



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pawła Urbanowicza

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

wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej
Narodowego Instytutu Leków w Warszawie
pod kierunkiem promotora prof. dr hab. n. med. Marka Gniadkowskiego

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Pawła Urbanowicza zawiera cykl czterech publikacji wraz z wprowadzeniem, omówieniem celu badań i uzyskanych wyników, dyskusją, wnioskami oraz umieszczonym na początku pracy wykazem skrótów, streszczeniem w języku polskim i języku angielskim, piśmiennictwem a także oświadczeniami współautorów o ich udziale w publikacjach zawartych w rozprawie. Praca doktorska napisana jest w języku angielskim, streszczenie i jedna z ujętych w rozprawie publikacji jest w języku polskim.

Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej obejmują ten sam obszar badawczy tworząc spójną tematycznie rozprawę. Sumaryczna wartość wskaźników bibliometrycznych publikacji zawartych w rozprawie wynosi: 16,771 Impact Factor i 420 punktów MNiSW. Kluczowe prace zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych takich jak *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* czy *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, co potwierdza wagę podjętego tematu rozprawy oraz duże zaangażowanie na polu naukowym Doktoranta. We wszystkich pracach był pierwszym autorem.

Rozprawa doktorska mgr Pawła Urbanowicza dotyczy bardzo ważnego tematu, jednego z największych światowych problemów medycznych - występowania wieloopornych szczepów *Pseudomonas aeruginosa* wytwarzających metalo- β -laktamazy, karbapenemazy

MBL (MPPA), o klonalnym rozprzestrzenianiu się i wysokim potencjale epidemicznym, odpowiedzialne za zakażenia szpitalne. Z powodu wielooporności i pandemicznego charakteru, w ciągu ostatnich lat stały się ogromnym zagrożeniem dla chorych. Ciężki przebieg przypadków zakażeń szczepami PDR (pandrug-resistant), ze względu na brak opcji terapeutycznych może prowadzić do wielu zgonów osób hospitalizowanych. Szczepy *P. aeruginosa* z powodu szerokiej możliwości pozyskiwania genów determinujących różne mechanizmy oporności, w tym kluczowy dla tego oportunistycznego patogenu - MBL, na przestrzeni ostatnich lat stały się ogromnym problemem terapeutycznym na całym świecie. Nabycie oporności na karbapenemy - leki „ostatniej szansy” stosowane wobec wieloopornych pałeczek Gram-ujemnych stwarza bardzo poważne zagrożenie, szczególnie z powodu ogromnego potencjału infekcyjnego tego drobnoustroju. Zagrożenie pacjentów w środowisku szpitalnym *P. aeruginosa* MBL i genetyczna specyfika genotypów epidemicznych tego gatunku, powiązana z klonalnym rozprzestrzenianiem się, powoduje, że zaobserwowana bardzo niepokojąca zwiększająca się liczba przypadków zakażeń pałeczkami *P. aeruginosa* staje się podstawą prowadzenia wielu badań molekularnych, analiz genomicznych i epidemicznych. Prace w tym zakresie są niezwykle cenne i bardzo ważne także w podejmowaniu działań ograniczających rozprzestrzenianie się *P. aeruginosa* MBL w różnych regionach naszego kraju. Stwarza to konieczność szczegółowych badań szczepów występujących w Polsce, pokrewieństwa ich typów sekwencyjnych i klonów pandemicznych oraz analizy roli elementów genetycznych w transferze genów w powiązaniu z pochodzeniem izolatów wywodzących się z innych rejonów geograficznych. Temat rozprawy doktorskiej, jest bardzo aktualny, ważny oraz wysoce uzasadniony.

