

Recenzja pracy magistra Pawła Urbanowicza
pt. „Mechanizmy szerzenia się enzymatycznej oporności na karbapenemy wśród pałeczek
***Pseudomonas aeruginosa* wywołujących zakażenia szpitalne w Polsce - badania molekularne i**
genomiczne” na stopień doktora nauk medycznych

Przedmiotem pracy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza jest bardzo aktualny problem oporności na karbapenemy wśród pałeczek *Pseudomonas aeruginosa* odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne w Polsce. *P. aeruginosa* należy do najczęstszych czynników etiologicznych zakażeń u pacjentów hospitalizowanych, zwłaszcza w oddziałach intensywnej terapii, gdzie wywołuje zapalenia płuc związane z mechaniczną wentylacją, zakażenia krwi i układu moczowego oraz w oddziałach leczenia oparzeń, gdzie jest głównym patogenem zakażeń ran. Infekcje *P. aeruginosa* obarczone są wysokim ryzykiem zgonu (20-50%), co wynika z licznych czynników zjadliwości oraz wysokiej lekooporności tego drobnoustroju. *P. aeruginosa* wykazuje naturalną oporność na wiele dostępnych leków przeciwbakteryjnych, a ponadto charakteryzuje się ogromną łatwością nabywania genów oporności. W ostatnich latach obserwuje się dynamicznie narastającą oporność pałeczek *Pseudomonas* na wszystkie istotne terapeutycznie grupy antybiotyków, w tym najważniejsze w leczeniu szpitalnym – karbapenemy. Wśród izolatów inwazyjnych oporność na tę grupę beta-laktamów przekracza w Polsce 20%. Spośród różnych mechanizmów oporności pałeczek ropy błękitnej na karbapenemy, najważniejsze i najgroźniejsze jest wytwarzanie metalo-beta-laktamaz (MBL), tj. enzymów zdolnych do hydrolizy niemal wszystkich antybiotyków beta-laktamowych. Praca mgr P. Urbanowicza stanowi próbę wyjaśnienia genetycznego podłoża szerzenia się w/w mechanizmu oporności w naszym kraju.

Praca doktorska stanowi spójny tematycznie cykl 4 publikacji (3 oryginalnych i 1 poglądowej) i składa się z następujących części: informacji o finansowaniu badań, spisu treści, wykazu publikacji, listy skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzenia, celów, kopii opublikowanych prac, dyskusji, wniosków, piśmiennictwa oraz oświadczeń współautorów określających ich procentowy wkład w przygotowanie publikacji. Z wyjątkiem streszczenia, jednej z publikacji wchodzącej w skład cyklu oraz oświadczeń, wszystkie pozostałe części rozprawy zostały przygotowane w języku angielskim.

We wprowadzeniu doktorant omówił kliniczne znaczenie pałeczek *P. aeruginosa*, mechanizmy oporności tego drobnoustroju ze szczególnym uwzględnieniem nabytych beta-laktamaz,

scharakteryzował ruchome elementy genetyczne będące nośnikami genów metalo-beta-laktamaz, strukturę populacji i klonalność, oraz wcześniejsze badania dotyczące molekularnej epidemiologii szczepów wytwarzających MBL w Polsce. Wprowadzenie stanowi dobre uzasadnienie celowości podjętych przez Kandydata badań. W tej części znalazło się również krótkie streszczenie prac wchodzących w skład cyklu publikacji, co nie jest najfortunniejszym umiejscowieniem (wyniki są przedstawione przed celami) – dla większej przejrzystości lepiej byłoby, gdy ten fragment został wyłączony jako osobna część przed lub po cyklu publikacji.

