

**Гостев Владимир Валерьевич**

**Популяционная структура *Staphylococcus aureus* и траектории эволюции  
устойчивости к антимикробным препаратам**

1.5.11. Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Оболенск – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

**Научный консультант**

**Сидоренко Сергей Владимирович**, чл.-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», научно-исследовательский отдел медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, заведующий отделом

**Официальные оппоненты:**

**Ермолаева Светлана Александровна**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория экологии возбудителей инфекций, руководитель лаборатории, г. Москва

**Чеботарь Игорь Викторович**, доктор медицинских наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория молекулярной микробиологии, главный научный сотрудник, г. Москва

**Мокроусов Игорь Владиславович**, доктор биологических наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, лаборатория молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики, заведующий лабораторией, г. Санкт-Петербург

**Ведущая организация:**

Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, г. Москва

Защита состоится «\_\_» 2024 г. в \_\_ часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Автореферат разослан «\_\_» 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук \_\_\_\_\_ **Фурсова Надежда Константиновна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования.

*Staphylococcus aureus* способен вызывать инфекционный процесс практически в любой ткани и органе человеческого организма, это определяет широкий спектр возможных форм заболеваний – от инфекций кожи и мягких тканей до критических состояний при сепсисе (Tong et al., 2015). В настоящее время смертность от инфекций, вызванных *S. aureus*, остается достаточно высокой, даже несмотря на внедрение в последние десятилетия новых эффективных антибиотиков. Так, по результатам исследования группы GBD (Global Burden of Diseases), было установлено, что *S. aureus* занимает первое место по абсолютному числу смертей среди всех бактериальных инфекций и по уровню летальности в 135-ти странах мира (GBD, 2022). *S. aureus* оказался первым микроорганизмом, для которого приобретенная антимикробная резистентность оказалась серьезной проблемой. Исторически первым глобально распространившимся в конце 50-х годов механизмом устойчивости была продукция бета-лактамаз, разрушающих природные пенициллины. В 1961 были описаны метициллин-резистентные стафилококки (Methicillin-resistant *S. aureus* - MRSA), однако, на основании данных геномного секвенирования и эволюционного моделирования, расчетное время появления MRSA находится в интервале 1938–1952 гг. (Harkins et al., 2017). Основное свойство MRSA – это устойчивость ко всем бета-лактамным антибиотикам, за исключением цефалоспоринов с анти-MRSA активностью (цефтаролина и цефтобипрола), обусловленная наличием дополнительного пенициллинсвязывающего белка 2a (PBP2a), кодируемого геном *mecA*.

Ген *mecA* локализован на стафилококковой хромосомной *mec*-кассете (*Staphylococcal cassette chromosome mec*, SCC*mec*), вероятное происхождение которой связывают с горизонтальным переносом от коагулазоотрицательных стафилококков группы *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus vitulinus* и *Staphylococcus fleuretti* (Rolo et al., 2017). Однако, функционирование SCC*mec* и

экспрессия устойчивости к бета-лактамам зависит от хромосомных факторов (Miragaia et al., 2018; Bilyk et al., 2022). Оксациллин-чувствительные MRSA (oxacillin-susceptible MRSA, OS-MRSA) являются примером, когда наличие *mecA* не отражается в проявлении фенотипической устойчивости к оксациллину (Tenover et al., 2015; Gargis et al., 2020). Такая «молчащая» устойчивость является неблагоприятным фактором, влияющим на корректную фенотипическую оценку чувствительности к антибиотикам, и, следовательно, на назначение адекватной антибактериальной терапии (Wagner et al., 2023).

Кроме хорошо известных механизмов резистентности *S. aureus* реализует и другие стратегии ухода от действия антимикробных препаратов – это гетерорезистентность и толерантность. Резистентность у *S. aureus* к различным антибиотикам обуславливается как генами, приобретаемыми на мобильных генетических элементах, так и мутациями в собственных генах. Однако, описываются и принципиально новые механизмы, в частности, влияние высоких внутриклеточных концентраций циклического динуклеозинамонофосфата (c-di-AMP) на устойчивость к антимикробным агентам, действующим на клеточную стенку (Commichau et al., 2019). На повышение концентрации c-di-AMP влияет активность специфической фосфодиэстеразы GdpP (GGDEF domain protein containing phosphodiesterase), которая при нормальных условиях гидролизует молекулы c-di-AMP. Молекулярный механизм этого процесса остается неизученным.

В настоящее время выделяют моноклональную гетерорезистентность, при которой, клетки одной генетической линии характеризуются разной чувствительностью к антибиотикам. У *S. aureus* гетерорезистентность описана к разным антибиотикам – бета-лактамам, гликопептидам, даптомицину и гентамицину (Heidarian et al., 2024). Опасность распространения таких фенотипов заключается в неправильной оценке чувствительности к антибиотикам, которая может привести к назначению неадекватной антибиотикотерапии (Band et al., 2019). Явление формирования множества

субклонов в пределах чистой культуры клона, культивируемого в среде на протяжении длительного периода, было продемонстрировано в работах группы Lenski и соавт. (Card et al., 2021; Good et al., 2017) при изучении длительной эволюции кишечной палочки (long-term evolution experiment (LTEE)). При растущем интересе к проблеме гетерорезистентности остаются неизученными многие аспекты: триггерные факторы, приводящие к ее появлению, связь с генотипом и генетическими линиями, межклональные взаимодействия и проблема детекции фенотипов.

Третья стратегия уклонения от действия антимикробных препаратов, реализуемая *S. aureus* – это формирование толерантности, которая описана в отношении многих бактерицидных антибиотиков, в частности, бета-лактамов, даптомицина и цефтаролина. В основе толерантности лежит универсальное для микроорганизмов явление – увеличение периода времени, необходимого для эффективного киллинга бактериальной популяции. Данный механизм остается до конца не изученным, однако многие экспериментальные исследования показывают, что замедление роста и работы рибосом и, как следствие, снижение метаболической активности бактериальной клетки являются главными драйверами антибиотикотолерантности (Bui et al., 2017). Предсказание и моделирование траектории эволюции устойчивости является важным фундаментальным научно-практическим направлением как для локальной, так и международной систем здравоохранения (Baquero et al., 2021).

После первого описания в 1961 г в течение длительного времени значение MRSA определялось их ролью как основных возбудителей внутрибольничных инфекций (Hospital-acquired MRSA, HA-MRSA) (Lee et al., 2018). Внебольничные MRSA (Community-acquired MRSA, CA-MRSA), которые характеризовались необычайно высокой степенью вирулентности, были описаны в 1990-х годах. Первоначально эпидемия CA-MRSA инфекций захватила территорию США, Центральной и Южной Америки (Itani et al., 2011; Nelson et al., 2015), а в дальнейшем распространилась на другие регионы.

Еще один эпидемиологический кластер – это MRSA, вызывающие инфекции у животных (Livestock-associated MRSA, LA-MRSA) (Khairullah et al., 2023). Инфекционные заболевания у сельскохозяйственных животных имеют стратегическое продовольственное значение (Cuny et al., 2013; van Alen et al., 2017). Появление и распространение LA-MRSA связывают с популяцией ежей (*Erinaceus europaeus*) европейского ареала, которые являются резервуаром MRSA (Larsen et al., 2022). Кожу ежей, наряду с *S. aureus*, колонизует сапрофитный дерматофит *Trichophyton erinacei*, производящий бета-лактамы. Возможно, формирование генотипа MRSA связано с необходимостью для *S. aureus* адаптироваться к селективному давлению этих антибиотиков, а использование антибиотиков в сельском хозяйстве опосредовало смену ниш обитания с появлением нового эпидемиологического кластера *S. aureus* – LA-MRSA.

Популяционная структура MRSA клональна, и основной механизм распространения – также клональный (Jolley et al., 2018). Однако, существует географическая и эпидемиологическая детерминированность, в частности, среди HA-MRSA наиболее распространены генетические линии (sequence type, ST) ST8, ST5, ST22, ST239, и ST228. Среди CA-MRSA доминируют ST8 (USA300), ST80, ST59 и ST30. Наиболее успешные клоны среди LA-MRSA – ST398 и ST97. В последнее десятилетие были проведены фундаментальные исследования, позволившие проследить эволюционную историю распространения наиболее успешных клонов *S. aureus*. Так, было установлено, что ST8-USA300, главный эпидемический клон на территории всей Америки, произошел от Европейских вариантов *S. aureus* в начале XX века (Strauss et al., 2017). Один из самых успешных клонов HA-MRSA ST239, появившийся в 1930 – 1950 гг. и распространившийся на всех континентах в 1980-х гг., является гибридным вариантом, возникшим в результате приобретения ST8 фрагмента генома ST30 (Gill et al., 2021). Установлено Африканское происхождение доминирующего на территории Европы клона CA-MRSA ST80 (Stegger et al.,

2014). В настоящее время выявлен отдельный подклスター эпидемического клона ST22 (EMRSA-15) – «Газа клон», впервые описанный на территории Палестины, характеризующийся быстрой скоростью распространения и эволюции (Zhao et al., 2023; Abrudan et al., 2023; Chang et al., 2018). Параллельный анализ локальной и глобальной геномной эволюции позволяет в значительной степени реконструировать историю появления успешных эпидемических клонов, а также выявить новые варианты. Прогнозирование клonalных сдвигов и их траектории эволюции можно использовать в долгосрочной перспективе для оценки различных биологических рисков, связанных с появлением и распространением новых потенциально опасных клонов.

### **Степень разработанности темы исследования.**

В мире существуют несколько авторитетных школ, которые занимаются многими аспектами микробиологии *S. aureus*. В частности, ведущим специалистом в области изучения проблем устойчивости к гликопептидам является K. Hiramatsu и его коллеги из Медицинского Университета Юнтендо (Токио, Япония). Работы A. Tomasz и H. de Lencastre из Рокфеллерского Университета (Нью-Йорк, США) связаны с исследованиями механизмов резистентности, толерантности к бета-лактамам и изучением динамики популяционной структуры. Группа профессора B. Howden из Университета Мельбурна (Австралия) занимается проблемами устойчивости к гликопептидам, геномной эволюцией MRSA. Несмотря на наличие больших международных коллективов, многие вопросы остаются неизученными – механизмы формирования устойчивости к гликопептидам, липопептидам, происхождение MRSA и успешных генетических линий, а также факторы, определяющие успешность распространения MRSA. В последние несколько лет интенсивно изучается роль вторичных внутриклеточных мессенджеров c-di-AMP в формировании устойчивости к бета-лактамам.

В Российской Федерации существует несколько научных школ, занимающихся проблемами эпидемиологии и формирования устойчивости *S. aureus* к различным антимикробным препаратам. Это коллективы из НИИ Антимикробной химиотерапии, Смоленск (работы Р.С. Козлова, А.В. Дехнича и коллег); НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва (работы О.А. Дмитренко и коллег), кафедра микробиологии Красноярского медицинского Университета им. Войно – Ясенецкого (работы О.Е. Хохловой и коллег), ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Москва, Оболенск (работы И.В. Абаева и коллег). Однако, исследования вышеперечисленных научных коллективов в основном затрагивают вопросы эпидемиологии, изучения популяционной структуры и резистентности нозокомиальных стафилококков. В частности, ранее было показано (Дмитренко О.А. и др., 2008), что на территории РФ длительно циркулируют два нозокомиальных клона – ST8 и ST239, однако детальная сравнительная геномная характеристика, происхождение и эволюция этих клонов остаются неизученными. Помимо этого, практически не изучена проблема популяционной структуры внебольничных MRSA на территории РФ, опубликованы только единичные исследования (Baranovich et al., 2010). Не изучены проблемы гетерорезистентности и снижения чувствительности к гликопептидам, эволюции устойчивости к антибиотикам у *S. aureus*. Экспериментальные работы по эволюционной динамике и изучению молекулярных механизмов устойчивости к антимикробным препаратам в Российской Федерации представлены недостаточно полно.

### **Цель и задачи исследования.**

**Цель.** Охарактеризовать популяционную структуру и траектории эволюции устойчивости к антимикробным препаратам у *S. aureus*.

### **Задачи.**

1. Охарактеризовать клonalную структуру внутрибольничных (НА-MRSA) и внебольничных MRSA (СА-MRSA), циркулирующих в России, провести

сравнительную оценку их чувствительности к традиционным и новым антимикробным препаратам, применяемым для лечения стафилококковых инфекций.

2. Выявить генотипические особенности генетических линий MRSA, доминирующих на территории Российской Федерации, и их эволюционные связи с глобальной популяцией стафилококков.
3. Определить генетические механизмы антимикробной резистентности среди доминирующих на территории Российской Федерации клонов НА-MRSA и СА-MRSA.
4. Охарактеризовать фенотипические изменения и траектории эволюции устойчивости *S. aureus* к антибиотикам при ступенчатых пассажах на возрастающих концентрациях ванкомицина, даптомицина и бета-лактамов.
5. Охарактеризовать фенотипические изменения и траектории эволюции устойчивости *S. aureus* к антибиотикам при воздействии шоковых концентраций ванкомицина, ципрофлоксацина и гентамицина.
6. Дать оценку роли феноменов гетерорезистентности и толерантности в формировании устойчивости *S. aureus* к антимикробным препаратам.

