Załącznik 2A

AUTOREFERAT

Dr ARTUR SABAT

UNIWERSYTECKIE CENTRUM MEDYCZNE GRONINGEN
UNIWERSYTET w GRONINGEN

Groningen, listopad 2017

1. **Imię i Nazwisko:** Artur Sabat

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

   a) **Dyplom magistra biotechnologii**

   - Kierunek: biologia
   - Specjalność: biologia molekularna
   - Opiekun pracy: dr Kinga Wójcik
   - Miejsce realizacji pracy: Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński
   - Jednostka przyznająca: Instytut Biologi Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński
   - Uzyskany: w 1994 r.
   - Dyplom: WBIB-m/419/459/93/94

   b) **Stopień doktora nauk biologicznych**

   - Specjalność: biochemia
   - Promotor: prof. dr hab. Jan Potempa
   - Miejsce realizacji pracy: Zakład Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński
   - Jednostka przyznająca: Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński
   - Uzyskany: w 2003 r.
   - Tytuł rozprawy doktorskiej: Molekularna analiza genu kodującego aureolizynę, sekrecyjną metaloproteinazę *Staphylococcus aureus*.
   - Dyplom: DO-4013/2014/07 (Załącznik 1)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

12-2015 – do chwili obecnej	Senior Researcher, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands
06-2015 – 11-2015	Researcher, CERTE, Groningen, The Netherlands.
01-2011 – 12-2014	Senior Researcher, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands
07-2007 – 12-2010	Post-Doc, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands
10-2003 – 12-2006	Adiunkt, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego, Warszawa, Polska
09-1994 – 09-2003	Starszy referent, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięciem jest cykl sześciu publikacji naukowych, w tym 5 artykułów eksperymentalnych i jeden artykuł przeglądowy pod zbiorczym tytułem:

Sekwencjonowanie nowej generacji w mikrobiologii medycznej: od ulepszonej identyfikacji bakterii do zwiększonych możliwości charakterystyki gatunku *Staphylococcus aureus*.

b) autor/autorzy, rok wydania, tytuł/tytuły publikacji, nazwa wydawnictwa

1. **Sabat AJ**, van Zanten E, Akkerboom V, Wisselink G, van Slochteren K, de Boer RF, Hendrix R, Friedrich AW, Rossen JWA, Kooistra-Smid M. 2017. Targeted next-generation sequencing of the 16S-23S rRNA region for culture-independent bacterial identification - increased discrimination of closely related species. Sci Rep 7(1):3434.
   $IF_{2016/2017}$ = 4,259
   $MNiSW_{2016}$ = 40

2. **Sabat AJ**, Hermelijn SM, Akkerboom V, Juliana A, Degener JE, Grundmann H, Friedrich AW. 2017. Complete-genome sequencing elucidates outbreak dynamics of CA-MRSA USA300 (ST8-spa t008) in an academic hospital of Paramaribo, Republic of Suriname. Sci Rep 7:41050.
   $IF_{2016/2017}$ = 4,259

$MNiSW_{2016}$ = 40

3. **Sabat AJ**, Pournaras S, Akkerboom V, Tsakris A, Grundmann H, Friedrich AW. 2015. Whole-genome analysis of an oxacillin-susceptible CC80 *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolate: insights into the mechanisms of cryptic methicillin resistance. J Antimicrob Chemother 70(11):2956-64.
IF_{2015} = 4,919
$MNiSW_{2016}$ = 40

4. **Sabat AJ**, Ilczyszyn WM, van Rijen M, Akkerboom V, Sinha B, Kluytmans J, Miedzobrodzki J, Grundmann H, Friedrich AW. 2015. Genome-wide analysis reveals two novel mosaic regions containing an ACME with an identical DNA sequence in the MRSA ST398-t011 and MSSA ST8-t008 isolates. J Antimicrob Chemother 70(5):1298-302.
IF_{2015} = 4,919
$MNiSW_{2016}$ = 40

5. **Sabat AJ**, Köck R, Akkerboom V, Hendrix R, Skov RL, Becker K, Friedrich AW. 2013. Novel organization of the arginine catabolic mobile element and staphylococcal cassette chromosome *mec* composite island and its horizontal transfer between distinct *Staphylococcus aureus* genotypes. Antimicrob Agents Chemother 57(11):5774-7.
IF_{2013} = 4,451
$MNiSW_{2016}$ = 40

6. **Sabat AJ**, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijl Jm, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW; ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. Euro Surveill. 18(4):20380. Praca przeglądowa.
IF_{2013} = 4,659
$MNiSW_{2016}$ = 40

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF, ang. Impact Factor) ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania: **27,466**
Suma punktów za ww. publikacje zgodnie z wykazem Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w 2016 r. ($MNiSW_{2016}$): **240**

c) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników

Wprowadzenie i cele naukowe

Główna część sekcji Wprowadzenie została przedstawiona w artykule przeglądowym:

Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijl Jm, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW; ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. Euro Surveill. 18(4):20380.

Sekwencjonowanie Nowej Generacji (NGS, ang. Next Generation Sequencing) przekształciło badania genetyczne, zapewniając efektywny sposób wykrywania zmian w pełnym genomie. Technologie NGS są również znane jako ,,sekwencjonowanie drugiej generacji" lub ,,sekwencjonowanie o wysokiej przepustowości". Terminy sekwencjonowania następnej generacji lub drugiej generacji są wykorzystywane do odróżnienia tych technologii od sekwencjonowania pierwszej generacji w oparciu o metodę Sangera. Wyraźną zaletą NGS w porównaniu do tradycyjnego sekwencjonowania Sangera jest możliwość generowania milionów odczytów (w przybliżeniu od 35 do 700 nukleotydów długości) w pojedynczych eksperymentach przy stosunkowo niskich kosztach. Aby zbudować kompletną sekwencję nukleotydową genomu, wiele krótkich odczytów sekwencji musi być złożonych w oparciu o regiony zachodzące na siebie (złożenie *de novo*) lub porównaniu z wcześniej zsekwencjonowanymi genomami ,,referencyjnymi" (resekwencjonowanie). Sekwencjonowanie pełnego genomu (WGS, ang. Whole Genome Sequencing) staje się potężnym i bardzo atrakcyjnym narzędziem do badań epidemiologicznych (Mellmann i wsp., 2011). Jest wysoce prawdopodobne, że w niedalekiej przyszłości technologia WGS do rutynowego stosowania klinicznego umożliwi dokładną identyfikację i charakterystykę izolatów bakteryjnych. Kluczowym wyzwaniem nie jest jednak dostarczenie danych sekwencyjnych, ale szybkie obliczanie i interpretowanie istotnych informacji z dużych zbiorów danych. Jednakże odczyty generowane przez technologie NGS są stosunkowo krótkie, co sprawia, że złożenie genomu *de novo* może stawać się wyzwaniem. Luki pomiędzy złożonymi regionami (kontigami) są spowodowane głównie obecnością powtórzeń rozproszonych lub tandemowych.

Aby poprawić złożenie genomu *de novo*, konieczne jest wprowadzenie nowych platform, które generują znacznie dłuższe odczyty. Sekwencjonowanie trzeciej generacji (PacBio) zostało uruchomione przez firmę Pacific Biosciences, które generuje bardzo długie odczyty o średniej długości powyżej 10 tysięcy nukleotydów a liczba odczytów powyżej 60 tysięcy nukleotydów nie jest rzadkością w tym systemie. Ponadto odczyty o długości około 100 tysięcy nukleotydów generowane są przez technologie sekwencjonowania nanoporowego opracowane przez firmę Oxford Nanopore. W chwili pisania autoreferetu najważniejsze ograniczenia platform sekwencjonowania trzeciej generacji to ich bardzo wysokie koszty i niska dokładność. Jednak kolejne udoskonalenia są ogłaszane przez firmy Pacific Biosystems i Oxford Nanopore w celu generowania długich odczytów sekwencji z wyższą dokładnością.

Koszty bakteryjnego WGS uzyskiwanego drogą NGS nadal obniżają się. Obecnie osiągnięto poziom cen, który zbliża się do ceny analizy MLST (ang. Multi-Locus Sequence-Typing) przeprowadzanej w tradycyjnych reakcjach sekwencjonowania Sangera. Zatem koszt sekwencjonowania genomu bakteryjnego przy użyciu NGS może wynosić zaledwie od 75 do 110 EUR na izolat, obejmując przygotowanie próbki, kontrolę jakości bibliotek oraz

sekwencjonowanie. Nic dziwnego, że wzrasta zainteresowanie zastąpieniem sekwencjonowania PCR/Sanger technologiami głębokiego sekwencjonowania wysokiej przepustowosci, takimi jak Illumina i Ion Torrent, co daje wysoką liczbę krótkich i wysokiej jakości odczytów. Modele biurkowe sekwenatorów nowej generacji znajdują się w zasięgu finansowym wielu, jeśli nie wszystkich, laboratoriów referencyjnych.

Poza tradycyjnymi zastosowaniami epidemiologicznymi, takimi jak identyfikacja gatunków bakterii i typowanie szczepów, WGS może być skuteczne w określaniu cech fenotypowych, takich jak wirulencja lub oporność na antybiotyki danego patogenu (Billal i wsp., 2011). Pierwsze próby opracowania sztucznego rezystomu (ang. resistome), czyli zbioru genów oporności na antybiotyki występujących w bakteriach, były już skuteczne, czego dowodem było porównanie prognoz opartych na genomie z wynikami testów fentotypowych lekowrażliwości (Koser i wsp., 2012). Podobnie, w oparciu o dane WGS ustalono potencjalny toksom (ang. toxome), obejmujący wszystkie geny toksyn (Koser i wsp., 2012). W związku z tym WGS może potencjalnie być używany do wspierania lub zastępowania klasycznego oznaczania serotypów bakteryjnych, ponieważ umożliwia wykrycie genów krytycznych w ekspresji konkretnych antygenów specyficznych dla określonego serotypu. Należy jednak pamiętać, że sekwencja genów nie pozwala na dokładne przewidywanie potencjalnie warunkowej ekspresji określonych genów, ani poziomu ich ekspresji. Krytycznie podkreślają to badania proteomiczne powierzchni komórek i egzoproteomów różnych izolatów *Staphylococcus aureus*, które wykazały duże różnice w ekspresji poszczególnych białek, w tym znane czynniki wirulencji (Dreisbach i wsp., 2010). Wreszcie, sekwencje genomowe będą również wykorzystywane do wyszukiwania znaczników genetycznych, takich jak obecność lub brak genu lub podstawienie aminokwasów w białku, które mogą być połączone z wyłącznym lub wyższym występowaniem choroby lub jej stopniem zaawansowania.

Metody NGS osiągnęły pewien punkt, zarówno pod względem kosztów, jak i szybkości, gdzie można je wprowadzać do rutynowych laboratoriów mikrobiologii klinicznej i stosować do szybkiego sekwencjonowania mikroorganizmów. Ważne jest, aby uświadomić sobie, że nowo wprowadzona metoda musi być bardzo dobrze potwierdzona przez różne niezależne laboratoria w celu określenia jej potencjału, a proces ten trwa latami, a nie miesiącami. Nowa metoda musi również wprowadzić konkretną jednoznaczną nomenklaturę, która musi zostać opracowana i ulepszona podczas procesu walidacji. W związku z tym zastąpienie starej, dobrej i powszechnie znanej metody, metodą nową musi być przeprowadzane stopniowo, aby uniknąć utraty cennych informacji historycznych generowanych przez wiele lat praktyki.

Od 2007 roku pracuję w Uniwersyteckim Centrum Medycznym Groningen (UMCG), które jest jednym z największych szpitali w Holandii. UMCG zatrudnia ponad 12 000 osób, kształci 3 400 studentów i liczy prawie 1 400 łóżek dla pacjentów. Moje doświadczenia z NGS rozpoczęły się w 2011 roku, kiedy pierwsze próbki zostały przez nasz zespół wysłane do firmy specjalizującej się w sekwencjonowaniu DNA dla partnerów akademickich. Dwa lata później Zakład Mikrobiologii Medycznej w UMCG zakupił pierwszy system NGS. Obecnie Zakład Mikrobiologii Medycznej w UMCG posiada dwa sekwenatory MiSeq firmy Illumina i jeden sekwenator Ion PGM firmy Life Technologies. Celem moich badań jest opracowanie metod do identyfikacji gatunków bakteryjnych bezpośrednio w próbkach klinicznych, które mogą dostarczyć szybkich i dokładnych informacji niezbędnych do podejmowania właściwych decyzji podczas leczenia pacjentów. Transmisja bakterii gatunku *S. aureus* w szpitalach jest poważnym

globalnym wyzwaniem dla bezpieczeństwa pacjentów. Dlatego też moje starania w kompleksowej charakterystyce drobnoustrojów gatunku *S. aureus* zmierzają do ograniczenia wpływu klinicznego tego patogenu na choroby ludzi. Przeprowadzony cykl studiów przy użyciu NGS umożliwił mi realizację następujących celów badawczych:

1. Opracowanie niezależnej od hodowli metody identyfikacji bakterii przy użyciu ukierunkowanego NGS z podwyższoną dyskryminacją blisko spokrewnionych gatunków.
2. Kompleksową analizę klonalności w czasie szpitalnej epidemii wywołanej przez lekooporny szczep gronkowca złocistego MRSA (ang. methicillin-resistant *S. aureus*).
3. Genotypowe przewidywanie fenotypowej oporności na antybiotyki z uwzględnieniem mechanizmów kryptycznej oporności *S. aureus* na antybiotyki.
4. Wyznaczenie genetycznej organizacji złożonych wysp zawierających element ACME (ang. arginine catabolic mobile element) wśród izolatów *S. aureus*.