Wprowadzenie do rozprawy doktorskiej zawiera bardzo dobrze opisane przez Doktoranta kluczowe zagadnienia charakteryzujące zakres tematyczny pracy. Autor przedstawił znaczenie kliniczne *P. aeruginosa* podkreślając udział tego patogenu w zakażeniach szpitalnych, w zapaleniu płuc związanym z wentylacją mechaniczną (2 miejsce wśród czynników etiologicznych VAP), zakażeniu układu moczowego (3 miejsce jako przyczyna ZUM osób cewnikowanych), w zakażeniu tkanek podskórnych i tkanek miękkich. Śmiertelność w ciężkich przypadkach zakażenia łożyska naczyniowego krwi może prowadzić nawet do 50% przypadków śmiertelnych. Lkooporność szczepów *P. aeruginosa* stanowi podstawowy czynnik determinujący zagrożenie niepowodzeniem antybiotykoterapii pacjentów hospitalizowanych. W podrozdziale charakteryzującym oporność *P. aeruginosa* na środki

przeciwdrobnoustrojowe oraz nabyte przez te pałeczki Gram-ujemne β -laktamazy – ich aktywność i epidemiologię. Autor przedstawia w bardzo przystępny sposób, ogólne zasady występującej lekooporności *P. aeruginosa*. Zwraca uwagę na naturalną oporność na liczne leki przeciwbakteryjne, która może być modyfikowana do wysokiej ekspresji i związana z mutacjami, co w konsekwencji może prowadzić do fenotypu MDR (multidrug-resistant) *P. aeruginosa*. Następnie analizuje chronologicznie odkrywane w kolejnych latach główne mechanizmy oporności, szczególnie kluczowe dla gatunku nabyte β -laktamazy MBL, należące do klasy B, które stanowią specyficzną gałąź w drzewie ewolucyjnym β -laktamaz wymagających jonów Zn^{2+} jako kofaktorów. Wzajemne relacje między nabytymi MBL z wybranymi grupami – IMP i VIM zostały przez Autora przedstawione w postaci drzewa filogenetycznego na Rycinie 1. W dalszej części podrozdziału Doktorant przedstawia najważniejsze etapy identyfikacji nabytych MBL, z uwzględnieniem ich dokładnej nomenklatury, filogrup i różnych wariantów, uwzględniając specyfikę ich występowania w różnych krajach np.: dominujący w Brazylii MBL Typ SPD, w Azji DIM i SIM, czy specyficzne dla Niemiec Typy GIM i HMB i MBL TYP CAM-1 w Ameryce północnej.

Bardzo istotne, we wprowadzeniu do rozprawy, jest scharakteryzowanie ruchomych elementów genetycznych związanych z genami MBL. Obejmują one integronowe kasety genowe, które zawierają kilka typów MBL (VIM, IMP, DIM) oraz dużą różnorodność innych elementów zawierających geny kodujące MBL (np.: transpozon Tn125). Mimo pewnych niestabilności z powodu m.in. insercji, wycięć i rekombinacji kaset, mogą one być cennymi markerami molekularnymi wytwarzania MBL w badaniach epidemicznych. Schematyczna struktura intergronów klasy 1, które są pochodnymi transpozonu Tn402, została zaawarta na Rycinie 2. Autor przedstawił również znaczenie plazmidów, autonomicznych, samoreplikujących się elementów genetycznych, w przenoszeniu genów determinujących cechy MDR *P. aeruginosa*. Dzięki wdrożeniu WGS i sekwencjonowaniu całych genomów *P. aeruginosa* możliwa jest ocena jego potencjału zmienności, powiązanego z udziałem plazmidów, wysp genomowych, determinant metabolicznych, wirulencji oraz wysokiej elastyczności genetycznej tego gatunku. Kolejny podrozdział charakteryzuje strukturę populacji szczepów *P. aeruginosa* i jego klonalność. Badania genomiczne pozwalają, wyróżniając 4 – 5 filogenetycznych grup, różniących się zawartością określonych markerów molekularnych, genów oporności i wirulencji, co umożliwia analizę klonów powiązanych z występowaniem w określonych środowiskach, szczególnie szpitalnym. Bardzo dobrze została

