

Lublin, 12-01-2016

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej p. mgr inż. PIOTRA CIEŚLIKA

pt. "Charakterystyka molekularna szczepów *Francisella tularensis* wyizolowanych z próbek klinicznych i środowiskowych za pomocą metody real-time PCR i Multispacer Typing"

przedłożonej Radzie Naukowej Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii

im. Gen. Karola Kaczkowskiego w Warszawie

w celu uzyskania stopnia doktora

### 1. Charakterystyka rozprawy

Choroby odzwierzęce (zoonozy) stanowią istotny problem zdrowia publicznego, zwłaszcza w aspekcie ochrony zdrowia pracowników leśnictwa i rolnictwa. Badania nad zoonozami mają również istotne znaczenie dla obronności kraju, ze względu na realną możliwość użycia niektórych patogenów wywołujących te choroby jako broni biologicznej. Do takich patogenów należy pałeczka *Francisella tularensis* wywołująca tularemię, która była w XX wieku w Polsce przedmiotem intensywnych studiów, prowadzonych głównie przez zespoły prof. Skrodzkiego i prof. Bileckiego, ale już od wielu lat jest badana w naszym kraju tylko sporadycznie, a liczby przypadków tej choroby rejestrowane corocznie w naszym kraju są według wszelkiego prawdopodobieństwa znacznie niedoszacowane. W świetle tych faktów na szczególne uznanie zasługuje podjęcie odkrywczego tematu z tej problematyki przez p. mgr inż. PIOTRA CIEŚLIKA w Jego rozprawie doktorskiej wykonanej pod kierunkiem Pana Profesora dr hab. Józefa P. Knapa, który jest wybitnym autorytetem w dziedzinie chorób odzwierzęcych.

Recenzowana praca została przedstawiona w postaci oprawionego wydruku komputerowego. Wyróżnia się ona estetyczną formą, znakomitym opracowaniem graficznym i logicznym, przejrzystym układem, spełniającym we wszystkich szczegółach wymagania stawiane pracom doktorskim. Napisana jest bardzo dobrym stylem, nienaganną polszczyzną. Praca liczy ogółem 183 strony, w tym 116 stron części podstawowej i 67 stron Załącznika nr 1, przedstawiającego sekwencje nukleotydowe badanych przez Autora szczepów *F. tularensis*. Zawiera 22

tabele oraz 21 rycin w części podstawowej oraz 34 ryciny w Załączniku nr 1. Rozprawa poprzedzona jest bardzo dobrze napisanym Streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz Spisem Treści.

W pierwszym rozdziale rozprawy zatytułowanym „Wstęp”, Autor przedstawia w dziewięciu doskonale napisanych podrozdziałach współczesny stan wiedzy na temat właściwości bakterii z gatunku *Francisella tularensis* oraz patologii, leczenia, epidemiologii i diagnostyki laboratoryjnej tularemii, ze szczególnym uwzględnieniem najnowszej problematyki z zakresu biologii molekularnej. Poszczególne zagadnienia opisuje On w sposób zwięzły, a zarazem perfekcyjnie dokładny i interesujący dla czytelnika. Doktorant wykazuje przy tym rzadko spotykaną erudycję i dogłębną znajomość piśmiennictwa naukowego z zakresu omawianej problematyki. W moim przekonaniu rozdział ten może stanowić podstawę do znakomitego opracowania monograficznego tularemii w świetle współczesnego stanu wiedzy.

