

Warszawa, 31 października 2025 r.

Prof. dr hab. Olga Szaluś-Jordanow
Katedra Chorób Małych Zwierząt i Klinika
Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Macieja Kosińskiego

pod tytułem:

„Opracowanie szybkiej metody detekcji wirusowych infekcji dróg oddechowych opartej
na sekwencjonowaniu w czasie rzeczywistym”

Przedstawiona do recenzji rozprawa powstała w Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG i GUMed pod opieką promotora dr hab. Andrei Lipińskiej oraz promotora pomocniczego dr. Łukasza Rąbalskiego.

Podstawę formalną do wykonania niniejszej recenzji stanowi pismo przewodniczącego Rady Dyscypliny Biotechnologia Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed z dnia 01.09.2025r.

Rozprawa dotyczy diagnostyki zakażeń wirusowych układu oddechowego- jednego z

najczęstszych problemów klinicznych u dzieci i dorosłych. W rutynowej diagnostyce dominują szybkie testy płytkowe i RT-qPCR. Choć metody te są powszechnie dostępne i sprawdzone, ich podstawowe ograniczenia są dobrze rozpoznane: obejmują skończoną liczbę celów i trudniej je elastycznie rozszerzać o nowe patogeny lub warianty; ponadto aktualizacja paneli bywa czasochłonna i kosztowna. W praktyce przekłada się to na problemy w różnicowaniu blisko spokrewnionych wirusów, na ograniczoną wykrywalność koinfekcji oraz na wysoki koszt badania. Na tym tle Doktorant trafnie identyfikuje potrzebę opracowania szybszej, bardziej elastycznej i ekonomicznej metody i proponuje rozwiązanie z realnym potencjałem wdrożeniowym.

Praca ma klasyczny, przejrzysty układ i spójną logikę wyводу. Obejmuje streszczenia polskojęzyczne i anglojęzyczne, obszernie wprowadzenie (przeгляд rodzin wirusów układu oddechowego i metod diagnostycznych), jasno sformułowane cele i hipotezę, część „Materiały i metody” (opis próbek, projektowania starterów, przygotowania bibliotek, sekwencjonowania i potoku bioinformatycznego), „Wyniki” (wraz z segmentem walidacyjnym), „Dyskusję”, „Wnioski” oraz kompletne ryciny, tabele i piśmiennictwo. Logika przejść między rozdziałami została dobrze zachowana: od tła i założeń – przez realizację eksperymentalną- po interpretację i implikacje praktyczne. W miejscach, gdzie autor wraca do wiadomości z wprowadzenia (np. ograniczenia RT-qPCR czy zalety ONT), warto zastąpić powtórzenia krótkimi odesłaniami, by skupić dyskusję na wnioskach z własnych badań.

Cele pracy sformułowano jasno i logicznie: opracowanie nowej metody detekcji patogenów wirusowych układu oddechowego, jej optymalizacja oraz walidacja. Hipoteza głosi, że sekwencjonowanie w czasie rzeczywistym (ONT), połączone z odpowiednio zaprojektowanym panelem ampliconów i zautomatyzowanym potokiem analitycznym, umożliwi szybkie i wiarygodne wykrywanie szerokiego spektrum wirusów, w tym koinfekcji oraz patogenów blisko spokrewnionych.

Autor wykorzystał sekwencje referencyjne wirusów z baz NCBI, izolowanych od człowieka (m.in. Adenoviridae, Coronaviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Picornaviridae, Pneumoviridae, Parvoviridae, Poxviridae, Matonaviridae; dla grypy A i B - segmenty PB1 i HA). Dla każdej grupy przeprowadzono dopasowanie

wielosekwencyjne (MAFFT); tam, gdzie konsensus był niepewny, wykonano analizę filogenetyczną (Geneious Tree Builder; model Tamury-Nei; Neighbor-Joining).

Zestawy starterów projektowano w zmodyfikowanym Primer3, przyjmując docelową długość amplikon 450–500 nt. Gdy zmienność sekwencji to wymuszała, stosowano startery zdegenerowane, a pary łączono w mieszanki multipleksowe. Reakcje prowadzono na mieszaninie Q5 według standardowego schematu; produkty weryfikowano elektroforezą, izolowano z żelu („DNA Gel-Out concentrator”), a część amplikonów klonowano do kontroli pozytywnych (wektor liniowy → ligacja → transformacja *E. coli* → selekcja → izolacja plazmidów → trawienia kontrolne). Równolegle, do walidacji czułości i specyficzności, wykonywano odpowiednio RT-qPCR lub qPCR z analizą krzywej topnienia.