#### **Научная новизна.**

Предложены эволюционные модели, объясняющие появление клонов ST8 и ST239 на территории Российской Федерации и предполагающие формирование MRSA задолго до внедрения метициллина в клиническую практику (1930 – 1950 гг.). Установлено, что клоны ST8, длительно циркулирующие на всей территории России, имеют общее происхождение с европейскими клонами, но в настоящее время эволюционируют как отдельные генетические линии. Клоны ST239 представлены разными кластерами, что предполагает их многократный импорт.

Представлена популяционная структура циркулирующих СА-MRSA, выявлены доминирующие клоны – ST22 и ST59. Анализ доступной глобальной коллекции геномов, а также полученных в настоящем исследовании *S. aureus* генотипа ST22, позволил выделить отдельный кластер – «Газа клон».

Проведенный филогенетический анализ послужил отправной точкой для молекулярно-эпидемиологического анализа клонов ST22, циркулирующих в других странах. Среди CA-MRSA выявлен ранее не описываемый в Российской Федерации клон ST59, который относится к Восточно-Азиатскому кластеру.

Впервые на территории РФ описаны фенотипы OS-MRSA, характеризующиеся мутациями в промоторе гена *tesA*, низкой его экспрессией, а также фенотипической гетерорезистентностью к оксациллину. Установлено, что OS-MRSA способны быстро трансформироваться в MRSA за счет хромосомных мутаций, влияющих на формирование устойчивости к беталактамным антибиотикам, независимо от *tesA*. Основная опасность OS-MRSA – это сложность корректной лабораторной детекции данного фенотипа, которая может привести к назначению неадекватной антибактериальной терапии.

В ходе изучения эволюции резистентности *in vitro* были получены фундаментальные результаты. Существующее ранее представление о формировании устойчивости, как появлении одной конкретной мутации, требует детализации. В частности, установлено, что к одному фенотипическому проявлению устойчивости могут приводить мутационные события, затрагивающие различные метаболические пути. Полученные данные свидетельствуют о том, что формирование устойчивости у *S. aureus* проходит по различным траекториям через этап формирования в популяции минорных клонов, которые либо элиминируют, либо начинают доминировать. Производные штаммы, полученные и детально охарактеризованные в ходе выполнения экспериментов селекции устойчивости *in vitro*, запатентованы. Изобретения относятся к медицинской микробиологии и могут быть использованы для разработки диагностических платформ.

### **Теоретическая значимость.**

За прошедшие несколько лет внимание научного сообщества к таким проблемам, как роль вторичных мессенджеров c-di-AMP и феномен моноклональной гетерорезистентности неуклонно возрастает (Corrigan et al., 2011, 2013). Полученные в настоящей работе данные подтверждают роль c-di-

AMP в формировании устойчивости к бета-лактамам. Отмечается растущая роль *mcs*-независимых путей формирования устойчивости к бета-лактамам у *S. aureus* за счет тенденции к преобладанию MSSA над MRSA, особенно при бактериемиях (Kourtis et al., 2019). Полученные результаты подтверждают, что формирование устойчивости происходит путем разных параллельных механизмов, что согласуется с последними экспериментальными данными по эволюции резистентности (Baym et al., 2016). Было обнаружено, что при формировании устойчивости к бета-лактамам затрагивается процесс изменения метаболизма c-di-AMP за счет мутаций в *gdpP*. У мутантов, полученных при селекции на разных бета-лактамах, детектируются мутации в пенициллинсвязывающих белках, системах регуляции, биосинтезе клеточной стенки, генах генерального метаболизма. Селекция мутаций может происходить через формирование множества минорных клонов с различными полиморфизмами, последующей экспансией единичных клонов, их доминированием и закреплением во всей популяции, что было продемонстрировано при анализе данных геномного секвенирования с обнаружением минорных (редких) генетических событий, а также фенотипически, с использованием популяционного анализа. В диссертационной работе было показано, что приобретение устойчивости сопровождалось снижением скорости роста бактериальных культур, наиболее значимые изменения были выявлены при формировании устойчивости к даптомицину. Это позволяет прогнозировать длительный процесс эволюции устойчивости к препаратам, действующим на цитоплазматическую мембрану, что может являться вектором для будущих разработок антибактериальных препаратов. В ходе исследования было установлено, что формирование устойчивости к бета-лактамам и гликопептидам происходит с накоплением множества мутаций, а также через формирование гетерорезистентных популяций. Выявлено, что устойчивость к ванкомицину и даптомицину сопровождается множественным накоплением мутаций в различных регуляторных генах, участвующих в регуляции биосинтеза клеточной стенки.

Кратковременное воздействие высокими концентрациями ванкомицина способствует формированию гетерорезистентности. Воздействие ципрофлоксацином опосредует появление перекрестной толерантности к бактерицидным антибиотикам.

### **Практическая значимость.**

Полученные научные результаты могут быть использованы в практической медицине, в частности, в диагностическом процессе, фармакологии (корректировка существующих схем антибактериальной терапии), а также при разработке лабораторных диагностических платформ. Предложенные модели эволюции доминирующих генетических линий могут быть использованы в эпидемиологическом мониторинге за эволюцией MRSA на территории РФ. Характеристика циркулирующих «клонов высокого риска» является важным эпидемиологическим звеном в системе здравоохранения для сохранения национальной безопасности Российской Федерации. Особую значимость имеют выявленные MRSA изоляты, проявляющие ложную чувствительность к бета-лактамам, циркулирующие на территории РФ. Такие фенотипы представляют опасность вследствие возможного определения ошибочной чувствительности в лабораториях системы здравоохранения РФ. В работе приведен сравнительный анализ эффективности разных методов выявления OS-MRSA фенотипов.

Данные по эволюции устойчивости *in vitro* могут быть использованы при разработке и поиске новых антибактериальных препаратов. Полученные результаты подчеркивают риски появления ассоциированной и перекрестной устойчивости на фоне воздействия бета-лактамными и гликопептидными антибиотиками, что важно учитывать при использовании этих препаратов в клинической практике для лечения стафилококковых инфекций. В ходе экспериментов по селекции устойчивости *in vitro* к бета-лактамам у MSSA было выявлено, что устойчивые мутанты сохраняли чувствительность к маркерному антибиотику – цефокситину, по чувствительности к которому судят об общей чувствительности стафилококков к бета-лактамам. Это данные

говорят о неэффективности использования цефокситина как маркерного антибиотика для детекции *tesc*-независимых механизмов устойчивости. Было также показано, что устойчивые к ванкомицину и даптомицину производные штаммы *S. aureus* характеризуются перекрестной устойчивостью к липогликопептидам: телаванцину, далбаванцину и оритаванцину. Эти результаты свидетельствуют о неэффективности использования липогликопептидов в отношении изолятов со сниженной чувствительностью к ванкомицину и/или даптомицину.

Производные устойчивые штаммы могут быть использованы в качестве тест-культур для оценки чувствительности к гликопептидным, липопептидным и бета-лактамным антибиотикам или как референс-штаммы для постановки РАР-анализа, «time-killing»-анализа; для поиска новых мишней в клетке с целью разработки новых потенциальных антибактериальных препаратов; для тестирования новых потенциальных антимикробных соединений. Депонированные штаммы, характеризующиеся перекрестной толерантностью, могут быть использованы в опытах по моделированию фармакодинамических параметров при использовании различных антибиотиков; для тестирования новых потенциальных антимикробных соединений с оценкой их эффективности на антибиотикотолерантные стафилококки; как референс-штаммы для изучения феномена антибиотикотолерантности. Штаммы депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск) и доступны для практического и научного использования. Полученные данные по исследованию гетерорезистентности, антибиотикотолерантности, общих путях формирования устойчивости *S. aureus* к бета-лактамам, гликопептидам, даптомицину могут быть использованы для разработки и оптимизации существующих схем антибактериальной терапии.

Результаты диссертационного исследования используются в медицинских учреждениях Санкт-Петербурга: ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России (акт внедрения от 19.01.2024), ГБУ Спб НИИ СП им. И.И. Джанелидзе (акт внедрения от

18.01.2024) и Москвы: ГБУЗ «ГКБ им. В.В. Вересаева ДЗМ» (акт внедрения от 18.01.2024), ГБУЗ «ГКБ им. С.С. Юдина ДЗМ» (акт внедрения от 22.01.2024), уровень внедрения – учрежденческий. Материалы диссертационного исследования используются в лекционном материале и на практических занятиях по медицинской микробиологии для студентов, врачей – бактериологов, ординаторов различных специальностей, специалистов среднего медицинского образования в медицинских ВУЗах – ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова (акт внедрения от 05.02.2024) и ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (акт внедрения от 02.02.2024), уровень внедрения – учрежденческий.

### **Методология и методы исследования.**

Объектом исследования являлся микроорганизм *S. aureus*, а изучаемые явления – закономерности, влияющие на приобретение и распространение устойчивости к антибиотикам у данного микроорганизма. Для достижения поставленных цели и задач анализировалась как принадлежность *S. aureus* к определенной генетической линии, так и пути формирования устойчивости при селекции *in vitro* посредством индуцированного изменения генотипа и фенотипа. Диссертационное исследование сочетает в себе два методологических подхода. Первый – это применение описательных методов, второй – использование эксперимента по моделированию формирования резистентности. Для описания коллекции бактериальных культур *S. aureus* были использованы фенотипические и генотипические методы исследований. Геномы представителей изолятов доминирующих генетических линий были секвенированы с проведением комплекса биоинформационических подходов, включающих сравнение с глобально-распространенными клонами, пангеномный и филогенетический анализ, оценку времени дивергенции а также Байесовскую кластеризацию. В экспериментах по адаптивной эволюции проводилось изучение приобретения устойчивости с оценкой мутационного резистома. Для этого проводилось сравнение генотипа и фенотипа до селекции и в динамике на разных этапах селекции с использованием комплекса

различных подходов: фенотипических, геномного секвенирования и биоинформатики.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. Для внутрибольничных и внебольничных изолятов MRSA характерна различная популяционная структура с преобладанием определенных генетических линий. Среди внутрибольничных генетических линий доминирует клон ST8, представленный тремя кластерами, произошедшими от европейской линии, расчетное время появления которых относится к 1930 – 1950 гг. Среди внебольничных изолятов MRSA доминирует субклuster «Газа клон» ST22, вероятное происхождение которого – Палестина. Данные генетические линии характеризуются разным уровнем ассоциированной устойчивости к антибиотикам различных групп. Выявлена ложная чувствительность к оксациллину (OS-MRSA) среди внебольничных представителей MRSA.

2. В экспериментальных условиях траектории эволюции устойчивости MRSA и MSSA к антимикробным препаратам, применяемым для лечения соответствующих инфекций, определяются генетическим окружением, особенностями воздействия антибиотиков на микроорганизм (серийные пассажи в присутствии возрастающих концентраций антибиотиков или кратковременное воздействие шоковыми концентрациями).

3. Процесс приобретения устойчивости связан со значительной «биологической ценой сопротивления», а степень ее выраженности зависит от действующего антибиотика и механизма устойчивости. По мере увеличения количества приобретаемых мутаций увеличивается и «биологическая цена сопротивления». Формирование устойчивости к антибиотикам приводит к появлению перекрестной и ассоциированной устойчивости. Воздействие шоковыми концентрациями ципрофлоксацина приводит к появлению толерантности.

4. Изменения в метаболизме c-di-AMP (посредством мутаций в *gdpP*) и мутации в *rprP* и его промоторе детерминируют устойчивость к бета-лактамам.

Мутации в регуляторных генах, ответственных за биосинтез клеточной стенки, приводят к устойчивости к гликопептидам. Мутации в системах биосинтеза мембранных фосфолипидов приводят к устойчивости к даптомицину. Кросс-толерантность связана с появлением мутаций в пептидил-тРНК-гидролазе (Pth). Приобретение устойчивости также ассоциировано с накоплением мутаций в «нецелевых» генах, генах метаболизма.

5. Гетерорезистентность и накопление гетеромутаций в популяции являются первичным этапом формирования полноценной устойчивости (гоморезистентности) к антибиотикам.

#### **Степень достоверности.**

Исследование выполнено с использованием современного исследовательского оборудования. Были использованы современные международные протоколы и стандарты исследований, касающиеся разделов по оценке чувствительности и молекулярного типирования бактерий. Экспериментальные работы проводились с повторностями и включением надлежащих контролей. На всех этапах использовались контрольные референсные штаммы ATCC. Использовали входной контроль полученных данных секвенирования, некачественные ДНК-прочтения удалялись из анализа с повторным получением данных секвенирования. Результаты статистически обработаны с порогом принятия значимости ( $p$ ) от  $\leq 0,001$  до  $< 0,05$ . Полученные результаты были рецензированы в различных международных и российских изданиях при публикации материалов по теме диссертационного исследования. Часть экспериментальных работ также рецензирована экспертами Российского Научного Фонда (РНФ), по грантам которого выполнялась часть исследований. Выводы диссертации соответствуют цели и задачам исследования.

