

Gdańsk, dn. 28 października 2025 r.

Recenzja

rozprawy na stopień doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia

mgr Macieja Kosińskiego

„Opracowanie szybkiej metody detekcji wirusowych infekcji dróg oddechowych

opartej na sekwencjonowaniu w czasie rzeczywistym”

Promotor: dr hab. Andrea Lipińska; promotor pomocniczy: dr Łukasz Rąbalski

Zakład Biologii Molekularnej Wirusów oraz Zakład Szczepionek Rekombinowanych,
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu
Medycznego

Praca doktorska została przygotowana w oparciu o finansowanie udzielone przez:

1. firmę Vaxican Sp. z o.o.;
2. Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w formie subwencji dla projektu dr Łukasza Rąbalskiego „Infekcje towarzyszące przy zakażeniach SARS-CoV-2. Baza Infekcji Towarzyszących COVID-19”;
3. Narodowe Centrum Nauki w postaci grantu Opus-20 dla projektu „Właściwości immunomodulacyjne białek koronawirusa SARS-CoV-2” dr hab. Andrei Lipińskiej;
4. Europejskie Archiwum Wirusów – EVAg przyznanego mgr Maciejowi Kosińskiemu.

Recenzent zakłada, że badanie nie wymagało opinii Komisji Bioetycznej, jednak prosi o komentarz Doktoranta w tym zakresie.

Rozprawa doktorska mgr Macieja Kosińskiego **liczy sto siedemdziesiąt osiem stron i ma układ rozdziałów typowy dla prac z zakresu nauk biologicznych i medycznych.** Znaczącą część rozprawy stanowi **obszerny (trzydzieści osiem stron) wstęp**, w którym Doktorant omawia typowe objawy kliniczne i najczęstsze powikłania zakażeń wirusowych górnych dróg oddechowych, najczęstszą etiologię tego typu infekcji wirusowych, metody diagnostyczne obecnie dostępne i stosowane w diagnozowaniu zakażeń wirusowych, rozwój metod sekwencjonowania materiału genetycznego wirusów i ich przydatności w praktyce klinicznej. **Omówienie to przygotowane jest bardzo starannie, syntetycznie i wyczerpująco, a przede wszystkim dowodzi biegłej znajomości tego szerokiego spektrum zagadnień przez Doktoranta.** Recenzent, będący praktykującym klinicystą i na co dzień

korzysta jedynie z gotowych wyników uzyskanych dzięki tym zróżnicowanym biotechnologiom, zapoznał się z tą częścią z dużym zainteresowaniem, chciałby jedynie wskazać, że w części tekstu dotyczącej klasyfikacji wirusowych czynników etiologicznych górnych dróg oddechowych syncytialny wirus oddechowy (RSV) wymieniony jest zarówno w rozdziale dotyczącym rodziny *Paramyxoviridae* jak i rodziny (podrodziny? rodzaju?) *Pneumoviridae*, dlatego Recenzent, prosi tu o komentarz ze strony Doktoranta – pytanie to ma charakter redakcyjny, a nie merytoryczny. Ponadto recenzent w odniesieniu do tabeli 2 prosi o przyjęcie uwagi, że objawy takie jak kaszel, duszność czy bóle w klatce piersiowej mogą wskazywać na rozszerzenie się infekcji wirusowej (lub wtórnej bakteryjnej) na dolne drogi oddechowe, a także wymagają one od lekarza co najmniej starannego zbadania pacjenta stetoskopem i pulsoksymetrem. Zapalenie krtani, tchawicy, oskrzeli i płuc nie są objawami w ścisłym tego słowa znaczeniu, stanowią raczej jakościowo odrębne jednostki chorobowe o poważniejszym rokowaniu, powinny być postrzegane jako powikłania prostej infekcji górnych dróg oddechowych, a do tego potencjalnie mogą zapowiadać wystąpienie kolejnych powikłań infekcji górnych dróg oddechowych, takich jak niewydolność oddechowa, zaburzenia krzepnięcia, zapalenie mięśnia sercowego etc. Rozdzielenie objawów zakażenia górnych dróg oddechowych od ich następstw jest dlatego ważne, że te pierwsze są bardzo powszechne lecz zazwyczaj błahe, natomiast te drugie są znacznie rzadsze choć wiążą się z wyraźnie gorszym rokowaniem, szczególnie u pacjentów z grup podwyższonego ryzyka.

Bardzo ważnym i ambitnym celem pracy było stworzenie szybkiej, taniej, prostej w wykonaniu i wiarygodnej metody równoczesnego wykrywania licznych potencjalnych infekcji górnych dróg oddechowych przy użyciu sekwencjonowania nanoporowego w czasie rzeczywistym, jej optymalizacja i walidacja. Tak sformułowany cel budzi szczerzy szacunek klinicysty, który prosi jedynie o przyjęcie uwagi, iż z punktu widzenia pacjenta docelowo kompletne narzędzie diagnostyczne powinno zawierać również możliwość detekcji wybranych bakterii (paciorkowce!), jednak jest to zadanie na zupełnie odrębną pracę.

