

Отзыв официального рецензента

на диссертационную работу Бабенко Дмитрия Борисовича на тему:
«Исследование конкордантности и дискриминирующей способности
молекулярных методов, используемых в субвидовом
типировании микроорганизмов»,
представленной на соискание степени доктора PhD
по специальности: 6D110100 «Медицина»

07 декабря 2016

1 Актуальность темы исследования и ее связь с общенаучными и общегосударственными программами (запросами практики и развития науки и техники).

Одной из ключевых задач клинической микробиологии и эпидемиологии является определение и классификация микроорганизмов. В эпидемиологических исследованиях необходимо установить, являются ли патогены, изолированные от различных пациентов или из различных источников, генетически родственными, идентичными или генетически гетерогенными, несвязанными, а также установить связь со штаммами, циркулирующими на данной территории, со штаммами, распространенными на других территориях или выделенных в другие годы (MacCannell D., 2013). Конечной целью молекулярно-эпидемиологического расследования является выяснение закономерностей распространения, циркуляции и эволюционного развития патогенных штаммов и клонов и создание мероприятий эпидемиологического контроля и мониторинга с целью предотвращения развития и распространения инфекционного процесса. Одним из главных условий для реализации эпидемиологических мер инфекционного контроля является возможность выявлять сходство и различия между штаммами патогенов одного и того же биологического вида (Tenover F.C., 1997).

Первоначально для типирования микроорганизмов использовались методы, основанные на биохимических особенностях бактерий, общих антигенных детерминант, чувствительности к бактериофагам, а также к антимикробным препаратам. Несмотря на успешное применение данных методов, фенотипические подходы в типировании бактерий обладают рядом недостатков, такими как высокая трудоемкость, недостаточная воспроизводимость и низкая разрешающая способность, ограничивающих их применение на практике (Tenover F.C., 2007). Более того, на основе фенотипических методов невозможно оценить эволюционные связи и структуру бактериальных популяций. Следует отметить, что фенотип достаточно часто не соответствует генотипу. Как например, одинаковым спектром антибиотикорезистентности могут обладать не только разные штаммы одного и того же вида, но и представители разных видов -

Escherichia coli и *Proteus mirabilis* с идентичной антибиотикорезистентностью. Все это способствовало поиску новых подходов в типировании бактерий. К таким методам следует в первую очередь отнести молекулярно-генетические методы типирования. На данный момент разработаны и успешно применяются множество молекулярно-генетических методов внутривидового типирования микроорганизмов. В основе генотипических подходов используются различные принципы действия, которые могут быть ассоциированы как с технологией секвенирования, так и с использованием энзимов рестриктаз, продукты расщепления которых необходимо разделить в электрофоретическом поле. Другие же методы внутривидового типирования бактерий используют в своей основе технологию полимеразной цепной реакции. Несмотря на разнообразие, молекулярно-генетические методы обладают явными преимуществами в сравнении с фенотипическими методами типирования (Шагинян И.А., 2000).

Таким образом, большое количество различных методических подходов в субвидовом типировании микроорганизмов, а также накопленных данных результатов типирования требует проведение сравнительной оценки молекулярно-генетических методов субвидового типирования организмов на основе результатов, полученных данными методами. Все это указывает на то, что диссертационная работа Бабенко Дмитрия Борисовича на тему: «Исследование конкордантности и дискриминирующей способности молекулярных методов, используемых в субвидовом типировании микроорганизмов», представленная на соискание степени доктора философии (PhD), является актуальной и представляет несомненный интерес для специалистов в области клинической микробиологии и молекулярной эпидемиологии.

2. Научные результаты в рамках требований к диссертациям.

Диссертационная работа написана в классическом стиле и является законченным научным трудом. Цель и задачи исследования сформулированы корректно. Положения, выносимые на защиту, практическая значимость работы отражают суть исследования. 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, 48 рисунков и 2 приложения.

Во введении указана обоснованность и актуальность выбранной темы исследовательской работы, сформулирована цель исследования, а также определяющие ее задачи, раскрыты научная новизна и практическая значимость работы.

В первой главе представлены данные о становлении молекулярной эпидемиологии и приложения данной дисциплины, которая совмещает в себе методы традиционной эпидемиологии и достижения молекулярной биологии,

а также роль методов внутривидового типирования бактерий и области их применения. Приведен обзор современных методов внутривидового типирования бактерий, включающий как фенотипические, так и генотипические методы.