Niezależna od hodowli identyfikacja bakterii przy użyciu ukierunkowanego sekwencjonowania nowej generacji – podniesiona dyskryminacja blisko spokrewnionych gatunków.

Opracowanie nowej metody identyfikacji bakteryjnej zostało opisane w:

Sabat AJ, van Zanten E, Akkerboom V, Wisselink G, van Slochteren K, de Boer RF, Hendrix R, Friedrich AW, Rossen JWA, Kooistra-Smid M. 2017. Targeted next-generation sequencing of the 16S-23S rRNA region for culture-independent bacterial identification - increased discrimination of closely related species. Sci Rep 7(1):3434.

W czasie infekcji bakteryjnej szybka i specyficzna identyfikacja drobnoustroju odpowiedzialnego za zakażenie umożliwia odpowiednie wdrożenie celowanego leczenia. Do tej pory identyfikacja gatunków bakterii w dużym stopniu opiera się na metodach hodowlanych lub molekularnych (Law i wsp., 2015, Rudkjøbing i wsp., 2016). Znaczące ograniczenia metod zależnych od hodowli związane są z wolno rosnącymi, trudnymi do hodowli lub niehodowalnymi patogenami (Hasman i wsp., 2014). Chociaż testy molekularne oferują szybszą i bardziej wiarygodną identyfikację mikroorganizmów bakteryjnych niż rutynowe metody hodowlane, wymagają one uprzedniej znajomości potencjalnych gatunków chorobotwórczych, które mogłyby być obecne w próbce. Sekwencjonowanie Sangera amplikonu zawierającego gen 16S rRNA jest powszechną metodą sekwencjonowania wykorzystywaną do rutynowej identyfikacji izolatów bakterii w laboratorium klinicznym. Sekwencjonowanie genu 16S rRNA jest wiarygodnym narzędziem diagnostycznym, ponieważ ten gen występuje we wszystkich bakteriach. Jest wystarczająco duży do celów informatycznych, a jego funkcja w czasie nie uległa zmianie (Patel, 2001). Jednakże jednoznaczna identyfikacja nie zawsze jest możliwa, ponieważ zmienność tego markera jest niewielka, a niektóre powiązane genetycznie gatunki bakterii mają taką samą sekwencję 16S rRNA (Kalia i wsp., 2016). Ponadto, przy użyciu sekwencjonowania Sangera genu 16S rRNA bezpośrednio z materiału klinicznego, w próbce wielobakteryjnej można jedynie zidentyfikować organizm dominujący lub też może być wygenerowany sygnał niemożliwy do interpretacji.

NGS dostarcza danych sekwencyjnych z milionów pojedynczych cząsteczek DNA pozwalających na niezależne klasyfikowanie każdego fragmentu. Może to być wykorzystane do wykrywania licznych różnych drobnoustrojów bakteryjnych w bardzo złożonych społecznościach

mikrobiologicznych bez konieczności tworzenia żadnych wcześniejszych hodowli. Metagenomika będzie ostatecznym podejściem w dostarczaniu dokładnej identyfikacji wszystkich mikroorganizmów bakteryjnych w pełnym mikrobiomie. Jednakże metody metagenomowe wytwarzają ogromne zestawy surowych danych. To z kolei wymaga połączenia umiejętności bioinformatycznych i odpowiednich zasobów obliczeniowych, co obecnie nie jest powszechne w medycznych laboratoriach mikrobiologicznych. Ponadto metody metagenomowe są czasochłonne i kosztowne.

Celem badań było opracowanie szybkiej i łatwej w użyciu metody diagnostycznej, bez koniecznosci hodowli, opartej na NGS regionu 16S-23S rRNA; metody, która może jednoznacznie identyfikować istotne klinicznie izolaty bakterii do poziomu gatunku. W tym celu produkty amplifikacji PCR obejmujące region 16S-23S rRNA poddano sekwencjonowaniu nowej generacji przy użyciu MiSeq Illumina. Metoda NGS wygenerowała odpowiednio od 25 000 do 50 000 lub od 1 do 2 milionów sekwencji dla czystej hodowli lub próbki klinicznej w celu uzyskania minimalnego pokrycia sekwencji 1000x na próbkę. Odczytywane pary 300-nukleotydowe zostały złożone *de novo* w kontigi za pomocą oprogramowania SeqMan NGen (DNASTAR). Identyfikacja gatunku była oparta na dopasowaniu (ang. alignment) sekwencji kontigu z sekwencjami regionu 16S-23S rRNA przechowywanymi w bazie danych GenBank, co wykonywano przy użyciu algorytmu lokalnego przyrównywania sekwencji nukleotydów BLAST (ang. Basic Local Alignment Search Tool).

W celu określenia rozdzielczości nowej metody, 67 izolatów reprezentujących 55 gatunków bakterii poddano czterem metodom identyfikacji: (i) sekwencjonowaniu Sangera genu 16S rRNA; (ii) NGS regionu 16S-23S rRNA przy użyciu sekwenatora MiSeq (Illumina); oraz dwóm systemom spektrometrii masowej MALDI-TOF MS (ang. matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry), (iii) Microflex MS (Bruker) i (iv) VITEK MS (bioMérieux). Wskaźniki dokładnej identyfikacji do poziomu gatunku przy użyciu NGS regionu 16S-23S rRNA, sekwencjonowania Sangera genu 16S rRNA, Microflex MS i Vitek MS były następujące: odpowiednio 92,5%, 56,7%, 73,1% i 64,2% . Natomiast wskaźniki dokładnej identyfikacji do poziomu rodzaju przy użyciu NGS regionu 16S-23S rRNA, sekwencjonowania Sangera genu 16S rRNA, Microflex MS i Vitek MS były następujące, odpowiednio: 100%, 94,0%, 88,1% i 83,6%. Na poziomie gatunku i rodzaju ocena istotności statystycznej różnic w dokładności czterech metod identyfikacji bakterii wykazała statystycznie znaczące różnice między NGS regionu 16S-23S rRNA, a wszystkimi innymi testowanymi metodami dla wszystkich izolatów bakterii. Jedyny wyjątek zaobserwowano na poziomie rodzaju pomiędzy dwoma metodami sekwencjonowania.

Aby ocenić skuteczność nowej metody identyfikacji bakterii, opartej na NGS regionu 16S-23S rRNA, przeprowadzono badania 60 próbek moczu od pacjentów podejrzanych o zakażenia układu moczowego, 23 dodatnich hodowli płynnych z krwi BacT / ALERT (bioMérieux) i 21 klinicznych próbek ortopedycznych.

W próbkach moczu, w których zaszła reakcja amplifikacji PCR, metoda NGS regionu 16S-23S rRNA pozwoliła zidentyfikować od 1 do 47 różnych gatunków bakterii. Próbki moczu uznawano jako dodatnie przy wzroście przeważającego jednego lub dwóch drobnoustrojów oraz gdy stwierdzono conajmniej 10^4 CFU/ml. Dwadzieścia dziewięć próbek uznano za istotne klinicznie. Wśród nich 11 próbek zawierało tylko pojedyncze gatunki bakteryjne, co stwierdzono metodą

NGS regionu 16S-23S rRNA. W większości tych przypadków (n = 10) identyfikacje metodą NGS regionu 16S-23S rRNA były w idealnej zgodności z wynikami konwencjonalnych metod hodowlanych. W 12 próbkach, w których NGS regionu 16S-23S rRNA zidentyfikowało 2 lub więcej gatunków, kontigi reprezentujące patogenny gatunek bakterii zidentyfikowany poprzez hodowlę konwencjonalną miały najwyższą liczbę odczytów sekwencji (od 53,7 do 99,1% wszystkich odczytów). W przypadku 3 próbek identyfikacja gatunków została poprawiona przez metodę NGS regionu 16S-23S rRNA w porównaniu z konwencjonalną hodowlą. W pozostałych dodatnich próbkach, gatunki bakterii, które zostały ustalone metodami hodowlanymi jako przyczyna zakażenia dróg moczowych, zostały również zidentyfikowane przez NGS regionu 16S-23S rRNA, ale ich kontigi nie zawierały przeważającej liczby odczytów. Trzydzieści jeden próbek zakwalifikowanych konwencjonalnymi metodami hodowlanymi jako ,,nieistotne klinicznie" zawierało wiele gatunków bakterii, prawdopodobnie reprezentujących florę komensalną. Nie otrzymano produktów amplifikacji PCR z użyciem starterów specyficznych dla regionu 16S-23S rRNA tylko dla próbek (n = 13), których gęstość wzrostu wynosiła 10^2 CFU/ml.

Drugą grupę analizowanych próbek klinicznych stanowiły próbki zebrane z zakażeń krwi (n = 23). Wśród nich 20 próbek zostało zidentyfikowanych prawidłowo. Dla 3 próbek metoda NGS regionu 16S-23S rRNA dała poprawione identyfikacje w porównaniu do wyników otrzymanych konwencjonalnymi metodami hodowlanymi. Poprawa dotyczyła lepszej identyfikacji na poziomie gatunku.

NGS regionu 16S-23S rRNA wykazało podniesiony poziom czułości w wykrywaniu drobnoustrojów bakteryjnych w próbkach ortopedycznych. Wśród 21 próbek klinicznych uzyskanych od pacjentów podejrzanych o zakażenia ortopedyczne, 18 próbek dało negatywne wyniki hodowli, a dla 3 próbek hodowli nie przeprowadzono. W 5 próbkach metoda NGS regionu 16S-23S rRNA wykryła tylko ludzki DNA, a w dwóch próbkach zostały otrzymane wyniki nie nadające się do interpretacji, najprawdopodobniej z powodu degradacji matrycy DNA. W pozostałych 14 próbkach ortopedycznych NGS regionu 16S-23S rRNA wykryło od 1 do 3 różnych drobnoustrojów zidentyfikowanych na poziomie rodzaju lub gatunku. Była tylko jedna wyjątkowa próbka, która zawierała 11 różnych mikroorganizmów. W próbkach, które zostały zanalizowane w tych badaniach, znaleziono kilka gatunków bakterii, które wczesniej były uznane jako czynnik etiologiczny zakażeń ortopedycznych, w tym *Haemophilus parainfluenzae* (O'Neil i wsp., 2016), *Moraxella osloensis* (Sugarman i Clarridge, 1982) i *Staphylococcus epidermidis* (Morgenstern i wsp., 2016).

W celu zbadania powtarzalności NGS regionu 16S-23S rRNA poddano analizie 6 próbek moczu. Próbki badano w trzech powtórzeniach przez 3 różnych operatorów, w tym przeprowadzane były niezależne amplifikacje PCR, oczyszczania produktów PCR i przygotowywania bibliotek NGS. Następnie biblioteki NGS były rozdzielone i poddane dwóm oddzielnym sekwencjonowaniom przy użyciu systemu MiSeq. NGS regionu 16S-23S rRNA wykazało doskonałą powtarzalność (100%) w odniesieniu do składu bakteryjnego w próbkach o gęstości wzrostu $\geq 10^5$ CFU/ml. W próbkach o gęstości wzrostu $\geq 10^3$ CFU/ml we wszystkich powtórzeniach dominował ten sam organizm i reprezentowany był przez 50,9 - 100% odczytów. Ponadto, jeśli identyfikowany organizm był reprezentowany przez ≥5% odczytów w co najmniej jednym powtórzeniu próbki, organizm ten był zawsze wykryty w pozostałych dwóch powtórzeniach.

Podsumowanie i wnioski:

- Rozdzielczość NGS regionu 16S-23S rRNA okazała się być lepsza od innych metod identyfikacji powszechnie stosowanych w rutynowych klinicznych laboratoriach mikrobiologicznych.
- Ponadto metoda ta była łatwa w użyciu.
- Nowa metoda pozwoliła prawidłowo zidentyfikować patogeny w próbkach moczu i krwi, które również były zidentyfikowane jako przyczyny infekcji poprzez konwencjonalne metody hodowlane.
- NGS regionu 16S-23S rRNA wykazało również wyższą czułość w wykrywaniu drobnoustrojów bakteryjnych w próbkach klinicznych pobranych od pacjentów ortopedycznych.
- Dlatego metoda ta może podnieść wydajność diagnostyczną w celu wykrycia gatunków chorobotwórczych bakterii w porównaniu z obecnymi metodami, poprawiając w ten sposób skuteczność leczenia antybiotykami.
- Ponadto metoda ta ma ogromny potencjał do wykrywania patogenów bakteryjnych, których nie można w ogóle wyhodować.
- Wreszcie tę nową metodę można wdrożyć do kilku dyscyplin, takich jak mikrobiologia kliniczna, weterynaryjna, żywności, rolna, czy środowiskowa.

Sekwencjonowanie pełnego genomu do analizy klonalności podczas epidemii powodowanej przez oporne na metycylinę gronkowce złociste w warunkach szpitalnych.

Wyjaśnienie epidemii w Surinamie wywołanej klonem USA300 przedstawiono w publikacji:

Sabat AJ, Hermelijn SM, Akkerboom V, Juliana A, Degener JE, Grundmann H, Friedrich AW. 2017. Complete-genome sequencing elucidates outbreak dynamics of CA-MRSA USA300 (ST8-*spa* t008) in an academic hospital of Paramaribo, Republic of Suriname. Sci Rep 7:41050.

