



Prof. dr hab. Małgorzata Łobocka,
Pracownia Biologii Bakteriofagów,
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN,
Ul. Pawińskiego 5A
02-106 Warszawa,
Tel.: 022-592-1300 lub 022-592-1303,
Fax: 022-823-7190
E-mail: lobocka@ibb.waw.pl

Warszawa, 31. 08. 2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza pt.:

„Mechanizmy szerzenia się enzymatycznej oporności na karbapenemy wśród pałeczek *Pseudomonas aeruginosa* wywołujących zakażenia szpitalne w Polsce - badania molekularne i genomiczne”

Promotor: prof. dr hab. n. med. Marek Gniadkowski (Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Leków, Warszawa)

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Pawła Urbanowicza została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Marka Gniadkowskiego, od lat zajmującego się badaniem mechanizmów pojawiania się i rozprzestrzeniania antybiotykoopornych szczepów bakterii wśród sprawców zakażeń szpitalnych. Rozprawa mgr Urbanowicza ściśle wpisuje się w zakres tych badań, a podjętą w niej tematyką uważam za niezwykle ważną z punktu widzenia epidemiologicznego, z uwagi na niezrozumiały w chwili podjęcia opisanych w rozprawie badań duży wzrost zakażeń szpitalnych spowodowanych przez szczepy *P. aeruginosa* odporne na działanie karbapenemów. Rozprawa została przygotowana w języku angielskim. W jej skład wchodzi: streszczenie (w języku polskim i angielskim), wstęp zawierający krótkie omówienie włączonych do rozprawy publikacji, opis celu i zakresu badań, cztery publikacje będące podstawą rozprawy (w tym trzy oryginalne prace eksperymentalne i jedna praca przeglądowa), dyskusja wyników przedstawionych w wymienionych publikacjach, konkluzje, spis literatury, liczący 198 pozycji, oraz oświadczenia współautorów prac dotyczące udziału mgr Urbanowicza w przygotowaniu każdej z publikacji.

Trzy z włączonych do rozprawy publikacji zostały opublikowane w renomowanych

międzynarodowych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania, ujętych w bazie Web of Science (Journal of Antimicrobial Chemotherapy, IF=5,758, 2 publikacje, oraz Antimicrobial Agents and Chemotherapy, IF=5, 938, jedna publikacja), a jedna w polskojęzycznym czasopiśmie Kosmos. Opublikowane prace eksperymentalne były w związku z tym już wysoko ocenione przez specjalistów. Mimo, że zostały one opublikowane w ciągu ostatnich trzech lat, każda z nich została już zacytowana. W sumie prace te były cytowane 21 razy, co świadczy o ich wysokiej wartości naukowej. Chociaż wszystkie prace są wieloautorskie, mgr Urbanowicz jest pierwszym autorem każdej z nich, a jego udział w tworzeniu każdej z prac był dominujący (50-70%), co wynika ze zgodnych oświadczeń pozostałych współautorów.

Wszystkie cztery włączone do rozprawy publikacje są spójne tematycznie i dotyczą ujętych w tytule rozprawy zagadnień związanych z mechanizmami rozprzestrzeniania się enzymatycznej oporności na karbapenemy wśród szpitalnych izolatów *Pseudomonas aeruginosa* wywołujących zakażenia. Rozprawa opatrzona jest piętnastostronicowym wstępem. Doktorant nakreślił w nim problemy jakie stwarza *P. aeruginosa* z punktu widzenia medycznego i uzasadnił dlaczego bakteria ta została włączona do patogenów tzw. grupy ESKAPE odpowiedzialnych za większość stwarzających problemy terapeutyczne zakażeń związanych z antybiotykoopornością. Podsumował też naturalne cechy czyniące nawet środowiskowe izolaty *P. aeruginosa* mało podatnymi na działanie szeregu antybiotyków i stwarzające środowisko sprzyjające nabywaniu drogą horyzontalnego transferu genów dodatkowych oporności, w tym oporności na karbapenemy warunkowanej przez metalo- β -laktamazy (MBL) i rozprzestrzeniającej się wśród polskich izolatów szpitalnych *P. aeruginosa* w szybkim tempie. Omówił poszczególne typy metalo- β -laktamaz oraz ruchome elementy genetyczne zaangażowane w przenoszenie genów kodujących te enzymy, ze szczególnym podkreśleniem roli integronów, plazmidów i mobilnych wysp genomowych. Zwrócił uwagę na klonalność populacji *P. aeruginosa* oraz na akumulację genów antybiotykooporności nabywanych drogą horyzontalnego transferu w stosunkowo niewielkiej liczbie klonów, rozważając możliwe przyczyny takiego zjawiska. Szczególnie dużo uwagi poświęcił szczepom *P. aeruginosa* kodującym metalo- β -laktamazy (MBL) i izolowanym na przestrzeni ostatniego ćwierćwiecza w Polsce, prezentując w klarowny sposób tło prowadzonych przez siebie badań. Ostatnia część wstępu zawiera krótkie omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy.