przedstawiona Rycina 3 obrazująca drzewo filogenetyczne oparte na SNP, 1311 izolatów *P. aeruginosa* z kolorystycznie odróżnionymi grupami tych izolatów. Również Rycina 4 obrazująca rozmieszczenie klonu ST235, najbardziej rozpowszechnionego z opisanymi karbapenemazami, oraz Rycina 5 dotycząca klonu ST111. Bardzo istotnym w kontekście tematu rozprawy doktorskiej jest kolejny podrozdział omawiający epidemiologię molekularną MPPA w Polsce. Począwszy od lat 1980-1990 przeprowadzone badania polskich izolatów klinicznych wskazują na niskie w owych czasach wskaźniki oporności na antybiotyki, które w kolejnych latach 1996-2003 wykazały wyraźny wzrost. Pierwszy izolat zawierający blaVIM-4 w ramach oryginalnego integronu In238 pojawił się w Warszawie w 1998 roku. W 2004 roku ukazało się opracowanie dotyczące polskich szczepów, sklasyfikowanych w ośmiu odrębnych pulsotypach produkujące VIM-2 lub VIM-4. Po tym czasie sytuacja w Polsce dramatycznie się pogorszyła. W latach 2005-2010 i 2011-2015 zgłoszono odpowiednio 410 i 904 przypadków infekcji i/lub kolonizacji MPPA. Łącznie 1314 szczepów zgłoszonych z całego kraju z 258 szpitali, stało się podstawą do przeprowadzenia badań. Wybór ostatecznie 454, z puli zgromadzonych izolatów, dotyczył potwierdzonych szczepów MPPA, uzyskanych z 212 szpitali (127 miast z wszystkich regionów Polski). Były one izolowane głównie z OIT (n=184;45%) oraz Oddziałów internistycznych (n=92; 23%) i chirurgicznych (n=77; 19%).

Celem rozprawy doktorskiej było wyjaśnienie charakteru i mechanizmów ekstensywnego wzrostu w polskich szpitalach zakażeń *P. aeruginosa* wytwarzającego MBL (MPPA) w okresie 11 lat, 2005-2015, z uwzględnieniem uzyskanych obserwacji z wcześniej wykonanych badań w latach 2000-2004, odnosząc się do znaczenia klonalnego rozprzestrzeniania się genotypów epidemicznych, horyzontalnego transferu genów MBL i selekcji (de novo/import). Cel ten miał zostać osiągnięty poprzez kompleksową charakterystykę molekularną i genomyczną izolatów MPPA, łącznie z przedstawicielami z wczesnej fazy wystąpienia MPPA w Polsce, 2000-2004.

Doktorant przedstawił trzy cele szczegółowe obejmujące: a) ujawnienie struktury klonalnej populacji MPPA, zidentyfikowanie genotypów epidemicznych z ich rozkładem czasowym i geograficznym oraz analizę możliwego ich pochodzenie poprzez: analizę filogenetyczną względem międzynarodowych szczepów *P. aeruginosa*; b) aby scharakteryzować integrony kodujące MBL w MPPA - zidentyfikowanie elementów rozprzestrzeniających się w całej populacji, zwłaszcza, gdy są przenoszone przez duże plazmidy koniugacyjne obserwowane od początku 2000 roku i przeprowadzenie analizy strukturalnej

i filogenetycznej plazmidów; c) zidentyfikowanie izolatów MPPA o unikalnych genotypach, które mogły pojawić się w kraju przez niedawną transmisję i wykonanie ich szczegółowej charakterystyki, oceniając zagrożenie epidemiczne spowodowane możliwym rozprzestrzenieniem się w kraju.