W rozdziale drugim „Materiał i Metody” p. mgr inż. PIOTR CIEŚLIK prezentuje w formie tabelarycznej bardzo dokładny i przejrzysty opis bogatego materiału badawczego w postaci 49 szczepów muzealnych *F. tularensis* pochodzących z kolekcji Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni, które Autor namnożył w celu izolacji DNA i dokonania charakterystyki genetycznej. Spośród badanych szczepów, 15 pochodziło z Polski, a pozostałych 34 – z 10 różnych krajów z terenu Europy, Ameryki i Azji. Były one izolowane z różnych źródeł: zajęcy, drobnych gryzoni, jelenia, kleszczy, pcheł, a także z próbek materiału klinicznego pobranego od ludzi. Ponadto, w celu oceny specyficzności i czułości oraz optymalizacji zastosowanych testów genetycznych, Autor przebadiał próbki DNA pochodzące od 6. szczepów referencyjnych bakterii z rodzaju *Francisella* oraz 15. szczepów należących do 10 innych rodzajów bakterii patogennych pochodzących z kolekcji Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii. Do celów porównawczych wykorzystał On również sekwencje 9. szczepów referencyjnych *F. tularensis* zdeponowane w National Center for Biotechnology Information (NCBI) w USA. Zastosowanie tak szerokiej kontroli umożliwiło interpretację uzyskanych wyników w szerokiej perspektywie i wystawia jak najlepsze świadectwo rzetelności naukowej Autora.

Charakterystykę genetyczną badanych szczepów Autor przeprowadził za pomocą dwóch testów, z których pierwszy miał na celu określenie podgatunku *F. tularensis* metodą PCR czasu rzeczywistego (real-time PCR), natomiast drugi – oznaczenie genotypu metodą Multispacer Typing (MST), polegającej na określeniu sekwencji nukleotydów w przestrzeniach międzygenowych S1-S4. Na duże uznanie zasługuje twórcza inwencja Autora w

przygotowaniu i wystandaryzowaniu metodyki zastosowanych testów. Zaprojektował On samodzielnie oligonukleotydy starterowe oraz sondy hydrolizujące do testów i określił optymalne profile termiczne i składki mieszanin reakcyjnych. Wykazał także godną pochwały inwencję i dokładność w określeniu specyficzności i czułości metody PCR czasu rzeczywistego, oznaczając czułość dwoma metodami: w stosunku do izolowanego DNA oraz zawiesiny komórek *F. tularensis*. Wartość oznaczeń podnosi wnikliwa analiza statystyczna.

W kolejnym, krótkim rozdziale zatytułowanym "Cel pracy" p. mgr inż. PIOTR CIEŚLIK precyzuje w sposób zwięzły dwa powiązane ze sobą cele swojej rozprawy pracy doktorskiej. Pierwszym z nich jest hodowla szczepów *F. tularensis* pochodzących z Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni, natomiast drugim, podstawowym celem jest charakterystyka genetyczna izolatów za pomocą wspomnianych wyżej metod PCR-u czasu rzeczywistego i genotypowania metodą MST, oraz analizy otrzymanych profili genetycznych za pomocą sekwencjonowania.

W czwartym rozdziale recenzowanej rozprawy zatytułowanym "Wyniki", p. mgr inż. PIOTR CIEŚLIK prezentuje uzyskane przez siebie wyniki w sposób klarowny i logiczny w trzech podrozdziałach, ilustrując je licznymi tabelami i rycinami, przejrzystymi i znakomicie opracowanymi pod względem graficznym. W pierwszym podrozdziale zatytułowanym „Real-time PCR” Autor przedstawia wyniki wzorowo i wnikliwie przeprowadzonych analiz mających na celu ocenę specyficzności i czułości zastosowanej przez Niego metody PCR-u czasu rzeczywistego. Stwierdził On zarówno wysoką specyficzność metody (brak reakcji krzyżowych), jak i niezwykle wysoką czułość, na poziomie 10 fg/μl DNA, pozwalającą na wykrycie 4,83-4,9 kopii genomu *F. tularensis*. W kolejnym, drugim podrozdziale Autor prezentuje wyniki badań 49 muzealnych szczepów *F. tularensis* za pomocą wystandaryzowanej metody PCR czasu rzeczywistego, pozwalającej na sklasyfikowanie szczepu w obrębie jednego z czterech podgatunków. Okazało się, że wszystkich 15 szczepów pochodzących z Polski i 29 spośród 34 szczepów pochodzących z różnych krajów świata (85,3% tej podgrupy) należało do mniej wirulentnego podgatunku *F. tularensis* subsp. *holarctica*, podczas gdy tylko 5 szczepów zagranicznych (14,7% tej podgrupy) należało do bardziej wirulentnego podgatunku *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Badania 19 szczepów należących do innych gatunków z rodzaju *Francisella* oraz do innych rodzajów patogennych bakterii dały wynik ujemny, potwierdzając wysoką specyficzność metody.