Doktorant postawił sobie bardzo ambitne zadanie wyjaśnienia mechanizmów dynamicznego wzrostu częstości zakażeń wywoływanych przez pałeczki *P. aeruginosa* wytwarzające metalo-beta-laktamazy (MBL-producing *P. aeruginosa*, MPPA) w polskich szpitalach w latach 2005-2015 i sformułował 3 cele szczegółowe, tj. 1) określenie struktury klonalnej MPPA, identyfikację genotypów epidemicznych oraz określenie ich występowania i pochodzenia; 2) scharakteryzowanie integronów kodujących MBL oraz analizę filogenetyczną wielokopistkowych koniugacyjnych plazmidów zawierających geny MBL; 3) zidentyfikowanie unikalnych genotypów MPPA i ocena ewentualnych zagrożeń epidemicznych. Swoje badania Kandydat prowadził w ramach grantów naukowych Narodowego Centrum Nauki, Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Ministerstwa Zdrowia, czeskiej Agencji Badań Zdrowia oraz Federacji Europejskich Stowarzyszeń Mikrobiologicznych.

Wyżej wymienione cele zostały zrealizowane i zaprezentowane w pracach oryginalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Na cykl publikacji składają się 3 prace oryginalne: "Molecular and genomic epidemiology of VIM/IMP-like metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in Poland", opublikowana w *J Antimicrob Chemother* (IF 5,76), "Epidemic territorial spread of IncP-2-type VIM-2 carbapenemase-encoding megaplasmids in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* populations" zaprezentowana w *Antimicrob Agents Chemother* (IF 5,2) oraz „*Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands" przedstawiona w *J Antimicrob Chemother* (IF 5,44), a także praca poglądowa „Ciężkozbrojny” *Pseudomonas aeruginosa*: mechanizmy lekooporności i ich tło genetyczne" opublikowana w periodyku *Kosmos*.

We wszystkich publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem, a jego potwierdzony oświadczeniami wszystkich współautorów udział wyniósł odpowiednio 55%, 50%, 60% i 70%. Ponadto wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie w/w prac w rozprawie doktorskiej mgr Urbanowicza.

W swoich badaniach opublikowanych w w/w pracach oryginalnych Kandydat podjął się szczegółowej analizy molekularnej i genomicznej reprezentatywnej grupy 454 klinicznych szczepów MPPA pochodzących z 212 szpitali ze 127 miast z różnych regionów kraju. Szczepy pochodziły głównie od pacjentów hospitalizowanych w latach 2005-2015 w oddziałach intensywnej terapii, internistycznych i chirurgicznych i były izolowane z zakażeń układu oddechowego, moczowego, skóry i tkanek miękkich oraz krwi.

Badania mgr P. Urbanowicza wykazały znaczne zróżnicowanie i specyficzność polskich szczepów MPPA. Ogromna większość analizowanych izolatów należała do czterech typów sekwencyjnych, w tym dwóch obserwowanych od dłuższego czasu klonów pandemicznych. W obrębie dominujących klonów Kandydat zidentyfikował 10 genotypów o podwyższonym potencjale epidemicznym, odpowiedzialnych za ponad połowę wszystkich zakażeń, a wśród nich genotypy unikalne dla naszego kraju, w tym, co wykazały analizy porównawcze, obecne w polskich szpitalach już od wczesnych lat 2000. Doktorant dokładnie scharakteryzował metalo-beta-laktamazy badanej populacji MPPA wykazując, że większość z nich należała do rodziny VIM (najczęstszym wariantem enzymu była VIM-2), a wszystkie geny MBL znajdowały się w integronach klasy 1, które wykazywały bardzo duże zróżnicowanie strukturalne (wiele elementów zidentyfikowano po raz pierwszy, a znaczna ich część była wykrywana tylko w szczepach polskich). Ponadto badania Kandydata udokumentowały, że równoległe do epidemii klonalnych MPPA, już od 2000 roku zachodziło horyzontalne rozprzestrzenianie się megaplazmidów z grupy IncP-2, zawierających charakterystyczny integron niosący gen kodujący VIM-2, co było największą opisaną do tej pory „epidemią plazmidu” u *P. aeruginosa*. W trakcie swoich badań mgr Urbanowicz zidentyfikował również unikalny izolat pałeczki ropy błękitnej zawierający aż 25 nabytych genów oporności, wśród których znajdowały się rzadko opisywane u tego gatunku MBL typu DIM-1 i NDM, wykazując przy tym jego pokrewieństwo ze szczepami z zachodniej Afryki. Znaleźisko to sugeruje odrębne pochodzenie szczepu i wskazuje na zagrożenia związane z łatwym do przeoczenia importem groźnych patogenów z zagranicy.