Celem badań opisanych w rozprawie mgr. Pawła Urbanowicza było wyjaśnienie mechanizmów odpowiedzialnych za szybki wzrost w Polsce, w latach 2005-2015, infekcji szpitalnych powodowanych przez szczepy *P. aeruginosa* produkujące MBL oraz określenie charakteru tego wzrostu. Za teoretyczne przygotowanie do rozpoczęcia i prowadzenia badań w tym zakresie można uznać opublikowaną przez doktoranta we współpracy z promotorem i

chronologicznie pierwszą z publikacji zaprezentowanego w rozprawie cyklu prac - pracę przeglądową w czasopiśmie Kosmos pt. **"Ciężkoobrojni" *Pseudomonas aeruginosa*: mechanizmy lekooporności i ich tło genetyczne**. Praca ta jest wartościowym merytorycznie i wszechstronnym omówieniem poruszonej tematyki, które czyta się z dużym zainteresowaniem, m. in. ze względu na umiejętne wplecenie informacji o szczepach *P. aeruginosa* opornych na coraz to nowe antybiotyki w kontekst historii ich odkrywania. Dodatkowo stanowi doskonałe wprowadzenie do badań eksperymentalnych przedstawionych w pozostałych trzech publikacjach.

Materiałem wyjściowym do badań przedstawionych w pracach eksperymentalnych zawartych w rozprawie była kolekcja blisko 454 szczepów *P. aeruginosa* produkujących metalo- β -laktamazy i reprezentujących kliniczne izolaty z 212 szpitali w 127 miastach z całej Polski, z okresu od roku 2005 do 2015 oraz 4 szczepy MBL z kolekcji archiwalnej z lat 2000-2004. Badane szczepy wybrano z większej kolekcji polskich izolatów *P. aeruginosa* produkujących metalo- β -laktamazy (MPPA) na podstawie analizy ich pulsotypów. W pierwszej z prac cyklu pt. **Molecular and genomic epidemiology of VIM/IMP-like metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in Poland**, opublikowanej w 2021 roku w Journal of Antimicrobial Chemotherapy dokonano na szeroką skalę szczegółowej analizy molekularnej tych szczepów rozszerzonej o analizę sekwencji genomowych 163 wybranych izolatów i uzupełnionej o analizę zidentyfikowanych elementów mobilomu oraz o dane epidemiologiczne dotyczące m.in. miejsc i okresu izolacji, czy typu związanej z każdym szczepem infekcji. Pozwoliło to na wyciągnięcie unikalnych wniosków dotyczących struktury badanej populacji *P. aeruginosa*, dominujących w różnych rejonach Polski typów sekwencyjnych (ST) i pulsotypów tej bakterii, powiązań pomiędzy typami ST/pulsotypami poszczególnych szczepów, a kodowanymi przez te szczepy typami metalo- β -laktamaz i innych determinantów antybiotykooporności, rodzajem mobilnych elementów genetycznych niosących poszczególne determinanty antybiotykooporności. Dodatkowych danych dostarczyły analizy porównawcze, filogenetyczne i korelacyjne szczepów o dominujących typach ST z wykorzystaniem sekwencji genomowych szczepów o takich samych typach ST zdeponowanych w bazie danych GenBank. Dopiero przeprowadzona w ramach tej pracy analiza na tak szeroką skalę doprowadziła do obserwacji, że szybkie rozprzestrzenianie się w Polsce zakażeń z udziałem szczepów *P. aeruginosa* kodujących MBL ma charakter klonalny. Można je przypisać głównie szczepom należącym do 4 z 52 badanych typów ST, a w szczególności szczepom typu ST235 i ST211, stanowiącym ponad połowę zbadanych izolatów. Sukces ewolucyjny szczepów o tych właśnie typach ST okazał się być skorelowany ze szczególnie dużą liczbą w ich genomach determinantów oporności na antybiotyki, w tym kodujących metalo- β -laktamazy wielu typów

