

dr hab. Marzena Rola-Łuszczak, profesor instytutu
Dział Wirusologii i Chorób Wirusowych Zwierząt
Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. Macieja Kosińskiego zatytułowanej:
„Opracowanie szybkiej metody detekcji wirusowych infekcji dróg oddechowych opartej na
sekwencjonowaniu w czasie rzeczywistym”

wykonanej pod kierunkiem **dr hab. Andrei Lipińskiej (promotor rozprawy)**

oraz dr. Łukasza Rąbalskiego (promotor pomocniczy)

na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego
Uniwersytetu Medycznego

Przedstawiona do oceny dysertacja dotyczy opracowania szybkiej metody diagnostycznej pozwalającej na zidentyfikowanie wirusowego czynnika etiologicznego w przebiegu zakażenia układu oddechowego w oparciu o sekwencjonowanie następnej generacji. Opracowanie takiej metody jest bardzo ważne dla postawienia trafnej i szybkiej diagnozy pozwalającej na podjęcie decyzji, co do postępowania z pacjentem (dobór właściwej terapii, bez użycia antybiotyków, zalecenia hospitalizacji). Dodatkowo przeprowadzanie tego typu diagnostyki wirusologicznej pozwala zastosować środki mające na celu zapobieganie szerzeniu się zakażenia, (np. izolacja chorego) a poznanie sekwencji wirusa może w dalszej perspektywie pomóc w nadzorze epidemiologicznym. Z tego względu uważam, że podjęte przez Doktoranta zadanie opracowania nowej technologii diagnostycznej do wykrywania infekcji wirusowych posiada istotny potencjał aplikacyjny, odznacza się wartością poznawczą i ma znaczenie dla rozwoju analizowanego obszaru nauki, a także w ochronie zdrowia publicznego.

Manuskrypt ocenianej rozprawy ma układ typowy dla prac doktorskich, składa się ze: spisu treści, wykazu skrótów, streszczeń w języku polskim i angielskim, wstępu, celu pracy, materiałów, metod, wyników, dyskusji, wniosków, spisu rycin i tabel oraz bibliografii. Dodatkowym elementem jest aneks do rozprawy doktorskiej, który wzbogaca pracę, a także może być użyteczny dla kolejnych studentów i doktorantów wchodzących w obszar podobnych badań. Rozprawa liczy 178 stron wydruku komputerowego, a dokumentacja pracy jest obszerna i obejmuje 47 rycin i 25 tabel umiejętnie włączonych w tekst pracy.

Wstęp, relatywnie obszerny bo 38-stronicowy, zawiera przegląd wiedzy o wirusach powodujących zakażenia górnych dróg oddechowych, przekrój metod stosowanych w diagnostyce chorób wirusowych, a następnie zawiera wprowadzenie w podstawy poszczególnych technologii sekwencjonowania. W pierwszej części **Wstępu** zanotowano pewien błąd dotyczący aktualnej klasyfikacji taksonomicznej syncytialnego wirusa

oddechowego (RSV, *respiratory syncytial virus*), o którym niewłaściwie wspomina Doktorant opisując rodzinę *Paramyxoviridae* (str.19), następnie umieszczając go, już poprawnie, w rodzinie *Pneumoviridae* (str.22). Pozostałe dwie części **Wstępu** napisane są skądnie i obrazowo, a także posiadają ważne tabele podsumowujące. Zwróciłabym jedynie uwagę, iż precyzyjnie powinno być: o danych „omicznych”, nie „omiowych” (str.47).

Rozdział **Wstępu** pracy jest napisany w taki sposób, że logicznie uzasadnia postawienie sobie za **Cel** przez Doktoranta – opracowanie szybkiej, ekonomicznej, względnie nieskomplikowanej metody wykrycia wirusowych zakażeń dróg oddechowych przy użyciu sekwencjonowania w czasie rzeczywistym. Przedstawienie realizacji **Celu** Pracy w częściach i podpunktach uwzględniających także walidację metody uważam za właściwe i zasadne. Dopełnieniem tej części rozprawy, ze względu na wieloetapowość pracy, różnorodny materiał użyty do badań z poszczególnymi wirusami, mógłby być dodatkowy element w postaci schematu blokowego przedstawiający przebieg i rodzaj wykonanych doświadczeń w odniesieniu do danego etapu opracowywania metody.