Вторая глава содержит методологию исследования, включающая 2 различных подхода – лабораторное исследование 98 клинических штаммов *S.aureus* методами MLVA и Spa типирования, и *in silico* подход определения внутривидовых типов для 7 современных молекулярно-генетических методов типирования, определенных на основе полногеномных последовательностей. Кластеризация результатов типирования осуществлялась с использованием различных алгоритмов, включая eBURST/MST и UPGMA. Оценка дискриминирующей способности методов типирования, а также согласованности результатов проводилась на основе популярных индексов Симпсона и Ранда.

В третьей главе представлены результаты собственных исследований. Приведена оценка двух методов типирования (MLVA и Spa типирование), полученная на коллекции клинических штаммов *S.aureus* и оценка 7 современных молекулярно-генетических методов, включающих и такие как полногеномное мультилокусное секвенирование типирование и пангеномный анализ, полученная на основе биоинформатического подхода. Проведен подробный анализ факторов, влияющих на показатель дискриминирующей способности метода типирования и показатель согласованности между результатами, полученными разными методами.

В заключении описаны результаты, включающие основные выводы и практические рекомендации по итогам диссертационного исследования.

Диссертация выполнена на русском языке и включает большое количество наглядных иллюстраций, облегчающих понимание.

3. Степень обоснованности и достоверности каждого результата (научного положения), выводов и заключения соискателя, сформулированных в диссертации.

Работа была проведена на клинических штаммах *S.aureus*, видовая идентификация которых была определена с помощью MALDI-TOF метода. Профиль антибиотикорезистентности был получен на основе количественного метода серийных разведений. Spa и MLVA типирование проводилось на основе стандартных методик, предложенных международными группами авторов и с использованием современного оборудования (ПЦР, Секвенатор, Гель-документирующая система). Также результаты исследования были получены на чрезвычайно большой выборке (порядка 7 тысяч геномов *S.aureus*), что позволило получить однозначное ранжирование методов типирования по их дискриминирующей способности. В качестве алгоритмов расчета уровня разрешающей способности и уровня согласованности результатов типирования выбраны адекватные показатели

(индексы Симпсона и Ранда), что подтверждается большим количеством цитирований выбранных коэффициентов. Кластеризация штаммов *S.aureus* с образование близкородственных групп на основе данных типирований проводилась с использованием популярных на текущий момент алгоритмов кластеризации – UPGMA и eBURST/MST. Все это позволило диссертанту сформулировать 8 выводов.

В первом и втором выводах автор указывает на уровень антибиотикорезистентности коллекции клинических штаммов *S.aureus*, изолированных из различных городов Республики Казахстан за 2014-2015 гг., а также на циркуляцию 4 внутривидовых групп с указанием доминирования 2 клональных комплексов. В то же время обнаружение таких спа типов, как t002, t030, t008, указывает на вовлеченность данных штаммов в глобальную эпидемиологию.

В третьем и четвертом выводах указаны характеристики Spa и MLVA методов типирования, оцененные на коллекции клинических штаммов *S.aureus*: 90-92% дискриминирующая способность данных методов типирования и 20,7% конкордантность на уровне внутривидовых типов и 86,2% на уровне близкородственных групп.

В пятом и шестом выводах представлены результаты биоинформатического анализа, проведенного на 4976 геномах *S.aureus*, который показал, что методы, основанные на геномной последовательности ДНК (panGenome, wgMLST, cgMLST) обладают наивысшей (100%) дискриминирующей способностью. MLVA метод обладает 98% разрешающей способностью. Для MVLST, Spa и MLST методов разрешающая мощность была на уровне 92%, 90% и 85,5%, соответственно.

В заключительных пунктах вывода отмечаются факторы, влияющие на параметры дискриминирующей способности и уровень согласованности результатов, полученных различными методами типирования.

Выводы не вызывают сомнений, так как они основываются на полученных и установленных фактических данных и не содержат элементов предположений.

4. Степень новизны каждого научного результата (положения) и вывода диссертанта, сформулированных в диссертации.

