

**Бабенко Дмитрий Борисовичтің**  
диссертациялық жұмысына  
**АННОТАЦИЯ**

тақырыбы:

**«МИКРОАҒЗАЛАРДЫҢ СУБТҮРЛІ ТИПТЕНУІНДЕ  
ПАЙДАЛАНЫЛАТЫН МОЛЕКУЛЯРЛЫҚ ӘДІСТЕРДІҢ  
БАҒЫТТАСТЫЛЫҒЫ МЕН НӘТИЖЕЛЕРІН КЕМСІТУДЕГІ  
МҮМКІНДІКТЕРІН ЗЕРТТЕУ»**

6D110100 «Медицина» мамандығы бойынша философия докторы (PhD)  
дәрежесін іздену

**Өзектілігі**

Бір түрді сараландырудың оқшаулауыштарын өткізуге арналған микроағзаларды түрішілік типтеу әдістері инфекциялық ауруларды профилактикалау мен бақылауда маңызды эпидемиологиялық құралдар болып табылады. Микроағзаларды түрішілік типтеу сол түрге байланыссыз өкілдерінен эпидемиялық процеспен қауымдастырылған микроағзалардың штамдарының арасындағы айырмашылықты анықтауға мүмкіндік береді. Аталған ақпарат инфекциялық аурудың таралуы кезінде микроағзалардың таралу жолдары мен механизмдерін анықтау және инфекция ошағын анықтау кезінде қажет (MacCannell 2013). Микроағзалардың түрішілік типтелуінің зертханалық әдістерінің арқасында қоғамдық денсаулық сақтау саласындағы басқару стратегиясын әзірлеуде талдау жүргізуді қамтамасыз ете отырып инфекциялық ауруларды бақылау және қадағалау жүйесінің тиімділігін сандық бағалау мүмкіндігі туындады.

Зерттеу жүргізу және еңбек шығынын орындау уақыты, сенімділігі, орындалуы мен бағасы, сонымен қатар оқшаулаушыларды саралау мүмкіндігімен ерекшеленетін түрлі қағидаттар қарастыру негізінде (Foxman, Zhang et al. 2005) патогендерді типтеу әдістерінің түрлілігінде барлық әдістер фенотипті және генотипті деп жіктелуі мүмкін. Зерттеудің фенотипті жолдарында еңбек шығыны, зерттеу орындау уақыты, нәтижелердің түрленгіштігі, салыстырмалы түрде шешуші мүмкіндігінің төмендігі (Keelara, Scott et al. 2014, Duarte, Seliwiorstow et al. 2016) тәрізді жетіспеушіліктердің көп кездесуіне байланысты молекулярлық-генетикалық типтеу әдістері бүгінгі таңда микробиология мен эпидемиологияда түрлі тапсырмаларды шешуде басыңқы орынға ие болды (Шагинян 2000).

Ағымдағы уақытта микроағзалардың түрішілік типтелуінің түрлі әдістерінің үлкен саны ұсынылды. Молекулярлық эпидемиологияның арсеналындағы әр әдіс үшін ғылыми қауымдастық аталған әзірleme қаншалықты табысты шыққаны мен қандай жағдайларда қолданылуын түсіну мақсатында параметрлер қатарымен әдіске баға қояды. Басты параметрлердің бірі симпсон көрсеткішінің көмегімен бағаланатын типтеу әдісінің саралаушы күші болып табылады.

Микроағзаларды типтеудің түрлі әдістерін әртүрлі зерттеу топтарымен қолдану жарияланымдар мен мәліметтер базаларында қазіргі кезеңде типтеудің ауқымды көлемі жинақталғаны және толығып келе жатқанын көрсетті, ол өз қатарынан шешуші күшімен типтеудің әдістерінің салыстырмалы талдауын өткізу қажеттілігіне, сонымен қатар типтеу нәтижелерінің келісілуінің (бағыттастылығының) деңгейіне алып келеді.

### **Зерттеу мақсаты**

Микроағзалардың субтүрлік типтелуінің заманауи молекулярлық-генетикалық әдістерінің бағыттастылық пен нәтижені кемсітудегі мүмкіндігін салыстырмалы түрде бағалау.

