

## **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 г.

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

Интенсивно совершенствующиеся методы молекулярной эпидемиологии являются чрезвычайно перспективным направлением, они уже внесли значительный вклад в биомедицинскую и клиническую науку и являются актуальным инструментом инфекционного контроля, общественного здравоохранения, клинической микробиологии, эпидемиологии, генетики микроорганизмов. Основными задачами эпидемиологических методов являются определение путей и механизмов распространения инфекционных заболеваний, подтверждение или исключение наличия вспышки инфекции, вызванной конкретным возбудителем, оценка эффективности профилактических мер, прогноз адаптационной эволюции микроорганизмов, которые могут повлиять на инфекционные свойства.

Методы субвидового типирования вносят вклад в понимание внутренних процессов развития эпидемического процесса и позволяют увеличить специфичность, точность, чувствительность анализа, объективизировать мониторинг инфекций, провести полноценный скрининг с возможностью прогнозирования.

На данный момент появилось достаточное количество методов субвидового типирования микроорганизмов, каждый из которых имеет особенности, как по техническим характеристикам, так и по применимости в той или иной клинической ситуации и к тому или иному штамму или процессу.

Проведение полноценного сравнительного анализа различных методов субвидового генотипирования микроорганизмов, представленных в арсенале современной молекулярной биологии, определение дискриминирующей способности, а также уровня конкордантности между ними на примере *Staphylococcus aureus* является актуальной задачей, имеющей фундаментальное значение в молекулярной эпидемиологии инфекционных заболеваний с целью адекватного и доказательного выбора метода субвидового типирования в зависимости от условий, целей и задач эпидемического расследования и инфекционного контроля.

## **2. Научные результаты в рамках требований к диссертациям.**

Представленная диссертационная работа Д.Б. Бабенко «Исследование конкордантности и дискриминирующей способности молекулярных методов, используемых в субвидовом типировании микроорганизмов» является законченной научной квалифицированной работой по решению актуальной задачи практического здравоохранения – сравнительной характеристике и анализу применимости различных методов молекулярной биологии в эпидемиологии микроорганизмов.

В ходе исследования была собрана коллекция из 98 клинических штаммов *S. aureus*, оценен профиль антибиотикорезистентности, проведено внутривидовое типирование 2 современными методами типирования – Spa-типирование, на основе секвенирования фрагмента spa гена, и MLVA типирование, на основе вариации в tandemных повторах 6 SIRU маркеров. Был произведен сравнительный анализ и расчет дискриминирующей способности данных методов внутривидового типирования, а также уровня согласованности результатов, полученных на собственной коллекции *S. aureus*. Кроме того, в работе были применены биоинформатические подходы для анализа *in silico* 6970 полногеномных данных *S. aureus* с целью определения внутривидовых типов для различных методов генотипирования, таких как MLVA, MLST, MVLST, spa, cgMLST, wgMLST, PanGenome. Была получена количественная оценка дискриминирующей способности данных методов типирования, а также уровень конкордантности между полученными данными.

Работа изложена на 117 страницах, построена по традиционному принципу, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы собственных исследований, заключения, выводов. Библиографический указатель содержит 228 современных источников. Диссертационная работа адекватно проиллюстрирована и включает 36 таблиц и 42 рисунка.

Во введении представлены актуальность исследования, цели и задачи. Раскрыты научная новизна и значимость работы. В литературном обзоре описаны актуальные аспекты использования молекулярно-генетических методов в эпидемиологии, приведен обзор существующих методов субвидового типирования. Материалы и методы раскрывают источники и условия сбора коллекции, методы микробиологического анализа, описывают все используемые методы субвидового типирования и биоинформатические подходы в анализе полногеномных данных. Результаты и их обсуждение включают полученные данные типирования коллекции клинических штаммов *S. aureus* методами spa- и MLVA-типирования, а также результаты сравнения семи различных методов молекулярно-генетического типирования, полученных с использованием биоинформатического подхода на основе анализа полногеномных данных. В заключении описаны результаты, включающие основные выводы по итогам диссертационного исследования.

Диссертация выполнена на русском языке. Большое число иллюстраций и таблиц в представлении результатов делают работу наглядной и легкой для восприятия.

## **3. Степень обоснованности и достоверности результатов, выводов и заключения соискателя, сформулированных в диссертации.**

В ходе исследования была собрана коллекция из 98 собственных штаммов *S. aureus*, проведено микробиологическое исследование с целью подтверждения видовой принадлежности и установления профиля антибиотикорезистентности методом серийных разведений. Собранная соискателем коллекция изолятов подверглась генотипированию 2 различными методами, в соответствии с ранее опубликованными широко применяемыми



в мире протоколами. Был произведен сравнительный анализ данных методов типирования на основе расчета дискриминирующей способности и оценен уровень согласованности результатов на основе индекса Симпсона и скорректированного коэффициента Ранда, соответственно. Кроме того, в работе были применены биоинформатические подходы для *in silico* анализа порядка 7 тысяч геномных последовательностей *S. aureus*. В результате для 4976 геномов были успешно определены внутривидовые типы методами MLVA, MLST, MVLST, Spa, cgMLST, wgMLST, PanGenome. На основе полученных данных были рассчитаны показатели дискриминирующей способности и конкордантности как на уровне внутривидовых типов, так и клональных групп с кластеризацией на основе алгоритмов построения дендрограмм минимальных дистанций.

Первый вывод содержит информацию о распространенности антибиотикорезистентности полученной в собственном исследовании коллекции клинических штаммов *S. aureus*. Устойчивость к макролидам была на уровне 25%, к антистафилококковым бета-лактамам – 18%. Для всех устойчивых к оксациллину штаммов их принадлежность к MRSA подтверждалась с использованием ПЦР на наличие гена *mecA*.