Bardzo szczegółowa metodologia badania liczy czterdzieści osiem stron i jest napisana na tyle przystępnie, że recenzent zapoznał się z tą częścią pracy z dużym zainteresowaniem i nie zgłasza do niej jakichkolwiek zastrzeżeń.

Wyniki bardzo żmudnych i szczegółowo przeprowadzonych analiz zajmują trzydzieści osiem stron. W efekcie opracowano metodę jednoczesnego wykrywania zakażeń wirusami RNA jak i DNA poprzez pobranie wymazu z nosogardzieli osób prezentujących objawy infekcji, potencjalnie zarówno dorosłych jak i dzieci, metodą szybkiego sekwencjonowania nanoporowego w czasie rzeczywistym. Jest to system częściowo zautomatyzowany, wykorzystujący do interpretacji wyników

narzędzia bioinformatyczne, a całość procesu kończy się uzyskaniem pliku wynikowego zawierającego informacje o obecności wirusów w pobranym materiale. Opracowana metoda ma bardzo niski próg detekcji na poziomie od jednego do stu wirionów w badanej próbce, zależnie rodzaju wirusa. Ponadto Doktorant **przeprowadził symulację ośmiu koinfekcji w celu potwierdzenia przydatności tej metody diagnostycznej w przypadku obecności nawet 5-6 wirusów jednocześnie** – w efekcie we wszystkich próbkach symulowanej koinfekcji wykryto spodziewane wirusy. Wypada podkreślić, że **sytuacja ta daleko wykracza poza kliniczne oczekiwania dla testu diagnostycznego**: w warunkach *real life* zakażenia górnych dróg oddechowych są monoinfekcjami, sporadycznie mogą być koinfekcją dwóch wirusów, a już wirusowe koinfekcje potrójne są kazuistyką.

Dodatkowo przeprowadzono walidację metody przy użyciu próbek pozyskanych ze szpitala Uniwersyteckie Centrum Kliniczne GUMed z potwierdzoną obecnością wirusów zakażających górne drogi oddechowe badaniem panelu oddechowego Biofire firmy Bio-Mérieux. Porównanie 14 wyników w tabeli 25 (wprawdzie w tekście wspomniano o 15 próbkach...) wykazało, że nowa metoda diagnostyczna w większości potwierdziła pierwotne rozpoznanie, w trzech wykryła dodatkowe patogeny, a w dwóch nie potwierdziła pierwotnego rozpoznania czynnika etiologicznego. Ta część pracy z pewnością wymaga zwiększenia liczby oznaczeń i porównania także z innymi metodami diagnostycznymi, jednak już na obecnym etapie **analiza potwierdziła jej bardzo wysoką czułość i swoistość, najwyraźniej ma ona również wysoką tzw. wartość predykcyjną pozytywną (PPV) a także, zapewne, negatywną (NPV).**

Na liście wybranych do wykrywania wirusów recenzent niestety nie dostrzega wirusów EBV i CMV z rodziny *Herpes*, których pierwotne zakażenie stanowi nierzadką przyczynę dolegliwości migdałków i węzłów chłonnych u dzieci i nastolatków.

Dyskusja liczy trzynaście stron i stanowi skrócone omówienie uzyskanych wyników z odniesieniami do rezultatów podobnych prac zmierzających do opracowania zbliżonych testów diagnostycznych wykrywających czynniki etiologiczne zakażeń górnych dróg oddechowych – przy czym porównania wskazują, że oceniana metoda sekwencjonowania nanoporowego cechuje się licznymi przewagami i generalnie jest lepsza pod względem ceny, szybkości, prostoty wykonania i zakresu wykrywanych czynników etiologicznych.

Doktorant prawidłowo formułuje pięć wniosków odpowiadających celom pracy, będących w istocie ogólnym podsumowaniem wykonanych etapów prac i analiz.

Część poświęcona literaturze tematu liczy 19 stron zawiera aż 174 doniesienia z lat 1976-2025 uszeregowane w kolejności cytowania, prawidłowo dobrane i przytoczone. Dodatkowo praca zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spisy: skrótów, treści, 47 rycin i 25 tabel.