Pierwsza z oryginalnych publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej „Urbanowicz P, Izdebski R, Baraniak A, Żabicka D, Hryniewicz W, Gniadkowski M. (2021) Molecular and genomic epidemiology of VIM/IMP-like metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in Poland. *J Antimicrob Chemother.* 76 (9):2273-2284 ”, przedstawia badania izolatów MPPA z podstawowymi danymi epidemiologicznymi i ogólną charakterystyką obejmującą typowanie, analizę genów i integronów MBL oraz identyfikację położenia integronów w obrębie chromosomów lub plazmidów. Izolaty MPPA zostały typowane za pomocą PFGE, następnie MLST. Geny *bla* VIM/IMP MBL zostały zamplifikowane i zsekwencjonowane w obrębie integronu klasy I. Ich lokalizacja została oceniona za pomocą testów hybrydyzacji nukleazy S1. Został też przeprowadzony krótki odczyt WGS 163 izolatów, a genomy zostały poddane analizie filogenetycznej i opornościowej opartej na SNP. Bardzo ważnym efektem przeprowadzonych badań było przedstawienie ogólnego obrazu populacji MPPA w Polsce od 2005 do 2015 roku w porównaniu z okresem 1998 – 2004, wskazującego na wiele wspólnych i specyficznych cech izolatów. Była to jedna z największych przeprowadzonych analiz molekularnych/genomowych MPPA. Rozprzestrzenianie się multiklonalne zostało uznane za główny czynnik odpowiedzialny za rozległą ekspansję MPPA w Polsce. Różnorodność izolatów, zilustrowana przez integrony 52 ST i 46 MBL, była prawdopodobnie największą jaka kiedykolwiek została zaobserwowana w Polsce. Analiza międzyregionalnego rozprzestrzeniania się 10 głównych genotypów (ST/pulsotyp-integron), które były kluczowe dla ogólnego wzrostu MPPA (ok.60%), dostarczyła ważnych informacji umożliwiających zrozumienie ich pochodzenia. Na szczególną uwagę zasługuje uzyskana informacja o roli ST273 z integronu In 249, który był najbardziej ekspansywnym genotypem epidemii MPPA (ok.15% wszystkich izolatów) i prawdopodobnie reprezentował nowy odkryty klon, świadczący o intensywnej ewolucji MPPA w polskich szpitalach. Przeprowadzone badania przyczyniły się również do poszerzenia ogólnej wiedzy na temat klonalności i filogenezy dwóch pandemicznych klonów *P. aeruginosa* – ST235 i ST111. Stwierdzenie występowania identycznych integronów w różnych ST, wskazało na ich prawdopodobną transmisję z plazmidami/ICE, ze spektakularnym przykładem In461, który rozprzestrzenił się

na plazmidach typu Inc-2 na ST (ok.18%) w kilku regionach. Uzupełnieniem pierwszej z prac ujętych w rozprawie były cztery tabele (S1-S4) zawierających dane dotyczące np.: analizowanych izolatów w zakresie szczegółowych informacji ich pochodzenia, liczb SNP między badaniami MPPA ST 235, ST 111, ST 273 i odpowiednimi szczepami referencyjnymi oraz dziewięciu rycin (S1- S9) świetnie opracowanych graficznie obrazujących np.: regionalne i geograficzne rozmieszczenie badanych izolatów, czy opracowane drzewa filogenetyczne zawierające pulsotypy i intergrony, oparte na SNP MPPA z 15 (ST654), 27 (ST273), 29 (ST111) lub 59 (ST 235) zsekwencjonowanych polskich izolatów MPPA.

Druga praca „Urbanowicz P, Bitar I, Izdebski R, Baraniak A, Literacka E, Hrabák J, Gniadkowski M. (2021) Epidemic territorial spread of IncP-2-type VIM-2 carbapenemase-encoding megaplasms in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* populations. *Antimicrob Agents Chemother.* 65(4):e02122-20 ”, została zainspirowana analizą lokalizacji i kodowania MBL w całej zgromadzonej kolekcji MPPA. Stwierdzono, że najbardziej dominującym typem integronu był In461. W wyniku przeprowadzonych badań, integron ten został znaleziony w 80 izolatach 35ST i 55 pulsotypach, uzyskanych z 49 szpitali w 33 miastach 11 województw Polski. Kompleksowa analiza plazmidów, transferu koniugacyjnego oraz testów S1/PFGE i hybrydyzacji wykazała, że zdecydowana większość tych szczepów (ok. 85%) posiada megaplazmidy z In461. W celu uzyskania pełnej charakterystyki tych cząsteczek, 19 izolatów zostało zsekwencjonowanych i poddanych analizie filogenetycznej opartej na polimorfizmie pojedynczego nukleotydu (SNP). Utworzyły one podgrupę w rodzinie megaplazmidów typu IncP-2, obserwowanych na całym świecie i nadające oporność/tolerancję na wiele czynników stresowych środowiska, w tym na antybiotyki. Badania te zostały zrealizowane we współpracy z czeskim zespołem prof. J. Hrabaka z Centrum Biomedycznego w Pilźnie oraz w ramach grantu FEMS.