Отсутствие подобных исследований дает право на утверждение, что все основные результаты, полученные в диссертационной работе, являются новыми научными фактами. Впервые в Казахстане было проведено генотипирование коллекции клинических штаммов *S.aureus* двумя современными методами и получена количественная оценка конкордантности и дискриминирующей способности данных методов типирования. Также проведенный *in silico* анализ на большой коллекции штаммов позволил провести однозначное ранжирование 7 современных молекулярно-генетических методов типирования на основе разрешающей

способности. Были получены результаты согласованности для всех методов как на уровне внутривидовых типов, так и на уровне клональных групп/комплексов/кластеров. Более того, был впервые проведен подробный анализ факторов, влияющих на показатели разрешающей способности и уровня конкордантности между результатами, полученными различными методами типирования.

5. Оценка внутреннего единства полученных результатов.

Диссертационная работа построена по традиционной форме в соответствии с требованиями. Все разделы диссертационной работы логически взаимосвязаны и характеризуются последовательностью изложения материалов работы. Наблюдается соответствие выводов поставленным задачам. Все это указывает на внутреннее единство результатов, полученных в данной исследовательской работе.

6. Направленность полученных соискателем результатов на решение соответствующей актуальной проблемы, теоретической или прикладной задачи.

Диссертационная работа является итогом научного исследования, имеющего существенное значение в решении научно-практических проблем в области клинической микробиологии и молекулярной эпидемиологии.

7. Подтверждение достаточной полноты публикаций основных положений, результатов, выводов и заключения диссертации.

Основные результаты исследовательской работы докладывались на различных конференциях и конгрессах, включая такие крупные международные конгрессы как Международный конгресс по инфекционным заболеваниям – ISID (ЮАР-2014, Индия-2016), Международный конгресс азиатско-тихоокеанского общества по инфекционному контролю - APSIC (Тайвань - 2015), Международный конгресс по антимикробной терапии – МАКМАХ (Москва - 2015, 2016), Европейский конгресс клинической микробиологии и инфекционных заболеваний – ECCMID (Дания - 2015, Нидерланды - 2016) и многие другие.

По теме диссертации опубликовано 42 печатные работы, в том числе главы в 2 сборниках по лабораторной диагностике, опубликованных издательским домом Lambert (2015, 2016 гг.). 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. Получено свидетельство об интеллектуальной собственности № 156 от 07.04.2016 года.

8. Соответствие аннотации содержанию диссертации.

Аннотации представлены на трех языках – казахском, русском и английском, полностью соответствуют содержанию диссертации.

9. Недостатки по содержанию и оформлению диссертации.

С учетом вышеуказанных положительных сторон исследовательской работы, диссертация все же не лишена недостатков:

1. В литературном обзоре по методам типирования представлена информация в сжатом виде. Можно было бы расширить и дополнить описание каждого метода внутривидового типирования. Кроме того, в методах отсутствует подробное описание проведения идентификации *S.aureus* с помощью метода MALDI-TOF масс-спектрометрии.

2. Несмотря на наличие ссылки на методику MLVA типирования, следовало указать внесенные в методику изменения. Из текста диссертации неясно, почему за основу была взята 6-локусная панель Ikawaty R. et al., в то время как у других авторов описаны 8 и 16-локусные MLVA панели.

3. Формулировки выводов имеют частичное совпадение с формулировками положений, выносимых на защиту.

4. Список используемых публикаций представлен на 99% англоязычной литературой.

5. В работе имеются отдельные грамматические ошибки, стилистические погрешности и опечатки.

Указанные замечания не принципиальны, имеют преимущественно рекомендательный характер, не касается существа исследования и не снижают общей положительной оценки работы.

10. Заключение о возможности присуждения степени доктора философии (PhD) по соответствующей специальности.

Учитывая актуальность исследования, объем проведенной научно-исследовательской работы, ее научную новизну и практическую значимость диссертация Бабенко Дмитрия Борисовича на тему: «Исследование конкордантности и дискриминирующей способности молекулярных методов, используемых в субвидовом типировании микроорганизмов» представленная на соискание степени доктора PhD по специальности: 6D110100 «Медицина», направление научно-педагогическое, срок обучения 3 года, соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям.

Соискатель заслуживает присуждения степени «доктора философии PhD» по специальности: 6D110100- Медицина.

Заведующий лабораторией
протеомики и масс-спектрометрии
РГП "Национальный центр биотехнологий"
доктор PhD



П.В. Тарлыков