

Warszawa, dn.08.02.2016 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej 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”

Ostatnia dekada przyniosła szereg nowych problemów w obszarze chorób zakaźnych i zakażeń. Niewątpliwie na skutek wielu czynników doszło do przesunięcia barier klimatycznych a także gatunkowych dla wielu patogenów. Uwagę zwraca wzrost zakażeń odzwierzęcych. Niektóre z nich stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego ze względu m.in. na wysoką zjadliwość, inwazyjność, niską dawkę letalną, trudności w hodowli i identyfikacji a także brak skutecznego leczenia i wystarczająco skutecznych metod profilaktyki. Te cechy powodują, że spośród nich wywodzą się gatunki/szczepy stosowane w broni biologicznej.

Francisella tularensis należy do tej właśnie grupy drobnoustrojów. Ponadto, wywołuje zakażenia u bardzo wielu gatunków zwierząt skąd przenoszona jest na człowieka. Istnieje więc szeroki rezerwuar tego patogenu. Obraz kliniczny zależy w dużej mierze od postaci klinicznej, ogromnie zróżnicowanej a więc trudnej w diagnozie. Epidemiologia zakażeń *F. tularensis* w Polsce jest słabo rozpoznana i opiera się głównie na badaniach serologicznych, których wiarygodność jest często podważana ze względu na ogromne zróżnicowanie w obrębie gatunku i szereg nieswoistych reakcji krzyżowych.

W związku z powyższym wybór tematu jest ważny i aktualny zarówno ze względów poznawczych jak i aplikacyjnych i wpisuje się w wiodącą, w tym zakresie, tematykę na świecie.

Przedstawiona mi do oceny Rozprawa liczy 183 strony i ma charakter typowy (książkowy).

Wstęp zawarty jest na 44 stronach i podzielony na podrozdziały co znacząco ułatwia czytanie. Pierwsza część historyczna przedstawia w sposób ciekawy odkrycie *F. tularensis*, losy taksonomii tego drobnoustroju a także zróżnicowanie i ustalenie podgatunków.

W kolejnych rozdziałach starannie omówiono taksonomię, morfologię, sposoby hodowli i identyfikacji oparte przede wszystkim do dnia dzisiejszego na testach biochemicznych a także cechy, które pozwalają na długotrwałe utrzymywanie się tego drobnoustroju w środowisku. Ważną część wstępu stanowi charakterystyka zsekwencjonowanych

genomów *F. tularensis* co pozwala na śledzenie zmian ewolucyjnych a także pokazuje obecność wielu elementów inercyjnych z pewnością za to także odpowiedzialnych. Część ta ściśle łączy się z kolejnymi, ważnymi podrozdziałami nt tego drobnoustroju jako czynnika broni biologicznej, opracowanych szczepionek a przede wszystkim nt patomechanizmu zakażeń wywoływanych przez ten drobnoustrój. Ta ostatnia tematyka zasługuje na szczególne wyróżnienie a jej szczegółowe potraktowanie pokazuje różnorodne strategie uruchomiane przez *F. tularensis* celem wywołania zmian chorobowych. Kolejny bardzo ciekawy podrozdział, przydatny z punktu widzenia praktycznego, omawia różne postaci zakażeń *F. tularensis* i charakterystyczne dla nich objawy. Wydaje mi się, że bardziej adekwatnym dla niego tytułem byłby .. Postacie kliniczne.. zamiast przedstawionego ..Patogenność *F. tularensis*, która została podana w poprzedzającym podrozdziale. Schematy leczenia podane wg WHO2007 dotyczą zarówno dorosłych jak i dzieci oraz kobiety ciężarne. Doktorant uwzględnia pacjentów z zaburzeniami układu immunologicznego a nie wspomina o tych, którzy mają niewydolność nerek i/lub wątroby, zwłaszcza, że standardowa terapia wykazuje toksyczność wobec tych dwóch narządów. Nie wspomina także o chloramfenikolu, który może stanowić opcję terapeutyczną u dzieci z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych. Niemniej jednak, pomimo, że doktorant nie jest medykiem, omówił wszystkie najważniejsze leki stosowane w terapii tularemii, różnicując między przypadkami sporadycznymi a powstałymi na skutek masowego ataku.

