. W całej badanej populacji uczulenie na zwierzęta futerkowe stwierdzono u ~ 35% kobiet (36% w ImmunoCAP ISAC vs 34% w Allergy Xplorer – ALEX) oraz u ~ 44% mężczyzn (odpowiednio 43% vs 44%). W ImmunoCAP ISAC najwięcej osób uczulonych na alergeny zwierzęce stwierdzono w grupie wiekowej 13-19 lat (25,3%), a najmniej w grupie 23-37 lat (24,7%). W ALEX najwięcej osób uczulonych na alergeny zwierzęce stwierdzono w grupie wiekowej do 18 lat (35,6%), a najmniej w grupie 19-38 lat (31,9%). Zgodnie z celami pracy, scharakteryzowano również profile uczuleniowe pacjentów w przypadku nadwrażliwości na poszczególne zwierzęta. Opisano ponadto znaczenie reakcji krzyżowych w analizowanej populacji z uwzględnieniem diagnostyki komponentowej. Przeanalizowano i usystematyzowano monosensytyzację w przypadku uczulenia na zwierzęta, z odróżnieniem jej odmiennych definicji. Dodatkowo doktorant podjął próbę oceny przydatności analizowanych testów w diagnostyce alergii na zwierzęta futerkowe.

Przeprowadzone badania umożliwiły doktorantowi wysnucie poniższych wniosków:

1. Alergeny zwierząt futerkowych są częstą przyczyną uczulenia w badanej populacji. Alergenowo swoiste IgE (asIgE) dla alergenów zwierząt futerkowych występowały u ok. 38% osób z podejrzeniem choroby alergicznej. Najwięcej badanych było uczulonych na kota (ok. 30%), psa (ok. 24%) oraz konia (ok. 9%). Komponentami alergenowymi, dla których asIgE występowało najczęściej były: Fel d 1 (kot; uteroglobina; ok. 26%) oraz Can f 1 (pies; lipokalina; 15%).
2. Uczulenie na alergeny zwierząt futerkowych częściej dotyczyło mężczyzn (44% vs 35%). Nie obserwowano znaczących różnic pomiędzy poszczególnymi grupami wiekowymi.
3. Dominująca komponenta alergenowa to komponenta, dla której podwyższone asIgE stwierdzano najczęściej wśród osób uczulonych na dane zwierzę. Komponentami dominującymi były:
 - dla psa – Can f 1
 - dla kota – Fel d 1
 - dla konia – Equ c 1
 - dla królika – Ory c 3
4. Lipokaliny i albuminy surowicy odpowiadają za najczęstsze reakcje krzyżowe w zakresie alergenów zwierzęcych. Monosensytyzacja na alergen będący lipokalina

- należy do rzadkości, w przeciwieństwie do uczulenia na kilka, różnych lipokalin jednocześnie.
5. Allergy Xplorer – ALEX oraz ImmunoCAP ISAC to testy przydatne w diagnostyce uczulenia na zwierzęta futerkowe. W teście ImmunoCAP ISAC dostępne są wyłącznie komponenty alergenowe zwierząt (13), z kolei w Allergy Xplorer - ALEX mieszczono zarówno komponenty alergenowe (20), jak i ekstrakty (5). Wybór konkretnego testu molekularnego każdorazowo powinien być dostosowany do potrzeb diagnostycznych wynikających z obrazu klinicznego.
 6. Monosensytyzację w uczuleniu na zwierzęta futerkowe można rozpatrywać na trzech głównych poziomach: monosensytyzacja na jeden gatunek zwierzęcia, monosensytyzacja na jedną rodzinę białek alergenowych oraz monosensytyzacja na jedną, konkretną molekułę alergenową. Na przykładzie najpopularniejszych zwierząt domowych, tj. kota i psa, przedstawiono częstość występowania poszczególnych rodzajów monosensytyzacji: monosensytyzacja na kota - ok. 27%; monosensytyzacja na lipokaliny kota - ok. 4,05%; monosensytyzacja na Fel d 4 - ok. 4,05%; monosensytyzacja na psa – ok. 15%; monosensytyzacja na lipokaliny psa – ok. 5%; monosensytyzacja na Can f 1 – ok. 3%.
 7. W żadnym z analizowanych testów, tj. ImmunoCAP ISAC i Allergy Xplorer – ALEX, nie umieszczono wszystkich opisanych do tej pory komponent alergenowych poszczególnych zwierząt, co uniemożliwia wykrycie wszystkich potencjalnie uczulonych pacjentów. Ponadto, ekstrakty alergenowe, dostępne wyłącznie w Allergy Xplorer – ALEX, charakteryzują się niską czułością i niejednokrotnie dają wyniki negatywne, nawet przy obecności dodatnich wyników dla poszczególnych komponent alergenowych danego zwierzęcia.

