Centrum Zaawansowanych
Materiałów i Technologii
CEZAMAT

Warszawa, 8 lutego 2022r

Dr hab. Monika Staniszewska, Profesor PW
Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii
CEZAMAT Politechnika Warszawska

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej „Genetyczna charakterystyka *Mycobacterium bovis* BCG podszczepu Moreau stosowanego do powszechnych szczepień przeciw gruźlicy w Polsce" autorstwa mgr Katarzyny Krysztopy-Grzybowskiej z Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego PZH – Państwowego Instytutu Badawczego pod promotorstwem prof. dr hab. n. med. Ewy Augustynowicz-Kopeć z Zakładu Mikrobiologii, Krajowego Referencyjnego Laboratorium Prątka, Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Krysztopy-Grzybowskiej wpisuje się w bardzo ważny nurt dotyczący skuteczności i bezpieczeństwa szczepień przeciw gruźlicy. Specyfika stosowanej przez dziesięciolecia technologii produkcji szczepionek BCG z wykorzystaniem oryginalnego francuskiego szczepu *M. bovis* BCG oraz ciągłe jego pasażowanie w różnych częściach świata wywołała indywidualne zmiany genetyczne wśród szczepów potomnych. Wcześniejsze wyniki własne Doktorantki wykazały 876-nukleotydową insercję w genomie *M. bovis* Moreau PL w porównaniu do szczepu macierzystego BCG-Moreau – *M. bovis* BCG Moreau Rio de Janeiro RDJ. Dlatego kluczowym jest scharakteryzowanie szczepów szczepionkowych BCG, w tym szczepu *M. bovis* BCG Moreau PL, który od ponad 65 lat wchodzi w skład szczepionki stosowanej w Polsce.

Przedstawiona do oceny praca liczy sobie 143 strony przedstawione w układzie typowym: 12 rozdziałów w klasycznych segmentach wstępu z przeglądem piśmiennictwa, założeń i celów pracy, materiałów i metod, wyników, dyskusji, wniosków i piśmiennictwa, aneksu (zawierającego tabelaryczne zestawienie sekwencji par starterów użytych w pracy oraz zidentyfikowanych różnic w sekwencji nukleotydowej) poprzedzonego streszczeniem pracy w j. polskim oraz w j. angielskim. Praca zawiera 26 rycin, 14 tabeli.

1. Wstęp, przegląd piśmiennictwa, założenia i cele pracy.

W części wstępu Doktorantka zamieściła i scharakteryzowała istotę zjawiska powstawania zmian genetycznych typu: od SNP po duże rearanżacje genomowe, a także jak te zmiany przekładają się na funkcje biologiczne i cechy behawioralne podszczepów szczepionkowych. Omówienie tych zagadnień stanowi podłoże do badań podjętych przez Doktorantkę i stwarza możliwość zrozumienia mechanizmów biologicznych na poziomie molekularnym, które odpowiadają za efektywność i immunogenność szczepionek.

W oparciu o postawione hipotezy, Autorka sformułowała jasno i zrozumiale główne cele pracy– nie ma najmniejszych wątpliwości do czego dążyła Doktorantka – do (1) oceny stabilności genetycznej szczepu *M. bovis* BCG Moreau (oznaczonego na potrzeby recenzji skrótem PL) opartej o analizę genetycznego podobieństwa pięciu jego serii pochodzących z różnych lat (od 1957 do 2015), (2) Uzyskanie pełnej sekwencji nukleotydowej genomu szczepu *M. bovis* BCG Moreau PL, (3) Zidentyfikowania różnic genetycznych pomiędzy szczepem PL a najbliższym siostrzanym szczepem BCG, wywodzącym się z tego samego szczepu macierzystego BCG-Moreau – *M. bovis* BCG Moreau RDJ (AM412059.2). (4) Zidentyfikowanie różnic genetycznych

Politechnika
Warszawska
ul. Poleczki 19
02-822 Warszawa
tel. 22 182 12 17
sekretariat@cezamat.eu

pomiędzy szczepem PL a najbardziej odległym siostrzanym szczepem BCG – *M. bovis* BCG Pasteur (AM408590.1).

