



Instytut Biochemii i Biofizyki
Polska Akademia Nauk

Pawińskiego 5a; 02-106 Warszawa; Tel.: +48 22 / 592 21 45; Fax: +48 22 / 592 21 90; e-mail: secretariate@ibb.waw.pl; <http://www.ibb.waw.pl>

Prof. dr hab. Małgorzata Łobocka,
Pracownia Biologii Bakteriofagów,
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN,
Ul. Pawińskiego 5A
02-106 Warszawa,
Tel.: 022-592-1303,
E-mail: lobocka@ibb.waw.pl

Warszawa, 27. 07. 2026

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Biedrzyckiej pt.:

„Struktury klonalne populacji wytwarzających karbapenemazy szczepów *Klebsiella* spp. w Polsce: genotypy epidemiczne, ich filogeneza, mechanizmy lekooporności i czynniki zjadliwości”,

Promotor: dr hab. n. med. Radosław Izdebski

(Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Leków)

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Marty Biedrzyckiej została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie pod kierunkiem dr hab. n. med. Radosława Izdebskiego. Tematyka pracy jest zbieżna z zakresem zainteresowań promotora, które obejmują m.in. antybiotykooporne szczepy pałeczek rzędu *Enterobacterales*, w tym szczególnie szczepy oporne na antybiotyki beta-laktamowe nowej generacji. Wagę tej tematyki podkreśla fakt, że szczepy *Enterobacterales* produkujące karbapenemazy są w większości odpowiedzialne za obecny kryzys związany z antybiotykoopornością bakterii na świecie. Wybór przez doktorantkę jako obiektu badań szczepów z rodzaju *Klebsiella* wytwarzających karbapenemazy i będących jednymi z najbardziej ekspansywnych i trudnych lub wręcz niemożliwych do leczenia sprawców coraz szerzej rozprzestrzeniających się zakażeń uważam za bardzo trafny i odpowiadający na potrzebę zrozumienia ewolucji i mechanizmów ekspansji tych szczepów oraz niesionych przez nie determinantów antybiotykooporności i wirulencji. Jest to szczególnie istotne biorąc pod uwagę, że Polska należy do krajów dotkniętych rosnącym problemem rozprzestrzeniania się szczepów *Klebsiella pneumoniae* i *Klebsiella oxytoca* opornych na karbapenemy. Dodatkowo, migracje ludności, turystyka i międzynarodowy handel towarami stwarzają nowe okazje dla rozprzestrzeniania się szczególnie zjadliwych klonów tych bakterii, a poznanie mechanizmów ich rozprzestrzeniania i czynników mu sprzyjających może pomóc w przyszłości w opracowaniu odpowiednich środków zapobiegawczych lub umożliwiających wczesną detekcję zagrożeń.

Rozprawa została przygotowana w języku angielskim. W jej skład wchodzi: lista publikacji włączonych do rozprawy, streszczenie (w języku polskim i angielskim), obszerny wstęp zawierający wprowadzenie do tematyki rozprawy i omówienie włączonych do rozprawy publikacji, zbiorcza dyskusja wyników przedstawionych w publikacjach w świetle danych literaturowych, opis celu i zakresu badań przedstawionych w rozprawie, cztery oryginalne publikacje będące podstawą rozprawy wraz z materiałami uzupełniającymi do każdej publikacji, konkluzje wraz z krótkim podsumowaniem najważniejszych wyników przedstawionych w rozprawie, liczący aż 309 pozycji spis literatury, oraz oświadczenia współautorów publikacji włączonych do rozprawy dotyczące udziału w przygotowaniu publikacji.

