

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 64.1.002.01,
СОЗДАННОГО 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 ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 24.05.2024 г. № 4
о присуждении Гостеву Владимиру Валерьевичу, гражданину Российской
Федерации, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Популяционная структура *Staphylococcus aureus* и траектории эволюции устойчивости к антимикробным препаратам» по специальности 1.5.11. Микробиология принята к защите 22.02.2024 г., протокол № 3, диссертационным советом 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, 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24, приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Гостев Владимир Валерьевич, 1985 г. рождения, диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Фенотипическая и генотипическая характеристика метициллинрезистентных представителей вида *Staphylococcus aureus*» защитил в 2013 г. в диссертационном совете Д 208.130.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва; работает старшим научным сотрудником в научно-исследовательском отделе медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический

центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт Петербург.

Диссертация выполнена в научно-исследовательском отделе медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт Петербург.

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,

дали положительные отзывы на диссертацию.

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, в своем положительном заключении, подписанном доктором медицинских наук Подколзиным Александром Тихоновичем, заместителем директора по эпидемиологии, указал, что диссертационная работа Гостева Владимира Валерьевича является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержатся подходы для решения актуальной научно-практической проблемы, связанной с молекулярно-генетической характеристикой штаммов *S. aureus*, циркулирующих на территории Российской Федерации. Внедрение молекулярных и геномных подходов для типирования клинических изолятов *S. aureus* вносит существенный вклад в развитие системы здравоохранения страны. Расшифровка механизмов резистентности и моделирование мутационных резистомов *S. aureus* также носят важное фундаментальное значение. Представленные на защиту положения диссертации можно квалифицировать как научное достижение в современной микробиологии. По актуальности, научной новизне, методическому уровню, практической значимости, диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., с изменениями, опубликованными в Постановлениях Правительства РФ от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539, от 26.09.2022 г. № 1690, от 26.01.2023 г. № 101, от 18.03.2023 г. № 415, от 26.10.2023 г. № 1768, от 25.01.2024 г. № 62, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Гостев Владимир Валерьевич, заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Соискатель имеет **85** опубликованных работ, в том числе по теме диссертации **32** работы, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано **24** работы, **5** патентов Российской Федерации и **8** работ в других изданиях. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах.

Наиболее значимые научные работы 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. **(ВАК), цит.: 16.**
2. **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. **(WoS, Scopus Q1), цит.: 1.**
3. 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 // Frontiers in Microbiology. – 2018. – V. 9. – P. 1436. **(WoS, Scopus Q1), цит.: 56.**
4. **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 // Journal of Global Antimicrobial Resistance. – 2018. – V. 12. – P. 21-23. **(WoS, Scopus Q2), цит.: 4.**
5. **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. Klotchenko, S. Sidorenko // Microbial Drug Resistance. – 2019. – V. 25, № 10. – P. 1401-1409. **(WoS, Scopus Q1), цит.: 9.**
6. **Гостев, В. В.** Селекция устойчивости к даптомицину метициллинрезистентного *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. **(WoS, Scopus Q4), цит.: 4.**

7. **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 // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2021. – V. 57, № 2. – P. 106264. (**WoS, Scopus Q1**), **цит.: 11.**

8. **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. (**WoS, Scopus Q1**), **цит.: 5.**

9. **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. (**Scopus Q4**), **цит. 0.**

10. **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. (**WoS, Scopus Q1**), **цит.: 1.**

11. **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 // European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2023. – V. 42, № 9. – P. 1125-1133. (**WoS, Scopus Q1**), **цит.: 0.**

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

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

На диссертацию и автореферат поступило **8** положительных отзывов без замечаний от:

(1) д-ра мед. наук, доцента **Исаевой Гузель Шавхатовны**, заместителя директора по инновационному развитию Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань; (2) д-ра мед. наук **Гончарова Артемия Евгеньевича**, заведующего лабораторией функциональной геномики и протеомики Института экспериментальной медицины Минобрнауки РФ, г. Санкт-Петербург; (3) д-ра мед. наук, профессора **Королюка Александра Михайловича**, лауреата Государственной премии СССР, профессора кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета Минздрава РФ, г. Санкт-Петербург; (4) д-ра мед. наук **Азизова Ильи Сулеймановича**, старшего научного сотрудника Научно-исследовательского института антимикробной химиотерапии Смоленского государственного медицинского университета Минздрава РФ, г. Смоленск; (5) д-ра мед. наук, профессора РАН **Попова Дмитрия Александровича**, заведующего микробиологической (бактериологической) лабораторией Национального медицинского исследовательского центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева Минздрава РФ, г. Москва; (6) д-ра биол. наук, доцента **Садыковой Веры Сергеевны**, заведующей отделом микробиологии Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе Минобрнауки РФ, г. Москва; (7) д-ра мед. наук, профессора **Клясовой Галины Александровны**, заведующей отделом микробиологии и антимикробной терапии Национального медицинского исследовательского центра гематологии Минздрава РФ, г. Москва; (8) д-ра мед. наук, профессора **Тапальского Дмитрия Викторовича**, директора Института физиологии Национальной академии наук Беларуси, г. Минск.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что:

доктор биологических наук **Ермолаева Светлана Александровна** является авторитетным специалистом по изучению патогенности, вирулентности, резистентности и молекулярной эпидемиологии возбудителей сапронозных инфекций, и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей докторской диссертации Гостева В.В. (**Sci Rep.** – 2023. – Vol. 13, N 1. – P. 4315; 2022. – Vol. 12, N 1. – P. 614; **Клин Микробиол Антимикроб Химиотер.** – 2022. – Vol. 24, N 2. – P. 156-164; **Int J Mol Sci.** – 2022. – Vol. 23, N 1. – P. 524; 2022. – Vol. 23, N 3. – P. 1837; 2021. – Vol. 22, N 18. – P. 9776; **Front Microbiol.** – 2022. – Vol. 13. – P. 825076; **Antibiotics.** – 2021. – Vol. 11, N 1. – P. 1; 2022. – Vol. 11, N 5. – P. 648; 2021. – Vol. 10, N 10. – P. 1206; **Foods.** – 2021. – Vol. 10, N 11. – P. 2790; **Appl Environ Microbiol.** – 2020. – Vol. 86, N 18. – P. e01074-20; **Drug Devel Res.** – 2021. – Vol. 82, N 1. – P. 123-132; **Front Cell Inf Microbiol.** – 2020. – Vol. 10. – P. 582803; **Pathogens.** – 2020. – Vol. 9, N 11. – P. 867);

доктор медицинских наук **Чеботарь Игорь Викторович** является признанным специалистом в области изучения молекулярной эпидемиологии, молекулярных механизмов резистентности к антибиотикам, проблем биопленкообразования у актуальных грамотрицательных патогенов и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей докторской диссертации Гостева В.В. (**Diagn Microbiol Infect Dis.** – 2024. – V. 108, N 2. – P. 116102; **Heliyon.** – 2023. - V. 9. – P. e16618; **Клин Микробиол Антимикроб Химиотер.** – 2023. – Т. 25, №2. – С. 187-201; 2022. – Т. 24. №1. – С. 4-13; 2020. – Т. 22. №1. – С. 4-19; **Microbiol Spectr.** – 2022. - V. 10, N 3. – P. e0049422; **Microbial Path.** – 2021. – V. 155. – P. 104901; **Diagn Microbiol Inf Dis.** – 2021. – V. 102, N 3. – P. 115596; **Клин Лаб Диагн.** – 2021. – Т. 66, № 10. – С. 629-634; **Журн Микробиол Эпидемиол Иммунобиол.** – 2021. – Т. 98, № 6. – С. 721-730; **Int J Antimicrob Agents.** – 2020. – V. 55, № 4. – P. 105899; **J Glob Antimicrob Resist.** – 2019. – V. 17. – P. 309-311);

доктор биологических наук **Мокроусов Игорь Владиславович** является международно признанным экспертом по изучению популяционной структуры и механизмов резистентности *Mycobacterium tuberculosis* к антимикробным