Cele realizowano kolejno poprzez (**1**) złożenie hybrydowe *de novo* wyników sekwencjonowania genomu szczepu PL, przeprowadzonego na platformie Illumina oraz MinION, weryfikację mutacji za pomocą met. Sangera i *in silico*, (**2**) porównania sekwencji genomowych PL, z najbliższym siostrzanym szczepem BCG i najbardziej odległym siostrzanym szczepem BCG oraz weryfikację mutacji za pomocą met. Sangera i *in silico* (3) wykorzystując narzędzia bioinformatyczne bazujące na programach Trim Galore!, Bowtie2, minimap2, BCFtools, fastANI, breseq, IGV (Integrative Genomics Viewer), hybridSPAdes, CONTIGuator, BLAST, Primer3Plus, FinchTV, NotePad++.

2. Materiały i Metody, Analiza statystyczna

Nie wnoszę żadnych zastrzeżeń do bardzo dobrze opracowanej części prezentującej Materiały i Metody w pracy doktorskiej mgr Katrzyny Krysztopy-Grzybowskiej. W kolejnych trzydziestu jeden podrozdziałach tej części rozprawy doktorskiej wystarczająco dokładnie i jasno opisano postępowanie badawcze, kolejno: hodowlę bakterii, izolację DNA genomowego i jego oczyszczanie oraz ocenę jakościową i ilościową DNA, przeznaczonego do sekwencjonowania przy użyciu dwóch uzupełniających się platform (**1**) NGS Illumina NextSeq 500 w przypadku genomów pięciu serii siewnych szczepu PL i przygotowanie bibliotek zgodnie z zaleceniami producenta; (**2**) MinION, w przypadku genomu roboczej serii siewnej nr 3122000 szczepu PL i przygotowanie biblioteki z wykorzystaniem zestawu Ligation Sequencing Kit zgodnie z zaleceniami producenta.

W kolejnym etapie doktorantka przeprowadziła odczyty uzyskane z platformy NGS Illumina, zmapowanie odczytów dla 5 serii siewnych szczepu PL do BCG Moreau RDJ i przeprowadziła analizy bioinformatyczne. Doktorantka przeprowadziła analizę stabilności genetycznej szczepu PL (5 serii siewnych) poprzez wyznaczenie średniego podobieństwa sekwencji (ustalono sekwencje konsensusowe), identyfikację przewidywanych mutacji i miejsc o braku pokrycia oraz weryfikację różnic bezpośrednio na odczytach z platformy NGS.
Następnie Doktorantka przeprowadziła odczyty pochodzące z platformy NGS MinION dla roboczej serii siewnej nr 3122000 i ich zmapowanie do genomu referencyjnego *M. bovis* BCG Moreau RDJ za pomocą narzędzia minimap2.
Doktorantka przeprowadziła sprawdzenie równoległych odczytów pochodzących z NGS Illumina oraz NGS MinION za pomocą programu IGV. Doktorantka dokonała analizy ważności przewidywanych mutacji poprzez wytypowaniu mutacji istotnych (niesynonimicznych, czyli prowadzących do zmiany aminokwasu w sekwencji kodującej) lub w obszarze promotora, jak również obszarów bez pokrycia lub o znikomym pokryciu i powtórzenia. Następnie przeprowadziła weryfikację mutacji poprzez projektowanie starterów (weryfikację ich komplementarności do amplifikowanych sekwencji docelowych za pomocą PrimerBLAST– czyli różnic wskazanych za pomocą programów breseq i IGV), sekwencjonowanie amplikonów za pomocą klasycznej metody Sangera.
Projekt genomu, składający się z odczytów, złożyła w kontigi uporządkowane w oparciu o genom szczepu ref. RDJ przy użyciu CONTIGGuator. Tak uzyskała sekwencję roboczą. Kolejnym krokiem była korekta sekwencji złożonej *de novo* w oparciu o wyniki Sangera oraz analiz *in silico*.
W końcowym etapie badań sekwencję szczepu PL porównano z genomem ref. RDJ za pomocą narzędzi BLAST i sekwencję zdeponowano w międzynarodowej bazie GeneBank. Doktorantka przedstawiła wizualizację genomu szczepu PL przy użyciu aplikacji CGViewer Serwer BETA i naniosła mutacje SNP oraz INDEL w szczepie PL względem RDJ.

Podsumowując, Metody biologii molekularnej oraz techniki bioinformatyczne zastosowane na poszczególnych etapach pracy dla realizacji założonych celów opisane zostały z dużą dokładnością, co wskazuje na ich pełne zrozumienie przez Doktorantkę. Na uwagę zasługuje dociekliwość badawcza Doktorantki oraz dążenie do uzyskania rzetelnych wyników. Doktorantka używa dwóch metod sekwencjonowania, które wzajemnie się uzupełniały, celem ostatecznego porównaniu sekwencji szczepu PL oraz BCG Pasteur za pomocą Bowtie2, wyznaczenia mutacji przewidywanych (w programie breseq), mapowania odczytów z platformy NGS MinION dla serii siewnej 3122000, weryfikacji mutacji wyznaczonych w breseq i poszukiwanie dodatkowych *in silico*.