Wszystkie publikacje włączone do rozprawy są publikacjami wieloautorskimi (6-7 autorów). Pierwszym autorem wszystkich z nich jest mgr Marta Biedrzycka, co świadczy o jej dominującym udziale w przygotowaniu tych publikacji i znajduje potwierdzenie w oświadczeniach współautorów. Wszystkie omawiane publikacje ukazały się w uznanych międzynarodowych czasopismach ujętych w bazie Web of Science: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (praca z 2021 r., IF=4,1; 24 cytowania); *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* (prace z 2023 i z 2024 r., IF=4,818, 10 i 4 cytowania) i *Infection Disease Therapy* (praca z 2025 r., IF=5,6; 8 cytowań), i były już w związku z tym ocenione przez specjalistów. Dwa czasopisma, w których zostały opublikowane (*J. Antimicrob Chemother* i *Infect Dis Ther*) sklasyfikowano w pierwszym kwartyle (Q1), a jedno (*Eur J Clin Microbiol Infect Dis*) w drugim kwartyle (Q2) czasopism z danej dyscypliny. Łączny współczynnik oddziaływania wymienionych czasopism w roku publikacji wyniósł 19,313. Omawiane publikacje doczekały się w sumie 46 cytowań, co świadczy o docenieniu ich wartości przez środowisko naukowe, tym bardziej, że pochodzą one z okresu ostatnich pięciu lat.

Wszystkie włączone do rozprawy publikacje są spójne tematycznie. Ich zbiorczym celem było wyjaśnienie mechanizmów będących podłożem rozprzestrzeniania się w Polsce na przestrzeni lat 2006-2019 szczepów *Klebsiella* spp. wytwarzających karbapenemazy, a także mechanizmów rozprzestrzeniania się tych szczepów w czasie pierwszego roku pełnoskalowej wojny w Ukrainie w latach 2022-2023. To ostatnie uważam za szczególnie cenną część pracy ze względu na wykorzystanie unikalnej z punktu widzenia historycznego okazji zbadania udziału napływu dużej grupy ludności z zewnątrz w kształtowaniu polskiej populacji szczepów *Klebsiella* spp. opornych na karbapenemy. We wszystkich publikacjach jako materiał do analiz posłużyły setki lub tysiące szczepów *Klebsiella* spp. zebranych w wymienionych okresach z terenu całej Polski przez Krajowy Ośrodek ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów Narodowego Instytutu Leków. Spośród nich, na podstawie typowania molekularnego i/lub porównawczej elektroforezy pulsacyjnej (PFGE) oraz analizy PCR z wykorzystaniem markera wskaźnikowego, a także analizy wrażliwości na antybiotyki, wybierane były do dalszych analiz i sekwencjonowania genomowego określone szczepy produkujące karbapenemazy. Sekwencje genomów zebranych szczepów zostały ustalone na podstawie złożenia krótkich odczytów fragmentów sekwencji, w razie potrzeby uzupełnionych o długie odczyty. Określone w ramach

przygotowania publikacji sekwencje genomowe zostały zdeponowane w bazie danych NCBI, wraz z charakterystyką szczepów, z których pochodziły. Ich szczegółowa analiza bioinformatyczna pod kątem pokrewieństwa filogenetycznego, obecności profagów i plazmidów oraz innych mobilnych elementów genetycznych, a także serotypów, oraz determinantów antybiotykooporności i wirulencji pozwoliła na sformułowanie unikalnych i ciekawych wniosków dotyczących mechanizmów i kierunków ekspansji szczepów reprezentujących dominujące i najbardziej istotne z punktu widzenia epidemiologicznego kłony *Klebsiella* spp. biorące udział w rozprzestrzenianiu genów karbapenemaz oraz niesionych przez nie cech genetycznych, a także zróżnicowania struktury klonalnej ich populacji w Polsce w badanym przedziale czasowym. Na podstawie uzyskanych wyników możliwe było (1) opisanie występowania poszczególnych typów sekwencyjnych i izolatów kodujących różne typy karbapenemaz oraz różne nośniki tych genów, (2) ujawnienie związku poszczególnych grup szczepów z konkretnymi ogniskami zakażeń, (3) odtworzenie drzew filogenetycznych polskich izolatów na tle izolatów z innych krajów przygotowane w oparciu o analizę SNP dla poszczególnych typów sekwencyjnych, (4) porównania sekwencji i map genomowych plazmidów i integronów niosących geny karbapenemaz wykryte w badanych szczepach z sekwencjami podobnych elementów dostępnymi w bazach danych. Zbiorczo, dane te pozwoliły na poznanie kompleksowej epidemiologii kodujących karbapenemazy szczepów *Klebsiella* spp. w Polsce w okresie ostatnich 20 lat i znacznie poszerzyły wiedzę na temat rozprzestrzeniania się w Polsce tych szczepów i sposobów pozyskiwania przez nie determinantów antybiotykooporności. Co istotne ujawniły też jakie elementy genetyczne pełniły dominującą rolę w rozprzestrzenianiu się genów dla poszczególnych typów karbapenemaz pomiędzy szczepami kompleksu *K. pneumoniae* i *K. oxytoca* w badanym przez doktorantkę okresie lub w pozyskiwaniu tych genów od innych bakterii.