Podsumowując – recenzent wyraża bardzo pozytywną opinię o przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej mgr Macieja Kosińskiego: „Opracowanie szybkiej metody detekcji wirusowych infekcji dróg oddechowych opartej na sekwencjonowaniu w czasie rzeczywistym”. Praca dowodzi rzetelności i biegłości warsztatowej Autora w realizacji badań naukowych i w pełni uzasadnia uzyskanie przez mgr Macieja Kosińskiego stopnia naukowego doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia. Na podkreślenie zasługuje ogrom pracy i duża liczba wielokierunkowych analiz przeprowadzonych w ramach tego badania. W efekcie opracowana metoda diagnostyczna czynników etiologicznych infekcji wirusowych górnych dróg oddechowych wymaga wprawdzie dalszej analizy biznesowej i kosztownych prac wdrożeniowych, jednak pod względem naukowym jest opracowaniem niemal kompletnym, posiadającym wiele zalet rokujących duży potencjał wdrożeniowy. Uwagi krytyczne recenzenta nie stanowią istotnych zarzutów a jedynie mają na celu podniesienie jakości osiągnięcia.

Infekcje górnych oddechowych są bardzo powszechne, wysoce transmisyjne i w swej przytłaczającej większości postrzegane jako błaha, dobrze rokujące nawet pomimo stosowania jedynie leczenia objawowego o skuteczności placebo, gdyż leczenie przyczynowe w większości z nich nie jest dostępne. Opiniowana praca porusza fundamentalny problem lekarzy rodzinnych, specjalistów medycyny ratunkowej i chorób zakaźnych: czy objawy kliniczne prezentowane przez chorego uzasadniają użycie antybiotyku i/lub skierowanie go do leczenia w warunkach oddziału szpitalnego. Przez wieki medycyna wypracowała zasady podejmowania tu trafnych decyzji terapeutycznych przy braku precyzyjnej informacji o czynniku etiologicznym zakażenia górnych dróg oddechowych. **Pora zakończyć w medycynie diagnostyki opartej na „szkiełku i oku” lekarza i przejść do obiektywnych metod diagnostycznych.**

Paradoks polega tu na tym, że brak leczenia przyczynowego nie stymuluje do opracowywania ani zlecenia testów diagnostycznych, gdyż przy braku leczenia przyczynowego testy pozostają same w sobie bez wpływu na losy chorego, natomiast brak testów uniemożliwia realną ocenę odległych szkód zdrowotnych wywoływanych przez te wirusy (zapalenia płuc, stawów i mózgu, kardiomiopatie kończące się przeszczepem serca, zatorowości płucne, kłębkowe zapalenia nerek, zespół Guillaine-Barre etc.) i w efekcie nie ma przesłanek do opracowania leków przeciwwirusowych. Lekarz dysponuje pełnym pakietem interwencyjnym (test, lek, szczepionka) jedynie w odniesieniu do

wirusów grypy i SARS-CoV-2. Niniejsza praca dąży do przełamania tego paradoksu – i dlatego jest tak wartościowa.

Testowanie ma wymiar kliniczny i epidemiologiczny. Wprowadzenie po pandemii COVID-19 łatwego, taniego i szybkiego testowania w gabinecie lekarza rodzinnego w kierunku COVID-19, grypy i RSV w połączeniu z rozwiązaniami informatycznymi umożliwia wręcz śledzenie w czasie rzeczywistym ewolucji epidemii tych zakażeń (<https://ezdrowie.gov.pl/portal/home/badania-i-dane/raport-o-chorobach-zakaznych>). **Zastosowania epidemiologiczne to kolejna potencjalna zaleta recenzowanej pracy.**

Jedyna cecha opracowanej metody sekwencjonowania nanoporowego, która potencjalnie może ograniczyć jej zastosowanie w praktyce klinicznej to brak w obecnej formie możliwości wykonania tego badania przy łóżku chorego (sekwencjonowanie nanoporowe nie jest testem typu *point-of-care* ze względu na konieczne oprzyrządowanie), czyli fakt iż badanie musi być przeprowadzane w placówce diagnostycznej, a nie ściśle medycznej.

W opinii recenzenta rozprawa doktorska mgr Macieja Kosińskiego „Opracowanie szybkiej metody detekcji wirusowych infekcji dróg oddechowych opartej na sekwencjonowaniu w czasie rzeczywistym” stanowi oryginalną odpowiedź na realny i bardzo powszechny problem codziennej praktyki lekarza rodzinnego i daje rzetelne rozwiązanie tego problemu, a więc wypełnia wymogi art. 187 Ustawy z dnia 18 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742), dlatego recenzent wnioskuje do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie tej rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

GDANSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
Wydział Lekarski
Klinika Chorób Zakaźnych
81-519 Gdynia
ul. Powstania Styczniowego 9b
tel./fax 58 349 15 88 kchz@gumed.edu.pl

KIEROWNIK
Kliniki Chorób Zakaźnych GUMed

dr hab. n. med. Tomasz Smiatacz