W rozdziale **Materiały**, liczącym 29 stron, Autor podaje szczegółowe, wartościowe informacje na temat sekwencji użytych wirusów, plazmidów kontrolnych, wymienia między innymi użyte odczynniki, pożywki, roztwory, zestawy, aparaturę i oprogramowanie, opatrując poszczególne elementy odnośnikami numerycznymi, co znacznie ułatwia śledzenie informacji zawartych w kolejnym rozdziale **Metody**. Pozwolę sobie jednak zwrócić uwagę, na to aby odnośniki te miały tę samą formę w całej pracy np. dla plazmidu opisanego w pkt. 6.4.1.1. zawierającego sekwencję nukleotydową ludzkiego koronawirusa 229E podano w tym punkcie numerację dla starterów „25”, a w **Metodach**, w Tabeli 6 podano już odnośniki [6.3.25 i 6.3.102], co może prowadzić do dezinformacji. Brakuje również w tej części pracy, lub w wykazie skrótów, informacji związanych z kodowaniem nukleotydów zdegenerowanych (zawierają je sekwencje genów wirusowych umieszczone w plazmidach) – brakuje wyjaśnienia dla takich skrótów jak B, M,H, S, V (dla nukleotydów R, W, D, Y – rzeczony wyjaśnienie umieszczono na str. 106).

Na 15 stronicach rozdziału **Metody** Doktorant prezentuje bogaty warsztat technik biologii molekularnej. Ponadto, z zapisów umieszczonych w tym rozdziale widać wyraźnie, że Doktorant porusza się bardzo dobrze w obszarze analiz bioinformatycznych. Nie uniknięto jednak w omawianym rozdziale drobnych błędów. Trudno bowiem prześledzić: z jakiego materiału pochodzi „8 µl RNA” (7.4.2 – 86 str.); dlaczego w Tabeli 6 matrycą jest cDNA, a tuż przed tabelą mowa jest o konstrukcie, co może sugerować zastosowanie plazmidowego DNA (7.4.3 – str. 87); punkt 7.5. Izolacja wirusowego materiału genetycznego – czy tylko koronawirusów? Jeśli nie, to czy zestaw „CoV RNA” może być stosowany również dla innych wirusów? (str. 90); jeżeli w pkt. 7.7 opisujemy jako jedną reakcję – reakcja łańcuchową polimerazy z odwrotną transkrypcją (tytuł podrozdziału 7.7)- to dlaczego w Tabeli 11 opisany jest już PCR w czasie rzeczywistym i jako matryca cDNA? (str. 91-92). Zrozumiałym jest również, że metodyki z takiej dziedziny zawierają wiele terminologii specjalistycznej. Niestety, osobom niezajmującym się daną techniką trudno zrozumieć, co oznaczają? W związku z tym mogą pojawiać się wątpliwości i pytania: Czy duża liczba sekwencji NNNN w plazmidach kontrolnych nie jest przeszkodą? W związku z tym sformułowanie „zbyt duże ilości” pkt. 7.1 rozdziału **Metody** wydaje się mocno nieprecyzyjne. Punkt 7.2. - niejasny jest zapis „dodatkowo

stworzeniu przerwy przypisano karę o wartości 1,53; a wartość przedłużenia przerwy ustawiono na 0,123” (str.85). Czy można w bardziej dostępny sposób opisać : „szereg pakietów zewnętrznych ułatwiających obsługę interfejsu...” (str.98) a także „oraz procentowej wartości skorygowanych okien sekwencji („Polished windows”) części sekwencji, które zostały poprawione przez algorytm na podstawie uzyskanych odczytów w celu stworzenia sekwencji konsensusowej” (str.100).