препаратам и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей докторской диссертации Гостева В.В. (**PLoS One.** – 2022. – V. 17, N 5. – P. e0266837; **Microorganisms.** – 2023. – V. 11, N 2 - P. 1-15; **Pharmaceuticals (Basel).** – 2022. – V. 15, N 9. - P. 1136; **Microbiol Spectr.** – 2023. – V. 11, N 5. – P. e0139223; **Antibiotics (Basel).** – 2020. – V. 9, N 10. - P. 669; **Diagnostics (Basel).** – 2023. – V. 13, N 4. - P. 771; **Int J Mol Sci.** – 2023. – V. 24, N 12. - P. 10302; **BMC Infect Dis.** – 2023. – V. 23, N 1. – P. 426; **Инф Иммуно.** – 2023. - Т. 13, № 1. – С. 91-99; **Мол Генет Микробиол Вирусол.** – 2022. - Т.40, № 2. – С. 21-27).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области изучения эпидемиологии и анализа популяционных структур циркулирующих клинически важных патогенов, вызывающих инфекционные заболевания человека, включая инфекции связанные с оказанием медицинской помощи, и наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей докторской диссертации Гостева В.В. (**Эпидемиол Вакцинопрофилактик.** – 2023. - Т.22, № 4. – С. 44-48; 2023. - Т.22, №6. – С. 108-123; 2021. - Т. 20, №1. – С. 44-50; **Эпидемиол Инф Бол Актуал Вопр.** – 2023. - Т.13, №2. – С. 28-33; 2023. - Т.13, № 2. – С. 56-62; 2023. - Т. 13, №2. - С. 76-82; 2021. - Т.11, № 1. – С. 48-51; **Genome Med.** – 2023. - Vol. 15, N 9. - P. 1-17; **Инф Бол Новости Мнения Обучение.** – 2023. - Т. 12, № 1(44). – С. 62-68; **Microorganisms.** – 2023. - Vol. 11, N 2. – P. 347; 2023. - Vol. 11, N 5. – P. 1314; 2023. - Vol. 11, N 8. – P. 2115; **Foods.** – 2022. - Vol. 11, N 17. - P. 2574; **Antibiotics.** – 2022. - Vol. 11, N 3. - P. 346;), а также наличием специалистов, экспертов в данной области исследований.

Диссертационный совет отмечает, что, на основании выполненных соискателем исследований:

разработаны методические основы анализа гетерорезистентных популяций *S. aureus* с целью поиска и аннотации геномных мутаций на основе данных полногеномного секвенирования с целью выявления гетерорезистентности к антибиотикам различных классов; методы получения антибиотикотолерантных штаммов, которые важны для практического

использования в качестве контроля для выявления снижения скорости отмирания бактериальных культур под воздействием бактерицидных антибиотиков;

предложены впервые эволюционные модели, объясняющие появление клонов ST8 и ST239 на территории Российской Федерации и предполагающие формирование метициллинрезистентных *S. aureus* (MRSA) задолго до внедрения метицилина в клиническую практику (1930-1950 гг.). Эволюционная модель для ST8 предполагает разделение европейской и российской филогенетических клад в 1930-е гг., что позволяет сделать вывод об импорте этой генетической линии с территории Европы в первой половине XX в. Наличие множества субкластеров генетической линии ST239, без четкого выделения российских геномов, свидетельствует о высоком клональном обмене или многократном импорте. Предложенные модели эволюции доминирующих генетических линий *S. aureus* могут быть использованы в эпидемиологическом мониторинге за эволюцией MRSA на территории страны, что является важным звеном в системе здравоохранения для сохранения национальной безопасности Российской Федерации;

доказано, что формирование устойчивости *S. aureus* к антибиотикам формируется не спонтанно, а через образование единичных клонов в популяции, которая на ранних этапах селекции устойчивости представляет собой смешанную клональную популяцию; формирование устойчивости к даптомицину у штаммов MSSA и MRSA связано с мутациями в генах системы биосинтеза мембранных фосфолипидов (*mprF*, *cls2*, *pgsA*) и генах путей метаболизма глицерола (*fabF*, *glp*) (Пат. РФ 2809847 опубл. 19.12.2023, Бюл. № 35. – 12 с.); формирование устойчивости к ванкомицину через многочисленные мутации в генах биосинтеза клеточной стенки (*walK*, *yucH*, *yucI*, *rpoB*) опосредует и появление устойчивости к липогликопептидам (Пат. РФ 2802896 опубл. 05.09.2023, Бюл. № 25. – 12 с.); устойчивость к цефтаролину у штаммов MRSA связана с мутациями в гене *gdpP*, участвующем в метаболизме вторичных внутриклеточных сигнальных мессенджеров c-di-AMP (Пат. РФ 2798788 опубл. 27.06.23, Бюл. № 18. – 14 с.); что формирование *tes-*