W ostatnim, trzecim podrozdziale rozdziału „Wyniki” p. mgr inż. PIOTR CIEŚLIK prezentuje przedstawiającą wysoką wartość naukową charakterystykę molekularną badanych szczepów *F. tularensis* w oparciu o wyniki genotypowania metodą MST. Charakterystyka ta wykazała wysoką zmienność genetyczną badanych izolatów. Wśród 15 szczepów pochodzących z Polski, Autor wykrył 3 znane genotypy i 5 nowych, wśród szczepów pochodzących z innych krajów – 9 znanych i 11 nowych, a wśród referencyjnych szczepów – 3 znane i 7 nowych. W sumie Doktorant wykrył i dokładnie scharakteryzował 23 nowe, nieznane do tej pory genotypy *F. tularensis*, co jest znaczącym osiągnięciem naukowym. Nowe warianty alleliczne Autor wykrywał w sumie najczęściej w sekwencji międzygenowej S1 (w 23 szczepach), rzadziej w sekwencji S2 (w 15 szczepach), S3 (w 10 szczepach) i S4 (w 11 szczepach). Niektóre nowe allele były wspólne dla większej liczby szczepów, na przykład wariant S4.N2 został wykryty aż w ośmiu szczepach *F. tularensis*. Bardzo wysoką wartość ma skonstruowany przez Doktoranta przy użyciu najnowszych technik genetycznych kladogram (rycina 21) ilustrujący stopień podobieństwa pomiędzy genotypami badanych przez Niego szczepów *F. tularensis*, a wcześniej opisanymi genotypami tego gatunku bakterii. Świadczy on o perfekcyjnym opanowaniu przez Autora technik współczesnej genetyki.

W rozdziale piątym zatytułowanym „Omówienie i Dyskusja” Autor omawia problem zróżnicowania genetycznego *F. tularensis* i metody stosowane do badania tej zmienności na tle zebranego przez siebie bogatego piśmiennictwa, porównując wyniki własne z rezultatami uzyskanymi przez wcześniejszych autorów. Wykazuje przy tym ponownie bardzo głęboką wiedzę w zakresie genetyki, mikrobiologii i epidemiologii. W końcowej części tego rozdziału Autor wskazuje na przydatność zastosowanych przez siebie metod do dokonywania charakterystyki genetycznej szczepów *Francisella tularensis*, i postuluje – jak najbardziej słusznie – potrzebę przeprowadzenia za pomocą tych metod badań szczepów izolowanych współcześnie z terenu Polski. Stanowiłoby to niezmiernie interesującą kontynuację przedstawionych w recenzowanej rozprawie badań Autora nad szczepami izolowanymi w większości przypadków kilkadziesiąt lat temu i stworzyłoby szansę uchwycenia kierunków ewolucji pałeczki tularemii na terenie Polski i Europy. W rozdziale szóstym zatytułowanym „Wnioski” p. mgr inż. PIOTR CIEŚLIK prezentuje trzy trafne i bardzo dobrze uzasadnione wnioski wypływające z Jego rozprawy doktorskiej. Dostarczają one pełnej odpowiedzi na cele rozprawy sformułowane przez Doktoranta w trzecim rozdziale recenzowanej pracy. Szóstym rozdziałem rozprawy jest spis bardzo bogatego piśmiennictwa, obejmujący 184 pozycje, w ogromnej większości najnowsze, opublikowane w XXI wieku (151 pozycji, ponad 82% całości).