Wyniki przedstawiono na 38 stronach pracy doktorskiej. Doktorant poprzez układ i kolejność opisu poszczególnych rezultatów badań w tej części dysertacji znacznie klarowniej odzwierciedlił etapy wyróżnione wcześniej jako realizacja celu pracy. Jako pierwsze Autor wymienia kroki podjęte w opracowaniu metody czyli: uzyskanie sekwencji konsensusowych dla wybranych wirusów; opracowanie panelu starterów; konstrukcja kontroli pozytywnych. Następnie opisana i bogato zilustrowana jest część dotycząca dopracowania warunków reakcji PCR oraz analiza jednorodności produktów PCR. Jest to etap bardzo pracochłonny, skomplikowany oraz wymagający uwagi, z czego mgr Maciej Kosiński wywiązał się doskonale. W ostatniej, aczkolwiek bardzo ważnej części **Wyników** Doktorant określa limit detekcji metody, a także opisuje wyniki walidacji opracowanej metody w oparciu o próbki uzyskane z supernatantu z hodowli komórkowych zakażonych poszczególnymi wirusami oddechowymi; próbki symulujące koinfekcje powstałe z mieszanin plazmidowego DNA zawierających geny dla 45 wirusów oddechowych i te najciekawsze – próbki pochodzące od pacjentów. Limit wykrycia dla 80% badanych wirusów w opracowanej metodzie, analizowany przy użyciu jako matrycy plazmidowego DNA kontrolnego, wynosił od 1 do 10 kopii na reakcję. Jest to cenny wynik, biorąc pod uwagę fakt, że część naturalnych zakażeń oddechowych może charakteryzować się niskim poziomem wirusa.

W następnym etapie walidacji nowoopracowanej metody Doktorant przeprowadza reakcję RT-qPCR wykorzystując 14 próbek materiału genetycznego wirusów (Tabela 21) i uzyskuje 11 wyników pozytywnych (wartość Ct przypada pomiędzy 11 a 31 cyklem). Następnie ten sam materiał genetyczny jest analizowany przy użyciu nowej metody. Wyniki przedstawione w Tabeli 22 wskazują na otrzymanie wyników pozytywnych a procent odczytów dopasowanych do sekwencji referencyjnych wynosił od 2% do 80%. Atutem użycia takich próbek do walidacji nowoopracowanej metody jest fakt stosowania metody RT-qPCR jako najczęściej używanej metody diagnostycznej, i z tego względu porównanie wyników otrzymanych w dwóch metodach jest wysoce wartościowe.

Bardzo interesującym podejściem Doktoranta była symulacja koinfekcji wirusowej przy użyciu mieszanin plazmidów kontrolnych i próba jej wykrycia nowoopracowaną metodą. We wszystkich próbkach, zawierających po 1000 kopii genomów każdego z 5 – 6 wirusów, wykryto spodziewane matryce. Jest to przydatne doświadczenie, ze względu na fakt, iż pewien procent zakażeń układu oddechowego ma charakter wirusowego zakażenia mieszanego.

Niezmiernie ważnymi i wartościowymi są wyniki otrzymane w badaniu próbek od pacjentów. Otrzymane rezultaty za pomocą nowoopracowanej metody są zestawione wobec wyników otrzymanych z użyciem testu Respiratory Panel 2.1. w systemie Biofire firmy BioMerieux. Uzyskano całkowitą zgodność wyników w przypadku 10 na 15 analizowanych próbek. Dodatkowo wirusy wykryto, w porównaniu do testu Respiratory Panel 2.1., w trzech

przypadkach. W dwóch próbkach nowa metoda nie zdołała potwierdzić uzyskanych wcześniej wyników. Trudno oczywiście w tym momencie mówić o takich wartościach jak czułość i specyficzność testu diagnostycznego, jednak próbki kliniczne uwiarygodniły to, że zaprojektowane przez Doktoranta sekwencjonowanie w czasie rzeczywistym umożliwia identyfikację zakażeń poszukiwanymi drobnoustrojami.

Dyskusja zawarta na trzynastu stronach napisana jest w sposób klarowny i spójny, dzięki temu jej odbiór nie sprawia trudności. W jej pierwszej części Doktorant przybliżył temat diagnostyki zakażeń górnych dróg oddechowych, kładąc szczególny nacisk na testy oparte o biologię molekularną. Następnie przechodzi do charakterystyki rezultatów otrzymanych dla poszczególnych etapów opracowywanej metody. Można, co prawda, odnieść wrażenie, że zbyt duża część informacji jest powtórzona z rozdziału Wyniki. Trzeba jednak przyznać, że dane te, tym razem, są bardzo umiejętnie wplecione w tekst, jednoznacznie nawiązują do problemu badawczego dysertacji i pozwalają zobaczyć logiczny układ poszczególnych doświadczeń, na czego niedostatek zwracałam uwagę wcześniej. Pan mgr Maciej Kosiński wykazał się tutaj znaczną znajomością omawianej problematyki i umiejętnością analizowania danych oraz zdolnością poszukiwania rozwiązań, co jest ważną cechą w pracy badacza. Doktorant właściwie ocenił wartość diagnostyczną opracowanej metody, potrafił zasugerować w jakim kierunku mogą zmierzać dalsze badania i potencjalne udoskonalenia procedury. Ponadto Doktorant wykazał się zdolnością współpracy z badaczami z innych ośrodków naukowych, zarówno polskich, jak i zagranicznych.