независимых механизмов устойчивости к бета-лактамам у штаммов MSSA связано с появлением мутаций в генах, кодирующих пенициллинсвязывающие белки (ПСБ), и в частности ПСБ4, а также с мутациями в гене *gdpP* (Пат. РФ 2802895 опубл. 05.09.2023, Бюл. № 25. – 11 с.); что формирование толерантности связано с появлением мутаций в гене пептидил-тРНК-гидролазы (Пат. РФ 2809538 опубл. 12.12.2023, Бюл. № 35. – 13 с.);

введено новое определение «гетеромутация», определяющее наличие нескольких аллельных вариантов генетических локусов в культуре одного штамма, относящегося к одному сиквенс-типу и применимое к анализу данных полногеномного секвенирования прокариотов. Показано, что мутации образуются не сразу во всей популяции (клеточной колонии) микроорганизмов, а у отдельных клеток, это приводит к появлению смешанной популяции по признаку наличия или отсутствия той или иной мутации.

Теоретическая значимость исследования подтверждается тем, что:

доказаны различия в клональной структуре внутрибольничных и внебольничных изолятов MRSA с преобладанием определенных генетических линий (ST8 и ST239 во внутрибольничной популяции, ST22, ST59 – во внебольничной популяции); определено Европейское происхождение доминирующего в Российской Федерации эпидемического клона *S. aureus* ST8; выявлено ближневосточное происхождение доминирующего клона *S. aureus* «Газа клон» ST22, циркулирующего в российской человеческой популяции; доказано, что внутрибольничные клоны ST228, ST239 и ST8 характеризуются более выраженной ассоциированной устойчивостью к аминогликозидам, тетрациклинам, макролидам, рифампицину, триметоприму/сульфаметоксазолу и фторхинолонам, а также сниженной чувствительностью к цефтаролину и ванкомицину, по сравнению с внебольничными клонами (ST22 и ST59); показано, что фенотип MRSA с ложной чувствительностью к оксациллину (OS-MRSA) встречается среди внебольничных MRSA и быстро трансформируется в MRSA с высоким уровнем устойчивости к бета-лактамам за счет формирования мутаций в генах ядерного генома *relA*, *eno*, *pyk*, *gmk* и *prsA*; определено, что

формирование устойчивости *S. aureus* к ванкомицину, даптомицину, цефтаролину, оксациллину и меропенему представляет собой многоступенчатый процесс с изначальным формированием минорных клонов с различными мутациями, сопряженный со снижением скорости роста культуры *S. aureus*, наиболее выраженный после воздействия даптомицина;

применительно к проблематике диссертации с получением обладающих новизной результатов использован комплекс методов исследований: микробиологических (культивирование бактерий, оценка скорости роста, метод серийных разведений для определения минимальных подавляющих концентраций (МПК), диско-диффузионный метод, градиентно-диффузионный метод, популяционный анализ (PAP), анализ кинетики отмирания под воздействием антимикробных препаратов «time-killing», оценка индуцированной аутолитической активности, изучение адаптивной эволюции устойчивости бактерий *in vitro* с использованием ступенчатых пересевов на возрастающих концентрациях антибиотиков и циклического кратковременного воздействия шокowymi концентрациями антибиотиков), генетических (одно- и мультилокусное сиквенс-типирование, оценка экспрессии генов, полногеномное секвенирование, направленное геномное редактирование с применением технологии молекулярных ножниц CRISPR/Cas9), биоинформатических (сборка геномов *de novo*, филогенетический и пан-геномный анализ, Байесовская кластеризация, определение времени дивергенции узлов с помощью алгоритмов BEAST, молекулярное типирование *in silico*), статистических (непараметрические критерии, корреляционный анализ);