Kolejny, bardzo obszerny rozdział dotyczy epidemiologii zakażeń *F. tularensis*. Omówiona została w nim szczegółowo sytuacja w Polsce, z rozbiciem na województwa i opis przypadków. To bardzo wartościowa część rozprawy. Doktorant podzielił przypadki na dwie powojenne grupy. Szczególnie ciekawe dane pokazał dla lat 1996-2014, a więc bardzo aktualne. Wskazał, rozszerzanie się terenów występowania *F. tularensis* na południe naszego kraju ciągłego wzrostu liczby odnotowywanych przypadków. Szkoda, że Doktorant nie pokusił się o próbę skomentowania tego zjawiska. Czy mamy do czynienia faktycznie ze wzrostem?, czy lepsza wykrywalnością, czy też innymi uwarunkowaniami?

Po przedstawieniu sytuacji epidemiologicznej w Polsce Doktorant szeroko omawia epidemiologię *F. tularensis* w krajach UE a także w innych Europy i spoza niej. Przedstawia szczegółowo sytuację w wybranych krajach i uzasadnia, co jest bardzo ważne, wzrost przypadków tularemii w połączeniu np. w Hiszpanii ze wzrostem populacji nornika zwyczajnego. Wskazuje, na przykładzie analizy epidemiologicznej przeprowadzonej w USA,

na zależność między rozległością rezerwuaru środowiskowego a liczbą występujących przypadków tularemii u ludzi.

Ostatnim ogromnie ważnym tematem Wstępu rozprawy jest diagnostyka laboratoryjna *F. tularensis*. Opisuje zarówno metody fenotypowe, serologiczne jak i molekularne, podkreślając ogromną wagę tych ostatnich. Umożliwiają wykrycie materiału genetycznego *F. tularensis* zarówno w materiale klinicznym jak i środowiskowym w bardzo krótkim czasie a także pozwalają na różnicowanie w obrębie gatunku. Znajdują także coraz szersze zastosowanie w dochodzeniach epidemiologicznych.

W podsumowaniu tej części rozprawy pragnę podkreślić wszechstronność zebranych danych na temat *F. tularensis* i to zarówno dotyczącą biologii drobnoustroju, jego patogenności jak i metod rozpoznawania, leczenia i profilaktyki.

Wprawdzie w Rozprawie Cel Pracy umieszczony jest po Materiałach i Metodach ale uważam, że powinien znaleźć się przed nimi, zresztą we wszystkich recenzowanych przeze mnie dysertacjach, tak właśnie było. Ułatwia to ocenę poprawności zastosowanych metod.

Cel Rozprawy jest dobrze uzasadniony a proponowane metody są nowoczesne i dotychczas w Polsce niestosowane w badaniach nad *F. tularensis*.

W Materiałach i Metodach Doktorant szczegółowo opisał źródło, rok izolacji i miejsce pochodzenia badanych szczepów. Uzyskane one zostały zarówno od ludzi jak i zwierząt (środowisko), dla wielu brak było pełnej charakterystyki. Były to szczepy z kolekcji zarówno wyizolowane w Polsce jak i w wielu innych krajach. Do kontroli włączono szczepy referencyjne.

Na podkreślenie zasługuje zaprojektowanie własnych sekwencji starterowych i sond hybrydacyjnych na podstawie przeanalizowania sekwencji pełnych genomów czterech podgatunków *F. tularensis* dostępnych w bazie danych GenBanku. Dokonano optymalizacji reakcji real-time PCR a także oceniano czułość opracowanej metody. Dokonano następnie sekwencjonowania i przeprowadzono analizę bioinformatyczną uzyskanych sekwencji. Przeprowadzono molekularną analizę epidemiologiczną 15 szczepów z woj. zachodniopomorskiego (d. szczecińskie) pochodzących z różnych lat zarówno od ludzi jak i zwierząt.

Wyniki są czytelnie przedstawione w postaci tabel (n=8) i rycin (n=12) i ich przejrzystego komentarza. Na zakończenie rozprawy przedstawiono wyniki sekwencjonowania (ponad 60 stron).

Wykazano specyficzność zastosowanej metody dla poszczególnych podgatunków, pokazując brak reakcji krzyżowych. Dotyczyło to także gatunków daleko spokrewnionych z *F. tularensis*. Wykazano wysoką czułość opracowanej metody na poziomie 10fg/ul DNA, a dla kopii genomu na poziomie 4,9 GE. Była ona taka sama bądź bardzo podobna dla wszystkich czterech podgatunków *F. tularensis*.