#### **Апробация результатов.**

Результаты работы были представлены на 40 различных международных и всероссийских конгрессах, научно-практических конференциях в виде устных и постерных докладов. Наиболее значимые результаты были представлены на

Европейских конгрессах по клинической микробиологии и инфекционным болезням ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases): ECCMID 2014 (Барселона, Испания), ECCMID 2015 (Копенгаген, Дания), ECCMID 2016 и ECCMID 2019 (Амстердам, Нидерланды), ECCMID2020 (online abstract book), ECCMID 2021 – 2022 (online); 10-ом международном симпозиуме по резистентности и антимикробным агентам, 10<sup>th</sup> ISAAR, International Symposium on Antimicrobial Agents and Resistance 2015 (Инчхон, Южная Корея); Конгрессах «Молекулярная диагностика (МД)» - МД 2014, МД 2017, МД 2021 и МД 2023 (Москва, Россия); Всероссийских конгрессах «Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург, Россия) в 2014 – 2022 гг.; Российских конференциях «Современные проблемы и перспективы антимикробной терапии» в 2016, 2020 – 2022гг; X конгрессе с международным участием «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи 2022» (Москва, Россия); «Санкт-Петербургском септическом форуме» в 2018, 2022 (Санкт-Петербург, Россия). Большинство международных выступлений (ECCMID, ISAAR) было поддержано грантами конференций для молодых ученых (Young scientist Travel Grants). В 2016 г. получен грант на прохождение образовательного курса по программе Европейского общества клинических микробиологов и инфекционистов (ESCMID) – Virulence and Resistance in *Staphylococcus aureus*: State of the Art, ESCMID Postgraduate Education Course (Лион, Франция). Исследование было поддержано грантами РНФ: 15-15-00185 (2015 – 2017 гг., основной исполнитель), 18-75-10114 (2018 – 2021 гг., руководитель) и 18-75-10114-П (2021 – 2023 гг., руководитель). Апробация диссертационной работы проведена на Ученом совете ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА (протокол №9 от 24.10.2023).

### **Личное участие автора в получении результатов.**

Автор принимал участие во всех этапах исследования: ведение коллекции бактериальных культур, проведение лабораторных, микробиологических методов исследований, молекулярного типирования, геномного секвенирования и биоинформационического анализа. Микробиологические работы, секвенирование

геномов, а также работы по селекции устойчивости *in vitro* были проведены на базе научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА совместно с коллегами – к.м.н. Калиногорской О.С., Сабиновой К.А., Чулковой П.С., Сулян О.С. Биоинформационный анализ проводился совместно с сотрудниками НИО Лихолетовой Д.В., Павловой П.А. и к.б.н. Цветковой И.А. Экспериментальные работы, связанные с выделением РНК, оценкой экспрессии генов, геномным редактированием, были проведены на базе Санкт-Петербургского филиала ИоГЕН РАН совместно с сотрудниками к.б.н Соловьевой Ю.В., Велижаниной М.Е. Секвенирование коллекции изолятов, относящихся к ST8 и ST239, и первичный анализ данных секвенирования был проведен на базе ФГБУ ЦСП ФМБА России совместно с сотрудниками Шаповаловой В.В., Мацвай А.Д., Нурмукановой В.А. Часть изолятов MRSA ST239 были типированы совместно с доктором Stefan Monecke (Институт фотонных технологий им. Лейбница, Йена, Германия).

### **Связь работы с научными программами.**

Проблема формирования и распространения устойчивости к антибиотикам является глобальной угрозой человечеству. В развитых странах мира многие государственные программы в сфере здравоохранения направлены на исследования таких аспектов, как механизмы формирования устойчивости, молекулярные векторы распространения резистентности и разработка мер по сдерживанию экспансии множественно устойчивых клонов бактерий. Проводятся программы по слежению за эволюцией и распространением как известных, так и новых генетических линий. Диссертационное исследование проведено в рамках этих задач. Работа была направлена на расшифровку механизмов резистентности, изучение возможности детекции новых фенотипов устойчивости у клинически значимого патогена – *S. aureus*. Диссертационная работа полностью соответствует направлению Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации (пункт 20в): переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и

технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных).

### **Публикации научных трудов.**

По результатам диссертационного исследования было опубликовано 32 печатные работы. Из них, 24 работы опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК и индексируемых в базах данных РИНЦ, Scopus или Web of Science, включая 8 публикаций в изданиях, входящих (на момент публикации) в Q1 по системе SJR. Остальные печатные работы представлены в виде тезисов докладов конференций. Получено 5 патентов на изобретение.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Текст изложен на 333 страницах, проиллюстрирован 54 рисунками, включает 38 таблиц, список литературы содержит 506 библиографических источников.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Обзор литературы (ГЛАВА 1)**

В обзоре дана краткая характеристика и клиническое значение *S. aureus*, описаны популяционная структура и основные стратегии ухода от действия антимикробных препаратов.

### **Материалы и методы исследования (ГЛАВА 2)**

**Коллекция бактериальных культур.** В работу включена коллекция *mesA*-положительных MRSA изолятов ( $n=853$ ), собранная в период 2011 – 2021 гг. из 50 медицинских центров (многопрофильных и специализированных стационаров) в 14 городах России. Внутрибольничные изоляты MRSA (НА-MRSA,  $n=659$ ) были выделены при различных стафилококковых инфекциях и осложнениях, развившихся в период пребывания пациентов стационаре. Группа изолятов CA-MRSA ( $n=194$ ) была собрана в период 2015 – 2019 гг. при исследованиях на назальное носительство *S. aureus*. Для описания коллекции был использован комплекс фенотипических (серийные разведения для

определения МПК, популяционный анализ (PAR), «time-killing») и генотипических методов (MLST, SCC<sub>mec</sub>-, spa-тиปирование *S. aureus*, оценка экспрессии генов, полногеномное секвенирование (n=339)). **Биоинформационические методы** включали: сборку геномов *de novo*, филогенетический и пан-геномный анализ, Байесовскую кластеризацию, определение времени дивергенции узлов с помощью алгоритмов BEAST, молекулярное типирование *in silico*. **Эксперименты по адаптивной эволюции устойчивости *in vitro***. Использовались две стратегии селекции устойчивости для MRSA и MSSA штаммов, относящихся к ST8, ST239, ST228, ST5, ST97: это ступенчатые пересевы на возрастающих концентрациях антибиотиков (цефтаролин, оксациллин, меропенем, ванкомицин, даптомицин) на протяжении 40-ка пассажей; и циклическое кратковременное воздействие (5 – 6 ч) шоковыми концентрациями, в 10 – 100 раз превышающих уровень МПК, (ванкомицин, ципрофлоксацин, гентамицин) в течение 10 пассажей. Для производных штаммов в динамике проведена оценка скорости роста, PAR-анализ, оценка индуцированной аутолитической активности, полногеномное секвенирование (n=90) с последующей аннотацией мутационных событий с оценкой их аллельной глубины. Использовалось **направленное геномное редактирование (CRISPR/Cas9)** гена *gdpP* на модельном штамме *S. aureus* RN4220 для подтверждения его роли в формировании устойчивости к беталактамам. **Данные геномного секвенирования** доступны в NCBI GenBank, BioProject: PRJNA872007, PRJNA325350, PRJNA721282, PRJNA609231, PRJNA237679, PRJNA996487.

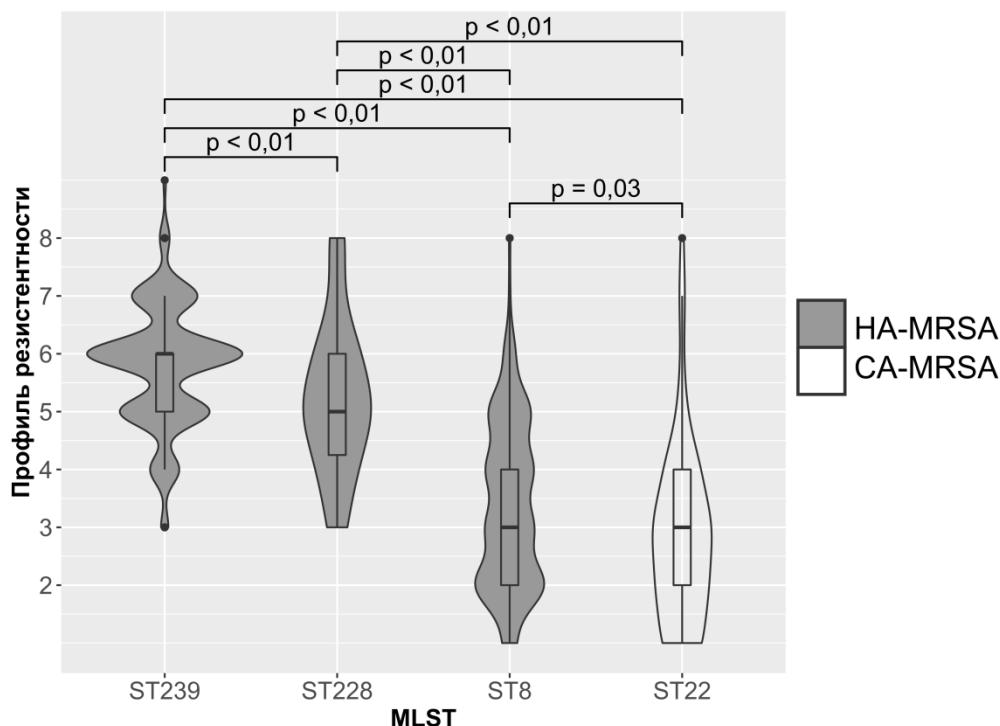
### **Особенности чувствительности к антибиотикам у разных генетических линий MRSA (Главы 3 и 4)**

Подавляющее большинство изолятов MRSA проявляли чувствительность к ванкомицину с МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub> – 1 и 2 мкг/мл, соответственно. Все изоляты характеризовались чувствительностью к линезолиду и тигециклину. Единичные изоляты НА-MRSA (0,7%) характеризовались устойчивостью к ванкомицину (hVISA/VISA фенотипы с МПК = 4 мкг/мл) и тейкопланину (3,5% изолятов с

МПК = 4 мкг/мл). Оритаванцин, далбаванцин и телаванцин проявляли более выраженную антибактериальную активность (МПК<sub>90</sub> 0,125 мкг/мл). Чувствительность к оксациллину у -положительных *S. aureus* (OS-MRSA) в большей степени встречалась у CA-MRSA (26%). Доля изолятов НА-MRSA со сниженной чувствительностью к цефтаролину (МПК = 2 мкг/мл) составляла 8,8%. По результатам ПЦР- и сиквенс-типирования, было выявлено 12 подтипов стафилококковых *mec*-кассет (SCC), 81 *spa*-тип и 31 уникальный сиквенс тип (ST), входящие в состав одиннадцати клональных комплексов (CC). Среди НА-MRSA доминировали ST8-t008/t024-SCC*mec* IVc (49%), ST239-t037/t632/t030-SCC*mec* III (35%), ST228-t041-SCC*mec* IA (6%). Среди CA-MRSA доминировали ST22-t223-SCC*mec* IVa (46%), ST8-t008/t024-SCC*mec* IVc (18%), ST59-t1950-SCC*mec* V (8%). Представители разных генетических линий характеризовались разным уровнем ассоциированной устойчивости. Наибольшей ассоциированной устойчивостью характеризовался генотип ST239, наименьшей – ST22 (рис. 1). Изоляты со сниженной чувствительностью к ванкомицину и даптомицину в большей степени встречались среди клонов ST8 (19%, p<0,01). Мутации в PBP2a (N146K, E239K, N204K, D208E, N204K), ассоциированные с низким уровнем устойчивости к цефтаролину (МПК = 2 мкг/мл), выявлялись у изолятов, относящихся к ST239 и ST228.

**Фенотипические и генотипические особенности OS-MRSA.** OS-MRSA фенотипы превалировали среди CA-MRSA (n=49, 24%), среди НА-MRSA эти фенотипы были определены только в 2% случаев (n=11). Все OS-MRSA (n=60) характеризовались уровнем МПК оксациллина < 2 мкг/мл, цефокситина в диапазоне 1 – 16 мкг/мл и относились к следующим клонам: ST22, ST8, ST59, ST1, ST6 и ST97. При оценке чувствительности OS-MRSA к разным беталактамам была отмечена чувствительность к комбинации пенициллина-claveуланата с МПК ≤2 мкг/мл. Средняя зона задержки роста в ДДМ с цефокситином составляла 18±4 мм. OS-MRSA характеризовались разными мутациями в PBP2a (S225R, A228T, K239E, E246G, D323N, A468V и S590P) и мутациями в промоторе гена *mecA*: замена G→T в положении -7 или замена

C→T в положении -33. Наиболее значимое влияние на сниженный уровень экспрессии гена *mcA* оказывала мутация позиции -33 ( $p < 0,001$ ). При сравнении разных лабораторных тестов для выявления OS-MRSA наибольшей положительной прогностической ценностью характеризовались тесты на основе цефокситина, в 100% случаев был выявлен ген *mcA*.



