

NARODOWY INSTYTUT LEKÓW

NARODOWE LABORATORIUM KONTROLI PRODUKTÓW LECZNICZYCH,
WYROBÓW MEDYCZNYCH I PRODUKTÓW BIOBÓJCZYCH

ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa



<http://www.nil.gov.pl>

Sekretariat (22) 851-43-69
Dyrektora: (22) 851-44-96

Kancelaria (22) 841-36-51
Fax: (22) 841-06-52

Warszawa 23.02.2018

Ocena osiągnięcia „Sekwencjonowanie nowej generacji w mikrobiologii medycznej: od ulepszonej identyfikacji bakterii do zwiększonych możliwości charakterystyki gatunku *Staphylococcus aureus*”, pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych, dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego dr. Artura Sabata w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Celem niniejszej recenzji jest ocena dorobku pana dr. Artura Sabata w ramach przeprowadzanego postępowania habilitacyjnego. Ocenę przeprowadzono na podstawie dokumentacji dostarczonej z Dziekanatu Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego dnia 13.02.18, wraz z pismem Centralnej Komisji ds. Stopni i Tytułów nr BCK-III-L-8406/2017 z dnia 5.02.18r.

Do oceny przedstawiono następujące materiały: autoreferat w języku polskim, autoreferat w języku angielskim, wykaz publikacji naukowych i innych osiągnięć naukowo-badawczych, informację o działalności dydaktycznej, współpracy naukowej, stażach naukowych i działalności popularyzującej naukę. Ponadto załączono kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego i kopię dyplomu doktora nauk biologicznych.

Przekazane materiały zostały przygotowane zgodnie z rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 września 2016 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. z 2016 poz. 1586).

Dr Artur Sabat uzyskał w 1994r dyplom magistra biotechnologii o specjalność biologią molekularną. Praca została zrealizowana w Zakładzie Mikrobiologii i Immunologii, Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytetu Jagiellońskiego. Stopień doktora nauk biologicznych o specjalności biochemia został mu nadany w 2003r przez Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński za rozprawę pt: „Molekularna analiza genu

kodującego aureolizynę, sekrecyjną metaloproteinazę *Staphylococcus aureus*." Praca została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jan Potempy.

Po uzyskaniu stopnia doktora, pan Artur Sabat rozpoczął pracę jako adiunkt w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego, obecnie Narodowy Instytut Leków w Warszawie, gdzie pracował do końca 2006r. Następnie w latach 2007-2010 odbył staż podoktorski w University Medical Center Groningen w Holandii. Dr Artur Sabat związany jest z Centrum Medycznym w Groningen do chwili obecnej, jako Senior Researcher, z przerwą między czerwcem a listopadem 2015, kiedy pracował jako researcher w centrum diagnostycznym CERTE w Groningen.

Ocena osiągnięcia naukowego

W skład osiągnięcia wchodzi 6 publikacji, w tym 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*”. Wspomniane artykuły zostały opublikowane w czasopismach: Euro Surveillance, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Journal of Antimicrobial Chemotherapy oraz Scientific Reports.

Dla dziedziny „Microbiology” wg Journal Citation Reports (JCR), mediana współczynnika oddziaływania wszystkich czasopism w tej kategorii wynosi 2,549 a dla dziedziny Infectious Diseases wynosi 2,509. Wszystkie publikacje dr. Artura Sabata zostały opublikowane w czasopismach o współczynniku oddziaływania między 4 a 5, a wszystkie czasopisma zaliczają się do kwartyła Q1 i znajdują się w pierwszej dziesiątce czasopism w kategorii Microbiology/Infectious Diseases/Multidisciplinary Sciences.

Na podstawie oświadczeń autorów i opisu wkładu przedstawionego przez dr. Artura Sabata, pełnił on rolę wiodącą w powstaniu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, a prace przedstawione jako osiągnięcie naukowe stanowią spójną tematycznie całość.

Celami badawczymi osiągnięcia naukowego było opracowanie niezależnej od hodowli metody identyfikacji bakterii przy użyciu ukierunkowanego NGS z podwyższoną dyskryminacją blisko spokrewnionych gatunków, kompleksowa analiza klonalności w czasie szpitalnej epidemii wywołanej przez lekooporny szczep gronkowca złocistego MRSA (ang. methicillin-resistant *S. aureus*), genotypowe przewidywanie fenotypowej oporności na antybiotyki z uwzględnieniem mechanizmów kryptycznej oporności *S. aureus* na antybiotyki oraz wyznaczenie genetycznej organizacji złożonych wysp zawierających element ACME (ang. arginine catabolic mobile element) wśród izolatów *S. aureus*.