Z obowiązku recenzenta w tym miejscu zmuszona jestem do wymienienia zastrzeżeń dotyczących przeprowadzonego badania. Jednakże praca została przygotowana niezwykle starannie i nie mam żadnych istotnych uwag krytycznych. Jedyne wątpliwości zostały rzetelnie wyjaśnione przez doktoranta w dodatkowym rozdziale, który umieścił na końcu opracowania - ograniczenia prezentowanego badania. Z drugiej strony właśnie ten rozdział znakomicie podnosi wartość pracy i ukazuje dojrzałość badacza, który krytycznie podchodzi do części uzyskanych danych.

Między innymi doktorant podkreślił, że diagnostyka alergii na zwierzęta nie jest łatwa, a jej możliwości i złożoność przedstawiono w ramach wstępu do niniejszej pracy. ImmunoCAP

ISAC oraz Allergy Xplorer – ALEX stwarzają możliwości w diagnostyce uczulenia na zwierzęta futerkowe, które wcześniej nie były tak dostępne i wszechstronne, jednak i one posiadają swoje ograniczenia. Podkreślił, że oba ww. testy pozwalają jedynie na stwierdzenie obecności asIgE, co umożliwia stwierdzenie uczulenia u danego pacjenta, ale nie jest to równoznaczne z jednoczesnym rozpoznaniem alergii. Aby postawić rozpoznanie alergii, konieczne jest powiązanie obecności asIgE z objawami klinicznymi po narażeniu na dany alergen. Tak więc, nawet najdoskonalsze metody diagnostyki, jeżeli nie pozwalają jednoznacznie rozróżnić uczulenia od alergii, stanowią jedynie uzupełnienie, co prawda często niezbędne, ale nadal uzupełnienie do podstawowej metody diagnostyki alergologicznej – badania podmiotowego. Doktorant podkreślił, że słabą stroną badania był jego retrospektywny charakter. Z uwagi na to, że opierają się one na analizie wyników, które pierwotnie nie były przeznaczone do oceny naukowej, brakuje w nich wielu, istotnych danych klinicznych. Ważne jest, aby podczas analizy badań o charakterze retrospektywnym unikać nadmiernego uogólniania wyników i zachować ostrożność w twierdzeniu o związku przyczynowo-skutkowym. Kolejne ograniczenie stanowi niekompatybilność wyników obu testów, tj. ImmunoCAP ISAC i Allergy Xplorer – ALEX. Nie mogą być one ze sobą bezpośrednio porównywane, gdyż oba testy zostały wykonane wśród innej grupy badanej, tj. każdy uczestnik badania miał wykonany wyłącznie jeden z analizowanych testów. Wpływ na to miały przede wszystkim ograniczenia finansowe, które nie pozwoliły na równoległe wykonanie obu testów wśród wszystkich badanych. Starano się zatem w możliwie optymalny sposób porównać przede wszystkim możliwości obu testów pod kątem diagnostyki alergii na zwierzęta futerkowe. Kolejne ograniczenie stanowiła zmiana składu testów w czasie, gdy wykonywano badania, których wyniki poddano późniejszej ocenie. Autor podkreślił, że nie każda molekula posiada swój odpowiednik w drugim teście. Próbowano jednak, na podstawie wprowadzonych ulepszeń w obu testach, ocenić, czy owe ulepszenia rzeczywiście wpłynęły pozytywnie na uzyskiwane wyniki i jakie mogą mieć potencjalne znaczenie kliniczne. Doktorant zwrócił również uwagę w podsumowaniu wyników na ograniczenia epidemiologiczne. Badanie zostało przeprowadzone w ramach jednego ośrodka i dotyczyło pacjentów z określonego regionu Polski, co również może mieć znaczenie w częstości ekspozycji na alergeny poszczególnych zwierząt. Wymienione wyżej utrudnienia z pewnością miały wpływ na uzyskane wyniki, jednak autor starał się aby powyższa analiza była jak najbardziej rzetelna i przedstawiała, możliwie szerokie, spojrzenie na możliwości obu testów molekularnych w zakresie diagnostyki uczulenia na zwierzęta futerkowe.

Jednak żadna z powyższych uwag nie zmienia mojej oceny przedstawionej mi do recenzji pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Uważam, że **rozprawa doktorska lek. Tomasza Rosady „Analiza uczuleń na komponenty alergenowe wybranych zwierząt futerkowych na podstawie wyników testów molekularnych ImmunoCAP ISAC oraz Allergy Xplorel-ALEX”**, spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.), stanowiąc samodzielne rozwiązanie problemu naukowego oraz wskazuje na szeroką wiedzę teoretyczną Doktoranta. Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie lek. Tomasza Rosady do dalszych etapów przewodu doktorskiego. **Wnoszę również o wyróżnienie przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej.** Doktorant przygotował niezwykle rzetelnie, w sposób przejrzysty, bardzo ciekawe wyniki swoich badań, co zapewne będzie przydatne w dalszych opracowaniach dotyczących poszukiwania złotego standardu diagnostyki alergii na zwierzęta futerkowe, uwzględniając nowoczesne metody oparte o diagnostykę molekularną.

Marta Chelmińska

prof. dr hab. Marta Chelmińska
specjalista chorób alergicznych
specjalista alergii i immunologii
nr ident. ZUS 622263

25/11/2024