3. Wyniki

W ten sposób przechodzimy do kluczowej części rozprawy doktorskiej – Wyników. Lektura tej części pracy doktorskiej pokazuje, że wykonano rzetelny, rozległy zakres badań za pomocą logicznie stosowanych technik bioinformatycznych. Opis wyników poszczególnych eksperymentów został przedstawiony rzeczowo i kompetentnie w postaci 13 tabeli i 17 rycin. *Przy tak dużej liczbie wyników, dużym ułatwieniem dla czytelnika jest graficzne* przedstawienie przez Doktorantkę skończonego ciągu jasno zdefiniowanego postępowania badawczego koniecznego do wykonania postawionych celów, a zatem sposobu postępowania prowadzącego do rozwiązania problemu - Algorytmu analizy wyników uwzględniających pośrednie cele pracy, zawarty na początku rozdziału 4 Wyniki (str 52). Ułatwieniem dla czytelnika jest syntetyczne podsumowanie każdego etapu pozyskania wyników.

W szczegółach, stabilność genetyczna została określona na podstawie danych uzyskanych z platformy Illumina, a następnie wyznaczenia średniego podobieństwa za pomocą programu fastANI osiągając wartość parametru średniego podobieństwa dwóch sekwencji nukleotydowych (parametru ANI) wynoszącą 3 log, co świadczy o bardzo wysokim podobieństwie. Dodatkowo użycie programu BCFtools umożliwiło wyznaczenie sekwencji konsensusowych. Porównano przewidywane mutacje za pomocą programu breseq i stwierdzono 14 mutacji typu SNP oraz 2 typu INDEL, których nieobecność stwierdzono w co najmniej 1 serii, jak również 37 miejsc o braku pokrycia; a weryfikacji wyników dokonano za pomocą programu IGV.

W szczegółach, złożono hybrydowo genom PAN BCG-Moreau PL za pomocą programu hybridSPAdes w oparciu o 240 odczyty z platformy Illumina oraz 40 z platformy MinION, uporządkowanie kontigów w całość w postaci superkontigu o długości 4 335 037 pz. Sekwencja została porównana z sekwencją ref. RDJ. Stwierdzono 136 mutacji SNP i 24 INDEL, przeprowadzono weryfikację metodą Sangera (stwierdzono 75 SNP i 11 INDEL mutacji istotnych) i *in silico* (potwierdzono 32 mutacje SNP oraz zidentyfikowano 1 dodatkową nie wskazaną breseq mutację SNP w obszarze międzygenowym, mutacje nie powodują zmiany w sekwencji aminokwasowej). Doktorantka dokonała weryfikacji mutacji zidentyfikowanych w programie IGV, pokazała 4 SNP oraz 3 INDEL nowe mutacje oraz insercje IS6110 i duplikacje DU2, nie wykazane w breseq, następnie porównano sekwencję PL z RDJ za pomocą Align Sequences Nucleotide BLAST w celu eliminacji pomyłek powstałych *de novo* i wykryła 12 różnego rodzaju typu zmiany w szczepie PL względem RDJ. Ostatecznie sekwencję PL umieszczono w bazie, po automatycznej annotacji sekwencja otrzymała numer CP085532.

Doktorantka przedstawiła graficzną mapę genomu *M. bovis* BCG Moreau PL wykonaną przy użyciu aplikacji CGView SerwerBETA (str 72) i charakterystykę: • długość – 4 333 682 pz, • %GC – 65,65, • liczba genów – 4 056, ♣ w tym kodujących białka – 3 782, ♣ pseudogenów – 223, • liczba rRNA – 3, • tRNA – 45.

Do najważniejszych oryginalnych wyników badań należy wykazanie poprawności autorskich narzędzi stosowanych w pracy. W moim przekonaniu wyniki te są wartościowe i wskazują, że badania w tym kierunku warto kontynuować i weryfikować w odniesieniu do innych szczepów szczepionkowych.