### **Зерттеу міндеттері**

1. *S.aureus* клиникалық штамдарының өкілділік топтамасын қалыптастыру, микробқа қарсы препараттарға сезімталдығына түсінік беру және анықтау, сонымен қатар *S.aureus* толық геномды мәліметтерін алу, оның ішінде NCBI GenBank, NCBI PubMed, Pathosystems Resource Integration Center – PATRIC мәліметтер базасын пайдалана отырып оқшаулау орны мен уақыты туралы ақпаратты қоса алу.
2. Типтеудің MLVA және Spa әдістерімен *S.aureus* клиникалық штамдарының түрішілік типтеуін өткізу, сонымен қатар *S.aureus* толық геномды мәліметтерін қолдана отырып, MLST, Spa, MVLST, MLVA, PFGE, cgMLST, wgMLST және panGenome әдістерімен *in silico* типтеу.
3. Симпсон әдісімен *S.aureus* субтүрлік типтеу әдісінің нәтижені кемсітуші қуатын бағалау.
4. Ранд әдісімен түрішілік тип және жақын туыстық топтар/кешендер/кластерлердің деңгейінде типтеудің түрлі әдістерімен алынған әдістер арасындағы бағыттастылықты (келісімді) бағалау.
5. Микроағзалардың түрішілік типтеу әдістерінің бағыттастылығы мен нәтижені кемсітуші мүмкіндіктерінің көрсеткіштеріне әсер ететін параметрлерді меңгеру.

### **Ғылыми жаңалығы**

- Қазақстанда алғашқы рет алынған нәтижелердің келісілуінің әр әдісі мен деңгейінің рұқсат етуші қуатын анықтау мақсатында MLVA және Spa әдістерімен *S.aureus* клиникалық штамдарының топтамасының түрішілік типтелуі өткізілді.
- cgMLST, wgMLST және panGenome секілді толықгеномды секвенирлеу негізіндегі тәсілдерді есепке ала отырып, геномдардың үлкен топтамасына ( $n = 4976$ ) типтеудің 7 заманауи молекулярлық-генетикалық әдістеріне алғашқы рет салыстырмалы бағалау жасалады, ол саралаушы мүмкіндіктері бойынша микроағзалардың түрішілік типтелуінің әдістерін бір тізбекке тізуге, сонымен қатар түрішілік типтер мен жақын туыстық топтар/кешендер/кластерлердің деңгейінде нәтижелердің келісілуінің көрсеткіштерін бағалауға мүмкіндік берді.
- типтеу әдісінің саралаушы мүмкіндігіне және нәтижелердің бағыттастылығына әсер ететін факторларға кешенді бағалау жасалды, олар типтеудің түрлі әдістерімен алынды.

## **Практикалық маңыздылығы**

Диссертациялық жұмыста жүргізілген зерттеулер микроағзалардың түрішілік типтелуінің әр әдісінің басымдылықтары мен кемшіліктері туралы түсінігін кеңейтеді, ол жергілікті таралу, сонымен қатар жаһандық эпидемияларды зерттеуді қоса алғанда практикалық денсаулық сақтаудың тапсырмаларының типіне байланысты әдістің адекватты тандауын жасауға мүмкіндік туғызады.

## **Практикаға нәтижелерді енгізу**

Диссертациялық зерттеу нәтижелері бойынша авторлық құқық нысанына құқықтарды мемлекеттік тіркеу туралы 1 куәлік алынды (Қосымша А). Диссертациялық жұмыста микроағзаларды типтеу әдістерінің бағыттастылығы мен саралаушы мүмкіндігін бағалауды есепке алу әдістері микробиология және молекулярлық биология және медициналық генетика кафедраларының оқу үдерісіне енгізілді. Spa типтердің стафилококктардың жақын туыстық түрішілік топтарына кластеризациялау әдісі ҚММУ Ұжымдық пайдалану зертханасына енгізілді (Қосымша Б).