Sekwencjonowanie prowadzono metodą nanoporową; w MinKNOW zastosowano ustawienia zgodne z zestawem SQK-RBK110.96, włączono basecalling w trybie wysokiej dokładności i filtr długości >100 nt. Kluczowym elementem jest autorski potok opracowany w Pythonie 3.8, który automatyzuje mapowanie odczytów, składanie kontigów i tworzenie zbiorczego raportu dla każdego indeksu (liczba dopasowań do poszczególnych celów). Zdefiniowano próg pozytywności na podstawie reakcji bez matrycy, co ogranicza ryzyko wyników fałszywie dodatnich i stabilizuje interpretację. Czułość analityczną oceniono na seriach rozcieńczeń kontroli pozytywnych; dla większości celów limit detekcji mieścił się w przedziale 1-100 kopii/reakcję. Wyniki te potwierdzają przydatność metody do zastosowań diagnostycznych, przy czym różnice między celami wynikają z właściwości sekwencji oraz konieczności stosowania starterów zdegenerowanych. Walidacja na materiałach z hodowli wykazała zgodność jakościową z oczekiwanym składem panelu: próbki dawały sygnały właściwych celów, a testy koinfekcji potwierdziły poprawną identyfikację wielu patogenów w mieszaninach (obserwowane różnice udziałów odczytów są spójne z różnicami powinowactwa starterów). Co istotne, ten schemat analityczny pozwolił zidentyfikować epizody kontaminacji materiałem referencyjnym, co dodatkowo podnosi wiarygodność procedury.

W analizie klinicznej przebadano łącznie 15 wymazów z nosogardzieli, porównując

wyniki z systemem zamkniętym stosowanym rutynowo. W większości przypadków uzyskano zgodność; w części próbek sekwencjonowanie wykryło dodatkowe wirusy nieuwzględnione w panelu porównawczym, a w kilku- nie potwierdziło wszystkich sygnałów systemu referencyjnego. Rozbieżności te są zrozumiałe w świetle różnic w doborze regionów docelowych, progów interpretacji oraz logistyki izolacji i przechowywania materiału. Na uwagę zasługuje przewaga rozdzielczości taksonomicznej nowej metody (np. rozróżnienie rinowirusów i enterowirusów), co ma znaczenie praktyczne w interpretacji wyników klinicznych. Należy podkreślić, że liczba zbadanych próbek klinicznych jest ograniczona, jednakże stanowi naturalny punkt wyjścia do dalszej walidacji metody.

Autor trafnie umieszcza wyniki na tle aktualnego piśmiennictwa i technologii (RT-qPCR, ONT). Aby uniknąć powtórzeń, sugeruję, jak wcześniej- w dyskusji odsyłać do sekcji wprowadzającej w miejscach, gdzie wracają ogólne rozważania o zaletach i ograniczeniach metod; pozwoli to skupić narrację na interpretacji uzyskanych wyników, w tym na kwestiach koinfekcji, rozdzielczości taksonomicznej i kontroli kontaminacji. Warto również wyraźniej podkreślić, że zdefiniowany próg pozytywności oparto na analizie tła (reakcje bez matrycy), co jest mocnym elementem pracy i nadaje wynikom stabilność interpretacyjną.

Najważniejsze ograniczenia przedstawionej pracy to:

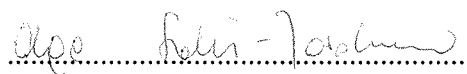
- relatywnie mała liczebność zbadanych próbek klinicznych
- brak ilościowego zestawienia kosztów i czasu procedury „od próbki do wyniku” (z rozbiciem na etapy). Zważywszy, że w celach pracy pojawia się sformułowanie o „szybkiej, ekonomicznej i łatwej” metodzie, dobrym uzupełnieniem byłoby podanie chociaż przybliżonego kosztu zbadania pojedynczej próbki oraz czasu badania dla typowego przebiegu (ekstrakcja → amplifikacja → biblioteka → sekwencjonowanie → analiza), co ułatwiłoby porównanie z RT-qPCR w realiach laboratoriów diagnostycznych.

Tekst pracy jest klarowny i merytorycznie spójny. Przed ostatecznym złożeniem wskazana jest korekta drobnych potknięć:

- w tytule angielskim: „Development of the rapid method...”, nie „od the rapid...”;
- nazwy gatunkowe: *Mycobacterium smegmatis* (zamiast „*smegmantis*”), *Clostridioides difficile* (zamiast „*Clostridiodes*”).

Podsumowując, zaproponowana metodyka łączy ze sobą szybkość uzyskania wyniku bezpośrednio z danych sekwencjonowania, elastyczność panelu ampliconów, wysoką rozdzielczość taksonomiczną (różnicowanie blisko spokrewnionych wirusów). Osiągana czułość analityczna (1-100 kopii/reakcję, w zależności od celu) została potwierdzona na materiałach z hodowli i w próbkach klinicznych. Całość świadczy o wysokiej dojrzałości technicznej rozwiązania i jego potencjale do pilotażowych wdrożeń diagnostycznych.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa mgr Macieja Kosińskiego spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Wnioskuje zatem o dopuszczenie mgr Macieja Kosińskiego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.



podpis