Transmisja *S. aureus* w szpitalach, w szczególności szczepów MRSA, stanowi globalne wyzwanie w zakresie ochrony zdrowia. Ze względu na fakt, że MRSA posiadają strukturę klonalną populacji, konwencjonalne molekularne metody typowania takie jak elektroforeza w zmiennym pulsowym polu elektrycznym (PFGE, ang. pulsed-field gel electrophoresis) lub MLST mogą nie mieć wystarczającej rozdzielczości, aby wykryć wszystkie podklony w dominujących liniach genetycznych MRSA. WGS ma zdolność różnicowania bardzo blisko spokrewnionych izolatów w celu ujawnienia transmisji szczepów między pacjentami, co jest ważne, aby opracować strategie zapobiegania dalszemu rozprzestrzenianiu się.

Epidemia MRSA, która była przedmiotem opisanych badań, miała miejsce w Szpitalu Akademickim Paramaribo (AZP) w Republice Surinamu w okresie od kwietnia do maja 2013 roku. W badaniach przeanalizowano łącznie 24 izolaty MRSA. Przeprowadzono analizę sekwencyjną pełnych genomów izolatów MRSA w celu oceny możliwych zdarzeń transmisyjnych wśród 12 pacjentów i 1 pracownika służby zdrowia - pielęgniarki. W niektórych przypadkach badano kilka izolatów od tego samego pacjenta lub pielęgniarki, wyizolowanych z różnych miejsc anatomicznych. Ponadto do porównania użyto 2 izolaty MRSA pochodzące od dziecka hospitalizowanego w AZP na miesiąc przed rozpoznaniem epidemii. W celu uzyskania szerszego kontekstu do przeprowadzonych badań, podczas analizy wyników typowania

wykorzystano dla porównania 6 pełnych, całkowicie adnotowanych genomów *S. aureus,* należących do linii USA300 i epidemiologicznie niezwiązanych z izolatami z Surinamu.

Badania metodą NGS zostały przeprowadzone przy użyciu sekwenatora MiSeq firmy Illumina. Odczyty o długości 300 nukleotydów były złożone *de novo* w kontigi przy użyciu assemblera SeqMan NGen (DNASTAR). Przerwy pomiędzy kontigami zamykano za pomocą amplifikacji PCR i sekwencjonowania Sangera.

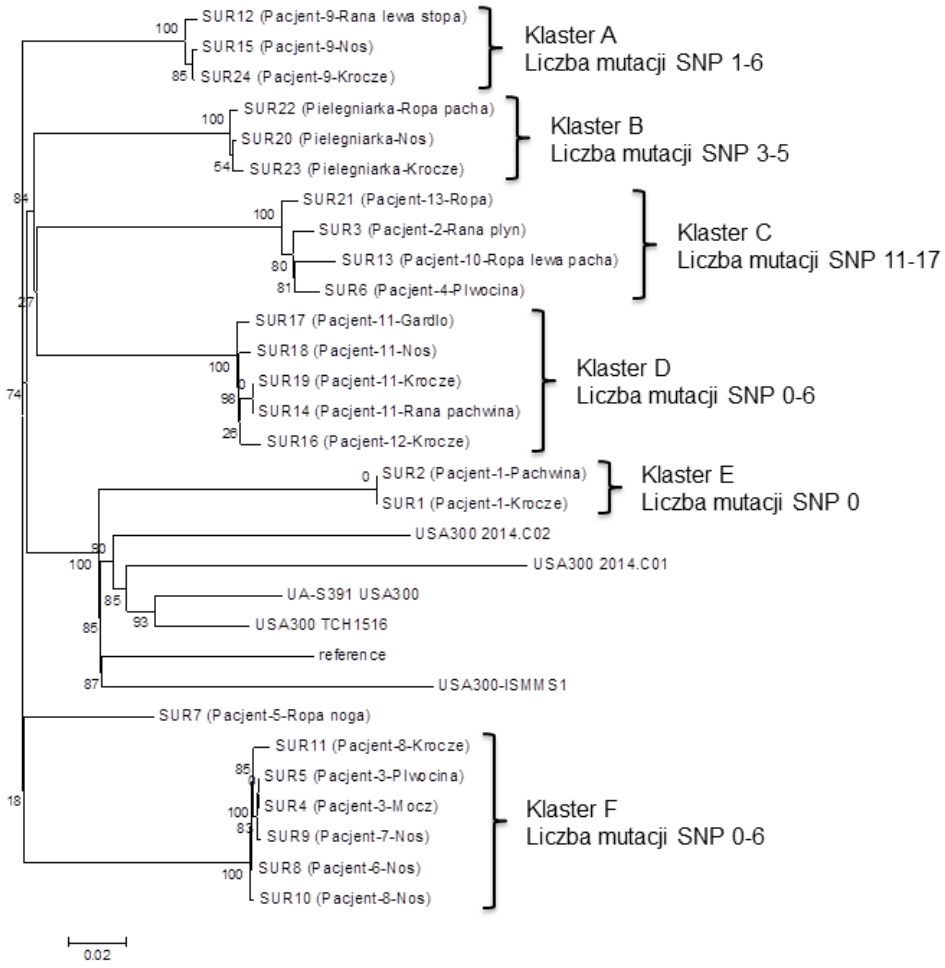
Typowanie *spa* uwidoczniło tylko jeden typ *spa* t008 wśród wszystkich izolatów MRSA wyizolowanych od pacjentów i od pielęgniarki. Również *in silico* MLST wykazało pojedynczy typ sekwencji (ST, ang. Sequence Type) 8 wśród wszystkich izolatów z Surinamu. Badanie WGS z 24 izolatów wykazało, że izolaty ST8-*spa* t008 należały do klonu USA300. Wszystkie izolaty USA300 z Surinamu posiadały element ACME typu I oraz leukocydynę Panton-Valentine (PVL).

Całkowite i zamknięte chromosomy izolatów USA300 z Surinamu składały się z od 2 876 067 do 2 919 595 pz. Po porównaniu z referencyjnym chromosomem USA300 szczepu FPR3757, wśród izolatów z Surinamu wykryto 2 insercje i 3 delecje fragmentów chromosomów obejmujących przynajmniej 2 geny. Jednak najbardziej uderzającą cechą izolatów USA300 z Surinamu była obecność 2 nowych fagów, oznaczonych jako phiUSA300-1 i phiUSA300-2. Te dwa nowe fagi miały różne miejsca integracji w chromosomie i zostały wprowadzone w przeciwnej orientacji.

Trzydzieści całych sekwencji chromosomowych (reprezentujących 24 genomy z Surinamu i 6 genomów z poza Surinamu) podstawiono do serwera CSI Phylogeny 1.4 (Kaas i wsp., 2014) w celu skonstruowania drzewa filogenetycznego na podstawie danych otrzymanych metodą polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP, ang. Single Nucleotide Polymorphism). Sekwencje były dopasowane do referencyjnego chromosomu (izolat USA300 FPR3757), a następnie identyfikowano warianty SNP. Referencyjny chromosom posiadał 2 872 769 nukleotydów, z tego 2 837 117 pozycji (98,76% referencyjnego chromosomu) znaleziono we wszystkich analizowanych chromosomach. Serwer CSI Phylogeny 1.4 ujawnił 6 klastrów bardzo blisko spokrewnionych chromosomów (Rycina 1). Znaleziono również siedem unikatowych chromosomów, które nie zostały zaklasyfikowane do żadnego z klastrów, w tym sześć izolatów USA300, epidemiologicznie niepowiązanych z izolatami Surinamu.

W obrębie klastra izolaty różniły się do 17 mutacji SNP, podczas gdy minimalna różnica między klastrami wynosiła 69 mutacji SNP. Klastry, które obejmowały izolaty od epidemiologicznie powiązanych pacjentów, to znaczy od pacjentów, którzy byli leczeni na tym samym oddziale lub leżeli na tej samej sali chorych podczas nakładających się okresów hospitalizacji, różniły się maksymalnie 8 mutacjami SNP. Nie więcej niż 6 mutacji SNP można było ustalić dla izolatów z różnych miejsc anatomicznych tych samych pacjentów i pielęgniarki. W oparciu o analizę SNP zidentyfikowano trzy pary chromosomów, które były nierozróżnialne. Każda para nierozróżnialnych chromosomów należała do izolatów od tych samych pacjentów. W obrębie klastra odległości SNP nie zawsze były dyskryminujące dla izolatów pochodzących od tego samego pacjenta lub dla izolatów pochodzących od innych pacjentów. Można to zilustrować w klastrze F, gdzie izolaty z nosa i krocza pacjenta 8 różniły się od siebie pięcioma mutacjami SNP, ale tylko od jednej do trzech mutacji SNP od izolatów z innych pacjentów. Izolaty od pacjentów leczonych na różnych oddziałach, a analiza bezpośrednich dróg transmisji okazała się mało

prawdopodobna ze względów epidemiologicznych, różniły się od 11 do 17 mutacji SNP (klaster C).



Rycina 1. Pokrewieństwo filogenetyczne izolatów epidemicznych ze Szpitala Akademickiego Paramaribo - AZP w 2013 roku.

W celu porównania analizy opartej na SNP z podejściem tzw. „gene-by-gene" zastosowano metodę *ad hoc* wgMLST (ang. whole genome MLST). W metodzie wgMLST wykorzystano genetycznie najbardziej spokrewniony genom jako referencję. Takie podejście wzmocniło rozdzielczość metody poprzez włączenie maksymalnej liczby homologicznych sekwencji kodujących, nie tylko z genomu rdzeniowego, ale również z genomu pomocniczego. Pełny chromosom szczepu *S. aureus* USA300 FPR3757, składający się z 2 869 genów, służył jako referencja dla analizy *ad hoc* wgMLST. Spośród wszystkich genów szczepu FPR3757, 2 767 genów zostało włączonych do analizy wgMLST, podczas gdy 102 geny zostały wykluczone przez program Ridom SeqSphere. Dendrogram (Rycina 1) został skonstruowany po analizie programem SeqSphere 30 całych sekwencji chromosomowych (tych samych genomów, jak w analizie opartej na SNP), który ujawnił 6 klastrów bardzo blisko spokrewnionych izolatów i 7

unikatowych chromosomów. Klastrowanie takie, przez wgMLST, było całkowicie zgodne z analizą SNP. Jedyną różnicą była niewiele niższa rozdzielczość wgMLST w porównaniu do analizy SNP. Więcej nierozróżnialnych izolatów zaobserwowano w metodzie wgMLST (2 pary i jedna trójka identycznych izolatów) niż w analizie SNP (3 pary identycznych izolatów). Zaobserwowano do 10 alleli różnicy w obrębie klastrów otrzymanych metodą wgMLST, a niespokrewnione izolaty różniły się między sobą co najmniej 48 allelami. W tych klastrach, w których izolaty wyizolowano od tego samego pacjenta lub można było wykazać bezpośredni przebieg transmisji między pacjentami, izolaty różniły się między sobą maksymalnie 5 allelami. Od 6 do 10 alleli różniły sie izolaty pomiędzy którymi nie znaleziono żadnego oczywistego łańcucha transmisyjnego.

Stabilny genomowy rdzeniowy MLST (cgMLST, ang. core genome MLST) jest metodą, która umożliwia typowanie wszystkich szczepów w obrębie gatunku, ponieważ wykorzystuje zawsze ten sam referencyjny genom szczepu *S. aureus* COL i standardowy zestaw 1 861 genów. Umożliwia to dostarczenie ogólnodostępnie rozwijanej uniwersalnej nomenklatury. Liczba genów używanych w metodzie cgMLST jest niższa niż ta w analizie wgMLST o około 900 (odpowiednio: 1 861 vs 2 767). Spowodowało to, że w analizie cgMLST obserwowana była wyższa liczba identycznych izolatów i niższa liczba alleli różnicy między izolatami spokrewnionymi i niespokrewnionymi.Klastry wyznaczone przez cgMLST były idealnie zgodne z tymi, które zostały wyprodukowane przez wgMLST. Używając metodę cgMLST znaleźliśmy 4 pary i pojedynczą czwórkę identycznych izolatów. Izolaty różniły się maksymalnie 6 allelami wewnątrz klastrów lub co najmniej 36 allelami, gdy porównywano niespokrewnione izolaty. Analiza 30 izolatów USA300 programem SeqSphere ujawniała 13 typów cgMLST.

Metoda PFGE została uznana za „złoty standard" wśród molekularnych metod typowania dla gatunku *S. aureus*. Chcieliśmy ustalić, czy PFGE może pogrupować izolaty USA300 w taki sposób jak metody SNP i wgMLST. Dla każdej sekwencji genomu, wzory restrykcyjne *SmaI* wyznaczono poprzez analizę *in silico*. Uzyskane profile genetyczne ujawniły niski stopień polimorfizmu wśród analizowanych izolatów. Analiza *in silico* wykazała jedynie 6 wzorów restrykcyjnych *SmaI* wśród 30 izolatów USA300, które zostały zaklasyfikowane do 2 odrębnych klastrów. Wszystkie izolaty USA300 z Surinamu były ze sobą spokrewnione. Jednak większość izolatów z Surinamu (n = 21) miała identyczny wzór PFGE, podczas gdy te same izolaty podzielono na 5 różnych klastrów i pojedynczy unikatowy izolat w analizach SNP i wgMLST. Ponadto pozostałe 3 izolaty z Surinamu były nierozróżnialne z epidemiologicznie niepowiązanymi izolatami z poza Surinamu, w przeprowadzonej *in silico* analizie makrorestrykcyjnej *SmaI*.