Przeprowadzone badania udowodniły, że wraz z rozprzestrzenianiem się poliklonów, również rozpowszechnienie się plazmidów odegrało niezwykle rolę w epidemiologii MPPA w Polsce, co poprzez wykonane badania doprowadziło do udokumentowania największego „wybuchu plazmidów” *P. aeruginosa*, jakie zostało opracowane w określonym czasie i obszarze występowania. Badania te przyczyniły się w bardzo ważnym zakresie do poszerzenia wiedzy na temat plazmidów typu IncP-2, na których temat obserwuje się zwiększoną liczbę badań, ze względu na szersze i coraz powszechniejsze stosowanie WCS. Publikacja również zawiera szeroką dokumentację w postaci dołączonych pięciu tabel (S1-S5)

zawierających m.in. wzory wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe ośmiu reprezentatywnych izolatów MPPA posiadających różne plazmidy pPUV i ich transkoniugaty, czy cechy klonalnych izolatów MPPA z integronem In461 oraz cztery ryciny (S1-S4) z przedstawionym np.: rozmieszczeniem w Polsce In461 MPPA w latach 2003-15, ilustrujące terytorialne rozprzestrzenienie się IncP-2 podobne do pBT2436 megaplazmidu pPUV, opracowanych bardzo przejrzystie, świetnie graficznie, co bardzo wzbogaca obraz uzyskanych wyników i zakres tematyczny pracy.

Trzecia praca „ Urbanowicz P, Izdebski R, Baraniak A, Żabicka D, Ziółkowski G, Hryniewicz W, Gniadkowski M. (2019) *Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands. *J Antimicrob Chemother.* 74(10):3117-3119 ”, zawiera badania obejmujące dokładną analizę izolatu *P. aeruginosa* uzyskanego ze spojówek oka 82-letniego pacjenta z zapaleniem wnętrza gałki ocznej, hospitalizowanego w polskim szpitalu. Sekwencjonowanie izolatu ujawniło obecność genów *bla* NDM-1 i *bla* DIM-1, których identyfikacja u *P. aeruginosa* do tej pory była bardzo rzadko raportowana. Stwierdzono, że jest on oporny na wszystkie leki przeciwdrobnoustrojowe z wyjątkiem kolistyny. Na podstawie szczegółowej analizy genomu stwierdzono, że jego oporność była jedną z najbardziej złożonych ze względu na obecność 25-ciu nabytych genów AMR, zlokalizowanych na chromosomie, kodowanych w obrębie nieznanych dotąd wysp genomowych. Zbadany i opisany izolat okazał się jedynym w zbiorze polskich MPPA przedstawicielem sporadycznego klonu ST234, który poprzez przeprowadzoną filogenezę opartą na SNP w dostępnej międzynarodowej bazie danych, wskazywał na najbliższe pokrewieństwo ze szczepami Ghany z zachodniej Afryki. Polska odmiana tego hiper epidemicznego szczepu mogła ewaluować na innym kontynencie, jednak pomimo pokrewieństwa z innymi izolatami afrykańskimi, miejsce i czas jego importu pozostaje nieznany. Przedstawiona praca jest bardzo ważnym efektem przeprowadzonych badań i bezpośrednio potwierdza pojawienie się skrajnie pod względem MDR genotypu/fenotypu wśród klinicznych izolatów w Polsce. Jest również przykładem badań, w których zastosowanie WGS umożliwia wykrycie kombinacji wielu cech AMR w jednym izolacie klinicznym, i co jest niesłychanie ważne, rutynowa diagnostyka mikrobiologiczna może prowadzić do pominięcia w toku standardowego postępowania tego typu szczepy o wysokim potencjale lekooporności. Fakt przeprowadzenia badań, które ujawniły ten unikalny w skali kraju izolat oraz wykonane w szerokim zakresie badania genomiczne,

profesjonalnie zinterpretowane i opracowane graficznie, zwracają uwagę na ogromny potencjał badawczy ośrodka naukowego, z którego wywodzi się Doktorant, świetne ukierunkowanie jego badań przez promotora oraz wskazuje na ogromne możliwości prowadzenia dalszych badań w tym zakresie, co jest niesłychanie ważne w naszym kraju ze względu na narastających problemów epidemiologicznych.