## **Қорғауға жіберілген диссертацияның негізгі ережелері**

1. Орталық Қазақстан өңірлерінде табылған макролидтерге (азитромицин) *S.aureus* резистенттілігі 25% құрады. Цефалоспориндерге (цефазолин, цефакситин) тұрақтылық деңгейі стафилококктардың окшаулаушыларының 18% анықталды. Оксациллинге резистенттілік 18% деңгейінде байқалды, ол геннің *mecA* болуына зерттеумен расталған метициллин-тұрақты стафилококк штамдарымен (MRSA) шарттастырылған.
2. *S.aureus* окшаулауыштарын типтеудің Spa және MLVA нәтижелерінің кластерлік талдауы екі клонды топтар/кешендердің басым болуын көрсетті, олардың құрылымы түрішілік белгілі бір топтардың өкілдерінің өңірлік циркуляциясына бағыттайды. Анықталған t002, t030, t008 Spa типтері жаһандық эпидемиялық таралуы бар *S.aureus* клонды топтар/кешендердің болуына көрсетеді.
3. *S.aureus* (n = 98) клиникалық штамдарының топтамаларын типтеу кезіндегі MLVA және Spa әдістерінің нәтижені кемсіту қуаты ~ 90-92% деңгейінде болды. Типтеудің екі әдісінің нәтижелерінің бағыттастылығы түрішілік типтер деңгейінде 20,7% және жақын туыстық топтар/кешендер деңгейінде 86,2% құрады.
4. *S.aureus* 4976 толық геномды In silico талдауы panGenome, wgMLST және cgMLST, 98% MLVA, 92% MVLST, 90% Spa және 85,5% MLST типтеу әдістерінің 100% нәтижені кемсітуші мүмкіндігін анықтады. Типтеу әдістерінің нәтижелерінің келісімділігі типтеу деңгейінен 50% аспады, cgMLST және wgMLST (85%) қоса алмағанда. Жақын туыстық топтар/кешендер/кластерлердің деңгейінде типтеу мәліметтерінің арасындағы бағыттастылық 66% бастап 95% дейінгі диапазонда болды. MLVA типтеу мен субтүрлі типтеудің басқа әдістерінің арасындағы келісімділіктен басқа (39-61%).
5. Типтеу сызбасының нәтижені кемсітуші мүмкіндігіне әсер ететін параметрлер болып табылады: типтеу сызбасындағы локустар саны, типтеу

сызбасына енетін локусаралық бағыттастылық көрсеткіші мен әр локустың нәтижені кемсітуші қуаты. Түрішілік типтеуге жататын микроағзалардың топтамасы Симпсон көрсеткішіне әсерін тигізеді.

6. Микроағзалардың типтелуінің мәліметтерінің кластерлік талдауының барлық кезеңдері, генетикалық қашықтықтар матрицасын есепке алу таңдауын қоса алғанда, дендрограмманың құрылуымен кластеризациялау алгоритмі мен топтар қалыптастыру ережелері немесе cut-off мән микроағзалардың топтастырылуына әсер етеді және микроағзалардың түрішілік типтелуінің нәтижелерінің арасындағы бағыттастылықтың көрсеткішіне де әсер етеді.

#### **Диссертацияның басқа ғылыми-зерттеу жұмыстарымен байланысы**

Диссертация ҚММУ ҒЗО Ұжымдық пайдалану зертханасының базасында ҚР БҒМ қаржыландырылатын «Орталық Қазақстандағы *Staphylococcus aureus* метициллин-тұрақты антибиотик резистенттілікке көп орталықты зерттеу» ғылыми-зерттеу жобасының аясында орындалды (2012-2014) (мемтіркеу №0112РК00812).