**Рисунок 1** – Сравнение профилей резистентности среди представителей доминирующих генетических линий.

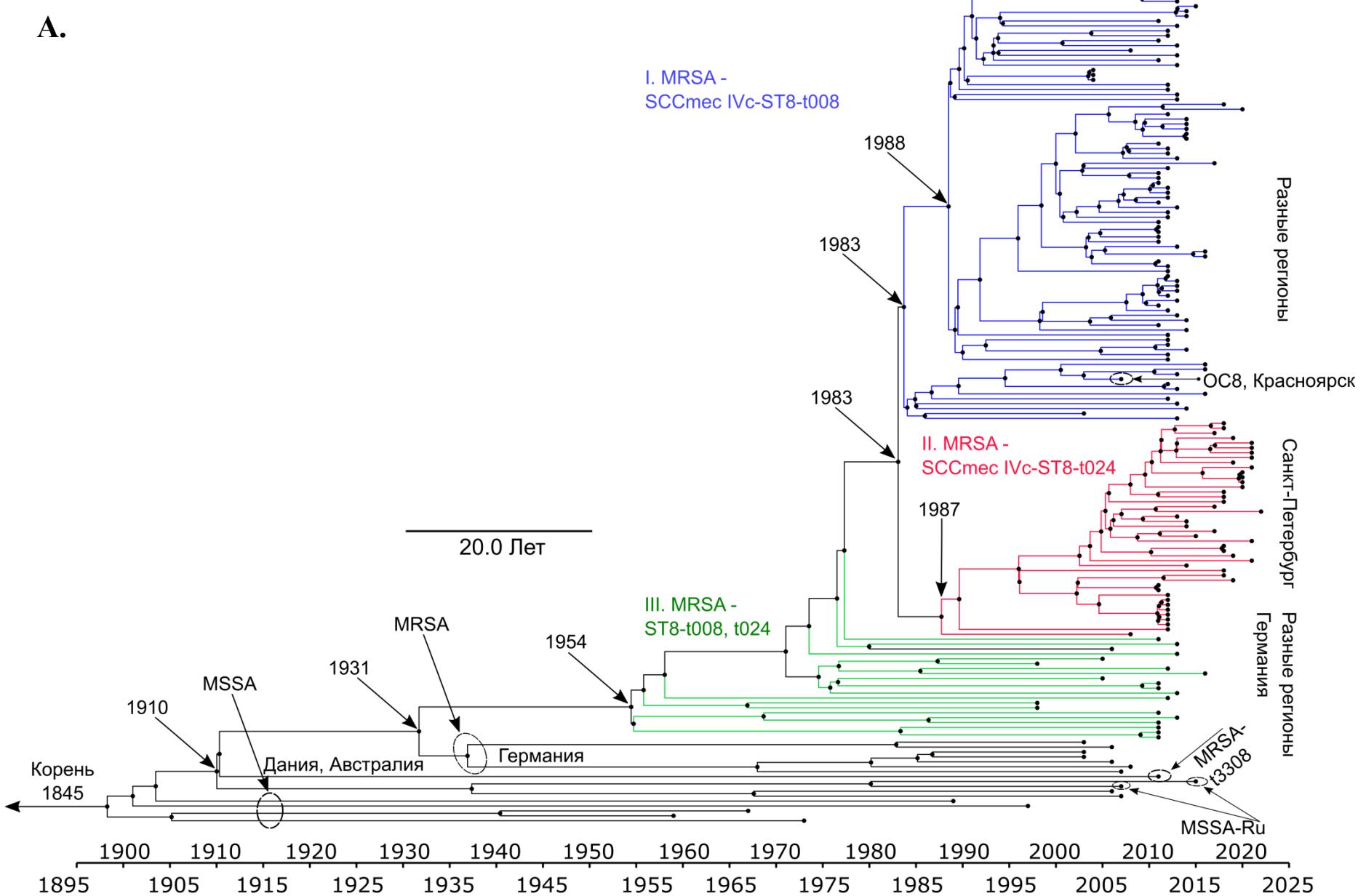
При исследовании с использованием РАР-анализа было установлено, что 60% OS-MRSA фенотипов характеризовались гетерорезистентностью в отношении оксациллина. Для подтверждения гетерорезистентности выросшие колонии на максимальной концентрации (32 мкг/мл) в РАР-анализе дополнительно культивировали с оксациллином в течение 48 часов. Полученные субпопуляции OS-MRSA характеризовались высокими значениями МПК к бета-лактамным антибиотикам, а также мутациями в генах дополнительных факторов (auxiliary factors), влияющих на фенотипическое проявление устойчивости к бета-лактамам: *relA*, *eno*, *pyk*, *gmk* и *prsA*.

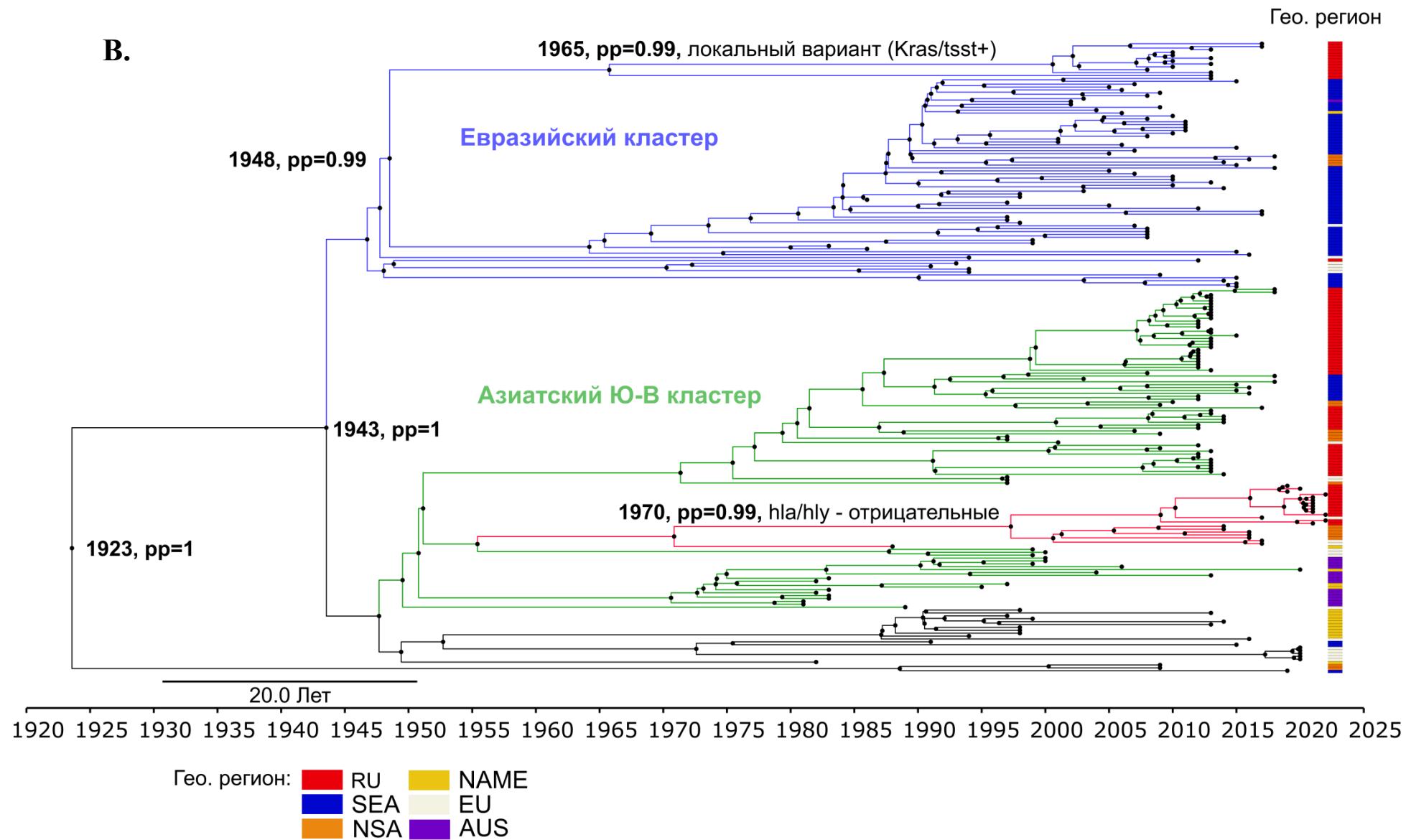
**Анализ глобальной и локальной популяционной структуры доминирующих генетических линий, циркулирующих в России (Глава 5).** В анализ были включены доступные геномы и их метаданные из NCBI GenBank соответствующих генетических линий (ST8, ST239, ST22, ST59).

**Популяционная структура доминирующего клона НА-MRSA ST8.** В работе были анализированы 2238 геномов, включая 156 геномов из России. На основе филогенетического анализа и Байесовской кластеризации 29990 сорных SNP среди всей популяции *S. aureus* ST8 выделялось три кластера. Все геномы российских изолятов локализовались в одном кластере совместно с геномами изолятов из Европы, в частности, из Германии. Для расчета времени дивергенции и определения датировки узлов филогенетического дерева, используя алгоритм BEAST, были отобраны 172 генома, из них 153 генома полученные и секвенированные при выполнении диссертационной работы (рис. 2А). Для калибровки построения консенсусного дерева были также добавлены геномы MSSA, выделенные в середине XX века в Европе и Австралии. Для оценки возможной филогенетической связи между ST8-MRSA и ST8-MSSA, циркулирующих на территории России, также были добавлены два генома MSSA (PRJNA541565 и PRJNA431177). По расчетным результатам общий гипотетический стафилококковый предок ST8 появился в  $1845 \pm 30$  г. (PP=1). Геномы изолятов MSSA-ST8 (из Дании и Австралии) образуют максимально длинные ветви с общими предшественниками, произошедшими в  $1910 \pm 20$  году (PP=1). В эту же группу входили и два генома российских изолятов MSSA-ST8 (обозначены на рисунке 2А как «MSSA-Ru»). Деление от общего предка на современные немецкие и российские MRSA-ST8 определялось  $1931 \pm 16$  г. (PP=1). Диапазон вероятных датировок захватывает и 1940-е гг., когда в клиническую практику был внедрен пенициллин, хотя первый клинический изолят MRSA был описан гораздо позже в 1960-х гг. В настоящем исследовании геномы изолятов, максимально близкие к геномам из Германии, формировали отдельный кластер (зеленая ветка на рисунке 2А – кластер III), которые произошли от гипотетического предка в  $1954 \pm 10$  г. (PP=1). У

российских изолятов не было выявлено существенных отличий в спектре факторов вирулентности. Токсинов PVL, TSST, Seb обнаружено не было. Таким образом, MRSA-ST8, входящих в III кластер, можно отнести к группе архаичных промежуточных вариантов. Кластеры I и II дивергировали от общего предшественника с геномами III кластера в  $1983\pm7$  г. (PP=1). Появление геномов II кластера датируется  $1987\pm5$  г. В данный кластер входили геномы изолятов, выделенные от разных пациентов, преимущественно из Санкт-Петербурга, в период 2008 – 2022 гг., включая колонизацию на фоне инфекции COVID-19. Появление предшественника геномов I кластера датируется  $1983\pm5$  годом (PP=0,99). В данный кластер входили геномы изолятов, выделенные в разных городах России в период 2003 – 2020 гг. В I кластер также входил ранее описанный геном изолята OC8 (Красноярск, PRJDB4364).

**Популяционная структура доминирующего клона НА-MRSA ST239.** В филогенетический анализ были включены 632 генома, 104 из которых - из России. Дерево было построено на основе выравнивания 10100 core-SNP, в качестве референс-генома использовался *S. aureus* TW20 (FN433596). Всего было выявлено пять кластеров (по Байесовской кластеризации). Геномы изолятов из России локализовались на разных ветках филогенетического дерева и входили в состав следующих кластеров: Европейский, Азиатский Ю.-В. и Евразийский. Геномы нескольких изолятов входили в кластер BAPS-3. Для датировки дивергенции узлов на филогенетическом дереве, а также расчета времени появления общих предшественников в работу было включено 219 геномов из различных коллекций, покрывающих 42-летний период 1980 – 2022 гг. (рис. 2В). Расчетное время появления генетической линии ST239 датируется  $1923\pm8$  г. Разделение на два основных кластера (по классификации Monecke) произошло в  $1943\pm8$  г.