Izolaty USA300 z Surinamu testowane w tym badaniu zawierały od 1 do 4 plazmidów posiadając zwykle jeden duży plazmid (26 do 32 kpz) i co najmniej jeden mały plazmid (2 do 4 kpz). Wśród izolatów z Surinamu było sześć różnych typów plazmidów i cztery różne profile plazmidowe. Profile plazmidowe nie zawsze były zgodne z analizą SNP przeprowadzonej na chromosomach. Izolaty klonalnie spokrewnione wyizolowane od tego samego pacjenta posiadały 2 różne profile plazmidowe.

Badania wrażliwości fenotypowych określone przy użyciu pasków E-test firmy bioMérieux wykazały, że oporność na 21 antybiotyków nie była klastrowo specyficzna. Izolaty różnych

klastrów wykazały identyczne profile oporności na antybiotyki, a izolaty tego samego klastra miały inną wrażliwość na klindamycynę.

Podsumowanie i wnioski:
- W niniejszych pracy opisano pierwsze zastosowanie pełnych i zamkniętych genomów wszystkich analizowanych izolatów dostarczając bezprecedensowy poziom szczegółów podczas badań nad epidemią.
- Metoda WGS wykazała heterogeniczną strukturę populacji USA300 krążącej w Szpitalu Akademickim Paramaribo, co wskazuje na egzogenne źródło wariantów genomowych.
- W opisanej pracy wykazano, że konwencjonalne molekularne metody typowania, takie jak typowanie *spa* lub PFGE, nie dysponują wystarczającą rozdzielczością w badaniach epidemii, aby wykazać małe różnice w izolatach MRSA, które są genetycznie spokrewnione, ale niekoniecznie bezpośrednio przekazywane między pacjentami.
- Tylko WGS zapewnia rozdzielczość potrzebną do identyfikacji transmisji od pacjenta do pacjenta i ponownego wprowadzenia do szpitala klonalnie spokrewnionych bakterii krążących w środowisku pozaszpitalnym.
- Metoda WGS jest doskonałym narzędziem do badania epidemii i uzupełnia informacje epidemiologiczne niezbędne do skutecznego zwalczania i opanowania epidemii MRSA.
- Jest oczywistym, że metoda WGS stanowi nowy złoty standard w analizie epidemii szpitalnych i może być stosowana w kontroli zakażeń w celu zapobiegania przenoszeniu MRSA oraz przewidywania oporności i zjadliwości.

Sekwencjonowanie pełnego genomu jako narzędzie przewidywania oporności na antybiotyki: wgląd w mechanizmy kryptycznej oporności na antybiotyki u *S. aureus*.

Wyjaśnienie mechanizmów odpowiedzialnych za wrażliwość na klindamycynę i oksacylinę w naturalnie występujących izolatach klinicznych *S. aureus* posiadających geny *ermC* i *mecA* opisano w publikacjach:

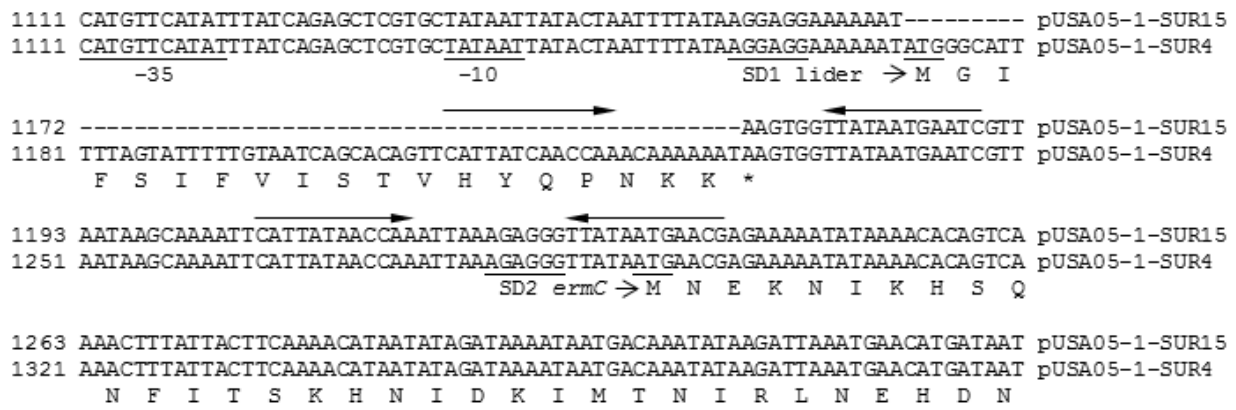
Sabat AJ, Hermelijn SM, Akkerboom V, Juliana A, Degener JE, Grundmann H, Friedrich AW. 2017. Complete-genome sequencing elucidates outbreak dynamics of CA-MRSA USA300 (ST8-spa t008) in an academic hospital of Paramaribo, Republic of Suriname. Sci Rep 7:41050.

Sabat AJ, Pournaras S, Akkerboom V, Tsakris A, Grundmann H, Friedrich AW. 2015. Whole-genome analysis of an oxacillin-susceptible CC80 *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolate: insights into the mechanisms of cryptic methicillin resistance. J Antimicrob Chemother 70(11):2956-64.

Obecnie określanie wrażliwości na antybiotyki wymaga od 48 do 72 godzin badań, od pobrania próbki od pacjenta do ostatecznego oznaczenia. Szybszą alternatywą dla fenotypowych testów wrażliwości na antybiotyki w diagnostyce klinicznej i w rutynowym nadzorze epidemiologicznym może być NGS. WGS umożliwia skanowanie sekwencji genomowych dla wszystkich znanych czynników determinujących oporność przeciwbakteryjną. Ostatnio wykazano, że WGS ma dobre wartości predykcyjne dla określania profili oporności na antybiotyki *S. aureus* (Aanensen i wsp., 2016). Jednak wyznaczanie *in silico* fenotypu oporności na antybiotyki nie jest jeszcze całkowicie rozwiązanym problemem. Aktualnie stosowane

metody bioinformatyczne mogą prowadzić do fałszywie pozytywnych i fałszywie negatywnych wyników. Ponadto regiony regulatorowe genów oporności na antybiotyki mogą modulować ich ekspresję utrudniając przewidywanie wrażliwości na antybiotyki *in silico*.

Stosując 24 izolaty *S. aureus* wyosobnione od pacjentów w Surinamie, określono skuteczność WGS jako narzędzia do przewidywania oporności na antybiotyki poprzez porównanie z konwencjonalnymi testami do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki. Wrażliwość na 21 antybiotyków została oznaczona metodą E-testu. WGS dokładnie przewidziało oporność dla prawie wszystkich antybiotyków. Wyjątkiem była klindamycyna. Plazmid oznaczony pUSA05-1, który posiadał gen *ermC* nadający oporność na klindamycynę, został znaleziony w 8 izolatach należących do 2 różnych klastrów. Plazmid ten zidentyfikowano we wszystkich izolatach klastra F i w dwóch z trzech izolatów klastra A (Rycina 1). Chociaż wywnioskowane sekwencje aminokwasowe genu *ermC* były identyczne w obu klastrach, to tylko izolaty SUR15 i SUR24 klastra A były oporne na klindamycynę. Różnicę znaleziono w regionie promotora, który wykazał obecność lub brak sekwencji liderowej o długości 58 pz (Rycina 2). Geny *ermC* ekspresjonowane konstytutywnie obserwowano tylko w tych izolatach posiadających delecję sekwencji liderowej w regionie promotora. Badania fenotypowe wykonane z użyciem krążków z klindamycyną i erytromycyną (DD test) wykazały indukowaną oporność na klindamycynę wśród pozostałych izolatów zawierających sekwencję liderową o długości 58 pz.



Rycina 2. Porównanie dwóch różnych typów regionów regulacyjnych genu *ermC*. Plazmidy pUSA05-1-SUR4 i pUSA05-1-SUR15 reprezentują indukowalny i konstytutywny typ ekspresji genu *ermC*. Pozycje promotora genu *ermC* (-35 i -10) są wskazane przez podkreślenie, podobnie jak początek transkrypcji peptydu liderowego i genu metylazy *ermC* oraz miejsc wiązania rybosomu SD1 i SD2. Sekwencje aminokwasowe wywnioskowane z sekwencji nukleotydowych oznaczone są jednoliterowymi skrótami. Gwiazdka wskazuje kodon stop. Odwrócone powtórzone sekwencje oznaczone są strzałkami.

W ciągu ostatniej dekady opublikowano wiele prac naukowych dotyczących identyfikacji naturalnie występujących wrażliwych na oksacylinę *mecA*-pozytywnych izolatów *S. aureus* (Ikonomidis i wsp., 2008; Kumar i wsp., 2013; Saeed i wsp., 2010). Poprzednie badania

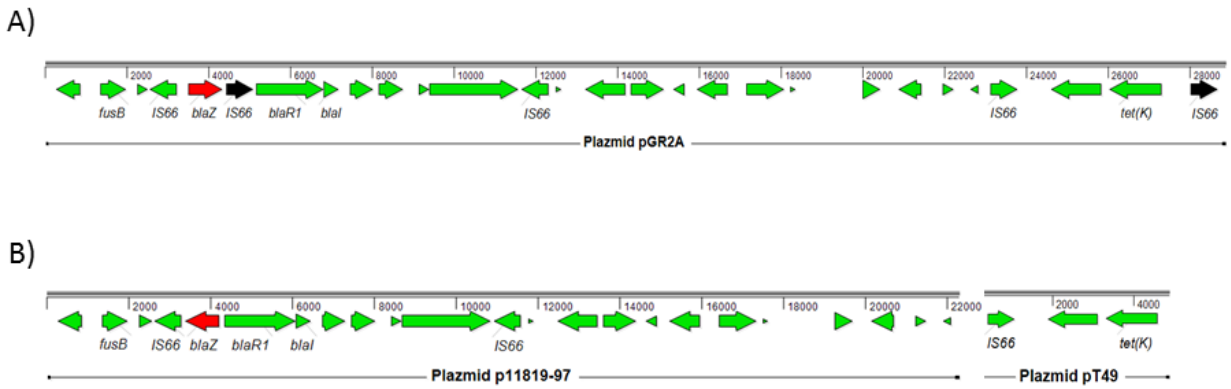
wykazały, że około 3% izolatów *S. aureus* wrażliwych na oksykacylinę posiadało gen *mecA* (Proulx i wsp., 2016). Biorąc pod uwagę miliony klinicznych zakażeń MRSA i stosunkowo wysokie odsetki *mecA*-pozytywnych izolatów *S. aureus* wrażliwywch na oksacylinę może to doprowadzić do wniosku, że takie izolaty istniały wcześniej, ale były błędnie identyfikowane przez kliniczne laboratoria mikrobiologiczne w rutynowych badaniach.

Systemy regulacyjne *mec* i *bla*, wśród innych elementów genetycznych zlokalizowanych w chromosomie lub na plazmidach, są podstawowymi czynnikami regulującymi ekspresję genu *mecA* w *S. aureus*. W celu wyjaśnienia mechanizmu leżącego u podstaw wrażliwości na oksykacylinę naturalnie występującego *mecA*-pozytywnego izolatu *S. aureus*, zastosowano WGS w celu zbadania czynników genetycznych wpływających na oporność na metycylinę.

NGS zostało przeprowadzone przy użyciu systemu Roche 454 GS FLX+, a także systemu MiSeq Illumina. Surowe pliki sff (system Roche 454 GS FLX +) o długości odczytu 700-1200 nukleotydów lub pliki FASTQ (MiSeq Illumina) o długości odczytu 300 nukleotydów zostały złożone *de novo* w kontigi przy użyciu oprogramowania SeqMan NGen. Przerwy między kontigami zamykano za pomocą amplifikacji PCR i sekwencjonowania Sangera.

Genom wrażliwego na oksacylinę *mecA*-pozytywnego izolatu *S. aureus* oznaczonego jako GR2 składał się z chromosomu o długości 2 792 802 pz i dwóch plazmidów pGR2A i pGR2B o rozmiarach odpowiednio 28 895 i 2 473 pz. Izolat GR2 z typem *spa* t044 i MLST ST728, który jest wariantem genotypu ST80 różniącym się sekwencją tylko w jednym spośród siedmiu analizowanych genów, należał do kompleksu klonalnego (CC, ang. Clonal Complex) 80. Sekwencję genomu izolatu GR2 porównano z wcześniej odczytaną sekwencją genomu opornego na oksacylinę *mecA*-pozytywnego izolatu *S. aureus* oznaczonego jako 11819-97. Izolat 11819-97 charakteryzował się genotypem ST80 i był przedstawicielem europejskiego szczepu pozaszpitalnego CA-MRSA (ang. community acquired MRSA), (Stegger i wsp., 2012). Obydwa analizowane chromosomy wykazały 98,21% identycznych pozycji nukleotydowych. Izolaty GR2 i 11819-97 posiadały kasetę SCC*mec* typu IV różniąc się tylko regionem J2. SCC*mec* typu IV nie zawiera genu *mecI*, a jego gen *mecR1* jest skrócony i niefunkcjonalny. Obydwa izolaty różniły się między sobą również plazmidami. Sekwencja nukleotydowa plazmidu pGR2A wykazała najwyższe podobieństwo do plazmidu p11819-97 izolatu 11819-97 (Rycina 3). Plazmid pGR2B nie miał żadnego odpowiednika w izolacie 11819-97 i był najbardziej zbliżony do plazmidu pKH19 również występującego w szczepach *S. aureus*. Obydwa genomy posiadały geny, które powinny nadać fenotypową oporność na aminoglikozydy, beta-laktamy, kwas fusydowy, makrolidy i tetracykliny.