Krótki opis publikacji włączonych do rozprawy poprzedzony jest obszernym wstępem podzielonym na kilka podrozdziałów. Doktorantka przedstawiła w nich m. in. ogólną charakterystykę szczepów kompleksu *Klebsiella pneumoniae* i *Klebsiella oxytoca*, na których zogniskowana była jej praca, zróżnicowanie tych szczepów, historię ich odkrywania i klasyfikacji, związek z różnymi typami infekcji, rozprzestrzenienie w różnych środowiskach i rejonach świata i zagrożenia związane z ich naturalną i nabywaną antybiotykoopornością. Wymieniła również geny oraz mechanizmy związane z antybiotykoopornością u poszczególnych gatunków zaliczanych do tych kompleksów. Szczególnie ciekawe jest naświetlenie mechanizmów nabywania przez te szczepy oporności na karbapenemy i problemu ogólnoświatowego jaki stwarzają szczepy, które tą oporność nabyły. Doktorantka omawia również podział karbapenemaz na różne typy, przypuszczalne źródła poszczególnych typów tych enzymów oraz dynamikę ich rozprzestrzeniania. Oddzielne podrozdziały poświęcone są czynnikom wirulencji szczepów kompleksu *K. pneumoniae* i *K. oxytoca* i ruchomym elementom genetycznym biorącym udział w rozprzestrzenianiu określonych czynników wirulencji i genów kodujących karbapenemazy. Doktorantka omawia też strukturę populacji i klonalność *Klebsiella* spp. Ostatni podrozdział wstępu poświęcony jest molekularnej

epidemiologii szczepów *Klebsiella* spp. produkujących karbapenemazy, co nawiązuje bezpośrednio do treści publikacji wchodzących w skład rozprawy. Moim zdaniem wstęp sam w sobie mógłby być wysłany do publikacji w czasopiśmie jako oddzielna praca przeglądowa. Szeroko i ciekawie przedstawia on problem szczepów *Klebsiella* spp. opornych na karbapenemy w Polsce i na świecie w powiązaniu z danymi historycznymi, epidemiologicznymi i informacjami z zakresu genetyki i biologii *Klebsiella* spp.

Głównym celem badań opisanych w pierwszej publikacji pt. „Dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST147 NDM-1 in Poland, 2015-19” wchodzącej w skład rozprawy była ocena skali rozprzestrzeniania się w Polsce klonu *K. pneumoniae* ST147 produkującego karbapenemazę typu NDM-1. W wyniku analizy genomów 126 szczepów wybranych do analizy PFGE i 47 szczepów wybranych spośród blisko 10 tysięcy izolatów do dalszych analiz wykazano obecność tego klonu w 33 szpitalach w 20 miastach różnych rejonów Polski, wykryto ich cechy wspólne i różnicujące, co pozwoliło m. in. na wykrycie wśród nich wyodrębnionego clustra szczepów o dużej homogenności genomicznej związanych z ogniskiem zakażeń w Warszawie i na Mazowszu i powiązać jego pojawienie się w Polsce z atakiem terrorystycznym w Tunezji w 2015 roku.