Bardzo cenne informacje naukowe zawarte są w „Załączniku Nr. 1”, który stanowi ósmą część rozprawy. Obejmuje on 34 precyzyjnie wykonane ryciny ilustrujące na 67 stronach wykryte przez Autora w poszczególnych szczepach *F. tularensis* nowe warianty alleliczne, kolejno dla poszczególnych sekwencji międzygenowych S1, S2, S3 i S4. Autor ilustruje bardzo czytelnie, przy użyciu markera kolorowego, zmiany nukleotydowe w sekwencji DNA wszystkich szczepów, w których wykrył - w różnych kombinacjach - nowe warianty alleliczne i które tym samym zostały sklasyfikowane jako nowe genotypy *F. tularensis*. Zmiany te są we wszystkich przypadkach porównywane ze szczepem wzorcowym i innymi badanymi szczepami. W sumie Załącznik ten jest przykładem doskonałej dokumentacji rozprawy naukowej, która może służyć za wzór dla podobnych prac z dziedziny biologii molekularnej. Stanowi on bardzo cenną pomoc dla każdego, kto chciałby wykonać podobne badania.

## 2. Sumaryczna ocena rozprawy

Pan mgr inż. PIOTR CIEŚLIK podjął w swojej rozprawie doktorskiej ambitny i nowatorski temat mający na celu dokonanie wszechstronnej charakterystyki genetycznej grupy szczepów *Francisella tularensis* pochodzących z różnych źródeł i z tego zadania wywiązał się znakomicie. Praca została zaplanowana w sposób bardzo staranny i logiczny, wykonana rzetelnie na dużym materiale przy zastosowaniu właściwej metodyki, obejmującej najnowsze techniki z zakresu biologii molekularnej i przyniosła oryginalne, nowe dla nauki wyniki, które Doktorant wnikliwie zinterpretował, posługując się swoją obszerną wiedzą z dziedziny genetyki, mikrobiologii i nauk pokrewnych.

Rozprawa doktorska p. mgr inż. PIOTRA CIEŚLIKA reprezentuje bardzo wysoką wartość naukową i w pełni zasługuje na miano pracy odkrywczej, stanowiącej istotny wkład do nauki światowej.

Po pierwsze, Autor dokonał po raz pierwszy w Polsce wszechstronnej genetycznej charakterystyki szczepów *Francisella tularensis*, wykazując przydatność do tego celu wystandaryzowanych przez siebie metod: PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) i Multispacer Typing (MST). Autor wykorzystał tu bezbłędnie zalety metody MST, przy zastosowaniu której wykrywano sekwencje nukleotydowe regionów międzygenowych, wykazujące wysoką zmienność.

Po drugie, według mojej wiedzy opartej na sprawdzeniu źródłowych prac cytowanych przez Autora, grupa szczepów *F. tularensis* przebadanych przez Doktoranta metodą MST jest najbardziej zróżnicowana spośród

wszystkich grup szczepów tej bakterii przebadanych dotąd na świecie i to zarówno pod względem źródła izolacji, jak i kraju pochodzenia. I tak, nie tylko obejmuje ona po raz pierwszy izolaty z terenu Polski, stanowiące dużą grupę 15 szczepów izolowanych z różnych źródeł (ludzie, zające, gryzonie, kleszcze), ale również z terenu 10 innych krajów, w większości nie badanych przez dotychczasowych autorów, którzy skupili się na badaniu izolatów ze Szwecji i Francji (La Scola i wsp. 2008, Li i wsp. 2011). Wykryte przez Autora znaczne zróżnicowanie genetyczne szczepów *F. tularensis* wyizolowanych z różnych źródeł w Polsce, wskazuje na utrzymywanie się pałeczki tularemii w różnych rezerwuarach zwierzęcych, które mogą być zakażone różnymi drogami.

Po trzecie wreszcie, Autor wykrył i wszechstronnie scharakteryzował 23 nowe, nie znane dotąd genotypy *F. tularensis*, co samo w sobie jest znacznym i oryginalnym osiągnięciem naukowym na skalę międzynarodową.