Na plazmidzie pGR2A, z izolatu wrażliwego na oksacylinę, znaleziono gen *blaZ* kodujący beta-laktamazę i jego geny regulacyjne *blaI* i *blaR1* (Rycina 3). Gen *blaZ* na plazmidzie pGR2A miał odwrotną orientację do genu *blaZ* znajdującego się na plazmidzie p11819-97. Ponadto, gen kodujący transpozazę przynależącą do rodziny IS*66* przeszedł multiplikację i oddzielił *blaZ* od swoich genów regulatorowych *blaI* i *blaR1*. Organizacja systemu *bla*, taka jak ta na plazmidzie pGR2A, jest unikatowa w *S. aureus*.



Rycina 3. Porównanie struktur plazmidów: (a) pGR2A obecny w izolacie GR2 oraz (b) p11819-97 i pT49 obecne w izolacie 11819-97. Strzałki przedstawiają geny: zielone, wspólne dla obu izolatów i posiadające taką samą orientację; czerwony, wspólny dla obu izolatów, ale posiadający odwrotną orientację; i czarny, specyficzny dla izolatu GR2. Następujące wybrane geny zostały adnotowane: gen kodujący oporność na penicylinę (*blaZ*) i jego geny regulacyjne (*blaI* i *blaR1*); gen kodujący oporność na kwas fusydowy (*fusB*); gen kodujący oporność na tetracyklinę [*tet*(K)]; i gen koduący transpozazę przynależącą do rodziny IS*66*.

Inwersja genu *blaZ* i multiplikacja genu transposazy spowodowały utratę oryginalnego regionu promotorowo/operatorowego *blaR1* na plazmidzie pGR2A. Ponadto koniec 5' genu *blaR1* uległ delecji. Dane te wskazały, że niefunkcjonalny, skrócony o koniec N anty represor BlaR1 może być produkowany przez wrażliwy na oksacylinę *mecA*-pozytywny izolat. W odwróconym regionie plazmidu pGR2A, gen *blaZ* poprzedzony był idealnie zakonserwowaną sekwencją regionu promotorowo/operatorowego *blaZ*, włączając sekwencje miejsc wiązania rybosomu, sekwencje promotora i sekwencje palindronowe, do których wiąże się represor BlaI. Sekwencje nukleotydowe genów *blaZ* i *blaI* były identyczne z odpowiednimi sekwencjami plazmidu p11819-97. Pomimo, że plazmid pGR2A posiadał nienaruszoną sekwencję genu *blaZ*, izolat GR2 wykazywał bardzo niską, w zakresie wrażliwości, wartość MIC (ang. minimal inhibitory concentration) penicyliny (0,094 mg/l).

Porównano także inne geny niezwiązane z systemami *mec* i *bla*, które regulują fenotypową ekspresję oporności na metycylinę, między izolatami GR2 i 11819-97. Analiza sekwencji wykazała identyczne sekwencje tych genów w obu izolatach.

Izolat GR2 hodowano w obecności czynnika leczącego komórki z plazmidów. Spowodowało to utratę dwóch plazmidów, co potwierdzono analizą WGS. Izolat GR2, który przed eksperymentem był wrażliwy na oksacylinę i penicylinę (wartości MIC odpowiednio 1,0 i 0,094 mg/L), po utracie plazmidów wykazał oporność na oksacylinę i penicylinę (wartości MIC odpowiednio 6,0 i 0,5 mg/l). Wyniki analizy WGS przed i po eksperymencie usunięcia plazmidów z komórki wyraźnie wskazały, że plazmid pGR2A z w pełni funkcjonalnym represorem BlaI i niefunkcjonalnym anty represorem BlaR1 odpowiedzialny był za wrażliwość na oksacylinę *mecA*-pozytywnego izolatu GR2 *S. aureus*. Możemy stwierdzić, że BlaI konstytutywnie hamował ekspresję genu *mecA*; jednakże w obecności antybiotyków beta-laktamowych, derepresja nie występowała, ponieważ nie było produkcji funkcjonalnego białka BlaR1 do dezaktywacji represora BlaI związanego z promotorem. Wyjaśnia to fenotyp

wrażliwości na oksacylinę i penicylinę izolatu GR2, chociaż geny oporności *mecA* i *blaZ* oraz ich nienaruszone regiony promotorowo/operatorowe były obecne w genomowym DNA.

Podsumowanie i wnioski:

- Były to pierwsze badania genetyczne wyjaśniające mechanizm odpowiedzialny za wrażliwość na oksacylinę w naturalnie występującym *mecA*-pozytwnym klinicznym izolacie *S. aureus*.
- Po ekspozycji na antybiotyki beta-laktamowe, niefunkcjonalny anty represor BlaR1 nie dezaktywował represora BlaI, derepresja nie występowała i gen *mecA* nie był wydajnie ekspresjonowany.
- Usunięcie systemu *bla* poprzez wyleczenie komórek z plazmidu pGR2A umożliwiło konstytutywną ekspresję genu *mecA*, co spowodowało oporność na oksacylinę i penicylinę.
- Taka utrata plazmidu może potencjalnie zachodzić *in vivo* podczas terapii antybiotykami beta-laktamowymi.
- Konieczne są zatem dalsze badania w celu zidentyfikowania dodatkowych czynników genetycznych i mechanizmów, które również przyczyniają się do wrażliości na oksacylinę *mecA*-pozytywnych izolatów *S. aureus*.
- Aby zaradzić niekontrolowanemu rozprzestrzenianiu się wrażliwych na oksacylinę *mecA*-pozytywnych izolatów *S. aureus* w szpitalach, a także w środowisku pozaszpitalnym, należy przeprowadzić testy fenotypowe (wykrywanie PBP2a) w połączeniu z metodami genotypowymi (np. detekcja genu *mecA* techniką PCR).

Wyznaczenie genetycznej organizacji złożonych wysp zawierających ACME wśród różnych genotypów *S. aureus*.

Analizę genetycznej organizacji nowych wysp złożonych zawierających element ACME zaprezentowano w publikacjach:

Sabat AJ, Köck R, Akkerboom V, Hendrix R, Skov RL, Becker K, Friedrich AW. 2013. Novel organization of the arginine catabolic mobile element and staphylococcal cassette chromosome *mec* composite island and its horizontal transfer between distinct *Staphylococcus aureus* genotypes. Antimicrob Agents Chemother 57(11):5774-7.

Sabat AJ, Ilczyszyn WM, van Rijen M, Akkerboom V, Sinha B, Kluytmans J, Miedzobrodzki J, Grundmann H, Friedrich AW. 2015. Genome-wide analysis reveals two novel mosaic regions containing an ACME with an identical DNA sequence in the MRSA ST398-t011 and MSSA ST8-t008 isolates. J Antimicrob Chemother 70(5):1298-302.

WGS jest w stanie ujawnić genetyczne podstawy dla klonalnej ekspansji i zjadliwości MRSA. Od 2001 roku odnotowano znaczny wzrost liczby zakażeń w Stanach Zjednoczonych wywołanych przez MRSA i zostało to powiązane z rozprzestrzenianiem się klonu USA300, najpierw w środowisku pozaszpitalnym (Carleton i wsp., 2004), a później w szpitalach (Seybold i wsp., 2006). Wyjątkowy sukces epidemiologiczny klonu USA300 CA-MRSA można częściowo przypisać obecności elementu ACME (Diep i wsp., 2006; Tenover and Goering, 2009). ACME zlokalizowane jest w chromosomie klonu USA300 poniżej kasety SCC*mec* typu IVa, tworząc wyspę złożoną ACME-SCC*mec* (ACME-SCCmec-CI, ang. ACME-SCC*mec* composite island),

(Diep i wsp., 2006). Najistotniejszymi cechami ACME są operon deiminazy argininowej (geny *arc*) oraz operon permeazy oligopeptydowej (geny *opp*). ACME podnosi zdolność klonu USA300 do kolonizacji skóry eliminując odczyn kwaśny środowiska utworzony z kwasów tłuszczowych oraz sprzyja przetrwaniu i wzrostowi *S. aureus* poprzez obniżenie dostępności l-argininy, która jest jedynym substratem do produkcji tlenku azotu przez makrofagi (Thurlow i wsp., 2013). Ponadto klon USA300 posiada zlokalizowany na ACME gen *speG* kodujący N-acetylotransferazę spermidyny, która przeciwdziała toksyczności poliamin (Joshi i wsp., 2011). Dotychczas zidentyfikowano trzy typy ACME, które między sobą różnią się dystrybucją klastrów genów *arc* oraz *opp*. Obecność obydwu klastrów charakterystyczna jest tylko dla ACME typu I, podczas gdy ACME typu II posiada tylko geny *arc*, a ACME typu III zawiera jedynie geny *opp*. Do tej pory w izolatach *S. aureus* zidentyfikowano tylko ACME typu I i skróconej postaci ACME typu II.

Celem tych badań było ustalenie rozpowszechnienia i genetycznej organizacji ACME-SCC*mec*-CI stosując WGS w szczepach *S. aureus* z różnych linii genetycznych.

Analizowano obecność ACME łącznie w 425 izolatach MRSA wyosobnionych od pacjentów hospitalizowanych w latach od 2002 do 2010 w holendersko-niemieckim obszarze EUREGIO. W celu wykrycia ACME, wszystkie izolaty poddano analizie stosując diagnostyczne mikromacierze DNA (system ArrayMate) i zestaw StaphyType opracowany przez firmę Alere Technologies, co umożliwiało wykrycie klastra genów *arc*. Ponadto, w celu wykrycia klastra genów *opp*, przeprowadzono amplifikacje PCR genów ACME-*opp3AB* (Diep i wsp., 2008). Wszystkie izolaty były również charakteryzowane typowaniem *spa*, a ACME-pozytywne izolaty poddano typowaniu MLST.

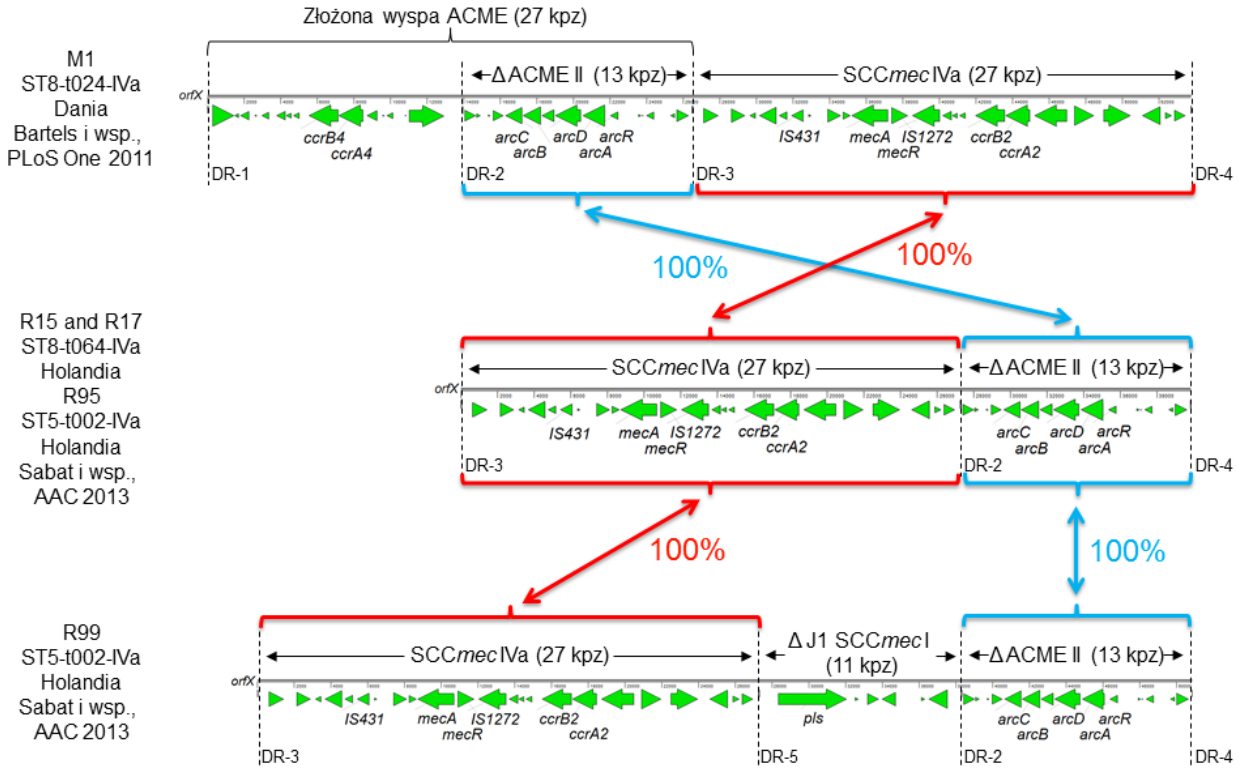
Wśród scharakteryzowanych izolatów MRSA, 36 z nich (8,47%) było pozytywnych w analizie ACME. Dwadzieścia dziewięć izolatów posiadało dwa główne klastry genów identyfikowane w ACME (geny *arc* i *opp*). Opierając się na typach *spa* i MLST oraz wynikach z mikromacierzy, zostały one zidentyfikowane jako USA300 (ST8-t008). Pozostałe 7 izolatów ACME-pozytywnych zawierało tylko klaster genów ACME-*arc* i należało do dwóch odrębnych linii genetycznych powiązanych z genotypami ST8-t064 (n = 4) i ST5-t002 (n = 3). W izolatach ACME-pozytywnych wykryto tylko SCC*mec* typu IV.