Pracę doktorską kończy 5 poprawnie sformułowanych Wniosków, będących bezpośrednią odpowiedzią na postawiony Cel pracy i założenia jego realizacji.

Podsumowując, wysoko oceniam wartość naukową i aplikacyjną przedstawionej mi do recenzji rozprawy Pana mgr. Macieja Kosińskiego. Moje uwagi krytyczne zawarte w treści recenzji pracy mają w większości charakter porządkowy i zapewne Doktorant ustosunkuje się do najważniejszych z nich.

Na zakończenie chciałabym zadać jeszcze cztery pytania, które nasunęły mi się podczas czytania pracy:

1. We Wstępie opisując szacunkowy udział poszczególnych rodzin wirusów w zakażeniach górnych dróg oddechowych cytuję Pan publikację „The Common Cold” opublikowaną przez Lancet w 2003 roku. Czy ta sytuacja nie zmieniła się/zmieniała się w ostatnich 20 latach? Czy są jakieś dane dotyczące badań prowadzonych w tym zakresie w Polsce, i czy rezultaty odbiegają od tych notowanych w innych krajach? Zdaję sobie sprawę, że śledził Pan na bieżąco literaturę i raporty o zagrożeniach chorobami zakaźnymi. W jaki sposób informacje te były uwzględniane podczas projektowania testu służącego do detekcji poszczególnych wirusów?
2. Podczas opracowywania tej metody podjął się Pan zastosowania takiego rodzaju kontroli, która potwierdziłaby prawidłowość przeprowadzenia wszystkich etapów badania, poczynając od izolacji RNA/DNA, optymalnej amplifikacji, tworzenia biblioteki i samego procesu sekwencjonowania. Zaproponowanym przed Pana genem jest ludzki

gen POTEE, ze względu na jego obecność w różnorodnych tkankach oraz unikalność dla człowieka. Czy jest jakaś przyczyna dlaczego akurat ten gen został wybrany? Czy jest dostępna referencja dotycząca tego genu i jego użycia w powyższym celu, gdyż budzi pewną wątpliwość jego zastosowanie, gdyż spotkałam się z danymi literaturowymi świadczącymi o jego specyficznej ekspresji w tkankach nowotworowych. Interesowałoby mnie również jaką liczbę sparowanych z referencją odczytów dla tego rodzaju genów „kontrolnych” otrzymuje się zwykle w badanych próbkach ?

3. Osobiście nie mam doświadczenia w pracy z ludzkim materiałem, a zdaję sobie sprawę ile zabezpieczeń wymaga moja praca naukowa i diagnostyczna wykorzystująca techniki biologii molekularnej w obszarze weterynarii. Interesuje mnie zagadnienie, jakie dodatkowe, szczególne zasady skutecznej prewencji kontaminacji obowiązują w laboratoriach zajmujących się genetyką ludzką? O pewnym wpływie zanieczyszczeń możemy też mówić w pracy w „laboratorium suchym”. Czy możliwy jest zatem wpływ błędów sekwencjonowania na interpretację wyniku badania i jak tego uniknąć?
4. Stworzył Pan solidne podwaliny dla testu diagnostycznego. Zauważyłam, iż na tym etapie nie ma jednakowego sposobu opisywania, wyrażania wyniku. Interpretacja rezultatów takiego rodzaju badania powinna być w miarę prosta i dla zlecającego badanie i dla pacjenta, oczywiście w przyszłości. Kiedy wynik będzie uznawany za dodatni, ujemny, wątpliwy? Jaki procent pokrycia z sekwencją referencyjną będzie wynikiem dodatnim? Jaka ilość otrzymanych odczytów z sekwencjonowania jest właściwa? Czy może myślał Pan jak taki wynik mógłby wyglądać np. graficznie?

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.187.1. Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz. 1571). Stanowi ona oryginalne osiągnięcie naukowe mgr. Macieja Kosińskiego, wskazując na ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta, a także Jego umiejętność prowadzenia pracy badawczej.

W związku z powyższym przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie Pana mgr. Macieja Kosińskiego do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Puławy, 8.04.2026.

dr hab. Marzena Rola-Łuszczak, prof. PIWet-PIB