изложена новая концепция о том, что к одинаковому фенотипическому проявлению устойчивости MRSA к ванкомицину, даптомицину, цефтаролину и MSSA к бета-лактамам могут приводить разные мутационные события, затрагивающие различные метаболические пути; так, формирование устойчивости *S. aureus* к различным антибиотикам обеспечивается различными механизмами, через этап формирования в популяции минорных клонов с

определёнными мутациями, которые либо элиминируют, либо начинают доминировать;

раскрыты молекулярные механизмы формирования устойчивости MRSA и метициллинчувствительных *S. aureus* (MSSA) к ванкомицину, даптомицину, цефтаролину, меропенему и оксациллину, связанные с формированием мутаций в генах биосинтеза клеточной стенки, мембранных фосфолипидов, пенициллинсвязывающих белках и с изменением метаболизма сигнальных мессенджеров c-di-AMP, а также молекулярные механизмы, влияющие на формирование фенотипов ложной чувствительности MRSA к оксациллину за счет наличия мутаций в промоторной области гена *tesA*, что опосредует его низкую экспрессию;

изучена популяционная структура циркулирующих в Российской Федерации клинических штаммов MRSA, собранных за 10-летний период на территориях различных регионов с преобладанием внутрибольничных генетических линий ST8, ST239 и ST228; изучена популяционная структура циркулирующих штаммов MRSA среди здоровой популяции людей с преобладанием генетических линий ST22, ST59 и ST8; изучены эволюционные связи доминирующих генетических линий MRSA ST8, ST239 и ST22 с глобально распространенными клонами: ST8-USA300 (Американская линия), ST8 (Европейская линия), ST239 (Азиатская линия), ST22-EMRSA-15 (Европейский эпидемический клон) и ST22 (Газа клон), соответственно; изучены стратегии уклонения от действия антимикробных препаратов среди представителей разных клонов MRSA, заключающиеся в формировании мутационных резистомов, фенотипически проявляющихся в виде устойчивости, гетерорезистентности или толерантности;

проведена модернизация методики определения чувствительности *S. aureus* к бета-лактамам, основанная на изучении чувствительности к цефокситину, путем дополнительного выявления гена *tesA* методом ПЦР и оценки чувствительности к оксациллину, что позволяет дифференцировать *tes*-зависимые фенотипы чувствительности/резистентности золотистого стафилококка: MRSA, MSSA и оксациллин-чувствительных

метициллин-резистентных (OS-MRSA), а также *mec*-независимые фенотипы Borderline оксациллин-резистентных *S. aureus* (BORSA) и модифицированных оксациллин-резистентных *S. aureus* (MODSA).

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены: Методические рекомендации «Метод определения *mec*-независимых механизмов резистентности *Staphylococcus aureus* к действию бета-лактамных антибиотиков» (Акт внедрения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Городская клиническая больница им. В.В. Вересаева Департамента здравоохранения Москвы» от 18.01.2024 г.) – региональный уровень внедрения;

«Метод оценки чувствительности *Staphylococcus aureus* к бета-лактамным антибиотикам с использованием ПЦР-детекции генов *mecA/mecC* и определением чувствительности к цефокситину» (Акт внедрения Городского бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе» от 18.01.2024 г.) – городской уровень внедрения;

«Метод определения чувствительности и выявление механизмов резистентности *Staphylococcus aureus* к даптомицину» (Акт внедрения Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, от 19.01.2024 г.) – учрежденческий уровень внедрения;

«Метод оценки гетерорезистентности *Staphylococcus aureus* к ванкомицину с использованием популяционного анализа (РАР) в формате микроразведений» (Акт внедрения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени С.С. Юдина Департамента здравоохранения города Москвы» от 22.01.2024 г.) – региональный уровень внедрения;

результаты диссертационного исследования внедрены в практические/лекционные занятия: «Методы определения чувствительности