Powyższe badania Kandydata wyjaśniają molekularne podłoże gwałtownego wzrostu częstości MPPA izolowanych w Polsce, wskazując, że główną przyczyną tego zjawiska była ekspansja klonalna genotypów o podwyższonym potencjale epidemicznym powstałych w wyniku wielotorowej ewolucji zachodzącej w środowisku szpitalnym, której towarzyszyła epidemia megaplazmidów kodujących MBL. Obserwacje Doktoranta mają bardzo duże znaczenie poznawcze oraz praktyczne, wskazują bowiem na sposób powstawania i drogi szerzenia się tych drobnoustrojów, a tym samym pośrednio na potencjalne możliwości kontroli wywoływanych przez nie zakażeń.

Doktorant zrealizował wszystkie założone cele badawcze, a uzyskane wyniki podsumował w 7 w pełni uprawnionych wnioskach i poddał analizie w dyskusji, w której odniósł się do aktualnego piśmiennictwa. Sposób jej przeprowadzenia świadczy o dojrzałości Kandydata. Ponadto dokonał on krytycznej analizy ograniczeń prowadzonych badań. Zwrócił uwagę, na potencjalnie niepełną reprezentatywność badanych szczepów, nie odzwierciedlającą rzeczywistej proporcji pomiędzy izolatami sporadycznymi i epidemicznymi (pochodzącymi ze szpitalnych ognisk epidemicznych). Zauważył także, że ze względu na retrospektywny charakter badań kolekcji pochodzącej z lat 2005-2015, uzyskane wyniki nie muszą odzwierciedlać aktualnej epidemiologii MPPA w Polsce. Powyższa refleksja świadczy o rzetelności i wnikliwości Doktoranta.

W podsumowaniu stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Pawła Urbanowicza spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Wchodzące w jej skład publikacje są spójne tematycznie, zostały zaprezentowane w czasopismach zagranicznych o wysokim współczynniku oddziaływania, a przedstawione w nich wyniki mają ogromną wartość poznawczą – pogłębiają wiedzę na temat mechanizmów odpowiedzialnych za niezwykle groźne zjawisko, jakim jest rozprzestrzenianie się oporności na karbapenemy wśród pałeczek *Pseudomonas aeruginosa* w polskich szpitalach. Składam zatem wniosek do Wysockiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Pawła Urbanowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie ze względu na ogromne walory naukowe pracy prezentującej nowe, bardzo cenne informacje na temat epidemiologii zakażeń wywoływanych przez wytwarzające metalo-beta-laktamazy pałeczki *Pseudomonas aeruginosa* w Polsce składam wniosek do Wysockiej Rady o jej wyróżnienie. Dzięki przeprowadzonej przez Doktoranta wnikliwej analizie molekularno-genomicznej reprezentatywnej kolekcji szczepów MPPA możliwe było poznanie mechanizmów warunkujących wzrost częstości występowania tych bardzo groźnych drobnoustrojów w polskich szpitalach w pierwszych dwóch dekadach XXI wieku. Zrozumienie podłoża tego niebezpiecznego zjawiska jest niezbędnym warunkiem do prób jego ograniczenia. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że wyniki badań Doktoranta zostały opublikowane w wiodących czasopismach mikrobiologicznych, o wysokim współczynniku oddziaływania, co świadczy o ich uznaniu na arenie międzynarodowej i odzwierciedla wagę poruszanego problemu.