#### **Диссертацияны сынау**

Негізгі ережелер мен жұмыс нәтижелері «Ғылыми әлемі мен жастар: жетістіктер мен келешек» Халықаралық жас ғалымдар конференциясында, Қарағанды (Қазақстан), 26 ақпан 2015 жыл; ISID 16 Халықаралық инфекциялық аурулар бойынша конгресте, Кейпт-Таун (ЮАР), 2-5 сәуір, 2014 жыл; 25 ECCMID Клиникалық микробиология және инфекциялық аурулар еуропалық конгресінде, Копенгаген (Дания), 25-28 сәуір 2015 жыл; APSIC 7 Инфекциялық бақылау бойынша халықаралық азиялық-тынық мұхиттық қауымдастық конгресінде, Тайбэй (Тайвань), 26-29 наурыз 2015 жыл; XVII МАКМАХ (IASMAC) Микробқа қарсы терапия бойынша халықаралық конгресте, Мәскеу (Ресей), 20–22 мамыр 2015 ж.; ISID 17 Халықаралық инфекциялық аурулар бойынша конгресте, Хайдарабад (Үндістан), 2-5 наурыз 2016 жыл; Инфекциялық аурулар эпигенетикасы мен геномикасы бойынша жақын шығыс және оңтүстік-азиялық конгресте, Амман (Иордания), 7-8 наурыз 2016 жыл; 26 ECCMID Клиникалық микробиология және инфекциялық аурулардың еуропалық конгресінде, Амстердам (Нидерланды), 9-12 сәуір 2016 жыл; «Ғылым әліме мен жастар: дамудың жаңа жолдары» Халықаралық жас ғалымдар конференциясында, Қарағанды (Қазақстан), 12 сәуір 2016 жыл; XIX «Іргелі ғылым және клиникалық медицина – адам және оның денсаулығы» Жас зерттеушілердің халықаралық медициналық-биологиялық конференциясында, Санкт-Петербург (Ресей), 26 сәуір, 2016; XVIII МАКМАХ (IASMAC) Халықаралық Микробқа қарсы терапия бойынша конгресте, Мәскеу (Ресей), 25-27 мамыр 2016 ж. баяндалды.

Алдын ала қорғау ҚММУ биологиялық химия кафедрасының кеңейтілген отырысында өтті, хаттама № 12 2016 жылдың 17 маусымы.

## **Жарияланымдар**

Диссертация материалдары бойынша 42 жұмыс жарияланды, оның ішінде Lambert баспа үйімен жарияланған зертханалық диагностика бойынша 2 кітаптың тараулары. Білім және ғылым саласындағы бақылау жөніндегі комитетпен ұсынылған баспаларда 5 жұмыс жарияланған. Scopus и/или Thomson Reuters мәліметтер базасына енетін басылымдарда 13 жарияланым жарияланды, оның ішінде 6 мақала мен 7 тезис бар.

## **Диссертация құрылымы мен көлемі**

Диссертация 117 бетте жазылған, кіріспе, негізгі бөлім, қорытынды мен еңбектерге 228 сілтеме жасалған пайдаланылған әдебиеттер тізімінен тұрады. Жұмыста 36 кесте және 48 сурет, 2 қосымша бар.

## **Материалдар мен әдістер**

Зерттеу барысында педиатриялық, хирургиялық, тері-венерологиялық, пульманологиялық және т.б., Қарағанды, Астана, Жезқазған және Семей қалаларының стационар бөлімшелерін қоса алғанда түрлі бөлімшелерден *S.aureus* (n=98) клиникалық штамдарының топтамалары қалыптастырылды, сонымен қатар 116 аяқталған, пікір берілген геномдар және GenBank NCBI мәліметтер базасынан алынған 4976 толық геномды кезектіліктегі *S.aureus* контингентер/скаффолдтар бар.

Зерттеу әдістері: Микробқа қарсы препараттарға тұрақтылық деңгейін бағалау сериялық ажырату көмегімен жүргізілді. *S.aureus* клиникалық штамдарын түрішілік типтеу Spa және MLVA әдістерінің көмегімен жүргізілді. Түрішілік типтеу, профильдер негізінде eBURST/MST және Jaccard/UPGMA алгоритмдерін пайдалана отырып кластеризация өткізілді. In silico MLST, MVLST, Spa, MLVA, cgMLST, wgMLST, panGenome типтерін анықтау толық геномды мәліметтер негізінде биоинформатикалық құралдар көмегімен жүргізілді. Типтеу әдісінің басым мүмкіндігін талдау Симпсон индексінің негізінде өткізілді. Нәтижелердің келісілуі (бағыттастылығы) типтер деңгейінде Рандтың түзетілген коэффициентінің көмегімен бағаланды, сонымен қатар жақын туыстық топтар/кешендер деңгейінде.