Do dalszej charakterystyki przy użyciu WGS wybrano sześć ACME-pozytywnych izolatów MRSA. Zamiarem było włączenie 2 reprezentatywnch izolatów z każdego ACME-pozytywnego genotypu: ST8-t008 (USA300), ST8-t064 i ST5-t002. NGS zostało przeprowadzone przy użyciu systemu MiSeq Illumina. Program komputerowy SeqMan NGen został wykorzystany do złożenia odczytów *de novo*. Kontigi obejmujące sekwencje DNA powiązane z elementami ACME lub SCC*mec* zostały zidentyfikowane przez oprogramowanie BLAST. Pozostałe przerwy pomiędzy kontigami zawierającymi sekwencje ACME i SCC*mec* zostały zamknięte poprzez amplifikację PCR i sekwencjonowanie Sangera.

We wszystkich charakteryzowanych izolatach, kaseta SCC*mec* typu IVa zintegrowana była z chromosomem bakteryjnym na końcu 3’ genu *orfX*, a poniżej kasety położony był element ACME. ACME typu I był obecny tylko w izolatach zaklasyfikowanych jako USA300, podczas gdy w pozostałych izolatach wykryto skróconą postać ACME typu II.

Dwa izolaty USA300 ujawniły obecność ACME-SCC*mec*-CI o tym samym rozmiarze (54 374 pz), w tym SCC*mec* IVa był długości 23 387 pz, natomiast ACME I posiadał długość 30 987 pz. Sekwencja ACME-SCC*mec*-CI tych dwóch izolatów była niemal identyczna (99%) jak w izolatach referencyjnych USA300 oznaczonych FPR3757 i TCH1516, których sekwencje genomu zostały wcześniej opublikowane (Diep i wsp., 2006; Highlander i wsp. 2007).

Analiza sekwencji ACME-SCC*mec*-CI w izolatach ST8-t064 i ST5-t002 ujawniła całkowicie nową strukturę genetyczną. Skrócona postać ACME typu II była wstawiona poniżej elementu SCC*mec* (Rycina 4), co nie było wcześniej opisane dla *S. aureus*. Wszystkie izolaty ST8-t064 i ST5-t002 wykazały identyczne sekwencje SCC*mec* typu IVa i skróconą sekwencję ACME typu II o rozmiarach odpowiednio 27 251 pz i 12 544 pz. Dodatkowo, jeden z dwóch izolatów ST5-t002 posiadał skrócony region J1 SCC*mec* typu I o długości 11 000 pz wstawiony pomiędzy elementy SCC*mec* typu IVa i ACME typu II (Rycina 4). Dlatego dwa izolaty ST8-t064 i jeden izolat ST5-t002, reprezentujące dwa różne genotypy, miały identyczną sekwencję ACME-SCC*mec*-CI o wielkości 39 852 pz.

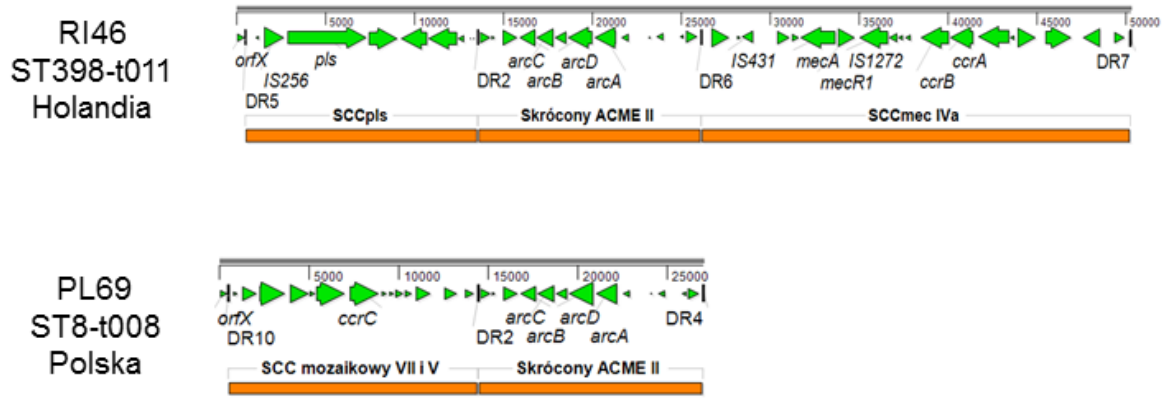


Rycina 4. Porównanie struktur ACME-SCC*mec*-CI. Następujące wybrane geny zostały adnotowane: szlak deimanazy argininowej (*arcCBDAR*), rekombinazy kasety SCC*mec* (*ccrB4*, *ccrA4*, *ccrB2* i *ccrA2*), determinanta kodująca oporność na metycylinę (*mecA*) i jej gen regulatorowy (*mecR*), transpozazy IS*431* i IS*1272* oraz białka powierzchniowego wrażliwego na plazminę (*pls*).

Przeszukania w bazie danych GenBank za pomocą algorytmu BLAST wykazały, że sekwencje skróconej postaci ACME typu II i kasety SCC*mec* typu IVa (z izolatów ST8-t064 i ST5-t002) były identyczne z odpowiednimi sekwencjami izolatu ST8-t024 wyizolowanego od pacjenta w Kopenhadze, w Danii (Rycina 4), (Bartels i wsp., 2011). Najważniejszą różnicą między izolatami pochodzącymi z Holandii i Danii było to, że duński izolat miał skróconą postać ACME typu II umieszczoną przed kasetą SCC*mec* typu IVa. Sekwencja skróconej postaci ACME typu II zidentyfikowana w izolatach ST8-t064 i ST5-t002 była identyczna lub różniła się tylko jednym nukleotydem od odpowiednich sekwencji w izolatach pochodzących z różnych miejsc geograficznych. Jednakże sekwencje regionu SCC*mec* w tych izolatach reprezentowały inne typy lub podtypy kasety SCC*mec* niż SCC*mec* typu IVa.

Kolejne izolaty *S. aureus*, które okazały się być ACME-pozytywne na podstawie analizy mikromacierzy DNA (system ArrayMate), zostały otrzymane podczas dwóch różnych badań (Rycina 5). Pierwszy izolat, który wyosobniono z rany pacjenta w Holandii w 2011 roku, należał do linii MRSA powiązanej ze zwierzętami hodowlanymi i posiadał MLST ST398 oraz typ *spa* t011. Izolat ten miał nową organizację ACME-SCC*mec*-CI o wielkości 49 796 pz z regionem SCC*pls* wintegrowanym w genie *orfX*, po czym następowała skrócona postać ACME typu II i kaseta SCC*mec* typu IVa. Niniejsze badania po raz pierwszy wykazały obecność ACME i genu *pls* w linii MRSA z ST398. Wcześniej wykazano, że białko Pls wrażliwe na plazminę jest czynnikiem wirulencji w modelu septycznego zapalenia stawów u myszy (Josefsson i wsp., 2005). Te determinanty mogą zwiększyć transmisję, ułatwić kolonizację człowieka i wzmocnić zjadliwość szczepów ST398 powszechnie powiązanych ze zwierzętami hodowlanymi.

Drugi izolat ACME-pozytywny z MLST ST8 i typem *spa* t008 wyizolowano z błony śluzowej przedsionka nosa bezobjawowego nosiciela w Polsce w 2005 roku. Wyniki uzyskane podczas analizy mikromacierzy wykazały, że izolat ST8-t008 był ACME-pozytywny i SCC*mec*-negatywny, co jest rzadko obserwowane w *S. aureus*. Jego złożona wyspa obejmująca ACME składała się z 26 539 pz. Analiza sekwencyjna ujawniła podobny do SCC element niosący gen *ccrC*, a następnie skróconą postać ACME typu II. Izolaty ST398-t011 i ST8-t008 zawierały skróconą postać ACME typu II o identycznej sekwencji nukleotydowej i wielkości 12 545 pz. Ponadto ich sekwencja ACME była identyczna z odpowiednimi sekwencjami izolatów charakteryzowanych w naszych poprzednich badaniach, opisanych powyżej w niniejszym autoreferacie (Sabat i wsp., 2013), a także w niezależnych badaniach (Bartels i wsp., 2011; Espedido i wsp., 2012).



Rycina 5. Porównanie struktur złożonych wysp ACME-SCC*mec* z izolatów *S. aureus*. Strzałki wskazują geny. Następujące wybrane geny zostały adnotowane: metylotransferaza rRNA (*orfX*) zawierająca miejsce integracji SCC*mec*, szlak deimanazy argininowej (*arcCBDA*), recombinazy kasety SCC*mec* (*ccrA, ccrB* i *ccrC*), determinanta kodująca oporność na metycylinę (*mecA*) i jej gen regulatorowy (*mecR1*), transpozazy IS*256*, IS*431* i IS*1272* oraz białko powierzchniowe wrażliwe na plazminę (*pls*). Pionowe słupki wskazują powtórzenia bezpośrednie (DR).

Podsumowanie i wnioski:

- Był to pierwszy opis regionu zawierającego ACME typu II, który znajduje się za kasetą SCC*mec*.
- Po raz pierwszy wykazano również identyczny ACME-SCC*mec*-CI w dwóch genetycznie odległych liniach MRSA.
- Obecność identycznej sekwencji nukleotydowej skróconej postaci ACME typu II w izolatach o różnych genotypach wskazała na jej niedawny transfer lateralny.
- Geny znajdujące się w ACME i gen *pls*, wykryte po raz pierwszy w linii MRSA powiązanej ze zwierzętami hodowlanymi, mogą podnosić zdolność do kolonizacji ludzi, a także zjadliwość i transmisję szczepu ST398.
- Była to także pierwsza prezentacja struktury wyspy złożonej zawierającej ACME w izolacie MSSA.
- Niniejsze badania wywołały pytanie, czy izolat MSSA pochodził od przodka, który był szczepem MRSA lub rekombinazy Ccr znajdujące się w elementach genetycznych podobnych do SCC mogą być zaangażowane w transfer ACME niezależnie od elementów SCC*mec*.
- Pomimo konserwatywnego charakteru genomu rdzeniowego, wyspy złożone wykazują zadziwiający stopień mozaikowości, co ma wpływ na transmisje *S. aureus* wśród ludzi, a tym samym na zdrowie publiczne.

PIŚMIENNICTWO

Aanensen DM, Feil EJ, Holden MT, Dordel J, Yeats CA, Fedosejev A, Goater R, Castillo-Ramírez S, Corander J, Colijn C, Chlebowicz MA, Schouls L, Heck M, Pluister G, Ruimy R, Kahlmeter G, Åhman J, Matuschek E, Friedrich AW, Parkhill J, Bentley SD, Spratt BG, Grundmann H; European SRL Working Group. 2016. Whole-Genome Sequencing for Routine Pathogen Surveillance in Public Health: a Population Snapshot of Invasive *Staphylococcus aureus* in Europe. MBio 7(3). pii: e00444-16.

Bartels MD, Hansen LH, Boye K, Sørensen SJ, Westh H. 2011. An unexpected location of the arginine catabolic mobile element (ACME) in a USA300-related MRSA strain. PLoS One 6(1):e16193.

Billal DS, Feng J, Leprohon P, Légaré D, Ouellette M. 2011. Whole genome analysis of linezolid resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals resistanceand compensatory mutations. BMC Genomics 17;12:512.

Carleton HA, Diep BA, Charlebois ED, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. 2004. Community-adapted methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): population dynamics of an expanding community reservoir of MRSA. J Infect Dis 190(10):1730-8.

Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, Lin F, Lin J, Carleton HA, Mongodin EF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. 2006. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 367(9512):731-9.

Diep BA, Stone GG, Basuino L, Graber CJ, Miller A, des Etages SA, Jones A, Palazzolo-Ballance AM, Perdreau-Remington F, Sensabaugh GF, DeLeo FR, Chambers HF. 2008. The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette *mec* linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis 197:1523–1530.

Dreisbach A, Hempel K, Buist G, Hecker M, Becher D, van Dijl JM. 2010. Profiling the surfacome of Staphylococcus aureus. Proteomics 10(17):3082-96.

Espedido BA, Steen JA, Barbagiannakos T, Mercer J, Paterson DL, Grimmond SM, Cooper MA, Gosbell IB, van Hal SJ, Jensen SO. 2012. Carriage of an ACME II variant may have contributed to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 239-like strain replacement in Liverpool Hospital, Sydney, Australia. Antimicrob Agents Chemother 56(6):3380-3.

Hasman H, Saputra D, Sicheritz-Ponten T, Lund O, Svendsen CA, Frimodt-Møller N, Aarestrup FM. 2014. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. J Clin Microbiol 52(1):139-46.