Czwarta publikacja „Urbanowicz P, Gniadkowski M. (2017) "Ciężkoobrojni" *Pseudomonas aeruginosa*: mechanizmy lekooporności i ich tło genetyczne. *Kosmos* 66(1): 11-29" jest pracą przeglądową napisaną w języku polskim i kierowaną do polskiego czytelnika. Zawiera obszerne informacje dotyczące *P. aeruginosa*, poprzez rys historyczny obejmujący etapy odkryć antybiotyków, mechanizmów powstawania lekooporności bakterii, skupia się na charakterystycznych cechach *P. aeruginosa*. Przedstawia znaczenie kliniczne i udział w zakażeniach ludzi. Ważną częścią pracy jest w bardzo przystępny sposób przedstawienie cech genomu *P. aeruginosa* oraz cech wirulencji i ich roli w patogenezie z uwzględnieniem regulacji ich wytwarzania. Bardzo ważne w omówionym temacie, jest obszerne przedstawienie w jasny, zrozumiały sposób, zasad oporności naturalnej, mutacyjnej oraz kodowanej przez geny nabyte, charakterystycznej dla tego gatunku. Struktura populacji izolatów ze środowiska szpitalnego poprzedza podsumowanie omawiające terapie zakażeń *P. aeruginosa* i związane z nimi nowe nadzieje. Praca jest bardzo cenną pozycją umożliwiającą czytelnikowi zapoznanie się z najważniejszymi, aktualnymi informacjami charakteryzującymi *P. aeruginosa* z uwzględnieniem ważnego molekularnego aspektu lekooporności.

Ze względu na charakter przeglądowy tej publikacji, w moim odczuciu powinna znajdować się jako pierwsza, wprowadzając w temat kolejnych oryginalnych publikacji zawierających szczegółowe badania genetyczne izolatów polskich *P. aeruginosa* MBL.

Dyskusję napisaną przez Doktoranta oceniam bardzo wysoko. Wykazuje się głęboką wiedzę teoretyczną w obszarze tematyki rozprawy doktorskiej oraz umiejętność interpretacji i analizy uzyskanych wyników nowoczesnymi metodami genetyki molekularnej. Wprowadzając do analizy uzyskanych wyników badań własnych, Doktorant odnosi się do badań autorów z innych rejonów geograficznych. Wskazuje na wagę uzyskanych wyników na tle ogólnej sytuacji epidemicznej *P. aeruginosa* na świecie. Jednocześnie podkreśla wagę stosowanych metod badawczych, które jak np.: WGS pozwala na zbadanie i lepsze zrozumienie klonalnej zmienności bakterii patogennych, identyfikację ich rezerwuarów oraz wzorców genetycznych, ruchomych elementów uczestniczących w transferze genów

oporności. Stworzyło to nowe możliwości badawcze o ogromnej precyzji i niezawodności w dochodzeniach epidemiologicznych. W dyskusji Autor wskazuje, że ekspansja określonych genotypów w polskich szpitalach, ma związek z ogromną presją selekcyjną różnych antybiotyków, co skutkuje w konsekwencji klonalnym charakterem ekspansji MPPA w Polsce. Ta wielokierunkowa ewolucja szczepów, dzięki przeprowadzonym badaniom doprowadziła do wyodrębnienia 10 genotypów epidemicznych rozprzestrzeniających się w kraju. Autor podkreśla wpływ na dużą rolę we wzroście przypadków zakażeń MPPA, megaplazmidów kodujących MBL. Rozprawa przedstawia unikatową sytuację epidemiologiczną, wskazującą na występowanie w Polsce niesłyszane niebezpiecznych izolatów *P. aeruginosa*. Wszystkie polskie izolaty ST654 tworzyły osobny klaster, niezależnie od ich pulsotypów i zawartości integronów. Autor zwraca uwagę również na udział w identyfikacji po raz pierwszy specyficznych izolatów (np.: MPPA z IMP-like MBL, IMP-7) oraz na udokumentowanie największego zarejestrowanej w kraju rozprzestrzeniania się plazmidów kodujących MBL *P. aeruginosa*. Doktorant podsumowując uzyskane wyniki badań i porównując je z danymi z piśmiennictwa wykazał ich nowatorstwo i wagę uzyskanych informacji o *P. aeruginosa* dla oceny sytuacji epidemicznej w kraju.

