

АННОТАЦИЯ
диссертационной работы
Бабенко Дмитрия Борисовича
на тему:
**«ИССЛЕДОВАНИЕ КОНКОРДАНТНОСТИ И
ДИСКРИМИНИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ
МЕТОДОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В СУБВИДОВОМ ТИПИРОВАНИИ
МИКРООРГАНИЗМОВ»**
на соискание степени доктора философии (PhD)
по специальности 6D110100 «Медицина»

Актуальность

Методы внутривидового типирования микроорганизмов, предназначенные для проведения дифференцировки изолятов одного вида, являются важными эпидемиологическими инструментами в профилактике и контроле за инфекционными заболеваниями. Внутривидовое типирование микроорганизмов позволяет проводить различие между штаммами микроорганизмов, ассоциированные с эпидемическим процессом от несвязанных с ним представителей того же вида. Данная информация необходима при установлении источника инфекции и определении путей и механизмов распространения микроорганизмов во время вспышки инфекционного заболевания (MacCannell 2013). Благодаря лабораторным методам внутривидового типирования микроорганизмов появилась возможность количественно оценить эффективность системы наблюдения и контроля за инфекционными заболеваниями, обеспечивая проведение анализа в разработке стратегии управления в области общественного здравоохранения.

При всем разнообразии методов типирования патогенов, в основе которых лежат различные принципы, отличающихся как по времени выполнения исследования и трудозатратности, надежности, воспроизводимости и цене, так и способностью к дифференцировке изолятов (Foxman, Zhang et al. 2005), все методы могут быть подразделены на фенотипические и генотипические. В связи с наличием достаточно большого количества недостатков в фенотипических подходах исследования, таких как трудоемкость, время выполнения исследования, вариабельность результатов, относительно невысокая разрешающая способность (Keelara, Scott et al. 2014, Duarte, Seliwiorstow et al. 2016), молекулярно-генетические методы типирования в настоящее время заняли доминирующую позицию в решении различных задач микробиологии и эпидемиологии (Шагинян 2000).

На текущий момент предложено большое количество разнообразных методик внутривидового типирования микроорганизмов. Для каждого, имеющегося в арсенале молекулярной эпидемиологии, метода, в том числе нового разработанного подхода в типировании, научное сообщество дает оценку методу по ряду параметров, с целью понимания насколько успешно и

в каких случаях данная разработка может быть использована. Одним из главных параметров является дискриминирующая сила метода типирования, который оценивается с помощью показателя Симпсона.

Использование различных методов типирования микроорганизмов различными исследовательскими группами привело к тому, что на данный момент, в публикациях и базах данных накопилось и продолжает пополняться большое количество результатов типирования, что в свою очередь, приводит к необходимости проведения сравнительного анализа методов типирования по их разрешающей силе, а также уровня согласованности (конкордантности) результатов типирования.

Цель исследования

Сравнительная оценка конкордантности и дискриминирующей способности современных молекулярно-генетических методов субвидового типирования микроорганизмов.

Задачи исследования

1. Сформировать представительную коллекцию клинических штаммов *S.aureus*, аннотировать и определить чувствительности к антимикробным препаратам, а также получить полногеномные данные *S.aureus*, включая информацию о месте и времени изоляции, используя NCBI GenBank, NCBI PubMed, Pathosystems Resource Integration Center – PATRIC базы данных.
2. Провести внутривидовое типирование клинических штаммов *S.aureus* методами MLVA и Spa типирования, а также *in silico* типирование методами MLST, Spa, MVLST, MLVA, PFGE, cgMLST, wgMLST и panGenome, используя полногеномные данные *S.aureus*.
3. Оценить дискриминирующую мощность методов субвидового типирования *S.aureus* методом Симпсона.
4. Оценить конкордантность (согласованность) между результатами, полученными различными методами типирования на уровне внутривидовых типов и близкородственных групп/комплексов/кластеров методом Ранда.
5. Изучить параметры, влияющие на показатели конкордантности и дискриминирующей способности методов внутривидового типирования микроорганизмов.

Научная новизна

- Впервые в Казахстане проведено внутривидовое типирование коллекции клинических штаммов *S.aureus* методами MLVA и Spa, с целью определения разрешающей мощности каждого метода и уровня согласованности полученных результатов.
- Впервые получена сравнительная оценка 7 современных молекулярно-генетических методов типирования, включая подходы на основе полногеномного секвенирования, таких как cgMLST, wgMLST и panGenome, на большой коллекции геномов ($n = 4976$), что позволило ранжировать методы внутривидового типирования микроорганизмов по дискриминирующей способности, а также оценить показатели согласованности результатов на уровне внутривидовых типов и близкородственных групп/комплексов/кластеров.

- Проведена комплексная оценка факторов, оказывающих влияние на дискриминирующую способность метода типирования и конкордантность результатов, полученных разными методами типирования.

Практическая значимость

Проведенные в диссертационной работе исследования расширяют представления о преимуществах и недостатках каждого метода внутривидового типирования микроорганизмов, позволяя провести адекватный выбор метода в зависимости от типа задач практического здравоохранения, включая расследование как локальных вспышек, так и глобальных эпидемий.