Highlander SK, Hultén KG, Qin X, Jiang H, Yerrapragada S, Mason EO Jr, Shang Y, Williams TM, Fortunov RM, Liu Y, Igboeli O, Petrosino J, Tirumalai M, Uzman A, Fox GE, Cardenas AM, Muzny DM, Hemphill L, Ding Y, Dugan S, Blyth PR, Buhay CJ, Dinh HH, Hawes AC,

Holder M, Kovar CL, Lee SL, Liu W, Nazareth LV, Wang Q, Zhou J, Kaplan SL, Weinstock GM. 2007. Subtle genetic changes enhance virulence of methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*. BMC Microbiol 7:99.

Ikonomidis A, Michail G, Vasdeki A, Labrou M, Karavasilis V, Stathopoulos C, Maniatis AN, Pournaras S. 2008. In vitro and in vivo evaluations of oxacillin efficiency against mecA-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 52(11):3905-8.

Josefsson E, Juuti K, Bokarewa M, Kuusela P. 2005. The surface protein Pls of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is a virulence factor in septic arthritis. Infect Immun 73(5):2812-7.

Joshi GS, Spontak JS, Klapper DG, Richardson AR. 2011. Arginine catabolic mobile element encoded *speG* abrogates the unique hypersensitivity of *Staphylococcus aureus* to exogenous polyamines. Mol Microbiol 82(1):9-20.

Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, Lund O. 2014. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencingplatforms. PLoS One 9(8):e104984.

Kalia VC, Kumar R, Kumar P, Koul S. 2016. A Genome-Wide Profiling Strategy as an Aid for Searching Unique Identification Biomarkers for *Streptococcus*. Indian J Microbiol 56(1):46-58.

Köser CU, Holden MT, Ellington MJ, Cartwright EJ, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL, Hsu LY, Chewapreecha C, Croucher NJ, Harris SR, Sanders M, Enright MC, Dougan G, Bentley SD, Parkhill J, Fraser LJ, Betley JR, Schulz-Trieglaff OB, Smith GP, Peacock SJ. 2012. Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak. N Engl J Med 366(24):2267-75.

Kumar VA, Steffy K, Chatterjee M, Sugumar M, Dinesh KR, Manoharan A, Karim S, Biswas R. 2013. Detection of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* isolates by use of chromogenic medium MRSA ID. J Clin Microbiol 51(1):318-9.

Law JW, Ab Mutalib NS, Chan KG, Lee LH. 2015. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. Front Microbiol 5:770.

Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, Prior K, Szczepanowski R, Ji Y, Zhang W, McLaughlin SF, Henkhaus JK, Leopold B, Bielaszewska M, Prager R, Brzoska PM, Moore RL, Guenther S, Rothberg JM, Karch H. 2011. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. PLoS One 6(7):e22751.

Morgenstern M, Post V, Erichsen C, Hungerer S, Bühren V, Militz M, Richards RG, Moriarty TF. 2016. Biofilm formation increases treatment failure in *Staphylococcus epidermidis* device-related osteomyelitis of the lower extremity in human patients. J Orthop Res 34(11):1905-1913.

O'Neil CR, Wilson E, Missaghi B. 2016. Bone and Joint Infections due to *Haemophilus parainfluenzae*: Case Report and Review of the Literature. Can J Infect Dis Med Microbiol 2016:4503025.

Patel JB. 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. Mol Diagn 6(4):313-21.

Proulx MK, Palace SG, Gandra S, Torres B, Weir S, Stiles T, Ellison RT 3rd, Goguen JD. 2016. Reversion from methicillin susceptibility to methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* during treatment of bacteremia. J Infect Dis 213(6):1041-8.

Rudkjøbing VB, Thomsen TR, Xu Y, Melton-Kreft R, Ahmed A, Eickhardt S, Bjarnsholt T, Poulsen SS, Nielsen PH, Earl JP, Ehrlich GD, Moser C. 2016. Comparing culture and molecular methods for the identification of microorganisms involved in necrotizing soft tissue infections. BMC Infect Dis 16(1):652.

Saeed K, Dryden M, Parnaby R. Oxacillin-susceptible MRSA, the emerging MRSA clone in the UK? 2010. J Hosp Infect 76(3):267-8.

Seybold U, Kourbatova EV, Johnson JG, Halvosa SJ, Wang YF, King MD, Ray SM, Blumberg HM. 2006. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. Clin Infect Dis 42(5):647-56.

Stegger M, Price LB, Larsen AR, Gillece JD, Waters AE, Skov R, Andersen PS. 2012. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain 11819-97, an ST80-IV European community-acquired methicillin-resistant isolate. J Bacteriol 194(6):1625-6.

Sugarman B, Clarridge J. 1982. Osteomyelitis caused by *Moraxella osloensis*. J Clin Microbiol 15(6):1148-9.

Tenover FC, Goering RV. 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. J Antimicrob Chemother 64(3):441-6.

Thurlow LR, Joshi GS, Clark JR, Spontak JS, Neely CJ, Maile R, Richardson AR. 2013. Functional modularity of the arginine catabolic mobile element contributes to the success of USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Cell Host Microbe 13(1):100-7.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Moje inne osiągnięcia po ukończeniu pracy doktorskiej, które nie są objęte tematem habilitacyjnym:

Wykrycie nowych szczepów MRSA, które posiadają gen *mecC* i ważne czynniki zjadliwości.
Podczas moich badań prowadzonych w ramach grupy naukowej kierowanej przez prof. Alexandra W. Friedricha (UMCG, Groningen, Holandia) we współpracy z grupami naukowymi kierowanymi przez prof. Karstena Beckera (Szpital Uniwersytecki, Muenster, Niemcy) oraz przez dr Ralfa Ehrichta (Alere Technologies GmbH, Jena, Niemcy), izolaty MRSA zawierające kasetę SCC*mec* typu XI, wyizolowane w holendersko-niemieckim regionie transgranicznym Euregio, zostały scharakteryzowane za pomocą mikromacierzy DNA (Sabat i wsp., 2012). W przeciwieństwie do wcześniejszych doniesień naukowych, nasze grupy badawcze wykazały po raz pierwszy, że dwa szczepy MRSA z różnych linii klonalnych zawierające kasetę SCC*mec* typu XI posiadały ważne czynniki zjadliwości. Wzbudziło to obawy, że szczepy MRSA o podniesionym potencjale zjadliwości i ograniczonej wykrywalności standardowymi testami molekularnymi (w czasie pisania publikacji) mogą rozprzestrzeniać się w Europie. Następnie nasze grupy oceniły komercyjnie dostępny test wykrywania MRSA oparty na multipleks PCR wykorzystując w tym celu międzynarodową kolekcję zawierającą izolaty MRSA zarowno *mecC*-jak i *mecA*-dodatnie. Badany test wykazał 100% czułości i specyficzności dla identyfikacji gatunku *S. aureus* oraz wykrywania genów *mecA* i *mecC* (Becker i wsp., 2013).

Becker K, Larsen AR, Skov RL, Paterson GK, Holmes MA, **Sabat AJ**, Friedrich AW, Köck R, Peters G, Kriegeskorte A. 2013. Evaluation of a modular multiplex-PCR methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection assay adapted for *mecC* detection. J Clin Microbiol 51(6):1917-9. **IF_{2013} = 4,232; $MNiSW_{2016}$ = 30**

Sabat AJ, Koksal M, Akkerboom V, Monecke S, Kriegeskorte A, Hendrix R, Ehricht R, Köck R, Becker K, Friedrich AW. 2012. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains that carry a novel genetic homologue and important virulence determinants. J Clin Microbiol 50(10):3374-7. **IF_{2012} = 4,068; $MNiSW_{2016}$ = 30**

Metoda MLVA / MLVF.
Po ukończeniu pracy doktorskiej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego dołączyłem do grupy badawaczej kierowanej przez prof. dr hab. Walerię Hryniewicz w Państwowym Instytucie Zdrowia Publicznego w Warszawie, gdzie pracowałem nad rozwojem metody MLVA (ang. multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis) służącej do typowania izolatów *S. aureus*. Grupa prof. W. Hryniewicz wraz z grupą kierowaną przez prof. dr hab. Jacka Międzobrodzkiego (Uniwersytet Jagielloński, Kraków) dokonała porównania metody MLVA z metodami PFGE, typowania *spa* oraz MLST na grupie 59 klinicznych izolatów *S. aureus* (głównie metycylinoopornych), (Malachowa i wsp., 2005). Pozwoliło to na ustalenie możliwych kryteriów grupowania wzorów MLVA oraz sprawdzenie poziomu zgodności pomiędzy wynikami uzyskanymi powyższymi metodami. W kolejnych badaniach MLVA została porównana z następnymi metodami typowania (także z metodami opartymi na amplifikacji PCR) w celu określenia jej przydatności jako metody pierwszej linii dla szybkiego różnicowania izolatów *S. aureus* w warunkach szpitalnych i pozaszpitalnych. (Sabat i wsp., 2006; Karynski i wsp., 2008; Luczak-Kadlubowska i wsp., 2008). Podczas procesu

walidacji zmieniliśmy nazwę tej metody z MLVA na MLVF (ang. multiple-locus variable-number tandem-repeat fingerprinting). W trakcie moich badań doświadczalnych w ramach grupy naukowej pod kierownictwem prof. Alexandra W. Friedricha (UMCG, Groningen, Holandia) metoda MLVF została połączona z technologią mikroprzepływów w celu szybkiego różnicowania linii MRSA w ogniskach epidemicznych (Sabat i wsp., 2012). Metoda MLVF zastosowana na polimerowych czipach mikroprzepływowych okazała się szybkim, tanim, powtarzalnym i wysoce różnicującym narzędziem do określania klonalności izolatów MRSA i śledzenia rozprzestrzeniania się szczepów w okresach wielu lat (Sabat i wsp., 2012). Inne badania przeprowadzone w UMCG przez różnych badaczy potwierdziły, że MLVF w połączeniu z technologią mikroprzepływową jest atrakcyjną metodą do typowania izolatów *S. aureus* z wysoką rozdzielczością i ustalania ich pokrewieństwa (van der Kooi-Pol i wsp., 2013; Amissah i wsp., 2015; Glasner i wsp., 2013A; Glasner i wsp., 2013B).

Amissah NA, Chlebowicz MA, Ablordey A, **Sabat AJ**, Tetteh CS, Prah I, van der Werf TS, Friedrich AW, van Dijl JM, Rossen JW, Stienstra Y. 2015. Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates Transmitted between Patients with Buruli Ulcer. PLoS Negl Trop Dis 9(9):e0004049. **IF_{2015} = 3,948; $MNiSW_{2016}$ = 45**

Glasner C, **Sabat AJ**, Chlebowicz MA, Vanderhaeghen W, Fetsch A, Guerra B, Huber H, Stephan R, Torres C, Butaye P, Voss A, Wulf M, van Dijl JM. 2013A. High-resolution typing by MLVF unveils extensive heterogeneity of European livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with the sequence type 398. Int J Med Microbiol 303(3):124-7. **IF_{2013} = 3,420; $MNiSW_{2016}$ = 35**

Glasner C, **Sabat AJ**, Dreisbach A, Larsen AR, Friedrich AW, Skov RL, van Dijl JM. 2013B. Rapid and high-resolution distinction of community-acquired and nosocomial *Staphylococcus aureus isolates* with identical pulsed-field gel electrophoresis patterns and spa types. Int J Med Microbiol 303(2):70-5. **IF_{2013} = 3,420; $MNiSW_{2016}$ = 35**

Karynski M, **Sabat AJ**, Empel J, Hryniewicz W. 2008. Molecular surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiple-locus variable number tandem repeat fingerprinting (formerly multiple-locus variable number tandem repeat analysis) and spa typing in a hierarchic approach. Diagn Microbiol Infect Dis 62(3):255-62. **IF_{2008} = 2,139; $MNiSW_{2016}$ = 25**

Luczak-Kadlubowska A, **Sabat A**, Tambic-Andrasevic A, Payerl-Pal M, Krzyszton-Russjan J, Hryniewicz W. 2008. Usefulness of multiple-locus VNTR fingerprinting in detection of clonality of community- and hospital-acquired *Staphylococcus aureus* isolates. Antonie Van Leeuwenhoek 94(4):543-53. **IF_{2008} = 1,673; $MNiSW_{2016}$ = 20**

Malachowa N, **Sabat A**, Gniadkowski M, Krzyszton-Russjan J, Empel J, Miedzobrodzki J, Kosowska-Shick K, Appelbaum PC, Hryniewicz W. 2005. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol 43(7):3095-100. **IF_{2005} = 3,537; $MNiSW_{2016}$ = 30**

Sabat AJ, Chlebowicz MA, Grundmann H, Arends JP, Kampinga G, Meessen NE, Friedrich AW, van Dijl JM. 2012. Microfluidic-chip-based multiple-locus variable-number tandem-repeat

fingerprinting with new primer sets for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 50(7):2255-62. **IF_{2012} = 4,068; $MNiSW_{2016}$ = 30**

Sabat A, Malachowa N, Miedzobrodzki J, Hryniewicz W. 2006. Comparison of PCR-based methods for typing *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol 44(10):3804-7. **IF_{2006} = 3,445; $MNiSW_{2016}$ = 30**

van der Kooi-Pol MM, Sadaghian Sadabad M, Duipmans JC, **Sabat AJ**, Stobernack T, Omansen TF, Westerhout-Pluister GN, Jonkman MF, Harmsen HJ, van Dijl JM. 2013. Topography of distinct *Staphylococcus aureus* types in chronic wounds of patients with epidermolysis bullosa. PLoS One 8(6):e67272. **IF_{2013} = 3,534; $MNiSW_{2016}$ = 35**