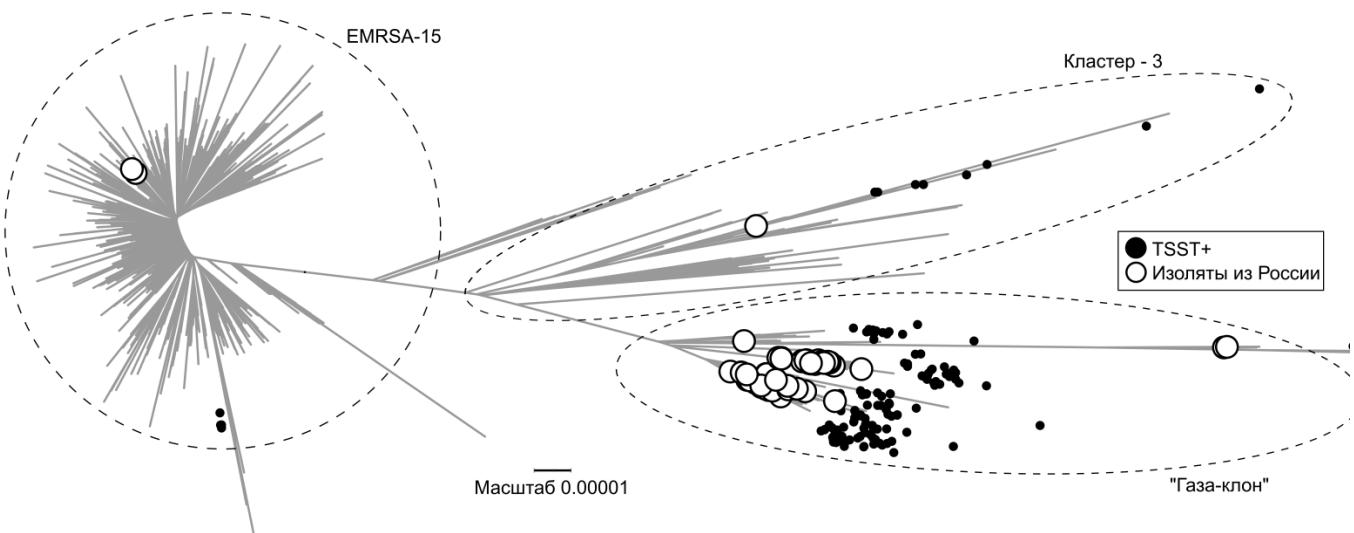




**Рисунок 2** – Филогенетический анализ с анализом времени дивергенции, А – геномы изолятов ST8 (n=172); В – геномы изолятов ST239 (n=219). Обозначения географических регионов: Ru – Россия, SEA – Юго-Восточная Азия, NSA – Северная и Южная Америка, NAME – Северная Африка и Ближний Восток, EU – Европа, AUS – Австралия.

Геномы изолятов из России локализовались в перемешку с другими геномами из разных географических регионов. Локальный Красноярский вариант (*tsst*-положительные изоляты) образовывал отдельную группу геномов в составе Евразийского кластера, временем происхождения которых является  $1965\pm9$  г. Отдельная группа *hla/hly*-отрицательных ST239 входила в состав Азиатского Ю.-В. кластера, время появления которого датировалось  $1970\pm6$  г.

**Популяционная структура доминирующих клонов CA-MRSA ST22 и ST59.** Для анализа было использовано 1311 геномов, включая 60 геномов, полученных в настоящем исследовании. Характерной особенностью изолятов «Газа клона» было наличие гена *tsst*. Попарное сравнение геномов трех кластеров выявило среднюю разницу 29 (27–31) core-SNP. Все Российские геномы ST22 были локализованы среди *tsst*-позитивных изолятов кластера «Газа клона», за исключением двух изолятов, которые относились к EMRSA-15. Геномы этих изолятов имели высокую степень идентичности – всего 11 (8 – 15) core-SNP. Были определены маркерные признаки ST22 «Газа клона» – это наличие фактора вирулентности *tsst*, интактного гена *ureC* и отсутствие гена *fnbB*, кодирующего адгезин фибронектин-связывающий белок. Изоляты MRSA-ST59 характеризовались чувствительностью к оксациллину и комбинации пенициллина-claveуланата за счет мутаций в промоторе гена *tesA* и PBP2a. Анализ доступных геномов MRSA-ST59 показал, что эти мутации часто ассоциированы с данной генетической линией. Российские изоляты MRSA-ST59 относились к Восточно-Азиатской сублинии ST59 и имели уникальные полиморфизмы. Российские геномы характеризовались высокой степенью идентичности, которая составила (медиана) 13 core-SNP.



**Рисунок 3 – Глобальная популяционная структура генетической линии ST22 (1343 геномов).**

### Селекция устойчивости *in vitro* (Глава 6)

В данной главе представлены результаты экспериментов по адаптивной эволюции устойчивости *S. aureus* к разным антибиотикам, используя две стратегии селекции (Таблица 1).

**Фенотипические и генотипические изменения при селекции на бета-лактамных антибиотиках.** Увеличение МПК к цефтаролину у MRSA коррелировало со статистически значимым снижением скорости роста и увеличением времени удвоения клеток. Относительная скорость роста снижалась на 10 – 19% ( $p<0,05$ ). Селекция MSSA на трех антибиотиках существенно влияла на скорость роста. Наибольшие изменения в скорости роста наблюдались у штаммов после селекции на оксациллине, наименьшие изменения были отмечены у штаммов после селекции на меропенеме. При селекции устойчивости MSSA к оксациллину рост уровня МПК составлял с 0,25 – 0,5 до 32 мкг/мл; рост МПК для цефтаролина – с 0,5 до 128 мкг/мл; и для меропенема рост МПК с 0,25 до 4 – 8 мкг/мл. У подавляющего большинства изогенных штаммов MSSA и MRSA после селекции на бета-лактамных антибиотиках были выявлены мутации в *gdpP*, *pbp4* и его промоторе. При селекции MSSA на оксациллине, меропенеме выявлялись мутации в разных

генах пенициллинсвязывающих белков (*pbp1*, *pbp2*, *pbp3* и *pbp4*), регуляторе *vraT*, а также генах, кодирующих биосинтез тейхоевых кислот.

Таблица 1 – Траектории эволюции мутационных резистомов (отмечены основные ключевые мутации)

Штаммы	АБ	Сел	Ключевые изменения у производных штаммов			
			Изменение фенотипов	СР	АЛ	Мутации в локусах
MRSA (ST8, ST239, ST228), MSSA (ST5), n=6	CPT	A	○→●●●	↓	Ч	<i>gdpP</i> , <i>pbp4</i> , <i>mecA</i>
	VAN	A	○→○/●→●	↓↓	Р	<i>walK</i> , <i>mprF</i> , <i>uscH</i> , <i>yycI</i> , <i>rpoB</i> , <i>vraG</i>
	DAP	A	○→●●●, Д	↓↓ ↓	Р	<i>mprF</i> , <i>cls2</i> , <i>pgsA</i> , <i>walK</i> , <i>fabF</i>
MSSA (ST8, ST97), n=2	CPT	A	○→●●●	↓	Ч	<i>gdpP</i> , <i>pbp4</i> , <i>tagA</i>
	OXA	A	○→○/●→●●●	↓↓	Ч	<i>gdpP</i> , <i>pbp4</i> , <i>vraT</i> , <i>vraS</i>
	MER	A	○→○/●→●●	↓	Ч	<i>gdpP</i> , <i>pbp4</i> , <i>vraT</i> , <i>pbp1</i> , <i>pbp2</i> , <i>pbp3</i>
MRSA (ST8, ST239), MSSA (ST5), n=5	VAN	B	○→○/●	–	НД	<i>walK</i>
MSSA (ST5, ST8, ST97), MRSA (ST22), n=4	CIP	B	○→○ Т	–	НД	<i>pth</i>
	GEN	B	○→●●, ○→○ Т, SCV, Д	–	НД	<i>atpG</i> , <i>pth</i> , <i>mprF</i> , <i>menA</i> , <i>fusA</i>
MRSA (ST8, ST239), n=4	CON	Без АБ	○→○	–	Ч	-

**Примечание:** АБ – антибиотики, CON – контроль (40 пассажей на среде без антибиотиков); Сел – вариант селекции *in vitro*: (A) – стратегия многократных пересевов на возрастающих концентрациях антибиотиков (40 пассажей), (B) – воздействие шоковыми концентрациями (10 пассажей); Изменение фенотипов: → – селекция, ○ – нет изменений МПК, ● – степень увеличения МПК (резистентность), ○/● – гетерорезистентность, ○ Т – толерантность, Д – фенотипическая диссоциация, SCV – мелкоколониевые варианты; СР – степень выраженности снижения скорости роста; АЛ – оценка индуцированного аутолизиса, (Р) – устойчивость, (Ч) – чувствительность, НД – нет данных.

Только у одного штамма MRSA (ST228) при селекции на цефтаролине были выявлены мутации в *mecA*. В ходе геномного редактирования на модельном штамме *S. aureus* RN4220 с помощью CRISPR/Cas9 было получено два мутантных штамма: штамм RN\_2 с делецией без сдвига рамки считывания и штамм RN\_3 с frameshift-делецией в гене *gdpP*. Делеция (90 п.н.) без сдвига

рамки считывания в линкерном участке между доменами GGDEF и DHH/DHHA1 белка GdpP напрямую не влияла на фенотип и чувствительность к антибиотикам. Напротив, frameshift-делеция (90 п.н.) сопровождалась увеличением времени удвоения клеток с 25 до 45 минут, увеличением МПК на 1 – 2 разведения, при этом была отмечалась фенотипическая гетерогенность при использовании градиентных диффузионных тестов. Изменение экспрессии приводило к незначительному увеличению (менее чем в 10 раз) транскриптов всех пенициллинсвязывающих белков: PBP1 – PBP4.

**Фенотипические и генотипические изменения при селекции на ванкомицине.** В конце селекции с ванкомицином максимальная концентрация в среде достигла 32 мкг/мл, а производные штаммы демонстрировали МПК 4–8 мкг/мл (VISA фенотипы). Селекция на ванкомицине приводила также к увеличению МПК липогликопептидных антибиотиков до 0,5–4 мкг/мл и МПК даптомицина до 2 мкг/мл. По мере селекции наблюдался рост показателя PAP/AUC в PAP-анализе с ванкомицином. Для некоторых штаммов наблюдался эффект качелей (Seesaw Effect). Производный штамм ATCC 29213 терял бета-лактамазу *blaZ*. Чувствительность к бета-лактамам была восстановлена у производного штамма SA0085 после 40 пассажей на среде без антибиотиков за счет делеции *SCCmec* элемента. Производные VISA штаммы характеризовались увеличением времени удвоения клеток с 20 – 26 до 27 – 57 минут; ЛАГ-фаза увеличилась со 129 – 178 до 180 – 208 минут. Ассоциированные с фенотипом VISA аминокислотные замены были идентифицированы в различных двух-компонентных системах, участвующих в биосинтезе клеточной стенки (WalK/WalR, YycI/YycH, VraS/VraT и VraG) и субъединицах РНК-полимеразы (RpoB, RpoC). Помимо этого были выявлены многочисленные мутации в различных системах метаболизма.

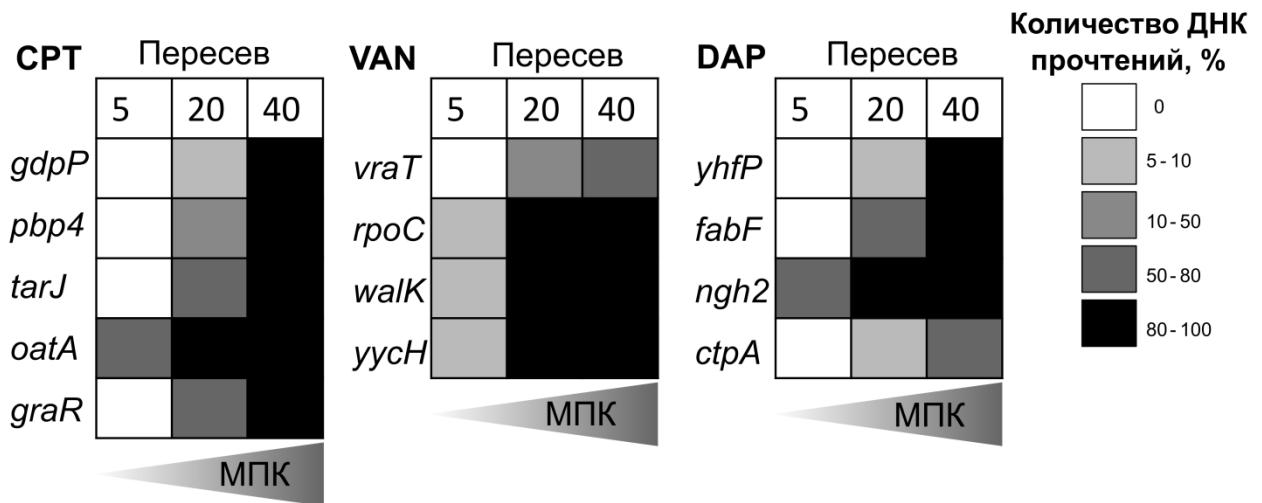
**Фенотипические и генотипические изменения при селекции на даптомицине.** При селекции на даптомицине максимальная концентрация антибиотика в среде достигала 128 мкг/мл. К 20-му пассажу все производные

штаммы приобретали высокий уровень устойчивости к даптомицину (диапазон МПК: 8–128 мкг/мл). Одновременно к концу селекции даптомицина также наблюдали повышенные уровни МПК ванкомицина (2 – 4 мкг/мл), тейкопламина, оритаванцина и далбаванцина. МПК телаванцина находилась в диапазоне 0,125–0,25 мкг/мл. Показатель РАР/AUC в РАР-анализе с ванкомицином достигал 0,5-1. Для штамма SA0736 к 40-му пассажу наблюдалась фенотипическая диссоциация: появлялись белые и желтые колонии. Отмечалось существенное изменение в скорости роста, время деления клеток было увеличено до 40-66 мин; ЛАГ-фаза увеличивалась до 140-564 мин; относительная скорость роста снижалась на 20 – 30%. У всех производных штаммов были выявлены мутации в ключевых генах, участвующих в биосинтезе мембранных фосфолипидов: *MprF* (R50H, S136L, S295L, S309L и L826F), *cls2* и *pgsA*, связанные с устойчивостью к даптомицину. Мутации в гене белка *MprF* появлялись после 20-го пассажа и коррелировали с повышением МПК до 32 мкг/мл. Также были выявлены мутации в генах метаболизма глицерола.