Celem badań przedstawionych w drugiej publikacji pt. „Multiple regional outbreaks caused by global and local VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Poland, 2006–2019”, było charakterystyka genomowa szczepów *K. pneumoniae* wyizolowanych w Polsce w latach 2006-2019 i produkujących karbapenemazę typu VIM. Analizą objęto 214 izolatów z 86 centrów medycznych z 49 miast reprezentujących niemal całą Polskę. Pozwoliło to ocenić zróżnicowanie klonów produkujących karbapenemazę typu VIM i odpowiedzialnych za ogniska infekcji w różnych rejonach Polski w badanym okresie. Za najciekawszy wynik tych analiz uważam wykazanie, że mimo podobieństwa szczepów wyizolowanych z różnych ognisk infekcji w Polsce do izolatów z innych krajów europejskich, większość z nich nabyła determinanty lekooporności na miejscu od bakterii innych gatunków przez horyzontalny transfer genów, co pokazuje potęgę i niespodziewaną dynamikę lokalnego powstawania klonów odpowiedzialnych za ogniska zakażeń.

Badania przedstawione w trzeciej publikacji pt. „Country-wide expansion of a VIM-1 carbapenemase-producing *Klebsiella oxytoca* ST145 lineage in Poland, 2009–2019”, miały na celu określenie roli szczepów kompleksu *K. oxytoca* w rozprzestrzenianiu się w Polsce genów kodujących karbapenemazę typu VIM. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem 106 szczepów tego kompleksu wyizolowanych w latach 2009-2019 w 60 centrach z 35 miast reprezentujących wszystkie rejony Polski. Pozwoliła ona na wykrycie dominującego typu szczepów *K. oxytoca* (ST145) kodujących karbapenemazę typu VIM-1 oraz zidentyfikowanie integronów niosące gen dla tej karbapenemazy w badanej grupie szczepów. Szczególnie ciekawa jest obserwacja, że najczęściej występujące szczepy *K. oxytoca* niosące integron In237-like i pochodzące najprawdopodobniej z Grecji, w procesie ewolucji w Polsce utraciły w wyniku szeregu różnych delecji fragment chromosomu niosący naturalny gen β -laktamazy *bla_{ox1}* charakterystyczny dla tego gatunku

bakterii i będący genem wskaźnikowym w identyfikacji jej szczepów. Jaki zatem marker genetyczny w świetle powyższych obserwacji można by alternatywnie używać jako pojedynczy marker we wstępnej identyfikacji szczepów *K. oxytoca*?

Wyniki analiz podsumowane w czwartej publikacji pt. „Carbapenemase-producing *Enterobacterales* from patients arriving from Ukraine in Poland, March 2022-February 2023” pokazują w dobitny sposób jak istotny wpływ na kształtowanie polskiej populacji szczepów *Klebsiella* spp. produkujących karbapenemazy miały wydarzenia historyczne, a konkretnie duży napływ uchodźców z Ukrainy pomiędzy lutym 2022 i lutym 2023. Szczególnie ciekawe, a jednocześnie zatrważające jest ujawnienie w niej wśród tych szczepów znaczącej liczby izolatów niosących hybrydowy plazmid pNDM-MAR zawierający determinanty lekooporności i hyperwirulencji. Chociaż przeprowadzone w ramach tej publikacji analizy dotyczyły genomów 65 szczepów produkujących karbapenemazy wyizolowanych od pacjentów z Ukrainy i hospitalizowanych w Polsce, porównanie wyników tych analiz z dostępnymi wynikami analiz innych szczepów *Klebsiella* spp. z tego okresu przeprowadzone przez mgr Biedrzycką w dyskusji jej rozprawy doktorskiej ujawniło znaczącą rolę szczepów ukraińskich w pozyskiwaniu nowych cech genetycznych przez polską populację, w tym we wzbogaceniu polskiej populacji w szczególnie zjadliwe szczepy.