Należy również podkreślić, że rozprawa p. mgr inż. PIOTRA CIEŚLIKA ma nie tylko duże znaczenie poznawcze, ale również aplikacyjne. Dostarcza ona, w postaci trafnie wybranych i wystandaryzowanych przez Autora do potrzeb diagnostyki genetycznej tularemii metod (PCR w czasie rzeczywistym i Multispacer Typing), wiarygodne narzędzia badawcze o wysokiej czułości i swoistości, które mogą znaleźć zastosowanie do szybkiej identyfikacji źródła i dróg rozprzestrzeniania pałeczki tularemii w przypadku ataku bioterrorystycznego lub epidemii powstałej w warunkach naturalnych w wyniku narażenia zawodowego lub innych przyczyn. Wyniki genotypowania według metodyki zastosowanej przez Autora mogą być przydatne również w profilaktyce i leczeniu tularemii. Przykładem potencjalnego znaczenia użytych technik genetycznych do identyfikacji źródła zakażenia może być wykazanie przez Autora wysokiego stopnia podobieństwa pomiędzy dwoma izolatami *F. tularensis* z terenu Polski, z których jeden pochodził od człowieka, a drugi od zająca. Wskazuje to z wysokim prawdopodobieństwem na zakażenie w wyniku kontaktu z zającem.

W mojej ocenie praca nie zawiera błędów rzeczowych, błędów metodycznych czy kontrowersyjnych sformułowań. W trakcie uważnej lektury znalazłem w niej niewielką liczbę błędów drukarskich (tak zwanych literówek) lub drobnych usterek, które przytoczę w kolejności tekstu: • strona 9, wiersz 13: powinno być „MATERIAŁY”; • s. 16, w. 1: powinno być „charakterystyczną”; • s. 24, w. 8 i 10 od dołu: powinno być „atenuowane”; • s. 29, w. 6 od dołu: jest tu odwołanie do ryciny „XXC”, która nie występuje; • s. 47, w. 14: powinno być „turystów”; • s. 53, w. 4: powinno być „charakterystyki”; • s. 55, w. 10: powinno być „Tabela 5” zamiast „Tabela 1”; • s. 55, w. 21: powinno być „*F. cantonensis* CCUG 60119” zamiast „*F. tularensis* subsp.

*novicida* FSC156”; • s. 56, Tab. 5, w. 5 od dołu: powinno być: „*Haemaphysalis*”; • s. 57, w. 2-4 od dołu: można było zrezygnować z wymienienia szczepów podanych wcześniej na s. 55, w. 1-4 od dołu; • s. 60, w. 7: jest tu niepotrzebne odwołanie do „Tabeli 3”; • s. 72, w. 3: powinno być „Tabela 18” zamiast „Tabela 5”; • s. 75, w. 7: powinno być „Tabela 15, 16, 17, 18” zamiast „Tabela 11, 12, 13, 14”; • s. 75, w. 18: użycie wyrażenia „typ B *F. tularensis*” jest prawidłowe, ale dla zachowania jedności z Tabelą 19 lepiej byłoby użyć synonimu „*F. tularensis* subsp. *holarctica*”; • s. 76, Tab. 19, oraz s. 80, Tab. 21, poz. 28 i poz. 30: w obu tabelach: powinno być odpowiednio „*F. tul. tularensis* Schu” i „*F. tul. holarctica* Jap. Downs”; • s. 78, Tab. 20, poz. 11, poz. 14, poz. 19: powinno być: „*burnetii*”, „*Listeria*”, „*enterocolitica*”; • s. 79, w. 4-5: można było opuścić symbole szczepów, ponieważ podane są one dalej na stronie 81, w. 2-3 od dołu; • s. 82, w. 8: należało dodać „ST28 (szczep Schu)”; • s. 82, w. 18: należało dodać „ST.N23 (U112)”; • s. 87, w. 19: Autor podaje wartość ekwiwalentu genomowego (GE) dla *F. mediasiatica* równą 3,83 GE, podczas gdy z Tab. 17 na s. 72 wynika, że wynosił on 4,9 GE; • s. 89, w. 21-22: powinno być „Jednakże”, „stwierdzili”, „wspomnianych”; • s. 96, w. 3-5 od dołu: Autor podaje, że wśród badanych przez Niego 15 szczepów *F. tularensis* z terenu Polski było 6 szczepów wyizolowanych z zajęcy i 4 z kleszczy *Ixodes ricinus*, podczas gdy z Tabeli 5 na s. 55-56 wynika, że takich szczepów było odpowiednio 8 i 3; • s. 141, podpis pod Ryc. 12: powinno być „Japoński Downs” zamiast „Japoński Biały”.