**Анализ генотипической гетерорезистентности.** При селекции на всех антибиотиках у всех изолятов было отмечено, что формируются гетеромутации (наличие смешанных нуклеотидных позиций в ридах после секвенирования), которые могут элиминировать в последующих пассажах при селекции либо закрепиться в популяции, то есть перейти в гомомутации. На рисунке 4 приведены примеры переходов гетеромутаций в гомомутации в процессе селекции *in vitro*.

**Селекция под воздействием шоковых концентраций ванкомицина: формирование гетерорезистентности.** В среднем, на протяжении всех 10-ти циклов воздействия ванкомицином (50 мкг/мл) количество выживших клеток было в диапазоне 70 – 100%. Все полученные производные штаммы характеризовались повышением уровня МПК ванкомицина и тейкопламина до 2 мкг/мл. Уровень МПК даптомицина менялся с 0,25 – 1 мкг/мл до 0,25 - 2 мкг/мл. По результатам РАР-анализа отмечалось увеличение параметра

площади под кривой на 45 – 50%. После селекции были обнаружены мутации в регуляторе *walK* (G223D, V380I, D235N, E261V, T188S).



**Рисунок 4** – Примеры переходов гетеромутаций (количество ДНК прочтений < 90%) в гомомутации (90 – 100%) в разных генах при селекции на трех антибиотиках.

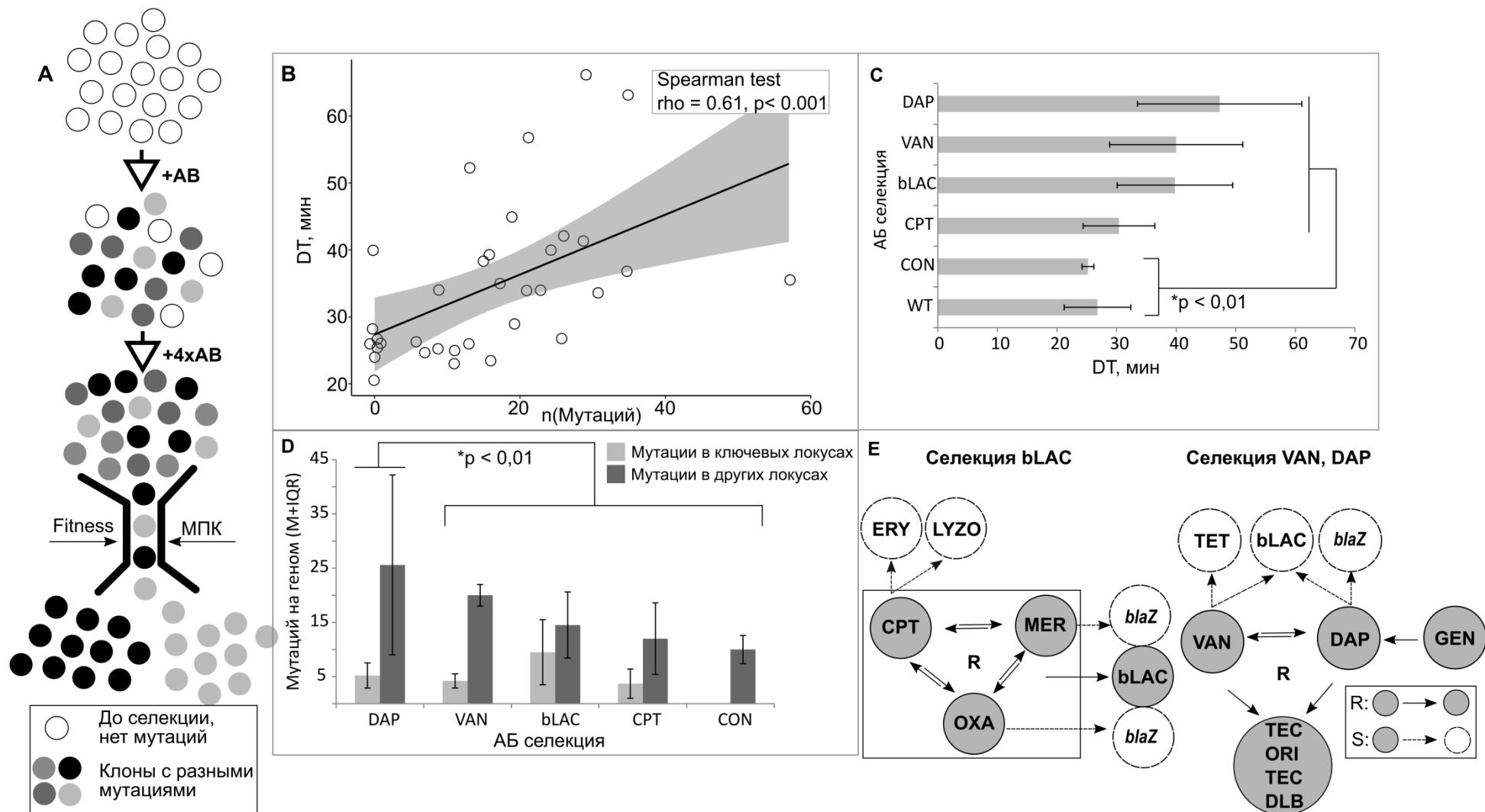
**Селекция под воздействием шоковых концентраций ципрофлоксацина: формирование кросс-толерантности.** К 4-6 циклу воздействия ципрофлоксацином (16 мкг/мл) отмечалось снижение эффекта киллинга с 0,1 – 1% живых клеток (что соответствует  $10^2$  –  $10^3$  КОЕ/мл) до 10 – 100% ( $10^7$  –  $10^8$  КОЕ/мл). После селекции не было отмечено устойчивости к фторхинолонам и не было выявлено мутаций в генах ДНК-гираз (*gyrAB*) и ДНК-топоизомераз (*parCE*). У всех производных штаммов выявлены различные варианты аминокислотных замен (V173D, I162N, F126S, M76K, Y79S, G44D) в пептидил-тРНК-гидролазе (Pth), участвующей в процессе трансляции белка. При оценке кривых в 72-часовых опытах «time – killing» было выявлено увеличение продолжительности времени, необходимого для 99% киллинга клеточной популяции бактерицидными антибиотиками: фторхинолонами, ванкомицином, даптомицином и бета-лактамами. Так, для всех фторхинолонов наблюдалось увеличение уровня MDK<sub>99,99</sub> с 6 – 14 часов до 24 – 38 часов ( $p < 0,01$ ). Увеличение MDK<sub>99,99</sub> с 18 – 24 часов до 38 – 48 часов было отмечено и для ванкомицина ( $p < 0,01$ ). Наибольшей скоростью киллинга среди всех тестируемых антибиотиков характеризовался даптомицин, снижение на 4 – 5

log КОЕ/мл происходило за 3 – 6 часов для штаммов до селекции. После воздействия ципрофлоксацином MDK<sub>99,99</sub> увеличился до 14 – 18 часов ( $p < 0,01$ ). Для оксациллина отмечалось незначительное увеличение MDK<sub>99,99</sub> с 24 – 38 часов до 38 – 48 часов ( $p < 0,05$ ) для штаммов после селекции. Более существенная разница отмечалась для цефтаролина, так MDK<sub>99,99</sub> составляла 9 – 14 и 24 – 38 часов для штаммов до и после селекции, соответственно ( $p < 0,01$ ). Для гентамицина не было выявлено значимого увеличения MDK<sub>99,99</sub>. Изменения в кривых отмирания для перечисленных антибиотиков не оказывало влияния на уровень МПК.

**Влияние шоковых концентраций гентамицина на формирование устойчивости и мелкоколониевых фенотипов.** Выраженный бактерицидный эффект воздействия гентамицином наблюдался только до третьего цикла. С четвертого и последующих циклов не наблюдалось отмирания клеточной биомассы, а количество живых клеток было в диапазоне от 6,6 до 7,2 log КОЕ/мл. Большинство производных штаммов демонстрировали резистентность после селекции с увеличением МПК до 8 – 64 мкг/мл к гентамицину и амикацину. У производного штамма ATCC 29213 после селекции отмечалось увеличение параметра MDK<sub>99,99</sub> гентамицина с 3-х до 14 часов за счет мутации в гене *pth*, при этом МПК не изменялось. Производный штамм SA0937 характеризовался фенотипической диссоциацией с образованием колоний трех видов: мелкоколониевый вариант (SCV) характеризовался наличием мутаций в гене *menA*; колонии нормального размера характеризовались устойчивостью к даптомицину за счет мутации в *tprF*; колонии желтого цвета имели делецию в гене *hepS* (биосинтез менахинона). У большинства гентамицин-устойчивых производных штаммов были выявлены мутации в гене *atpG*, кодирующем белок АТФ-синтазного комплекса.

**Обсуждение результатов работы: траектории эволюции резистентности к антибиотикам у *S. aureus* (Глава 7).** Траектории эволюции устойчивости *S. aureus* имеют разнонаправленный характер. Среди клинических изолятов основных генетических линий (ST8, ST239), а также среди изолятов,

выделенных от носителей (ST22, ST59), формирование устойчивости реализуется за счет мобильных генетических элементов. Формирование мутационного резистома в модельных экспериментах при селекции устойчивости *in vitro* происходило через фенотипическую и генотипическую гетерорезистентность. Гетерорезистентность можно рассматривать как этап формирования резистентности. Гетерорезистентность предполагает наличие в популяции клеток с разными мутациями, появление которых носит случайный характер, определяющий формирование совершенно разных путей устойчивости. В процессе существования такой смешанной популяции невозможно предсказать, какая группа клеток с определёнными мутационными событиями получит доминирование. Узким горлышком, которое является фильтром, будет выступать конкуренция и способность сопротивляться воздействию антибиотика (рис. 5А). Полученные результаты показали наличие зависимости между увеличением количества мутационных событий и увеличением времени удвоения клеток (рис. 5В). В целом наибольшим количеством мутаций, а также существенным снижением скорости роста характеризовались даптомицин-устойчивые штаммы по сравнению с другими производными штаммами, а также с контролем (рис. 5С). Было также выявлено, что вне зависимости от того, на каком антибиотике шла селекция *in vitro*, происходило накопление разных мутаций не только в ключевых генах/локусах-мишениях, на которые действуют антибиотики, но и в генах общего и специализированного метаболизма. Отмечалось, что количество ключевых мутаций было всегда меньше по сравнению с мутациями в других локусах (рис. 5Д). Приобретение устойчивости к одному антибиотику нередко сопровождается приобретением ассоциированной и/или перекрестной устойчивости. В ходе селекции *in vitro* было показано, что устойчивость к ванкомицину ассоциирована с устойчивостью ко всем липогликопептидам и даптомицину (рис. 5Е). Может наблюдаться и другой эффект – потеря какого-то механизма устойчивости (Seesaw Effect).



**Рисунок 5** – Траектории эволюции устойчивости у *S. aureus*. А – Модель формирования множества клонов в популяции под воздействием антибиотиков (AB), клональное разнообразие увеличивается по мере селекции и увеличения действующей концентрацией (4xAB). По мере селекции возрастает биологическая цена сопротивления (Fitness), и в совокупности с воздействием высоких концентраций антибиотиков (МПК) образуется узкое горлышко адаптивной направленной селекции, где остаются только клоны с оптимальным соотношением уровня сопротивления и способностью преодолевать действие антибиотиков. В – анализ корреляции и линейное приближение между количеством уникальных мутационных событий ( $n$ (Мутаций)) и временем удвоения клеток (DT); С – сравнение времени удвоения клеток после селекции на разных антибиотиках; D – сравнение количества уникальных мутационных событий (в ключевых и прочих локусах) в зависимости от селекции на различных антибиотиках. Е – формирование ассоциированной и перекрестной устойчивости, а также восстановление чувствительности после селекции. Обозначения: bLAC – бета-лактамы, ERY – эритромицин, TEC – тейкопланин, ORI – оритаванцин, DAL – далбаванцин, TLV – телаванцин LYZO – лизоцим, WT – исходные штаммы до селекции.

Например, некоторые производные штаммы после селекции теряли плазиды, несущие гены *blaZ* (устойчивость к пенициллину) или *ermC* (устойчивость к эритромицину).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

План исследования включал характеристику доминирующих генетических линий MRSA, циркулирующих на территории РФ, с оценкой особенностей устойчивости к различным антибиотикам. Для более детального описания механизмов устойчивости, моделирования и прогнозирования рисков формирования резистентности был использован эксперимент по адаптивной эволюции устойчивости с оценкой направленности (траекторий) мутационных событий (эволюции). Были использованы две стратегии селекции устойчивости *in vitro*. Первая стратегия заключалась в культивировании *S. aureus* при постоянно увеличивающихся концентрациях антибиотиков: бета-лактамов, ванкомицина и даптомицина. Эти антибиотики являются препаратами выбора при лечении инфекций, вызываемых стафилококками, включая MRSA, что аргументирует их включение в исследование. Вторая стратегия – циклическое воздействие шоковыми концентрациями ванкомицина, ципрофлоксацина и гентамицина. Используемые концентрации антибиотиков были близки к

пиковым сывороточным концентрациям при использовании стандартных схем антибактериальной терапии данными препаратами. Таким образом, этот подход частично моделирует фармакодинамику данных антибиотиков.