бактерий к антибиотикам», «Эпидемиология инфекционных и паразитарных болезней. Молекулярная эпидемиология» (цикл профессиональной переподготовки «Медицинская микробиология»), «Микробиологическая диагностика инфекций, вызываемых стафилококками» (цикл повышения квалификации «Бактериология»), «Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам и методы ее определения», «Механизмы резистентности бактерий к антибиотикам», «Эпидемиологические аспекты резистентности бактерий и грибов», «Контроль за глобальной резистентностью: интернет-ресурсы и базы данных, сдерживание глобальной резистентности», «Молекулярно-генетический мониторинг за глобальной резистентностью» (цикл повышения квалификации «Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам») (Акт внедрения Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации от 05.02.2024 г.) – межучрежденческий уровень внедрения;

результаты диссертационного исследования внедрены в лекционный материал кафедры микробиологии имени доцента Б.М. Зельмановича Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Акт внедрения от 02.02.2024 г.) - межучрежденческий уровень внедрения;

полученные в ходе выполнения диссертационной работы 10 экспериментальных штаммов *S. aureus* депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск»: *S. aureus* A9 (B-9982), A dap/40 (B-9983), A van/40 (B-9984), B19 (B-9985), OXA 45 (B-9986), OXA 68 (B-9987), SA0077 dap (B-9988), SA0077 van (B-9989), SA0146 cpt (B-9990) и SA0422 cpt (B-9991) - справки о депонировании №№ 326-335 от 06.06.2022 г. – федеральный уровень внедрения;

полногеномные последовательности 208 штаммов, депонированные в базу данных NCBI GenBank, доступны под номерами биопроектов (BioProjects) PRJNA872007, PRJNA325350, PRJNA721282, PRJNA609231, PRJNA237679 и PRJNA996487 – международный уровень внедрения;

определены перспективы практического использования результатов диссертационного исследования, в частности: разработанные и использованные методические подходы анализа фенотипической и генотипической гетерорезистентности *S. aureus* к антибиотикам для корректного определения чувствительности штаммов к антимикробным препаратам различных классов; полученные и охарактеризованные штаммы с известными механизмами резистентности и толерантности для разработки или тестирования новых и перспективных антистафилококковых соединений; выявленные уникальные генетические паттерны ядерного генома среди доминирующих генетических линий внутрибольничных и внебольничных MRSA, циркулирующих на территории Российской Федерации (ST8, ST239, ST22 и ST59), могут быть использованы эпидемиологами для мониторинга за эволюцией, а также за выявлением возможного импорта или искусственного привнесения изменений в геномы золотистого стафилококка;

создана уникальная коллекция детально фенотипически и генотипически охарактеризованных клинических изолятов MRSA и изолятов MRSA, выделенных от здоровых носителей, состоящая из 853 живых культур, представляющих 161 фенотипический профиль резистентности, 31 уникальный сиквенс-тип и 11 клональных комплексов, включая штаммы, для которых осуществлено полногеномное секвенирование (40 % коллекции), а также два модельных штамма с разными делециями в гене *gdpP*, полученных с помощью геномного редактирования;

представлены методические подходы по оценке чувствительности *S. aureus* к бета-лактамам антибиотикам, в которых обоснована необходимость проведения популяционного анализа для выявления гетерорезистентности и проведения оценки кинетики отмирания бактериальных культур под воздействием бактерицидных антибиотиков для выявления

антибиотикотолерантности. На основе полученных данных о формировании перекрестной резистентности между ванкомицином, даптомицином, оритаванцином, далбаванцином и телаванцином, даны рекомендации по интерпретации результатов оценки чувствительности к гликопептидным и липогликопептидным антибиотикам для коррекции схем антибактериальной терапии.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

степень достоверности результатов исследований подтверждается: большой выборкой анализируемых клинических изолятов, собранных за десятилетний период из многочисленных медицинских центров нескольких регионов Российской Федерации; использованием современных стандартных методов молекулярного и геномного типирования на соответствующем оборудовании исследовательского класса; применением адекватных математических, статистических и биоинформатических методов для анализа и интерпретации полученных результатов; публикациями в высокорейтинговых рецензируемых журналах, относящихся к Q1; уровнем цитируемости публикаций по теме диссертационного исследования (индекс Хирша по выборке публикаций из 24 работ по теме диссертации составляет 7), размещением данных полногеномного секвенирования штаммов (ДНК-ридов) в SRA депозитарий (Sequence Read Archive) Национального института биотехнологической информации США (NCBI GenBank);