W związku z tym mam pytanie: czy na podstawie przeprowadzonych badań zawartych w rozprawie doktorskiej można prognozować skalę dalszego rozprzestrzeniania się epidemicznych izolatów MPPA?

Przedstawione końcowe wnioski rozprawy doktorskiej są bardzo dobrze sformułowane i adekwatne do uzyskanych wyników. Zawarte w siedmiu punktach, dotyczą podsumowania uzyskanych kluczowych efektów, nowatorskich w kraju wyników badań, wykazując na bardzo ważne informacje konieczne dla oceny podłoża genetycznego rozprzestrzeniających się w kraju epidemicznych szczepów *P. aeruginosa* wytwarzających metalo- β -laktamazy, MBL.

Przeprowadzone badania były finansowane ze środków uzyskanych z grantów przyznanych przez: NCN w ramach konkursu OPUS, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, NPOA przez Ministerstwo Zdrowia, natomiast badania wykonane w Czechach były sfinansowane z grantów przyznanych przez czeską Agencję Badań Zdrowia, a także Research and Training Grant, otrzymanego od Federacji Europejskich Stowarzyszeń Mikrobiologicznych

W podsumowaniu stwierdzam, iż rozprawa doktorska mgr Pawła Urbanowicza jest na bardzo wysokim poziomie, potwierdza świetne przygotowanie teoretyczne i praktyczne Doktoranta. Bardzo dobrze przedstawił on w szerokim zakresie dokładną charakterystykę

wykonanych badań molekularnych i genomicznych wraz ich w pełni profesjonalną interpretacją. Należy również podkreślić nowatorstwo i trafność wyboru tematu, który w aspekcie coraz większego rozprzestrzeniania się epidemicznych MDR szczepów *P. aeruginosa* MBL są niesłychanie ważne w podejmowaniu działań ograniczających ich transmisję w środowisku szpitalnym w Polsce. Ważne jest również bardzo duże zaangażowanie Doktoranta, dokładność w przeprowadzonych analizach i ich interpretacjach, świetne przygotowanie w zakresie nowoczesnych molekularnych i genomicznych metod badawczych. Bardzo wysoko oceniam znajomości nowoczesnego warsztatu naukowego i umiejętności posługiwania się różnymi metodami badawczymi.

Stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne mgr Pawła Urbanowicza pt. „Mechanizm szerzenia się enzymatycznej oporności na karbapenemy wśród pałeczek *Pseudomonas aeruginosa* wywołujących zakażenia szpitalne w Polsce – badania molekularne i genomiczne” spełnia wszystkie ustawowe wymagania i kryteria stawiane tego typu rozprawom.

Rozprawa doktorska spełnia 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 powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Pawła Urbanowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zgłaszam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej, ze względu na jej ogromne znaczenie w poznaniu i scharakteryzowaniu występujących w polskich izolatach szpitalnych *P. aeruginosa* MBL, molekularnych mechanizmów wielolekooporności, nowatorski i szeroki zakres przeprowadzonych badań, ich wysokie znaczenie naukowe, poznawcze oraz stworzenie możliwości poprzez uzyskaną wiedzę, podejmowania działań ograniczających rozprzestrzenianie się MDR *P. aeruginosa* MBL w kraju.

Lublin 20.06.2022

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Prof. dr hab. n. med. Alina M. Olender