Популяционная структура MRSA в России отличается от других географических регионов на нашей планете. На территории России длительный период времени циркулирует две основные генетические линии НА-MRSA: ST8 и ST239. Среди CA-MRSA в России доминирует «Газа клон» ST22. Проблема CA-MRSA в России практически не изучена. В настоящем исследовании были исследованы MRSA, выделенные от условно-здоровых носителей, не связанных с системой здравоохранения (амбулаторный визит и пребывание в стационаре менее 48 ч), что позволяет в полной мере отнести данные изолятам с эпидемиологической точки зрения к CA-MRSA. Следует отметить, что CA-MRSA были получены при скрининге на носительство *S. aureus* среди большого числа участников из двух мегаполисов Москвы и Санкт-Петербурга и представлены детской и взрослой популяциями. Уровень носительства как *S. aureus*, так и MRSA оказался сопоставим с результатами аналогичных исследований, проводимых в других странах. В работе было выявлено, что НА-MRSA и CA-MRSA различаются по чувствительности к антибиотикам, профилям резистентности. Наиболее устойчивые генетические линии представлены клонами ST239 и ST228, при этом снижение чувствительности к ванкомицину отмечалось среди ST8. Использование филогенетического анализа с оценкой времени дивергенции и Байесовской кластеризации с включением геномов изолятов, собранных за десятилетний период 2011 – 2022 гг. (единичные изоляты были собраны с 1998 – 2008 гг.) позволило построить модель эволюции НА-MRSA-ST8 на территории России. Установлена циркуляция трех кластеров клонов, входящих в состав генетической линии ST8, которые имеют общего предка с европейскими клонами ST8. Начало дивергенции европейской и российской клад приходится на 1930-е годы, что позволяет сделать вывод об импорте этой линии с территории Европы. Также установлено, что циркулирующие MSSA относятся

к другому кластеру и формируют отдельные субклоны, что исключает гипотезу самостоятельного формирования российского кластера стафилококков через приобретение *SCCmec* IVc циркулирующими MSSA. Геном НА-MRSA-ST8 характеризуется выраженной стабильностью, несмотря на длительность циркуляции. Уровень ассоциированной устойчивости НА-MRSA к антибиотикам разных групп остается высоким, но к таким препаратам как оксазолидиноны, даптомицин, тигециклин, липогликопептиды устойчивость не выявлена. Среди CA-MRSA в России доминирует «Газа клон» ST22, впервые описанный на территории Палестины. «Газа клон» формирует отдельный кластер ST22, который не связан с эпидемическим клоном EMRSA-15 и характеризуется наличием токсина TSST. Как уже подчеркивалось ранее, «Газа клон» ST22 может являться резервуаром для старта будущего клонального сдвига, что требует слежения за распространением и эволюцией данной генетической линии. Другой представитель CA-MRSA – ST59, относится к Восточно-Азиатской сублинии ST59 и ранее не описывался на территории России. Наличие уникальных генетических маркеров свидетельствует о самостоятельной эволюции MRSA-ST59. В целом, для CA-MRSA был характерен высокий уровень чувствительности (36% изолятов) к не беталактамным антибиотикам, а также среди этой группы были выявлены OS-MRSA фенотипы, проявляющие ложную чувствительность к оксациллину. Такой фенотип связан с мутациями в промоторной области гена *mecA* и гетерорезистентностью.

Основные результаты, полученные при селекции устойчивости *in vitro*, были следующие. Во-первых, при селекции появлялась ассоциированная и перекрестная устойчивость, что лежит в основе концепции «параллельного ущерба», при котором на фоне появления устойчивости к одному препарату происходит формирование устойчивости и к другим антибиотикам (формирование множественной устойчивости). Во-вторых, мутационные события, идентифицированные у мутантов после селекции, затрагивают не только ключевые гены, но и другие системы клетки. Данное наблюдение лежит

в основе появляющейся в настоящее время концепции о формировании устойчивости к антибиотикам у прокариот посредством различных стратегий, например, под влиянием изменения работы генерального метаболизма, что было продемонстрировано в экспериментальной работе Lopatkin и соавт. В-третьих, устойчивость формируется через гетерорезистентность и толерантность, что находит подтверждение в работах группы Balaban и соавт. (2014 – 2021). Для изучения гетерорезистентности в диссертационной работе было использовано два методологических подхода: это определение фенотипической гетерорезистентности с использованием РАР-анализа и геномного секвенирования с анализом глубины мутационных событий, то есть с определением количественной аллельной представленности той или иной мутации. Для этого использовался термин «гетеромутация» применительно к прокариотам. Выявлено, что формирование мутаций происходит не сразу во всей популяции микроорганизма (как считается в классической модели формирования устойчивости), а начинается с появления множества минорных мутаций. Гетеромутации можно было бы принять за артефакты секвенирования, однако, во-первых, они возникают в целевых генах. Во-вторых, многие мутации переходят в гомомутации, то есть при дальнейшей селекции закрепляются во всей популяции. В-третьих, у контрольных штаммов (селекция на среде без антибиотика) обнаруживается гораздо меньшее число гетеромутаций, и они носят хаотичный характер.

Выявлено, что мутации в гене *gdpP* связаны с повышением МПК к беталактамным антибиотикам с появлением фенотипической гетерогенности. Мутации в *gdpP* влияют на изменение экспрессии пенициллинсвязывающих белков, что может рассматриваться как одна из гипотез причин появления устойчивости через внутриклеточное повышение молекул c-di-AMP. Мутации в пептидил-тРНК-гидролазе (*pth*) способствуют формированию универсальной толерантности к широкому кругу бактерицидных антибиотиков. Триггерным механизмом формирования антибиотикотolerантности у *S. aureus* является воздействие фторхинолонами. Для экстраполяции полученных результатов на

влияние толерантности при использовании стандартных схем дозирования на клинические исходы необходимо проведение экспериментов в динамических системах, моделирующих фармакокинетику и фармакодинамику бактерицидных антибиотиков. Данное направление является заделом для дальнейшего изучения феномена антибиотикотолерантности у клинически значимых бактерий. В свою очередь формирование устойчивости к гентамицину происходит через формирование SCV фенотипов с мутациями в генах метаболизма менахинона и электрон-транспортной цепи. При этом формирование устойчивости под действием гентамицина происходит достаточно быстро. Формирование фенотипов толерантности и устойчивости проходит через генотипическую и фенотипическую гетерогенность.

## **ВЫВОДЫ**

1. Для внутрибольничных и внебольничных изолятов характерна различная клonalная структура, среди НА-MRSA доминировали ST8 и ST239, среди СА-MRSA – ST22, ST8 и ST59. Для ST239 характерна более выраженная ассоциированная устойчивость, в то время как среди ST8 выше частота встречаемости сниженной чувствительности к гликопептидам. СА-MRSA изоляты характеризовались высоким уровнем чувствительности к не беталактамным антибиотикам. Среди НА-MRSA и СА-MRSA не было выявлено устойчивости к линезолиду, тигециклину и липогликопептидным антибиотикам.
2. Генетическая линия *S. aureus* ST8 на территории России представлена тремя кластерами геномов, имеющими общего гипотетического предшественника с геномами изолятов, циркулирующих в Европе (Германия). Расчетный временной период дивергенции европейской и российской клад датируется 1930–ми годами. Наличие множества субкластеров генетической линии ST239, без четкого выделения Российских геномов, свидетельствует о высоком клonalном обмене или многократном импорте. Расчетное время появления локальных уникальных вариантов ST239<sub>Kras</sub> и *hla/hly*-отрицательных ST239 датируется 1960–1970-ми годами. Доминирующая Российская

генетическая линия CA-MRSA-ST22 относится к кластеру «Газа клона», отличительная черта которого – наличие генов, кодирующих токсин TSST. Российские изоляты CA-MRSA-ST59 относятся к Восточно-Азиатской сублинии ST59.

3. Ассоциированная устойчивость доминирующих генетических линий к антибиотикам разных классов реализуется за счет мобильных генетических элементов. Для ST228 и ST239 характерна высокая частота встречаемости сниженной чувствительности к цефтаролину за счет наличия мутаций в гене *tesA*. Сниженная чувствительность к ванкомицину у изолятов ST8 связана с различными мутациями в генах биосинтеза клеточной стенки. Для 26% CA-MRSA характерен фенотип ложной чувствительности к оксациллину (OS-MRSA) за счет мутаций в гене *tesA* и его промоторе, что приводит к сниженной экспрессии. OS-MRSA быстро трансформируются в MRSA с высоким уровнем устойчивости к бета-лактамам за счет формирования мутаций в генах ядерного генома (*relA*, *eno*, *pyk*, *gmk* и *prsA*), влияющих на чувствительность к бета-лактамам (auxiliary factors).

4. Получены серии производных штаммов MRSA и MSSA, устойчивых к ванкомицину (МПК 4 – 8 мкг/мл), даптомицину (32 – 128 мкг/мл), цефтаролину (32 – 128 мкг/мл), оксациллину (32 – 256 мкг/мл), меропенему (8 – 16 мкг/мл). Накопление мутаций коррелирует со снижением скорости роста. Наиболее выраженные изменения в характере роста наблюдаются при формировании устойчивости к даптомицину. Ванкомицин и даптомицин, в отличие от бета-лактамных антибиотиков, приводят к устойчивости к индуцированному аутолизису. Мутации в *gdpP*, *pbp4* и его промоторе являются основными причинами перекрестной устойчивости у MRSA и MSSA ко всем бета-лактамным антибиотикам, включая цефтаролин. У MSSA при селекции на бета-лактамах формируются мутации и в пенициллинсвязывающих белках (*pbp1*, *pbp2*, *pbp3*). При селекции на ванкомицине формируются мутации в регуляторных генах, ответственных за биосинтез клеточной стенки (*walK*, *yucH*, *yucI*, *rpoB*), которые приводят к появлению устойчивости к ванкомицину,

липогликопептидам и даптомицину. При селекции на даптомицине формируются мутации в системах биосинтеза мембранных фосфолипидов (*mprF*, *cls2*, *pgsA*) и путях метаболизма глицерола (*fabF*, *glp*), приводящие к устойчивости к даптомицину, ванкомицину и липогликопептидам.

5. Воздействие шоковыми концентрациями ванкомицина приводит к формированию мутаций в *walK*, что опосредует появление гетерорезистентности и снижение чувствительности к даптомицину. Под воздействием шоковых концентраций цiproфлоксацина происходит формирование кросс-толерантности к бактерицидным антибиотикам разных групп (фторхинолонов, бета-лактамов, даптомицина и ванкомицина) без изменения уровня МПК. Кросс-толерантность обусловлена мутациями в пептидил-тРНК-гидролазе (*pth*). Воздействие гентамицином способствует быстрому появлению устойчивости к аминогликозидам (МПК 32 – 128 мкг/мл), фенотипической диссоциации и формированию SCV. Устойчивость к аминогликозидам обуславливается мутациями в генах электрон-транспортной цепи (*atpG*) и биосинтеза менахинона (*menA*). Воздействие шоковыми концентрациями не приводит к снижению скорости роста.

6. Формирование устойчивости (гоморезистентности) проходит через этап мультиклонального формирования различных мутаций в популяции, что приводит к появлению «смешанной культуры», клетки которой проявляют разный уровень чувствительности и устойчивости к антибиотикам. В процессе продолжительного воздействия антибиотиками одни клоны остаются в популяции, другие элиминируют. Направление мутационного процесса случайно, однако результат этого процесса всегда один – формирование устойчивости. Толерантность связана с увеличением времени, необходимого для эффективного киллинга 99% клеточной популяции, и является первичным этапом формирования резистентности.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для оценки чувствительности *S. aureus* к бета-лактамным антибиотикам рекомендуется проводить ПЦР на наличие *mec* генов и оценивать чувствительность к цефокситину. В случае неудовлетворительной терапии ванкомицином, даптомицином, бета-лактамами и при выделении клинических изолятов *S. aureus* с чувствительностью к данным антибиотикам необходимо использование РАР-анализа или проведение оценки кинетики отмирания для выявления возможной гетерорезистентности или толерантности. На фоне терапии ванкомицином при выявлении снижения чувствительности к данному антибиотику у клинических изолятов не целесообразно использовать в качестве альтернативы даптомицин или липогликопептиды.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Гостев, В. В. Антибиотикорезистентность метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus*, циркулирующих в Российской Федерации / В. В. Гостев, О. С. Калиногорская, Л. Н. Попенко, Т. В. Черненькая, З. С. Науменко, Т. М. Ворошилова, Ю. А. Захарова, О. Е. Хохлова, А. Н. Круглов, М. Г. Ершова, И. В. Молчанова, С. В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. – 2015. – Т. 60, № 1-2. – С. 3-9.
2. Гостев, В. В. Влияние шоковых концентраций ванкомицина на формирование гетерорезистентности у *Staphylococcus aureus* / В. В. Гостев, Ю. В. Сопова, О. С. Калиногорская, М. Е. Велижанина, И. В. Лазарева, П. С. Старкова, С. В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. – 2020. – Т. 65, № 9-10. – С. 3-7.
3. Гостев, В. В. Влияние шоковых концентраций гентамицина на формирование устойчивости и мелкоколониевых фенотипов у *Staphylococcus aureus* / В. В. Гостев, О. С. Калиногорская, О. С. Сулян, П. С. Чулкова, Ю. В. Сопова, М. Е. Велижанина, В. Ю. Плешков, В. А. Агеевец, С. В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. – 2023. – Т. 68, № 9-10. – С. 25-33.
4. Гостев, В. В. Геномная характеристика *mecA*-положительных *Staphylococcus aureus* ST59, проявляющих чувствительность к оксациллину / В. В. Гостев, О. С. Сулян, П. А. Павлова, Е. В. Нестерова, О. С. Калиногорская, П. С. Чулкова, Н. Н. Трофимова, В. А. Агеевец, И. В. Агеевец, С. В. Сидоренко // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2023. – Т. 25, № 2. – С. 116-122.