идея диссертационного исследования базируется на опубликованных результатах международных исследований по изучению клональной структуры внутрибольничных и внебольничных штаммов *S. aureus*, в которых прослеживается определенная географическая приуроченность, а также на фенотипической и геномной эволюции резистентности *S. aureus* к антимикробным препаратам;

установлено соответствие полученных автором результатов с опубликованными ранее в научной литературе данными других авторов по исследованиям популяционной структуры циркулирующих штаммов *S. aureus*, включая MRSA, особенностей формирования различных стратегий уклонения

патогена от действия антимикробных препаратов, в зависимости от принадлежности к определённым генетическим линиям, мутационных резистомов, приводящих к изменению фенотипов *S. aureus* в модельных экспериментах;

использованы современные методы получения, обработки и визуализации данных: биоинформатические методы анализа, фильтрации сырых данных секвенирования, сборка геномов *de novo* и при картировании на референс-геном, с последующей аннотацией; определение детерминант вирулентности, резистентности, типирование штаммов *in silico* по стандартным схемам молекулярного типирования *S. aureus*, с использованием баз данных PubMLST, SpaServer, Virulence Factor Database (VFDB), ResFinder и sscmecfinder_db; пан-геномный и различные варианты филогенетического анализа с расчетами эволюционных дистанций методами максимального правдоподобия (Maximum likelihood phylogeny); филогенетический анализ с оценкой времени дивергенции в программе BEAST; алгоритм машинного обучения XGboost для поиска ассоциаций совокупности генов в пан-геноме с разными группами или кластерами геномов на больших выборках; выявление смешанных нуклеотидных позиций («гетеромутаций») в динамике, анализ аллельной глубины, а также аннотация генетических изменений с помощью программы Breseq с моделью поиска замен mixed allele model; визуализация диаграмм, графиков и картированных графиков с использованием программной среды R (версия 4.1.2) в интерфейсе RStudio (версия 2021.09.01) с соответствующими пакетами для статистических расчетов непараметрических критериев и корреляционного анализа.

Личный вклад соискателя состоит в участии на всех этапах исследования от предложенной идеи, составления дизайна исследования и проведения экспериментальных работ, до получения результатов, их анализа и интерпретации. Автор самостоятельно поддерживал коллекцию бактериальных культур, проводил первичные микробиологические исследования. Автором самостоятельно были получены результаты молекулярного типирования, геномного секвенирования и биоинформатического анализа. Автор

непосредственно принимал участие во всех экспериментальных работах по селекции устойчивых клонов *in vitro*. Автор участвовал на всех этапах подготовки, написания публикаций, подготовки устных выступлений на различных конференциях по теме диссертационного исследования.

На заседании 24.05.2024 г. диссертационный совет принял решение присудить Гостеву Владимиру Валерьевичу ученую степень доктора биологических наук за разработку теоретических положений и решение важной научно-практической проблемы, связанной с расшифровкой механизмов формирования резистентности *Staphylococcus aureus* к антимикробным препаратам, а также путей распространения эпидемических клонов метициллин-резистентных *S. aureus* на территории Российской Федерации, что чрезвычайно важно для системы здравоохранения страны. Полученные в результате диссертационного исследования данные обеспечивают совершенствование диагностики и выбора оптимальных схем терапии инфекций, вызванных метициллинрезистентными *S. aureus*, а также лежат в основе научного прогнозирования дальнейшего формирования резистентности и поиска новых эффективных лечебных и профилактических антимикробных препаратов.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве **18** человек, из них **9** докторов наук по специальности 1.5.11. Микробиология, участвовавших в заседании, из **23** человек, входящих в состав совета, проголосовали: за **18** против **0**, недействительных бюллетеней **нет**.

Председатель

диссертационного совета
академик РАН, д.м.н., профессор



(Дятлов Иван Алексеевич)

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.б.н.

(Фурсова Надежда Константиновна)

Дата оформления Заключения – 24.05.2024 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.