Dzięki zastosowanej metodzie real-time PCR udało się sklasyfikować badane szczepy i okazało się, że spośród nich wiodącym podgatunkiem jest *F. tularensis* subsp. *holarctica* a drugim co do częstości *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Wśród pozostałych szczepów stwierdzono obecność typu B *F. tularensis*, a także innych tego podgatunku jak *F. tularensis* subsp. *novicida* i *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*. Przy zastosowaniu tej metody nie stwierdzono reakcji niespecyficzných wobec zarówno blisko spokrewnionych jak i odległych filogenetycznie szczepów bakteryjnych.

Wyniki ważne dla celów analizy i dochodzenia epidemiologicznego uzyskano dzięki zastosowaniu metody MST (Multispacer Typing), która umożliwiła głębszą analizę genetyczną badanych szczepów. Wykazano, że ST6 jest genotypem dominującym wśród polskich szczepów *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Stwierdzono także obecność genotypów ST6 oraz ST27 a także udało się zidentyfikować genotypy dotychczas nieopisywane. Na uwagę zasługuje fakt, że dzięki zastosowanej metodzie MST udało się wśród szczepów zdeponowanych w kolekcji ODiZZB WIHiE w Puławach, wykryć nieopisane dotychczas genotypy *F. tularensis*. Także dokonano identyfikacji nowych ST w kolekcjach pochodzących z innych źródeł.

Ponadto stwierdzono nowe allele zarówno w sekwencji międzygenowej S3 jak i w sekwencji genowej S4.

Na zakończenie rozdziału Wyniki Doktorant umieścił kladogram, porządkujący uzyskane wyniki i przedstawiający zależność oraz podobieństwo pomiędzy genotypami badanych szczepów a wcześniej opisanymi.

Dyskusja obejmuje wszechstronną analizę wyników badań własnych na tle opublikowanych w literaturze światowej. Wskazuje na ciągle fragmentaryczne informacje dotyczące zagrożeń ze strony *F. tularensis*. Uzasadnia to trudnymi warunkami hodowli i identyfikacji. Odnosi się, przytaczając szeroką literaturę do cech tego drobnoustroju pozwalających go zaliczyć do potencjalnych składników broni biologicznej. Doktorant podkreśla konieczność stosowania wiarygodnych metod molekularnych celem szybkiej identyfikacji nie tylko szczepów tego

gatunku ale także wykrywanie jego wirulencji. Krytycznie ocenia dostępne metody molekularne wskazując na ich przydatność w zależności od stawianego celu. Odnosi się do przydatności metod własnych i to zarówno dla charakterystyki molekularnej szczepów jak i ich typowania genetycznego.

Rozprawa kończy się trzema wnioskami, z których dwa (1 i 2) mają bardziej charakter wyniku. Należy je przeredagować.

Uważam, że wniosek nr 2 mógłby być podzielony na dwa wnioski.

Piśmiennictwo jest bogate i zawiera 184 pozycje.

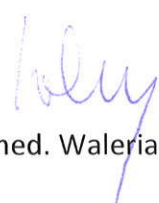
Rozprawę zamyka aneks zawierający wyniki sekwencjonowania, stanowiący ważne i wartościowe uzupełnienie wyników. Materiał ten będzie bardzo przydatny dla kontynuatorów tematyki Rozprawy.

Dla porządku pragnę odnotować, że Rozprawę rozpoczyna Streszczenie w j. polskim i j. angielskim oraz Spis treści.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, ważność i aktualność wybranego tematu. Cele badawcze zostały jasno sformułowane. Doktorant wykazał się szeroką i wszechstronną znajomością tematu i nowoczesnych metod badawczych. To pozwoliło mu w pełni zrealizować postawione cele. Dyskusja pokazała dobrą znajomość literatury i umiejętność prezentowania wyników badań własnych na tle dokonań światowych. Wnioski wskazują, że postawione w Rozprawie cele zostały zrealizowane. Drobne uwagi umieszczone w recenzji nie umniejszają wysokiej jakości merytorycznej Rozprawy.

Rozprawa doktorska mgr inż. Piotra Cieślika pt. „Charakterystyka molekularna szczepów *Franciscella tularensis* wyizolowanych z próbek klinicznych i środowiskowych za pomocą metody Real-time PCR i Multispacer Typing” spełnia wymogi stawiane tego typu rozprawom i dlatego wnoszę, do Wysokiej Rady Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Warszawie o dopuszczenie mgr inż. Piotra Cieślika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość poznawczą i aplikacyjną wnoszę o jej wyróżnienie.


Prof.dr hab. med. Waleria Hryniewicz