rodziny VIM/IMP, zlokalizowanych w obrębie ruchomych elementów genetycznych. Co ciekawe o ile szczepy dwóch głównych dominujących typów ST charakteryzowały się dużym zróżnicowaniem klonalnym, o tyle szczepy dwóch pozostałych dominujących typów ST okazały się znacznie mniej zróżnicowane klonalnie w obrębie swoich typów i właśnie spośród nich można było wyłonić genotyp epidemiczny, który indywidualnie odniósł największy sukces ewolucyjny. Na tle zróżnicowania genetycznego omawianych szczepów szczególnie interesująca jest zamieszczona w dyskusji rozprawy próba prześledzenia toku ewolucji szczepów o podobnych genotypach w obrębie dominujących typów ST i ustalenia ich źródła pojawienia się w Polsce. Z kolei analiza wybranych spośród pozostałych typów ST również doprowadziła do wniosków pokazujących prawdopodobne drogi i chronologię importu/eksportu szczepów tych typów pomiędzy Polską i innymi krajami. Równie ważnym aspektem przeprowadzonych analiz było odkrycie niespodziewanego bogactwa i zróżnicowania ruchomych elementów genetycznych, w szczególności integronów, obecnych w komórkach badanych szczepów oraz wskazanie ich dominującego udziału w rozprzestrzenianiu się enzymatycznej oporności na karbapenemy w naszym kraju.

Druga z przedstawionych prac cyklu pt. **Epidemic territorial spread of IncP-2-type VIM-2 carbapenemase-encoding megaplasmids in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* populations**, opublikowana w 2021 roku w *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, zogniskowana jest na wyjaśnieniu mechanizmu rozprzestrzeniania się enzymatycznej oporności na karbapenemy kodowanej przez integrony zlokalizowane w dużych plazmidach. Choć rolę integronów w tym procesie dostrzeżono już wcześniej, dopiero postęp technik sekwencjonowania z wykorzystaniem długich odczytów umożliwił dokładne poznanie i analizę ich głównych nośników jakimi okazały się megaplazmidy. W pracy przedstawiono analizę scharakteryzowanej w poprzedniej publikacji populacji 454 szczepów *P. aeruginosa* kodujących metalo- β -laktamazy pod kątem obecności w ich komórkach jednego z najczęściej występujących integronów odpowiedzialnych za rozprzestrzenianie się genów MBL, integronu In461. Obecność tego integronu wykazano aż w 80 szczepach badanej populacji reprezentujących zadziwiająco zróżnicowaną pulę, zarówno pod względem miejsca i czasu izolacji oraz typu powodowanej infekcji, jak i pulsotypów i typów sekwencji. Wszystkie te szczepy miały fenotyp MDR, a integron In461 w większości z nich był zlokalizowany w samoprzekazywalnych megaplazmidach o genomach rozmiarów 300-550 tys. par zasad i replikonie z grupy IncP-2. Szczegółowa analiza sekwencji DNA reprezentatywnej grupy zidentyfikowanych megaplazmidów pozwoliła na wykrycie ich zróżnicowania pod względem zarówno ładunku genów niesionych przez badane plazmidy jak i genów w obrębie integronu In461, w tym determinantów oporności na antybiotyki i inne czynniki stresowe. To z kolei, w połączeniu z analizą porównawczą badanych plazmidów pozwoliło na sformułowanie ważnych wniosków