Pragnę w tym miejscu podkreślić z całą mocą, że powyższe uwagi dotyczą drugoplanowych szczegółów, które w żadnym razie nie obniżają bardzo wysokiej oceny recenzowanej rozprawy.

Podsumowując, rozprawa doktorska p. mgr inż. PIOTRA CIEŚLIKA jest pozycją bardzo wartościową, perfekcyjnie wykonaną i stanowiącą znaczący, oryginalny wkład do nauki. Świadczy ona o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktoranta i Jego głębokiej wiedzy teoretycznej i praktycznej w zakresie genetyki, mikrobiologii, epidemiologii i nauk pokrewnych. Wnikliwe i stojące na wysokim poziomie naukowym opracowanie charakterystyki molekularnej szczepów *Francisella tularensis* pochodzących z Polski i wielu innych krajów sprawia, że w mojej ocenie praca ta może stanowić podstawę do co najmniej trzech publikacji w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym lub w innych wydawnictwach naukowych stojących na odpowiednim poziomie.

### 3. Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska p. mgr inż. PIOTRA CIEŚLIKA pt. "Charakterystyka molekularna szczepów *Francisella tularensis* wyizolowanych z próbek klinicznych i środowiskowych za pomocą metody real-time PCR i Multispacer Typing" spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z tym, stawiam pod adresem Wysokiej Rady Naukowej Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii im. Gen. Karola Kaczkowskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie p. mgr inż. PIOTRA CIEŚLIKA do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na szczególną wartość naukową recenzowanej rozprawy wnioskuję o przyjęcie jej z wyróżnieniem. Wniosek o wyróżnienie uzasadniam następująco: Rozprawa p. mgr inż. PIOTRA CIEŚLIKA ma walor odkrywczy i stanowi oryginalny wkład do nauki światowej. Doktorant dokonał po raz pierwszy w Polsce wszechstronnej genetycznej charakterystyki szczepów *Francisella tularensis*, wykazując przydatność do tego celu wystandardyzowanych przez siebie metod: PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) i Multispacer Typing (MST). Grupa szczepów *F. tularensis* przebadanych przez Doktoranta metodą MST jest najbardziej zróżnicowana spośród wszystkich grup szczepów tej bakterii przebadanych dotąd na świecie i to zarówno pod względem źródła izolacji, jak i kraju pochodzenia. Oryginalnym osiągnięciem Autora jest również wykrycie i wszechstronne scharakteryzowanie 23. nowych, nie znanych dotąd genotypów *F. tularensis*. Rozprawa p. mgr inż. PIOTRA CIEŚLIKA ma również istotny walor aplikacyjny, ponieważ dostarcza wiarygodne narzędzie badawcze do identyfikacji źródła i dróg rozprzestrzeniania pałeczki tularemii w przypadku ataku bioterrorystycznego lub epidemii powstałej w wyniku narażenia zawodowego. Rozprawa została przygotowana bardzo rzetelnie przy zastosowaniu nowatorskiej metodyki, odznacza się nienaganną prezentacją wyników i wzorową dokumentacją.

  
Prof. dr hab. Jacek Dutkiewicz  
Instytut Medycyny Wsi w Lublinie