Внедрения результатов в практику

По результатам диссертационного исследования получено 1 свидетельство о государственной регистрации прав на объект авторского права (Приложение А). Методы расчета оценки конкордантности и дискриминирующей способности методов типирования микроорганизмов, используемые в диссертационной работе, внедрены в учебный процесс кафедры микробиологии и кафедры молекулярной биологии и медицинской генетики. Метод кластеризации Spa типов в близкородственные внутривидовые группы стафилококков внедрен в лаборатории коллективного пользования КГМУ (Приложение Б).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Уровень резистентности *S.aureus*, выделенных в Центрально-Казахстанском регионе к макролидам (азитромицин) составил 25%. Уровень устойчивости к цефалоспорином (цефазолин, цефокситин) отмечался у 18% изолятов стафилококков. Резистентность к оксациллину наблюдалось на уровне 18%, обусловленная метициллин-устойчивыми штаммами стафилококка (MRSA), подтвержденная исследованием на наличие *mecA* гена.
2. Кластерный анализ результатов Spa и MLVA типирований изолятов *S.aureus* установил доминирование двух клональных групп/комплексов, структура которых указывает региональную циркуляцию представителей определенных внутривидовых групп. Обнаруженные t002, t030, t008 Spa типы указывают на принадлежность к клональным группам/комплексам *S.aureus* с глобальным эпидемическим распространением.
3. Дискриминирующая мощность MLVA и Spa методов, полученная при типировании коллекции клинических штаммов *S.aureus* ($n = 98$) была на уровне ~ 90-92%. Конкордантность результатов двух методов типирования составила 20,7% на уровне внутривидовых типов и 86,2% на уровне близкородственных групп/комплексов.
4. *In silico* анализ 4976 полногеномных данных *S.aureus* определил 100% дискриминирующую способность panGenome, wgMLST и cgMLST, 98% MLVA, 92% MVLST, 90% Spa и 85,5% MLST методов типирования. Согласованность результатов методов типирования не превысила 50% на уровне типов, за исключением cgMLST и wgMLST (85%). На уровне близкородственных групп/комплексов/кластеров конкордантность между данными типирования была в диапазоне от 66% до 95%. Исключение

составляет согласованность между MLVA типированием и другими методами субвидового типирования (39-61%).

5. Параметрами, влияющими на дискриминирующую способность схемы типирования, являются: количество локусов в схеме типирования, показатели межлокусной конкордантности и дискриминирующая мощность каждого локуса, входящего в схему типирования. Ведущая роль в определении разрешающей способности принадлежит показателю «количество маркеров» в схеме типирования. Коллекция микроорганизмов, которая подверглась внутривидовому типированию, также оказывает влияние на показатель Симпсона.

6. Все этапы кластерного анализа данных типирования микроорганизмов, включая выбор расчета матрицы генетических дистанций, алгоритм кластеризации с построением дендрограммы и правила формирования групп или значение cut-off влияют на группирование микроорганизмов и как следствие на показатель конкордантности между результатами внутривидового типирования микроорганизмов.

Связь диссертации с другими научно-исследовательскими работами

Диссертация выполнялась на базе лаборатории коллективного пользования НИЦ КГМУ в рамках научно-исследовательского проекта, финансируемого МОН РК «Многоцентровое исследование антибиотикорезистентности метициллин-устойчивых штаммов *Staphylococcus aureus* в Центральном Казахстане» (2012-2014) (№ госрегистрации 0112РК00812).

Апробация диссертации

Основные положения и результаты работы докладывались на Международной конференции молодых ученых «Мир науки и молодежь: достижения и перспективы», Караганда (Казахстан), 26 февраля 2015 года; 16 Международном конгрессе по инфекционным заболеваниям – ISID, Кейпт-Таун (ЮАР), 2-5 апреля, 2014 года; 25 Европейском конгрессе клинической микробиологии и инфекционных заболеваний – ECCMID, Копенгаген (Дания), 25-28 апреля 2015 года; 7 Международном конгрессе азиатско-тихоокеанского общества по инфекционному контролю – APSIC, Тайбэй (Тайвань), 26-29 марта 2015 года; XVII Международном конгрессе по антимикробной терапии – МАКМАХ (IACMAC), Москва (Россия), 20–22 мая 2015 г.; 17 Международном конгрессе по инфекционным заболеваниям – ISID, Хайдарабад (Индия), 2-5 марта 2016 года; Ближне-восточном и южно-азиатском конгрессе по эпигенетике и геномике инфекционных заболеваний – Амман (Иордания), 7-8 марта 2016 года; 26 Европейском конгрессе клинической микробиологии и инфекционных заболеваний – ECCMID, Амстердам (Нидерланды), 9-12 апреля 2016 года; Международной конференции молодых ученых «Мир науки и молодежь: новые пути развития», Караганда (Казахстан), 12 апреля 2016 года; XIX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье»,

Санкт-Петербург (Россия), 26 апреля, 2016; XVIII Международном конгрессе по антимикробной терапии – МАКМАХ (IASMAC), Москва (Россия), 25-27 мая 2016 г.