Każda z publikacji poświęcona jest wyodrębnionej grupie izolatów *Klebsiella* spp. kodujących karbapenemazy. Jednak razem stanowią one opis cech charakterystycznych, kierunków ewolucji oraz zmian zachodzących w dominującej części populacji. Widać to szczególnie po przeczytaniu obszernej dyskusji, w której doktorantka stworzyła całościowy obraz populacji i zachodzących w jej obrębie zmian w badanym przez nią okresie na podstawie indywidualnych wyników. Wyniki opisane we włączonych do rozprawy publikacjach zostały w niej przedstawione w tle wyników podobnych analiz w różnych rejonach geograficznych i przedyskutowane z wynikami opublikowanych i nieopublikowanych, ale dostępnych dla niej, analiz w Polsce z ostatniego okresu. Ogólnie, praca jest wartościowym i unikalnym wkładem w charakterystykę polskiej populacji *Klebsiella* spp. produkujących karbapenemazy i dynamiki zachodzących w niej zmian, a główne założone cele przedstawionych w niej badań zostały osiągnięte m.in. poprzez ocenę w badanym okresie skali rozprzestrzeniania się pochodzącego z Tunezji genotypu ST147 *K. pneumoniae* i określenie pozycji filogenetycznej tego genotypu w globalnej populacji ST147 *K. pneumoniae*, określenie struktury klonalnej populacji szczepów *K. pneumoniae* produkujących karbapenemazy typu VIM, określenie roli kompleksu *K. oxytoca* w epidemiologii *Enterobacterales* produkujących karbapenemazy typu VIM, oraz charakterystykę izolatów *K. pneumoniae* produkujących karbapenemazy i pozyskanych od pacjentów z Ukrainy leczonych w Polsce w pierwszym roku pełnoskalowej wojny w Ukrainie. Ponadto, przedstawione dane pozwoliły zidentyfikować typy genetyczne szczepów *Klebsiella* spp., oraz mobilne elementy genetyczne o największym udziale w rozprzestrzenianiu się oporności na karbapenemy w Polsce w badanym okresie.

Nawiązując do metod i wyników przedstawionych w rozprawie oraz do treści rozprawy mam kilka pytań do doktorantki.

1. Cele i założenia pracy są wymienione w rozprawie po wstępie, omówieniu treści publikacji wchodzących w skład rozprawy i dyskusji otrzymanych wyników. Co skłoniło doktorantkę do takiej organizacji tekstu? Czy nie lepiej było by umieścić spis celów pracy po wstępie, ale przed omówieniem treści publikacji i dyskusją wyników.
2. Duża część analiz genomowych była wykonana z wykorzystaniem złożeń sekwencji z krótkich odczytów. Jakie są ograniczenia analiz przeprowadzanych na tej podstawie i co najczęściej gubi się w tego typu składkach sekwencji?
3. Istotną rolę w ewolucji części analizowanych szczepów odegrały elementy profagowe. Czy można na podstawie przeprowadzonych analiz powiedzieć coś więcej o tych elementach, ich potencjale kodującym, funkcjonalności i pochodzeniu?
4. Najczęstszym nośnikiem genu *bla_{TEM-1}* okazał się integron *In237-like* zlokalizowany w mozaikowym rejonie chromosomu niosących go szczepów *K. oxytoca* ST145, wraz z innymi genami lekooporności. Czy na podstawie porównań rejonów niosących ten integron w różnych szczepach można prześledzić jego najczęstszą drogę horyzontalnego transferu i określić czy jest głównie elementem przenoszonym samodzielnie i integrującym z określonym rejonem genomu, czy też przenoszony jest preferencyjnie razem z innymi genami mozaikowego bloku genomu, w którym się znajduje?
5. Czy na podstawie wyników przedstawionych analiz można przewidzieć choćby ogólnie jaki będzie w najbliższym okresie najprawdopodobniejszy kierunek zmian w polskiej populacji szczepów *Klebsiella* spp. produkujących karbapenemazy.

Podsumowanie

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską mgr Marty Biedrzyckiej stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). W związku z tym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Marty Biedrzyckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na wysoką wartość naukową i spójność wyników, a także ich przydatność dla oceny kształtowania populacji szczepów *Klebsiella* spp. w Polsce, Europie i na świecie wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą. Nadmieniam jednocześnie, że rozprawa doktorska mgr Marty Biedrzyckiej z nawiązką spełnia wymogi kwalifikujące ją do wyróżnienia. Mgr Biedrzycka jest pierwszym autorem wszystkich czterech włączonych do rozprawy publikacji, przy czym dwie z tych publikacji zostały opublikowane w czasopiśmie zaliczonych do pierwszego kwartyłu (Q1), a dwie w czasopiśmie zaliczonych do drugiego kwartyłu (Q2) w swojej dziedzinie.