Pierwsza praca przeglądowa z cyklu stanowi wprowadzenie w różnorodne metody typowania bakterii w celu oznaczenia ich pozycji systematycznej i pozwalającej na wyznaczenie pokrewieństwa pomiędzy szczepami metodami biologii molekularnej. Jest to bardzo dobrze cytowana praca (156 cytacji od 2013r.) co świadczy o jej znaczeniu i tym, że w bardzo dobry sposób przedstawia stan wiedzy w dziedzinie.

Pierwsza z pięciu prac eksperymentalnych opisuje opracowanie i zastosowanie metody identyfikacji bakterii w celach diagnostycznych. Metoda oparta jest na sekwencjonowaniu przy użyciu metod nowej generacji, amplikonów obejmujących region kodujący 16S-23S rRNA. W wyniku przeprowadzonych prac udało się pokazać, że rozdzielczość metody jest lepsza od innych metod identyfikacji powszechnie stosowanych w rutynowych klinicznych laboratoriach mikrobiologicznych. Nowa metoda pozwoliła prawidłowo zidentyfikować patogeny w próbkach moczu, krwi oraz z wysoką czułością – czynniki etiologiczne w próbkach klinicznych pobranych od pacjentów ortopedycznych. Opisana metoda może podnieść wydajność diagnostyczną w celu wykrycia gatunków chorobotwórczych bakterii w porównaniu z rutynowymi metodami mikrobiologicznymi, co może mieć wpływ na skuteczność leczenia antybiotykami.

Mimo iż nie podzielam optymizmu habilitanta, że metody oparte o sekwencjonowanie genomowe szybko zastąpią metody mikrobiologiczne w podstawowych laboratoriach diagnostycznych, jednak z poznawczego punktu widzenia jestem jak najbardziej entuzjastycznie nastawiona do takiego podejścia. Sekwencjonowanie NGS jest z pewnością niezastąpionym narzędziem w pracy laboratoriów referencyjnych i wysoko wyspecjalizowanych. Usprawnienie identyfikacji czynników etiologicznych, zwłaszcza w mieszanych zakażeniach, czy zakażeniach inwazyjnych, jest niezwykle ważne z punktu widzenia dobrania optymalnej strategii leczenia.

Druga publikacja opisuje wykorzystanie metod sekwencjonowania genomowego do analizy zależności pomiędzy izolatami *S. aureus* pobranymi od pacjentów i personelu medycznego podczas epidemii wywołanej tym patogenem w szpitalu akademickim w Paramaribo w Surinamie. Poznanie drogi transmisji szczepów podczas epidemii to ważne zagadnienie w zwalczaniu zakażeń, zwłaszcza szpitalnych. Niestety, w przypadku analizy wysoce klonalnych bakterii takich jak *S. aureus* czy niektóre serotypy *Streptococcus pyogenes*, dostępne metody mają zbyt niską rozdzielczość, żeby wykryć różnice pomiędzy izolatami. Przedstawiona w publikacji analiza 30 pełnych genomów *S. aureus* pozwoliła zidentyfikować pojedyncze różnice nukleotydowe (SNPs), delecje w obrębie 2 genów, plazmidy, oraz wykryć dwa nowe fagi *S. aureus*. Strategie takie jak zastosowana w niniejszej publikacji z powodzeniem stosuje się do analizy klonalnych paciorkowców takich jak *S. pyogenes* oraz analiz epidemiologicznych *S. aureus* (Long et al mBio. 2014 Sep-Oct; 5(5): e01692-14.; Olsen et al J Clin Microbiol. 2014 Dec;52(12):4210-6; Nasser et al Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Apr 29;111(17):E1768-76).

Kolejne dwie publikacje opisują użycie sekwencjonowania nowej generacji do wyjaśnienia mechanizmów oporności na antybiotyki w klinicznych izolatach. Prace dotyczą niezwykle istotnego problemu, czyli zbadania czy na podstawie danych genomowych da się szacować fenotyp oporności bakterii na stosowane w terapii antybiotyki. W świetle ostatnich doniesień (Nguyen et al Sci Rep. 2018 Jan 11; 8(1): 421) takie podejście oparte o analizy genomowe wydaje się przynosić wymierne wyniki. Prace opublikowane przez dr. Sabata dotyczą głównie ustalenia roli mobilnych elementów genetycznych i elementów regulatorowych w przewidywanej ekspresji genów warunkujących oporność na antybiotyki takie jak erytromycyna i antybiotyki beta-laktamowe.