Предзащита проходила на расширенном заседании кафедры биологической химии КГМУ, протокол № 12 от 17 июня 2016 года.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 42 работы, в том числе главы в 2 книгах по лабораторной диагностике, опубликованных издательским домом Lambert. В изданиях, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки, опубликовано 5 работ. В изданиях, входящих в базу данных Scopus и/или Thomson Reuters опубликовано 13 публикаций, в том числе 6 статей и 7 тезисов.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 117 страницах, состоит из введения, основной части, заключения и списка использованных источников, включающих 228 ссылок на работы. В работе содержится 36 таблиц и 48 рисунков и 2 приложения.

Материалы и методы

В ходе исследования была сформирована коллекция клинических штаммов *S.aureus* (n=98) из различных отделений, включая педиатрическое, хирургическое, кожно-венерологическое, пульмонологическое и др. отделений стационаров городов: Караганда, Астана, Жезказган и Семей, а также данные 116 завершенных, аннотированных геномов и 4976 полногеномных последовательностей *S.aureus* в виде контигов/скаффолдов, полученные из GenBank NCBI базы данных.

Методы исследования: Оценка уровня устойчивости к антимикробным препаратам проводилась с помощью метода серийных разведений. Внутривидовое типирование клинических штаммов *S.aureus* осуществлялось методами Spa и MLVA. На основе внутривидовых типов, профилей проводилась кластеризация с использованием алгоритмов eBURST/MST и Jaccard/UPGMA. In silico определение MLST, MVLST, Spa, MLVA, cgMLST, wgMLST, panGenome типов проводилось с помощью биоинформатических инструментов на основе полногеномных данных. Анализ дискриминирующей способности метода типирования проводился на основе индекса Симпсона. Согласованность (конкордантность) результатов оценивалась с помощью скорректированного коэффициента Ранда как на уровне типов, так и на уровне близкородственных групп/комплексов.

Выводы:

1. Уровень устойчивости клинических изолятов *S.aureus* (n=98) Центрально-Казахстанского региона к макролидам (азитромицин) составляет 25%, а к цефалоспорином (цефазолин, цефакситин) – порядка 18%. Резистентность к оксациллину наблюдается на уровне 18% штаммами MRSA, что подтверждается ПЦР исследованием на наличие *mecA* гена.
2. Кластеризация данных Spa типирования и MLVA типирования изолятов *S.aureus* позволило установить 4 внутривидовых комплекса/группы с

доминированием двух клональных комплексов. Структура комплексов, включающая изоляты из различных городов Казахстана, указывает на взаимную циркуляцию представителей определенных внутривидовых групп. В то же время, обнаружение *Spa* типов t002, t030, t008 позволяет говорить о вовлеченности в глобальную эпидемиологию изолятов *S.aureus*, выделенных в Республике Казахстан.

3. Дискриминирующая мощность MLVA и *Spa* методов, полученная при типировании коллекции клинических штаммов *S.aureus* ($n = 98$) была на уровне ~90-92%.

4. Конкордантность результатов двух методов типирования (*Spa* и MLVA) составила 20,7% на уровне внутривидовых типов и 86,2% на уровне близкородственных групп, указывая на хорошую согласованность для внутривидовых групп, определенных данными методами типирования.

5. *In silico* анализ 4976 полногеномных данных глобальной коллекции *S.aureus*, позволил ранжировать 7 современных молекулярно-генетических методов типирования *S.aureus* по их дискриминирующей способности. Методы, основанные на полногеномной последовательности микроорганизмов, такие как *panGenome*, *wgMLST*, *cgMLST* продемонстрировали наивысшую разрешающую способность (100%). Метод типирования на tandemных повторах показал 98% дискриминирующую мощность. Разрешающая сила *MVLST* и *Spa* типирования была чуть выше 90% (92% и 90%, соответственно). Наименьшей дискриминирующей силой обладал *MLST* метод (85,5%).

6. Конкордантность данных методов типирования на уровне типов не превысила 50%, за исключение *cgMLST* и *wgMLST* (85%). Согласованность результатов, сгруппированных в близкородственные группы/комплексы/кластеры хорошую согласованность в диапазоне от 66% до 95%, за исключение согласованности между MLVA типированием и другими методами (39-61%).

7. Параметрами, влияющими на дискриминирующую способность схемы типирования, являются: количество локусов в схеме типирования, показатели межлокусной конкордантности и дискриминирующая мощность каждого локуса, входящие в схему типирования. Ведущая роль в определении разрешающей способности принадлежит показателю «количество маркеров» в схеме типирования. Кроме того, коллекция микроорганизмов, на которой выполнялось исследование, также влияет на показатель Симпсона, отражающий дискриминирующую мощность метода типирования.

8. Все этапы кластерного анализа данных, такие как выбор расчета матрицы генетических дистанций, алгоритмы кластерной сборки для построения дендрограммы, а также показатель *cut-off* или правила, на которых происходит формирование внутривидовых групп, оказывают влияние на показатель конкордантности между результатами внутривидового типирования микроорганизмов.