Rozpowszechnienie genów *sdr* wśród szczepów *S. aureus* izolowanych z przedsionka nosa bezobjawowych nosicieli oraz z zakażeń inwazyjnych.
Większość zakażeń powodowanych przez *S. aureus* wynika z połączonego działania różnych czynników. Jednak nadal nie jest dobrze zrozumiany udział określonych czynników zjadliwości w patogenności *S. aureus* u ludzi. Podczas charakteryzowania szczepów *S. aureus* metodą MLVA/MLVF znaleźliśmy również szczepy posiadające we wzórze elektroforetycznym tylko pięć prążków, zamiast sześciu lub siedmiu. Po analizie opartej na amplifikacji PCR typu simpleks przy użyciu par starterów przeznaczonych dla metody MLVA/MLVF ustaliliśmy, że podzbiór szczepów *S. aureus* miał tylko pojedynczy gen w locus *sdr* kodujący białko posiadające powtórzenia serynowo-asparaginianowe (Sabat i wsp., 2006). Dalsze badania wykazały, że gen *sdrC* był obecny we wszystkich badanych szczepach (n = 497). Znaleźliśmy istotne powiązanie pomiędzy profilem genowym, który charakteryzował się obecnością genu *sdrC* oraz nieobecnością genów *sdrD* i *sdrE*, a szczepami MSSA (P = 0,0005). Dwa lub trzy geny *sdr* były zawsze wykrywane we wszystkich szczepach MRSA (n = 115). Wśród badanych szczepów gen *sdrD* miał istotne powiązanie ze szczepami MRSA (P <0,0001), podczas gdy rozpowszechnienie genu *sdrE* nie różniło się pomiędzy szczepami MSSA i MRSA (P = 0,4898). Sprawdziliśmy rozpowszechnienie genów *sdr* pomiędzy szczepami wyizolowanymi z wymazów z przedsionka nosa od bezobjawowych nosicieli (n = 259) i z zakażeń inwazyjnych, zapalenia kości (n = 89) oraz zakażenia krwi (n = 52). Szczepy posiadające tylko gen *sdrC* w locus *sdr* nie były znajdowane wśród szczepów zebranych z zakażeń kości (P = 0,0019). Jest to silne wskazanie, że szczepy posiadające tylko gen *sdrC* nie są wstanie lub mają istotnie obniżony potencjał, aby wywołać zakażenia kości. W przeciwieństwie do zapaleń kości (osteomyelitis), wśród szczepów wyizolowanych z zakażeń krwi wykryto profil genowy *sdrC*-dodatni, *sdrD*-ujemny, *sdrE*-ujemny (P = 0,6001). Gen *sdrD* był istotnie powiązany z zapaleniem kości (P <0,0001), ale nie z zakażeniami krwi. Nie stwierdzono istotnej korelacji genu *sdrE* z zakażeniami krwi (P = 0,3457) i zapaleniem kości (P = 1,000). Zrozumienie specyficznych mechanizmów patogennych może mieć istotny wpływ na profilaktykę i terapię. Aby zapewnić skuteczne i opłacalne zapobieganie infekcji, ważne jest, aby odróżniać szczepy kolonizujące jamę nosową mogące być bardziej agresywne niż te, które nie są wstanie wywołać inwazyjnej infekcji lub odznaczają się znacznie obniżonym potencjałem do jej wywołania.

Sabat A, Melles DC, Martirosian G, Grundmann H, van Belkum A, Hryniewicz W. 2006. Distribution of the serine-aspartate repeat protein-encoding sdr genes among nasal-carriage and invasive *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol 44(3):1135-8. **IF_{2006} = 3,445; $MNiSW_{2016}$ = 30**

Genetyczna analiza genu *aur* kodującego aureolizynę.
Bakterie gatunku *S. aureus* ekspresjonują kilka proteaz, które uważane są za ważne składniki przyczyniające się do ich zjadliwości. Jedną z tych proteaz jest aureolizyna produkowana zewnątrzkomórkowo przez *S. aureus*. Należy ona do rodziny metaloproteaz podobnych do termolizyny. Pomimo znaczenia aureolizyny w fizjologii i patogenezie *S. aureus* stosunkowo niewiele informacji było dostępnych w odniesieniu do różnorodności i mobilności genu *aur* w obrębie i pomiędzy największymi grupami populacji *S. aureus*. Analiza różnorodnej epidemiologicznie i genetycznie kolekcji szczepów *S. aureus* potwierdziła wniosek, że gen *aur* występuje w dwóch odrębnych typach spokrewnionych ze sobą sekwencji (Sabat i wsp., 2008). Gen *aur* był znacznie bardziej polimorficzny, ale jednocześnie wykazywał wyższy dobór oczyszczający, niż geny wykorzystywane w metodzie MLST. Drzewa filogenetyczne skonstruowane na podstawie sekwencji nukleotydowych genu *aur* i łączonych (konkatenowanych) genów MLST ujawniły kilka przypuszczalnych rekombinacji asortatywnych (tj. wymiany całego genu *aur*) pomiędzy różnymi liniami *S. aureus*. Odkryliśmy również dowody na rekombinacje intragenowe (tj. wymianę wewnętrznych segmentów genu *aur*). Zbadaliśmy właściwości biochemiczne i specyficzność substratową dwóch typów aureolizyny oczyszczonych do stanu jednorodności, ujawniając niewielkie różnice w ich powinowactwie do substratów syntetycznych o niskiej masie cząsteczkowej. Mimo, że zidentyfikowano wiele różnic nukleotydowych między badanymi typami aureolizyny, nasze ustalenia wykazały, że silny dobór oczyszczający działa na gen *aur*. Zgodnie z tym, dobór oczyszczający może zapewniać jedynie niewielkie różnice fenotypowe i nie powinien być mechanizmem izolowania populacji bakteryjnych.

Sabat AJ, Wladyka B, Kosowska-Shick K, Grundmann H, van Dijl JM, Kowal J, Appelbaum PC, Dubin A, Hryniewicz W. 2008. Polymorphism, genetic exchange and intragenic recombination of the aureolysin gene among *Staphylococcus aureus* strains. BMC Microbiol 8:129. **IF_{2008} = 2,877; $MNiSW_{2016}$ = 30**

Inne badania.
Moje pozostałe osiągnięcia naukowe związane były z badaniami, w których wiodącą rolę odgrywali inni badacze i zostały przeprowadzone w dziedzinach: zjadliwości bakterii z rodzaju *Staphylococcus* (Bonar i wsp., 2016, Wladyka i wsp., 2015, Wladyka i wsp., 2008), genetycznej i strukturalnej charakterystyki proteaz cysteinowych produkowanych przez *S. aureus* (Golonka i wsp., 2004; Filipek i wsp., 2004), oporności *S. aureus* na metycylinę (Pournaras i wsp., 2015, Chlebowicz i wsp., 2013) oraz klonalnego charakteryzowania izolatów *S. aureus* zebranch od pacjentów na poziomie lokalnym (Ilczyszyn i wsp., 2016, Aiken i wsp., 2014, Krzysztoń-Russjan i wsp., 2006) oraz w całym Regionie Europejskim (Grundmann i wsp., 2014; Carriço i wsp., 2013).

Aiken AM, Mutuku IM, **Sabat AJ**, Akkerboom V, Mwangi J, Scott JA, Morpeth SC, Friedrich AW, Grundmann H. 2014. Carriage of *Staphylococcus aureus* in Thika Level 5 Hospital, Kenya: a cross-sectional study. Antimicrob Resist Infect Control 3:22. **$MNiSW_{2016}$ = 25**

Bonar E, Wojcik I, Jankowska U, Kedracka-Krok S, Bukowski M, Polakowska K, Lis MW, Kosecka-Strojek M, **Sabat AJ**, Dubin G, Friedrich AW, Miedzobrodzki J, Dubin A, Wladyka B. 2016. Identification of Secreted Exoproteome Fingerprints of Highly-Virulent and Non-Virulent

Staphylococcus aureus Strains. Front Cell Infect Microbiol 6:51. **$IF_{2016/2017}$ = 4,300; $MNiSW_{2016}$ = 40**

Carriço JA, **Sabat AJ**, Friedrich AW, Ramirez M; ESCMID Study Group for Epidemiological Markers (ESGEM). 2013. Bioinformatics in bacterial molecular epidemiology and public health: databases, tools and the next-generation sequencing revolution. Euro Surveill 18(4):20382. Review. **IF_{2013} = 4,659; $MNiSW_{2016}$ = 40**

Chlebowicz MA, Bosch T, **Sabat AJ**, Arends JP, Grundmann H, van Dijl JM, Buist G. 2013. Distinction of Staphylococcal Cassette Chromosome mec type V elements from *Staphylococcus aureus* ST398. Int J Med Microbiol 303(8):422-32. **IF_{2013} = 3,420; $MNiSW_{2016}$ = 35**

Filipek R, Szczepanowski R, **Sabat A**, Potempa J, Bochtler M. 2004. Prostaphopain B structure: a comparison of proregion-mediated and staphostatin-mediated protease inhibition. Biochemistry 43(44):14306-15. **IF_{2004} = 4,008; $MNiSW_{2016}$ = 25**

Golonka E, Filipek R, **Sabat A**, Sinczak A, Potempa J. 2004. Genetic characterization of staphopain genes in *Staphylococcus aureus*. Biol Chem 385(11):1059-67. **IF_{2004} = 3,598; $MNiSW_{2016}$ = 25**

Grundmann H, Schouls L, Aanensen D, Pluister G, Tami A, Chlebowicz M, Glasner C, **Sabat AJ**, Weist K, Heuer O, Friedrich A; ESCMID Study Group on Molecular Epidemiological Markers and the European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group. 2014. The dynamic changes of dominant clones of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections in the European region: Results of a second structured survey. Euro Surveill 19(49). **IF_{2014} = 5,722; $MNiSW_{2016}$ = 40**

Ilczyszyn WM, **Sabat AJ**, Akkerboom V, Szkarlat A, Klepacka J, Sowa-Sierant I, Wasik B, Kosecka-Strojek M, Buda A, Miedzobrodzki J, Friedrich AW. 2016. Clonal Structure and Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains from Invasive Infections in Paediatric Patients from South Poland: Association between Age, spa Types, Clonal Complexes, and Genetic Markers. PLoS One 11(3):e0151937. **$IF_{2016/2017}$ = 2,806; $MNiSW_{2016}$ = 35**

Krzysztoń-Russjan J, Tambic-Andrasevic A, Bukovski S, **Sabat A**, Hryniewicz W. 2006. First community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains in Croatia. Clin Microbiol Infect 12(7):697-8. **IF_{2006} = 3,254; $MNiSW_{2016}$ = 40**

Pournaras S, **Sabat AJ**, Grundmann H, Hendrix R, Tsakris A, Friedrich AW. 2015. Driving Forces of Mechanisms Regulating Oxacillin-Resistance Phenotypes of MRSA: Truly Oxacillin-Susceptible MecA-Positive *Staphylococcus Aureus* Clinical Isolates also Exist. Curr Pharm Des 21(16):2048-53. Review. **IF_{2015} = 3,052; $MNiSW_{2016}$ = 30**

Wladyka B, Bista M, **Sabat AJ**, Bonar E, Grzeszczuk S, Hryniewicz W, Dubin A. 2008. A novel member of the thermolysin family, cloning and biochemical characterization of metalloprotease from *Staphylococcus pseudintermedius*. Acta Biochim Pol 55(3):525-36. **IF_{2008} = 1,448; $MNiSW_{2016}$ = 15**

Wladyka B, Piejko M, Bzowska M, Pieta P, Krzysik M, Mazurek Ł, Guevara-Lora I, Bukowski M, **Sabat AJ**, Friedrich AW, Bonar E, Międzobrodzki J, Dubin A, Mak P. 2015. A peptide factor secreted by *Staphylococcus pseudintermedius* exhibits properties of both bacteriocins and virulence factors. Sci Rep. 5:14569. **IF_{2015} = 5,228; $MNiSW_{2016}$ = 40**

6. Podsumowanie

Sumarycznie, moja działalność naukowa obejmuje 36 publikacji w czasopismach z tzw. Listy Filadelfijskiej, w tym 33 prace eksperymentalne i 3 artykuły przeglądowe. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) wszystkich opublikowanych prac wynosi **136,506** ze średnim współczynnikiem oddziałwyania na publikację równym **3,792**. Sumaryczna liczba punktów $MNiSW_{2016}$ dla tych czasopism wynosi **1195**. Publikacje te były cytowane **864** razy, bez uwzględnienia autocytowań **808** razy. Indeks Hirscha (indeks *h*) moich publikacji wynosi **15** (dane odczytane 30.11.2017 r. ze strony Web of Science). Ponadto publikacja „Golonka i wsp., Biol Chem 2004; 385(11):1059-67", której jestem współautorem, została wyróżniona przez Komitet Mikrobiologii Polskiej Akademii Nauk w konkursie na najlepszą pracę eksperymentalną z zakresu mikrobiologii wykonaną w polskim laboratorium i opublikowaną w roku 2004.

Artur Sabat