Dwie ostatnie prace eksperymentalne wchodzące w skład osiągnięcia naukowego dotyczą genetycznej organizacji złożonych wysp zawierających element ACME (Arginine catabolic mobile element) wśród różnych genotypów *S. aureus*. Obecność elementu ACME podnosi zdolność klonów *S. aureus* do kolonizacji skóry eliminując odczyn kwaśny środowiska oraz sprzyja przetrwaniu i wzrostowi bakterii poprzez obniżenie dostępności L-argininy, która jest jedynym substratem do produkcji tlenu azotu przez makrofagi. Element ACME występuje raczej w szczepach MRSA podobnych do USA300, co czyni obecność ACME istotnym czynnikiem rozprzestrzeniania się patogennych szczepów *S. aureus*. Analizy genomowe wykazały występowanie zróżnicowanej architektury w rejonie ACME-SCCmec-CI (ang. ACME-SCCmec composite island) czyli elementu ACME wraz z kasetą warunkująca oporność na antybiotyki beta-laktamowe. Co ciekawe, wykryto taką złożoną wyspę w izolacie wrażliwym na antybiotyki beta-laktamowe (MSSA). W wyniku przeprowadzonych analiz udało się pokazać różnice organizacji pomiędzy kasetami ACME-SCCmec-CI oraz uzyskać wyniki sugerujące jej transfer horyzontalny. Wyniki uzyskane przez dr. Sabata wpisują się również w badania dotyczące specyficzności gospodarza dla *S. aureus*, geny kodowane przez element ACME wykryto bowiem w grupie szczepów (ST398), która wywodzi się od świń, jednak w ostatnich latach zaczęła kolonizować również ludzi i wywoływać u nich infekcje.

Na podstawie przedstawionych publikacji mogę stwierdzić, że cele założone przez Habilitanta zostały zrealizowane. Wyniki przedstawione przez dr. Artura Sabata wpisują się w nowoczesne badania dotyczące typowania mikroorganizmów. Informacje, które można uzyskać na podstawie analizy sekwencji genomowych oprócz tego, że mogą zastąpić dotychczasowe żmudne i często nieporównywalne między laboratoriami metody typowania, pozwalają na zdobycie wielu dodatkowych informacji, które będą mogły być wykorzystane w przyszłości.

Podsumowując, przedstawione, jako osiągnięcie naukowe, przez dr. Artura Sabata wyniki są oryginalne, na wysokim poziomie merytorycznym i stanowią istotny wkład do poznania mechanizmów rozprzestrzeniania się *S. aureus*, selekcji klonalnej i oporności tego groźnego patogenu na antybiotyki.

Ocena pozostałego dorobku

Sumaryczny impact factor czasopism, w których opublikowane zostały prace wchodzące w skład dorobku naukowego kandydata to 136,506 (według listy Journal Citation Reports, zgodnie z rokiem opublikowania), liczba cytowań – 864, Indeks H – 15. W mojej ocenie jest to dorobek zdecydowanie ponadprzeciętny, szczególnie w dziedzinie takiej jak mikrobiologia medyczna/choroby zakaźne. Między złożeniem wniosku a wykonaniem niniejszej recenzji upłynęło około 3 miesięcy. Pozwoliłam sobie więc sprawdzić czy zmianie uległy liczby cytowań artykułów, których autorem lub współautorem jest dr Artur Sabat. Rzeczywiście, w ciągu tego czasu kilka artykułów było dodatkowo cytowanych, włączając w to np. 10 cytacji artykułu przeglądowego wchodzącego w skład osiągnięcia naukowego oraz innych artykułów. Świadczy to o tym, że prace, w których uczestniczy dr. Sabat są ważne dla środowiska osób zajmujących się podobną tematyką.

Dorobek publikacyjny niewchodzący w skład osiągnięcia naukowego jest obszerny (30 pozycji) i dotyczy kilku wątków tematycznych, takich jak identyfikacja i charakterystyka czynników wirulencji *S. aureus*; charakterystyka mechanizmów oporności na antybiotyki czy epidemiologia zakażeń *S. aureus*. Jednym z wątków w pracy dr. Artura Sabata, na które chciałabym zwrócić uwagę ze względu na ścisły związek z osiągnięciem naukowym, były różne aspekty identyfikacji bakterii i przypisywania ich do określonych grup w obrębie gatunku, czyli różnego rodzaju metody typowania. Jest to niezwykle ważne zagadnienie w przypadku mikroorganizmów, które określane są jako klonalne, czyli na przykład *S. aureus* oporny na metycylinę. Różne klony *S. aureus* mają niejednorodny potencjał epidemiczny i często bardzo ściśle wyspecjalizowane linie genetyczne odpowiedzialne są za występowanie określonego rodzaju infekcji. Epidemiologia opisowa *S. aureus* jest niezwykle rozbudowana i przez wiele lat rozwijana przez różne laboratoria. Warto przy tym wspomnieć, że dr Artur Sabat jest pierwszym autorem publikacji z 2003r. opisującej precyzyjną metodę MLVA/MLVF typowania gronkowców.