dotyczących szlaków i źródeł nabywania enzymatycznej oporności na karbapenemy przez poszczególne szczepy/grupy szczepów. Jednym z najbardziej istotnych, choć niespodziewanych, jest wykazanie, że zróżnicowanie integronów klasy 1 kodujących metalo- β -laktamazy VIM/IMP i będących jednym z głównych czynników transmisji enzymatycznej oporności na karbapenemy wśród badanych szczepów można przypisać ewolucji tych integronów wewnątrz polskiej populacji MPPA.

Cykl prac eksperymentalnych przedstawionych w rozprawie zamyka, pierwsza w kolejności chronologicznej ukazania się w druku publikacja z 2019 roku w *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* pt. ***Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands**, w przypadku której doktorant jest nie tylko pierwszym, ale i korespondującym autorem. W pracy tej, wydrukowanej w dziale listów do edytora, zawarto dogłębną analizę genetyczną i filogenetyczną pierwszego w Polsce izolatu *P. aeruginosa* produkującego zarówno metalo- β -laktamazę typu NDM jak i DIM, których kombinacja w tym okresie w komórkach jednego szczepu uznawana była za rzadką. Został on pozyskany w 2014 roku ze spojówki zakażonego pacjenta, który nigdzie nie podróżował. Wykazano, że reprezentuje jedyny klon ST234 w polskiej kolekcji *P. aeruginosa*, charakteryzuje się niemal pan-genomowym profilem antybiotykooporności i jest wrażliwy tylko na kolistynę, spośród panelu antybiotyków standardowo wykorzystywanych do badań lekowrażliwości *P. aeruginosa*. Większość z 25 genów antybiotykooporności zlokalizowano w dwóch nowych chromosomalnych wyspach genomowych (GI), których strukturę w pełni określono. Poszukiwanie powiązań filogenetycznych badanego szczepu ze szczepami *P. aeruginosa* o określonej sekwencji genomowej wskazało na brak jego bliskich krewnych w lokalnych kolekcjach i pokrewieństwo z izolatem z Ghany, co zwraca uwagę na praktycznie niezauważalne rozprzestrzenianie się klonów *P. aeruginosa* o ekstremalnie szerokim spektrum oporności na antybiotyki i trudnym do odtworzenia szlaku rozprzestrzeniania się. Warto podkreślić, że wymieniona publikacja jest pierwszą publikacją zawierającą tak wszechstronną analizę genomyczną klinicznego szczepu *P. aeruginosa* wyizolowanego w Polsce.

Prace eksperymentalne wchodzące w skład rozprawy stanowią razem niemal wyczerpującą analizę populacji polskich izolatów *P. aeruginosa* kodujących metalo- β -laktamazy i odpowiedzialnych za rozprzestrzenianie się oporności na karbapenemy, wyizolowanych na przestrzeni ponad 10 lat. Reprezentują jedną z niewielu analiz narodowych przeprowadzonych na świecie na tak szeroka skalę. Dzięki systematycznemu podejściu do charakterystyki populacji szczepów *P. aeruginosa* kodujących enzymatyczną oporność na karbapenemy prace te pozwalają

na określenie zakresu i mechanizmów szybkiego rozprzestrzeniania się tych szczepów w polskich szpitalach, co było celem rozprawy, a także nakreślają ten problem w Polsce na tle sytuacji globalnej i w innych krajach świata. Wykorzystane metody, zarówno molekularne jak i bioinformatyczne, są zgodne z najnowszymi światowymi standardami. Na uwagę zasługuje też przemyślana strategia zarówno prowadzenia prac jak i kolejności publikowania ich wyników poczynając od pracy przeglądowej, poprzez analizę genomyczną i fenotypową jednego szczepu, a kończąc na globalnych analizach dużej populacji szczepów. To ostatnie związane jest ściśle z umiejętnym doбором reprezentatywnych izolatów do badań i ich wstępną charakterystykę z wykorzystaniem metod diagnostycznych przed przejściem do analizy genomicznej i porównawczej, a także umiejętnym wyłuskaniem z danych genomowych informacji kluczowych z punktu widzenia epidemiologicznego i pozwalających na wyjaśnienie mechanizmu rozprzestrzeniania się enzymatycznej oporności na karbapenemy. Wobec ogromu danych jakie dostarcza analiza sekwencji genomu nawet jednego szczepu bakterii wybór taki nie jest rzeczą oczywistą, a dobór odpowiednich metod bioinformatycznych w analizie wymaga doświadczenia.