W szczegółach, Doktorantka wykazała 77 mutacje SNP oraz 17 mutacji INDEL zmieniających sekwencje aminokwasowe białek (SNP, INDEL) w genomie PL w odniesieniu do RDJ, głównie

w genach kodujących białka PE, białka zaangażowanych w metabolizm pośredni i oddychanie, w genie kodującym reduktazę sulfotlenku biotyny itd.
Doktorantka zlokalizowała 2 delecje o dł 9 758 pz oraz 100 pz obejmujące 9 genów związanych z zjadliwością prątków, jak dowiodła Doktorantka w genie kodującym toksynę MazF6 i w genie kodującym antytoksyny MazE6 oraz kodującym białko stresu.
Autorka wykazała obecność 5 mutacji zlokalizowanych w prawdopodobnych obszarach promotorowych szczepu PL w odniesieniu do RDJ, tj., 3 mutacje typu SNP i 2 mutacje typu INDEL. Dotyczące genów kodujących białko zaangażowane w metabolizm glikolipidu ściany komórkowej oraz genu kodującego białko regulatorowe z rodziny GntR. Ponadto, Doktorantka wykazała obecność 48 mutacji synonimicznych oraz 27 mutacji zlokalizowanych w regionach międzygenowych.

W szczegółach, Doktorantka dowiodła 69 istotnych mutacji (41 SNP oraz 28 INDEL, niesynonimicznych jak również zlokalizowane w obszarach promotorowych) w szczepie PL w odniesieniu do BCG Pasteur. Były to mutacje wspólne dla PL i RDJ, które odróżniały je od szczepu BCG-Pasteur. Doktorantka potwierdziła obecność zmian charakterystycznych dla szczepu BCG-Moreau czyli brak duplikacji DU1, obecność duplikacji DU2-I, insercji IS6110 przed genem phoP, delecji C-końca genu fadD2 i N-końca genu ppsA, delecji RD16, delecja S-RD13 oraz braku delecji: N-RD18, RD14 i RD2. Łącznie zidentyfikowano 23 mutacje INDEL wspólne dla BCG-Moreau PL oraz BCG-Moreau RDJ, które odróżniały je od szczepu BCG-Pasteur. Ponadto, Autorka wykazała, że 77/80 sekwencji z mutacjami SNP i 15/19 sekwencji z mutacjami INDEL było identycznych z sekwencjami w genomie *M. bovis* BCG Pasteur. W związku z tym prawdopodobnie do tych mutacji doszło w genomie *M. bovis* BCG Moreau RDJ a nie *M. bovis* BCG Moreau PL.

4. Dyskusja

Dyskusja jest zwarta i klarowna, wyniki badań są precyzyjnie omawiane w odniesieniu do opublikowanych licznych badań genetycznych, ze szczególnym uwzględnieniem powyżej wymienionych analiz genetycznych podobieństwa 5 badanych serii szczepu *M. bovis* BCG Moreau, które były powodem wykonania oceny stabilności genetycznej szczepu szczepionkowego stosowanego do produkcji szczepionki przeciw gruźlicy w Polsce od 1955 roku.
Jest świadectwem biegłości wiedzy, którą zgłębiła Doktorantka w tematyce prowadzonych badań, a także zdolności wyprowadzania syntetycznych wniosków z mnóstwa danych uzyskanych z różnych technik sekwencjonowania (II generacji NGS Illumina) opartych o krótkie i długie odczyty (III generacji MinION) w celu wyjaśnienia sekwencji regionów zawierających powtórzenia, jak również weryfikacji wyników przy użyciu klasycznej metody Sangera. Doktorantka potrafił odnieść się krytycznie do uzyskanych własnych wyników badań, a także wskazać część potencjalnych przyczyn (np. brak serii szczepu z 1954r nie pozwala jednoznacznie określić czy do zmian genetycznych doszło w Polsce po otrzymaniu podszczepu 1954-57), które mogły wpłynąć na wniosek końcowy pracy doktorskiej, zawarty na końcu „dyskusji", tj., odmienny poziom ochronny szczepionek BCG produkowanych z różnych podszczepów wynika z zidentyfikowanego przez Doktorantkę polimorfizmu w genach kodujących białka należące do dwóch rodzin PE i PPE (odpowiedzialne za patogenezę szczepu). Doktorantka umiejętnie dyskutuje uzyskane wyniki własne z wynikami uzyskanymi przez inne grupy naukowców.