5. Гостев, В. В. Гетерорезистентность: клиническое значение и методы выявления (обзор литературы) / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко // Клиническая лабораторная диагностика. – 2023. – Т. 68, № 7. – С. 418-427.
6. Гостев, В. В. Метициллинрезистентные золотистые стафилококки: проблема распространения в мире и России / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко // Фарматека. – 2015. – Т. 299, № 6. – С. 30-38.
7. Гостев, В. В. Молекулярные механизмы снижения чувствительностью к цефтаролину метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* / В. В. Гостев, О. С. Калиногорская, О. А. Дмитренко, И. А. Цветкова, С. В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. – 2016. – Т. 61, № 9-10. – С. 17-21.
8. Гостев, В. В. Полиморфизм генов, участвующих в сборке клеточной стенки у метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* со сниженной чувствительностью к ванкомицину / В. В. Гостев, О. С. Калиногорская, С. М. Юдин, О. А. Дмитренко, А. В. Кудрявцева, С. В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. – 2018. – Т. 63, № 7-8. – С. 11-16.
9. Гостев, В. В. Селекция устойчивости к даптомицину метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*: роль гомо- и гетеро-мутаций / В. В. Гостев, Ю. В. Сопова, О. С. Калиногорская, И. А. Цветкова, С. В. Сидоренко // Генетика. – 2020. – Т. 56, № 3. – С. 282-291.
10. Гостев, В. В. Современные представления об устойчивости *Staphylococcus aureus* к бета-лактамным антибиотикам / В. В. Гостев, О. Е. Пунченко, С. В. Сидоренко // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2021. – Т. 23, № 4. – С. 375-387.
11. Гостев, В. В. Сравнительная активность липогликопептидных антибиотиков в отношении грамположительных бактерий / В. В. Гостев, О. С. Сулян, О. С. Калиногорская, Л. Н. Попенко, А. Н. Круглов, С. А. Гордеева, Е. В. Нестерова, Д. П. Гладин, Н. Н. Трофимова, П. С. Чулкова, И. В. Агеевец, В. А. Агеевец, Т. В. Черненькая // Антибиотики и химиотерапия. – 2022. – Т. 67, № 9-10. – С. 18-24.
12. Козлов, Р. С. Чувствительность основных возбудителей бактериальных инфекций к цефтаролину в Российской Федерации / Р. С. Козлов, М. В. Сухорукова, С. В. Сидоренко, М. В. Эйдельштейн, Е. Ю. Склепенова, Н. В. Иванчик, А. В. Микотина, В. В. Гостев, И. В. Лазарева, О. С. Калиногорская, М. О. Волкова, А. В. Дехнич // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2015. – Т. 17, № 3. – С. 217-226.
13. Сопова, Ю. В. Влияние делеции в некаталитическом домене GdpP на фенотип *Staphylococcus aureus* посредством направленного геномного редактирования с помощью

- системы CRISPR/Cas9 / Ю. В. Сопова, М. Е. Велижанина, Д. А. Кандина, **В. В. Гостев**, П. С. Чулкова, О. С. Сулян, С. В. Сидоренко // Генетика. – 2023. – Т. 59, № 9. – С. 1094-1098.
14. Сопова, Ю. В. Динамика протеома антибиотикорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* при воздействии субингибирующих концентраций бета-лактамных антибиотиков / Ю. В. Сопова, **В. В. Гостев**, А. Н. Лыхолай, О. С. Калиногорская, С. В. Сидоренко // Экологическая генетика. – 2018. – Т. 16, № 2. – С. 4-10.
  15. Хохлова, О. Е. Микробиологический мониторинг гнойных осложнений у ожоговых больных и молекулярно-генетические особенности метициллинорезистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA) / О. Е. Хохлова, О. В. Перьянова, И. В. Владимиров, В. А. Мацкевич, Н. К. Поткина, Д. Н. Капшук, Л. Н. Копытко, **В. В. Гостев**, С. В. Сидоренко, Я. Ивао, Т. Ямamoto // Антибиотики и химиотерапия. – 2017. – Т. 62, № 9-10. – С. 27-33.
  16. **Gostev, V.** Adaptive Laboratory Evolution of *Staphylococcus aureus* Resistance to Vancomycin and Daptomycin: Mutation Patterns and Cross-Resistance / V. Gostev, O. Kalinogorskaya, J. Sopova, O. Sulian, P. Chulkova, M. Velizhanina, I. Tsvetkova, I. Ageevets, V. Ageevets, S. Sidorenko // Antibiotics (Basel). – 2023. – V. 12, № 5.
  17. **Gostev, V.** Characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to ceftaroline collected in Russia during 2010-2014 / V. Gostev, O. Kalinogorskaya, A. Kruglov, Y. Lobzin, S. Sidorenko // J Glob Antimicrob Resist. – 2018. – V. 12. – P. 21-23.
  18. **Gostev, V.** Comparative genome analysis of global and Russian strains of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST22, a 'Gaza clone' / V. Gostev, K. Ivanova, A. Kruglov, O. Kalinogorskaya, I. Ryabchenko, S. Zyryanov, E. Kalisnikova, D. Likholetova, Y. Lobzin, S. Sidorenko // Int J Antimicrob Agents. – 2021. – V. 57, № 2. – P. 106264.
  19. **Gostev, V.** In Vitro Ceftaroline Resistance Selection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Involves Different Genetic Pathways / V. Gostev, J. Sopova, O. Kalinogorskaya, I. Tsvetkova, Y. Lobzin, S. Klotschenko, S. Sidorenko // Microb Drug Resist. – 2019. – V. 25, № 10. – P. 1401-1409.
  20. **Gostev, V.** In Vitro Selection of High-Level Beta-Lactam Resistance in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* / V. Gostev, O. Kalinogorskaya, K. Ivanova, E. Kalisnikova, I. Lazareva, P. Starkova, S. Sidorenko // Antibiotics (Basel). – 2021. – V. 10, № 6.
  21. **Gostev, V.** Molecular epidemiology and antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Russian Federation / V. Gostev, A. Kruglov, O. Kalinogorskaya, O. Dmitrenko, O. Khokhlova, T. Yamamoto, Y. Lobzin, I. Ryabchenko, S. Sidorenko // Infection, Genetics and Evolution. – 2017. – V. 53. – P. 189-194.
  22. **Gostev, V.** Phenotypic and genomic characteristics of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*, rapid selection of high-level resistance to beta-lactams / V. Gostev, K.

Sabinova, J. Sopova, O. Kalinogorskaya, O. Sulian, P. Chulkova, M. Velizhanina, P. Pavlova, L. Danilov, L. Kraeva, D. Polev, E. Martens, S. Sidorenko // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2023. – V. 42, № 9. – P. 1125-1133.

23. Monecke, S. Molecular Typing of ST239-MRSA-III From Diverse Geographic Locations and the Evolution of the SCCmec III Element During Its Intercontinental Spread / S. Monecke, P. Slickers, D. Gawlik, E. Muller, A. Reissig, A. Ruppelt-Lorz, P. E. Akpaka, D. Bandt, M. Bes, S. S. Boswihi, D. C. Coleman, G. W. Coombs, O. S. Dorneanu, **V. V. Gostev**, M. Ip, B. Jamil, L. Jatzwauk, M. Narvaez, R. Roberts, A. Senok, A. C. Shore, S. V. Sidorenko, L. Skakni, A. M. Somily, M. A. Syed, A. Thurmer, E. E. Udo, T. Vremera, J. Zurita, R. Ehricht // Front Microbiol. – 2018. – V. 9. – P. 1436.

24. Wan T.-W. Complete Circular Genome Sequence Of Successful ST8/SCCmec IV Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (OC8) In Russia: One-Megabase Genomic Inversion, IS256's Spread, And Evolution Of Russia ST8-IV / T.-W. Wan, O.E. Khokhlova, Y. Iwao, W. Higuchi, W. C. Hung, I. V. Reva, O. A. Singur, **V. V. Gostev**, S. V. Sidorenko, O. V. Peryanova, A. B. Salmina, G. V. Reva, L. J. Teng, T. Yamamoto // PLOS One. – 2017. – V. 11, № 10. – P. 164168.

## **ПАТЕНТЫ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Пат. РФ 2798788 МПК51 C12N 1/20, C12R 1/445 Штамм метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA), характеризующийся устойчивостью к цефтаролину и используемый в качестве контрольной тест-культуры для определения чувствительности к бета-лактамным антибиотикам (варианты) / **Гостев В.В.**, Калиногорская О.С., Сопова Ю.В., Велижанина М.Е., Цветкова И.А., Сидоренко С.В.; заяв. и патентообр. ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России – № 2022122669; заявл. 22.08.2022; опубл. 27.06.23, Бюл. № 18. – 14 с.

2. Пат. РФ 2802895 МПК51 C12N 1/20, C12R 1/445 Штаммы *Staphylococcus aureus* (MSSA), характеризующиеся тес-независимыми механизмами устойчивости к бета-лактамам и используемые в качестве контрольных тест-культур для определения чувствительности к бета-лактамным антибиотикам / **Гостев В.В.**, Калиногорская О.С., Сопова Ю.В., Велижанина М.Е., Агеевец И.В., Агеевец В.А., Сидоренко С.В.; заяв. и патентообр. ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России – № 2022120909; заявл. 29.07.2022; опубл. 05.09.2023, Бюл. № 25. – 11 с.

3. Пат. РФ 2802896 МПК51 C12N 1/20, C12R 1/445 Штаммы *Staphylococcus aureus*, характеризующиеся устойчивостью к ванкомицину и используемые в качестве контрольных тест-культур для определения чувствительности к гликопептидным антибиотикам / **Гостев В.В.**, Калиногорская О.С., Сопова Ю.В., Велижанина М.Е., Сидоренко С.В.; заяв. и

патентообр. ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России – № 2022122329; заявл. 16.08.2022; опубл. 05.09.2023, Бюл. № 25. – 12 с.

4. Пат. РФ 2809847 МПК51 C12N 1/20, C12Q 1/02, C12R 1/445 Штамм *Staphylococcus aureus*, характеризующийся устойчивостью к даптомицину и используемый в качестве контрольной тест-культуры для определения чувствительности к антибиотикам / Гостев В.В., Калиногорская О.С., Сопова Ю.В., Велижанина М.Е., Сидоренко С.В.; заяв. и патентообр. ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России – № 2022122330; заявл. 16.08.2022; опубл. 19.12.2023, Бюл. № 35. – 12 с.

5. Пат. РФ 2809538 МПК51 C12N 1/20, C12Q 1/02, C12R 1/445 Штамм *Staphylococcus aureus* A9, характеризующийся толерантностью к ципрофлоксацину и используемый в качестве контрольной тест-культуры для определения чувствительности к антибиотикам / Гостев В.В., Калиногорская О.С., Сулян О.С., Чулкова П.С., Сопова Ю.В., Велижанина М.Е., Сидоренко С.В.; заяв. и патентообр. ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России – № 2022122666; заявл. 22.08.2022; опубл. 12.12.2023, Бюл. № 35. – 13 с.

## **ОСНОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ**

**ДДМ** – Диско-диффузионный метод

**КОЕ** – Колониеобразующие единицы

**МПК** – Минимальная подавляющая концентрация

**AUC** – Площадь под кривой, у.е.

**CA-MRSA** – Внебольничные MRSA

**CC** – Клональный комплекс

**CIP** – Ципрофлоксацин

**CON** – Контрольные штаммы, которые пассивировались на среде без антибиотиков

**core-SNP** – Однонуклеотидные мутации основного (ядерного) генома

**CPT** – Цефтарицин

**DAP** – Даптомицин

**GEN** – Гентамицин

**HA-MRSA** – Внутрибольничные MRSA

**MDK<sub>99,99</sub>** – Минимальный период

времени, необходимый для киллинга 99,99% клеточной популяции

**MER** – Меропенем

**M-IQR** – Медиана и межквартильный интервал

**MLST** – Мультилокусное сиквенс-типирирование

**MRSA** – Метициллин-резистентные *S. aureus*

**MSSA** – Метициллин-чувствительные *S. aureus*

**OS-MRSA** – Оксациллин-чувствительные MRSA

**OXA** – Оксациллин

**PAP** – Популяционный анализ

**PP** – Апостериорная вероятность

**ST** – Сиквенс-тип

**VAN** – Ванкомицин