Второй вывод указывает на клональную структуру *S. aureus* при этом выявлено, что на территории центральной части Республики Казахстан доминирует 2 внутривидовых клональных комплекса.

В третьем и четвертом выводах представлены данные о показателях разрешающей способности spa- и MLVA-типирования. Дискриминирующая мощность MLVA и spa методов была на уровне 90-92%. Конкордантность результатов двух методов типирования (spa и MLVA) составила 20,7% на уровне внутривидовых типов и 86,2% - на уровне близкородственных групп.

Выводы 5-8 основаны на собственном биоинформатическом анализе полногеномных данных с использованием 4976 полногеномных записей глобальной коллекции *S. aureus*. Семь современных молекулярно-генетических методов типирования *S. aureus* были ранжированы по их дискриминирующей способности. Методы panGenome, wgMLST, cgMLST продемонстрировали наивысшую разрешающую способность (100%). Метод типирования, основанный на анализе tandemных повторов показал 98% дискриминирующую мощность. Разрешающая сила MVLST и spa типирования составила 92% и 90%, соответственно. Наименьшей дискриминирующей силой обладал MLST метод (85,5%). Конкордантность данных методов на уровне типов не превысила 50%, кроме достаточно высокой согласованности cgMLST и wgMLST (85%). В седьмом выводе был проведен анализ причин, влияющих на результаты дискриминирующей способности методов типирования. Основными параметрами, определяющими уровень разрешающей способности метода типирования, являются количество локусов, показатели межлокусной конкордантности и дискриминирующая мощность каждого локуса, входящего в схему типирования. Восьмой вывод указывает о влиянии всех этапов, предусмотренных в кластеризации данных, на уровень согласованности результатов, полученных различными методами типирования.

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

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы представляют собой новые данные. Впервые была проведена полноценная сравнительная характеристика разных современных молекулярно-генетических методов внутривидового типирования *S. aureus*, в том числе на изолятах, выделенных в Казахстане, с целью определения разрешающей мощности каждого метода и согласованности полученных результатов, при использовании разных подходов.



## **5. Оценка внутреннего единства полученных результатов.**

Диссертационная работа является квалификационным единым научным трудом. Цели и задачи согласованы между собой, а выводы вытекают из поставленных и решенных задач. Методология анализа результатов, используемая в данной работе, является актуальной и адекватной.

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

В результате проведенного исследования были получены данные, характеризующие клинические изоляты *S. aureus*, выделенные из различных стационаров четырех городов Центрального Казахстана. Определен уровень устойчивости к антибактериальным препаратам. На основе внутривидового типирования была определена клональная популяционная структура *S. aureus* с доминирование двух клональных групп. При этом spa типирование позволило обнаружить штаммы стафилококков, относящиеся к spa типам, характеризующиеся глобальным эпидемическим распространением.

На основе *in silico* анализа большой коллекции полногеномных данных были обнаружены внутривидовые типы для 7 различных современных молекулярно-генетических методов внутривидового типирования *S. aureus*, что в свою очередь позволило провести сравнение данных методов на основе их разрешающей способности, а также получить показатели конкордантности как на уровне внутривидовых типов, так и близкородственных внутривидовых групп/комплексов/кластеров.

Таким образом, результаты, полученные в диссертационной работе, вносят существенный вклад в решение научно-практических задач в области клинической микробиологии и молекулярной эпидемиологии.

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

Полученные результаты широко и полно представлены в научном сообществе, доложены на более чем 10 конференциях и конгрессах международного уровня. По итогам работы опубликовано 42 публикации, включая главы в сборниках по лабораторной диагностике. 13 публикаций, в том числе 6 статей, опубликованы в изданиях, входящих в базу данных Scopus и/или Thomson Reuters.

## **8. Соответствие аннотации содержанию диссертации.**

Аннотация полностью соответствует содержанию диссертации и представлена на трех языках – казахском, русском и английском.

## **9. Недостатки по содержанию и оформлению диссертации.**

Несмотря на некоторые стилистические погрешности и опечатки, работа, в целом, заслуживает положительной оценки. Следует отметить высокий технологический уровень выполнения исследования, а также анализ полученных результатов. Принципиальные замечания к диссертационной работе отсутствуют.

В качестве дискуссии необходимы некоторые пояснения автора исследования на вопросы:

- 1) Почему были выбраны Spa и MLVA для типирования коллекции *S. aureus*, а не, например, Spa и MLST или MLST и MLVA?

- 2) Является ли выбранный скорректированный коэффициент Ранда, достаточным для оценки уровня согласованности результатов, полученных различными методами типирования?
- 3) Почему были выбраны 2 уровня данных при получении уровня согласованности результатов – уровень внутривидовых типов и уровень данных, сгруппированных после кластеризации? Чем объясняется необходимость выбора такого подхода?

Обозначенные вопросы относятся к научной дискуссии и не влияют на главные теоретические и практические результаты исследования.

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

Содержание и квалификационные характеристики диссертации Бабенко Дмитрия Борисовича на тему: «Исследование конкордантности и дискриминирующей способности молекулярных методов, используемых в субвидовом типировании микроорганизмов» позволяют считать Бабенко Дмитрия Борисовича достойным соискателем степени доктора философии (PhD) по специальности 6D110100 «Медицина».

Заместитель директора по научной работе  
НИИ антимикробной химиотерапии  
ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
к.м.н.

А.В. Дехнич