5. Wnioski

W podsumowaniu wyników czyli Wnioskach stanowiących rozdział 6, Doktorantka w sposób zwięzły przedstawiła wnioski wynikające z postawionych celów badawczych. W opinii recenzenta zabrakło konkretnego wniosku dla celu 4 czyli wykazania różnic i zidentyfikowania różnic genetycznych pomiędzy szczepem *M. bovis* BCG Moreau PL a najbardziej odległym siostrzanym szczepem BCG – *M. bovis* BCG Pasteur (AM408590.1) w wyniku porównania ich sekwencji.

6. Piśmiennictwo

Piśmiennictwo obejmuje 162 pozycje. Są one względnie nowocześnie dobrane. Względnie dlatego, że oprócz pozycji z ostatnich 3 lat znalazły się pozycje z 2009 r (dotycząca zagadnień klinicznych tj., relacji między mikro- i makroorganizmem).

7. Uwagi porządkowe

Stylistyczne

Mimo bardzo dużej staranności w przygotowaniu językowym i edytorskim dysertacji, Doktorantka nie ustrzegła się nielicznych błędów typu:

- koinfekcja (str 11) lub konfkecja (str 10, 13) zamiast zakażenie lub zakażenie mieszane lub zakażenie współtowarzyszące/ współistniejące,

- zlikwidowane przez układ immunologiczny (str 13) zamiast uruchomienia mechanizmów obronnych prowadzących do ich wyeliminowania przez układ immunologiczny,

- *M. tuberculosis* (str 15, 16) zamiast pełna nazwa rodzajowa tj., *Mycobacterium* na początku zdania

- mających na celu wskazać … schematy (str 16) zamiast mających na celu wskazanie…schematów; stwierdzonych przez Roberta Koch zamiast ….Kocha (str 23); nowym podejście zamiast podejściem (str 24), 'kodujących białka występujących' zamiast '…występujące' (str 30), 'niejasną nomenklaturą', zamiast '..nomenklaturę' (str 32); delecją S-RD13 oraz brak delecji zamiast delecji S-RD13 oraz braku delecji (str 98) (odmiana przez przypadki)

- dodatkowa spacja (str 17), 'zwierząt .Celem' (str 24), którą należy usunąć

- interpunkcja w zdaniach wprowadzających wyliczenia i wyszczególnienia np. inne zwierzęta takie jak: psy, bydło, czy kozy (str 17) zamiast zwierzęta, takie jak….; ….cząsteczek takich jak zamiast …..cząsteczek, takich jak … (str 21),

- interpunkcja w zdaniach podrzędnie złożonych np. 'Celem utrwalenia uzyskanych cech szczep ponownie przeniesiono na zwykłe …..; zamiast Celem utrwalenia uzyskanych cech, szczep ponownie przeniesiono na zwykłe…. (str 24); .., 'który nie zetknął się nigdy ze zjadliwym prątkiem gruźlicy Calmette postanowił podawać' zamiast '…, który nie zetknął się nigdy ze zjadliwym prątkiem gruźlicy, Calmette postanowił podawać' (str 24-25); 'swemu szczepowi stałą jednak znacznie osłabioną zjadliwość, która' zamiast 'swemu szczepowi stałą, jednak znacznie osłabioną zjadliwość, która' (str 25); 'Z początkiem lat 50. akcję szczepień' zamiast 'Z początkiem lat 50., akcję szczepień' (str 26). '(….ziemniaków) w rozsianych po świecie laboratoriach…' zamiast '(….ziemniaków), w rozsianych po świecie laboratoriach,…' (str 29), 'Inne charakterystyczne wyłącznie dla „późnych" podszczepów BCG, obserwowane ' zamiast 'Inne, charakterystyczne wyłącznie dla „późnych" podszczepów BCG, obserwowane….' (str 30), 'w dwóch kopiach jako skutek' zamiast 'w dwóch kopiach, jako skutek'; 'zaobserwowano także' zamiast 'zaobserwowano, także' (str 30), 'Obecnie w krajach o małej zapadalności na gruźlicę szczepionkę BCG stosuje się' zamiast 'Obecnie, w krajach o małej zapadalności na gruźlicę, szczepionkę BCG stosuje się'; 'BCG zostało zakończone….' zamiast 'BCG zostało zakończone, …'(str 36)