Dodatkowo dr Sabat był autorem szeregu ustnych wystąpień i plakatów na szeregu konferencjach. Zaangażowany był w różnorodne konsorcja i projekty badawcze. Za istotne uważam dwa konsorcja związane bezpośrednio z tematyką osiągnięcia naukowego, czyli szeroko pojętego typowania bakterii, udział w the ESCMID Study Group for Staphylococci and Staphylococcal Diseases – ESGS oraz ścisły związek z siecią SeqNet.org gdzie jest odpowiedzialny za przyjmowanie nowych kandydujących laboratoriów mikrobiologicznych do organizacji SeqNet.org, przeprowadzanie testów, na podstawie których laboratoria przyjmowane są do sieci i przeprowadzanie oraz ocenę testów biegłości.

Oprócz działań stricte związanych z działalnością badawczą, dr Sabat był również zaangażowany w działalność naukową i popularyzującą naukę. Był opiekunem naukowym w Europejskim programie edukacyjnym Erasmus+, opiekunem naukowym magistrantki na kierunku biologia na

Uniwersytecie w Groningen oraz promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim Weroniki Ilczyszyn i Maji Koseckiej-Strojek. Dodatkowo dr Sabat prowadził zajęcia dydaktyczne w ramach kursu „Immunology & Infectious Diseases Research course” dla studentów trzeciego roku studiów pierwszego stopnia na kierunku biologia Uniwersytetu w Groningen. Dr Sabat prowadził również specjalistyczne kursy laboratoryjne dla ekspertów zajmujących się identyfikacją i epidemiologicznym typowaniem bakterii w odniesieniu do klinicznej oraz weterynaryjnej mikrobiologii i / lub profilaktyki zakażeń (Capacity-building workshop "Whole Genome Sequencing for clinical microbiology and infection prevention"; Capacity-building Workshop „Rapid NGS for Characterization and Typing of Resistant Gram-Negative Bacilli, ESCMID Postgraduate Technical Workshop”; Kurs organizowany dla pracowników chińskiego centrum kontroli zakażeń (the China CDC) oraz laboratoriów zdrowia publicznego z różnych prowincji w Chinach; i inne).

Dr Artur Sabat wykazywał również aktywność recenzencką, dokonując oceny manuskryptów dla czasopism takich jak Lancet Infectious Diseases, Applied and Environmental Microbiology, BMC Microbiology, International Journal of Molecular Sciences, Journal of Clinical Microbiology, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, PLoS ONE, Eurosurveillance, Acta Biochimica Polonica, Journal of Global Antimicrobial Resistance.

Dr Artur Sabat pozostaje w kontakcie ze swoją macierzystą uczelnią, czyli Uniwersytetem Jagiellońskim i kontynuuje współpracę z zespołem prof. dr hab. Jacka Międzobrodzkiego w Zakładzie Mikrobiologii, oraz prof. dr hab. Adamem Dubinem i dr hab. Benedyktem Władyką w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii.

Współpraca naukowa obejmuje również wspólne projekty z prof. Hajo Grundmannem z Department of Infection Prevention and Hospital Hygiene, University Medical Centre Freiburg, University of Freiburg, Germany, światowej klasy specjalistą zajmującym się epidemiologią zakażeń gronkowcowych; prof. Spyrosem Pournarasem z Laboratory of Clinical Microbiology, ATTIKON Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, Greece; prof. Annaliją Pantosti z Department of Infectious, Parasitic, and Immune-Mediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy.

Dodatkowo dr Sabat współpracuje z partnerem przemysłowym - Alere Technologies GmbH (Abbott Rapid Diagnostics), Jena, Germany (dr Ralf Ehricht) w ramach prac badawczo-rozwojowych.

Podsumowanie

W oparciu o analizę dorobku dr. Artura Sabata stwierdzam, że spełnione zostały wszystkie wymogi stawiane kandydatom do uzyskania stopnia doktora habilitowanego zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w

zakresie sztuki (Dz. U z 2016, poz. 882 z późniejszymi zmianami w Dz. U z 2016 poz. 1311) oraz rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

Popieram wniosek dr. Artura Sabata o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia



Dr hab. Izabela Sitkiewicz