## **Қорытындылар:**

1. Орталық Қазақстан өңірінің *S.aureus* (n=98) клиникалық оқшаулаушыларының макролидтерге (азитромицин) тұрақтылығының деңгейі 25%, цефалоспориндерге (цефазолин, цефакситин) тұрақтылығы 18%. MRSA штамдарымен оксациллинге резистенттілік 18% деңгейінде, ол *mecA* геннің болуына ПШР зерттеумен расталады.

2. Spa типтеу мен MLVA типтеудің мәліметтерін кластеризациялау *S.aureus* оқшаулауыштарына екі клондық кешендердің басымдылығымен 4 түрішілік кешен/топтарды орнатуға, Қазақстанның түрлі қалаларынан оқшаулауыштарды қоса алғандағы кешендердің құрылымы белгілі бір түрішілік топтардың өкілдерінің өзара циркуляциялануына мүмкіндік берді. Сонымен қоса, t002, t030, t008 типтерінің Spa анықтау Қазақстан Республикасында анықталған *S.aureus* оқшаулауыштарының жаһандық эпидемиологиясына тартылуы туралы айтуға мүмкіндік береді.

3. MLVA және Sra әдістерінің *S.aureus* (n = 98) клиникалық штамдарының кешенін типтеу кезінде алынған саралаушы қуаты ~90-92% деңгейінде болды.
4. Типтеудің екі әдістерінің (Sra және MLVA) нәтижелерінің бағыттастылығы түрішілік типтеу деңгейінде 20,7% және жақын туыстық топтар ішінде 86,2% құрады, сонымен типтеудің аталған әдістерімен анықталған түрішілік топтар үшін жақсы келіскенділікті көрсетті.
5. In silico *S.aureus* жаһандық топтамасының 4976 толықгеномды талдауы нәтижені кемсітуші мүмкіндігі бойынша *S.aureus* типтеу 8 заманауи молекулярлық-генетикалық әдістерін саралауға мүмкіндік туғызды. panGenome, wgMLST, cgMLST тәрізді микроағзалардың толық геномды кезектілігіне негізделген әдістер өте жоғары саралаушы қуатты көрсетті (100%). Тандемді қайталаулардағы типтеу әдісі саралаушы қуаттың 98% көрсетті. MVLST және Sra типтеудің рұқсат етуші күші 90% (сәйкесінше 92% және 90%) артықтау болды. Ең аз саралаушы күшке MLST әдісі (85,5%) ие болды.
6. Типтеудің аталған әдістерінің бағыттастылығы типтер деңгейінде 50% асқан жоқ, cgMLST және wgMLST (85%) басқа. Жақын туыстық топтар/кешендер/кластерлерге топтастырылған нәтижелер келісілуі 66% бастап 95% аралығындағы диапазонда, тек MLVA типтеу мен басқа әдістер арасындағы келісімді қоса алмағанда (39-61%).
7. Типтеу сызбасының нәтижені кемсітуші мүмкіндігіне әсер ететін паратмерлер болып табылады: типтеу сызбасындағы локустар саны, типтеу сызбасына енетін локусаралық бағыттастылық көрсеткіші мен әр локустың саралаушы қуаты. Рұқсат етуші мүмкіндікті анықтаудағы жетекші рольге типтеу сызбасы бойынша «маркерлер саны» көрсеткішіне жатады. Одан басқа, зерттеу жүргізілген микроағзалар саны, сонымен қатар типтеу әдісінің нәтижені кемсітуші қуатын сипаттайтын Симпсон көрсеткішіне әсер етеді.
8. Генетикалық қашықтықтар матрицасын есепке алуды таңдау, дендрограмманы құруға арналған кластерлік жинақтау алгоритмі, сонымен қатар cut-off көрсеткіші мен түрішілік топтардың қалыптасуы өтітен мәліметтердің кластерлік талдауының барлық кезеңдері микроағзалардың түрішілік типтелуінің нәтижелерінің арасындағы бағыттастылығының көрсеткішіне әсер етеді.