Uwagi i zagadnienia do dyskusji

1. W przedstawionej rozprawie, zarówno we włączonych do niej publikacjach jak i w dyskusji, mgr Urbanowicz skupił się m. in. na wykryciu i prześledzeniu na podstawie danych molekularnych i filogenetycznych ewolucji szczepów klinicznych *P. aeruginosa* w kierunku nabywania oporności na kolejne antybiotyki, podkreślając, że jest to stosunkowo szybki proces stymulowany szerokim stosowaniem antybiotyków w współczesnej medycynie. Można sobie wyobrazić, że przy braku selekcji szczepów antybioopornych poprzez zaprzestanie stosowania określonych antybiotyków, możnaby liczyć na gubienie genów związanych z antybioopornością przez szczepy, które nabyły takie geny drogą horyzontalnego transferu. Czy wiadomo coś na temat ewentualnego zachodzenia takiego właśnie procesu i czy można było dostrzec jego ślady w danych uzyskanych w wyniku przeprowadzonych analiz?
2. Można się spodziewać, że integrony obecne w plazmidach zdolnych do ich przekazywania (mating +) powinny być bardziej rozpowszechnione od tych, które nie mogły być przekazywane. Czy tak rzeczywiście było? Czy znane są przypadki przenoszenia integronów rezydujących w plazmidach *P. aeruginosa* innymi drogami niż koniugacja, np. poprzez transdukcję z udziałem bakteriofagów?
3. Szereg opisanych w publikacji (2) megaplazmidów z integronem In461 zawierało akcesoryjny rejon kodujący dodatkowe białka replikacyjne i partycyjne. Tylko w przypadku jednego plazmidu zaobserwowano, że dodatkowe białko replikacyjne powinno zastępować to właściwe ze względu na

sekwencję insercyjną wstawioną w gen dla właściwego białka. Podobnego stwierdzenia dotyczącego pozostałych plazmidów nie ma we wspomnianej publikacji. Zakładam więc, że wymienione plazmidy mają po dwa zestawy białek replikacyjnych i partycyjnych, co może sugerować lepsze przystosowanie do replikacji w różnych warunkach wzrostu bakterii lub w różnych gospodarzach. Czy coś na ten temat wiadomo, albo czy opisano funkcję dodatkowych białek replikacyjnych w przypadku innych plazmidów *Pseudomonas*.

4. Przy metodzie składania sekwencji genomowych z tzw. krótkich odczytów korzysta się standardowo z już złożonych sekwencji genomowych jak najbliższej spokrewnionych szczepów jako matrycy. Jednak często w takich przypadkach gubione są przy składaniu te elementy genomu dodatkowego, które nie mają odpowiedników w genomie szczepu matrycy. Jak sobie poradzono z tym problemem w przypadku składania sekwencji szczepów MPPA opisanych w publikacji (1).

Uwagi edytorskie

W wielu zdaniach numery odnośników literaturowych podane są w nawiasach po kropce kończącej zdanie, lub po przecinku, a nie jak powinno to być, przed kropką, czy też przed przecinkiem (np. str. 26, 115).

Podsumowanie

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską mgr Pawła Urbanowicza 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) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Pawła Urbanowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na duże znaczenie naukowe wyników przedstawionych w rozprawie, ich znaczący wkład w ogólnoswiatową wiedzę na temat mechanizmów rozprzestrzeniania się enzymatycznej oporności na karbapenemy wśród szpitalnych szczepów *P. aeruginosa* oraz ich klarowny opis mimo złożoności podjętej tematyki badań, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

M. Sobocień