- niepełna lista skrótów (w tym genów, aminokwasów, białek, enzymów: fosfataz, kinaz) stosowanych w pracy, jak np. TDM, SL-1, Man-LAM (str 20), LprG oraz P27, TLR2, ESX1-5 (str 21), PtpA oraz SapM, Ndk (str 23), *nuoG, katG, sodA/secA2, pknE i Rv3654c/Rv3655c*, DosS i DosT, WhiB3 i RsrA, SOD, KatG, AhpC i Prx (str 23), BCG (str 24), BAC, kpz, Rv3871-Rv3879c (str 28), kdpD, senX3, regX3, pks12, phoT (str 28), *hspR* (str 29), DU1 i DU2, Rv1782-Rv1800 (str 30), *whiB3*, *trcR,* WhiB3, TrcR-TrcS, *fadD26, ppsA, Rv3405c, rv3406, Rv3887c, rv3887c,* ESX-2 (str 31), ANI (str 44), DMSO, starter F i R (str 47)
wymienione skróty nie zostały ujęte 'W wykazie używanych skrótów' na stronach 8-9

- podrodziny pe zamiast podrodziny PE (str 22)

- prezentują antygeny .... dla komórek zamiast ....komórkom (str 23)

- wzrost 'odporności' na substancje toksyczne zamiast wzrost oporności na substancje toksyczne (str 23)
- Domain Ehanced Lookup Time Accelerated BLAST zamiast ....Enhanced.....
- niedoszacowana.[134], zamiast niedoszacowana [134].
-...regulatorowe . zamiast regulatorowe. (str 103)
- ...konserwowanych motywów ..., zamiast konserwatywnych motywów (str 22, 105)

Z obowiązku wywiązania się z niewdzięcznej roli recenzenta chciałabym wskazać na te fragmenty rozprawy doktorskiej, które nasuwają krytyczne spostrzeżenia i uwagi. Mam pytanie do Doktorantki, dlaczego tylko wybrana seria siewna nr 3122000 szczepu, a nie nr 8112000, została wytypowana do sekwencjonowania za pomocą platformy MinION? Nie zostało sprecyzowane w celach.

Liczba celów (4) nie pokrywa się z liczbą wniosków (7). **Zabrakło konkretnego wniosku dla celu 4 czyli zidentyfikowania różnic genetycznych pomiędzy szczepem *M. bovis* BCG Moreau PL a najbardziej odległym siostrzanym szczepem BCG – *M. bovis* BCG Pasteur (AM408590.1) w wyniku porównania ich sekwencji.**

Brak analizy statystycznej jako oddzielny podrozdział.

Na zakończenie stwierdzam, że wszystkie uwagi zamieszczone w niniejszej recenzji mają jedynie charakter korekcyjny nie rzutują na jakość i zasadność przeprowadzonych badań. Niniejszą rozprawę doktorską **oceniam bardzo wysoko**, szczególnie podkreślając jej merytoryczność, przejrzystość oraz znaczenie dla strategii immunizacji. Mgr biologii Katarzyna Krysztopa-Grzybowska wykazała bardzo dobre przygotowanie teoretyczne, pełne opanowanie nowoczesnego warsztatu badawczego z bardzo dobrze dobranymi narzędziami biostatystycznymi zawierającymi elementy nowatorstwa oraz umiejętność krytycznej analizy uzyskanych wyników. Praca zawiera elementy oryginalne: zdeponowanie sekwencji szczepu PL w bazie GeneBank, która może służyć do innych porównań taksonomicznych.
Warto podkreślić, że osiągnięcia Doktorantki mają znaczenie poznawcze – uzupełnienie wiedzy z zakresu mikroewolucji oraz atenuacji szczepionkowych podszczepów BCG jak również aplikacyjne – zidentyfikowane markery genetyczne mogą służyć opracowaniu specyficznych testów badania stabilności genetycznej szczepów szczepionkowych oraz dalszych badań nad poziomem eksprymowania genów polskiego podszczepu i klinicznych szczepów *in vivo* co jest związane z immunogennością i bezpieczeństwem szczepionek BCG.

Rozprawa jest znaczącym osiągnięciem Doktorantki i Jej Promotor. Z pełnym przekonaniem uważam, że przedstawiona do oceny praca doktorska pod tytułem" Genetyczna charakterystyka *Mycobacterium bovis* BCG podszczepu Moreau stosowanego do powszechnych szczepień przeciw gruźlicy w Polsce" stanowi wartościowy wkład dla dziedziny nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna i spełnia warunki określone art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. 2017, poz. 1789). W oparciu o powyższą opinię wnioskuję do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego PZH-Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie, o dopuszczenie mgr Katarzyny Krysztopy-Grzybowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Monika Skowiszewska