

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

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:

Клясова Галина Александровна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел микробиологии и антимикробной терапии, заведующий отделом, 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 «___» мая 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 ди-аденозинмонофосфата (с-di-AMP) на устойчивость к антимикробным агентам, действующим на клеточную стенку (Commichau et al., 2019). На повышение концентрации с-di-AMP влияет активность специфической фосфодиэстеразы GdpP (GGDEF domain protein containing phosphodiesterase), которая при нормальных условиях гидролизует молекулы с-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 (Vui et al., 2017). Предсказание и моделирование траектории эволюции устойчивости является важным фундаментальным научно-практическим направлением как для локальной, так и международной систем здравоохранения (Vaquero 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*, колонизирует сапрофитный дерматофит *Trichophyton erinacei*, продуцирующий 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 подкластер 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 клональных 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 К. Hiramatsu и его коллеги из Медицинского Университета Юнтендо (Токио, Япония). Работы А. Tomasz и Н. de Lencastre из Рокфеллерского Университета (Нью-Йорк, США) связаны с исследованиями механизмов резистентности, толерантности к бета-лактамам и изучением динамики популяционной структуры. Группа профессора В. 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 клональную структуру внутрибольничных (HA-MRSA) и внебольничных MRSA (CA-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 HA-MRSA и CA-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 метицилина 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 CA-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 *mecA*, 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 бета-лактамам антибиотикам, независимо от *mecA*. 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 раннее 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 элиминируются, 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 *tes*-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 (Baum 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, биосинтеза 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-лактамами 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 *tes*-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-лактамам антибиотикам или как референс-штаммы для постановки РАР-анализа, «time-killing»-анализа; для поиска новых мишеней 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 путей 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 биоинформатических 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 резистоста. 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 субкластер «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 шокowymi 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 шокowymi концентрациями ципрофлоксацина приводит к появлению толерантности.
4. Изменения в метаболизме c-di-AMP (посредством мутаций в *gdpP*) и мутации в *pbp4* 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 АТСС. 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 ESCMID (European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases): ESCMID 2014 (Барселона, Испания), ESCMID 2015 (Копенгаген, Дания), ESCMID 2016 и ESCMID 2019 (Амстердам, Нидерланды), ESCMID2020 (online abstract book), ESCMID 2021 – 2022 (online); 10-ом международном симпозиуме по резистентности и антимикробным агентам, 10th 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 (ESCMID, 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 гратами РФФИ: 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 биоинформатического 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. Биоинформатический анализ проводился совместно с сотрудниками НИО Лихолетовой Д.В., Павловой П.А. и 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 Соповой 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 antimicrobных 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 (HA-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 (РАР), «time-killing») и **генотипических методов** (MLST, SCC_{mec}-, *sra*-типирование *S. aureus*, оценка экспрессии генов, полногеномное секвенирование (n=339)). **Биоинформатические 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) шокowymi концентрациями, в 10 – 100 раз превышающих уровень МПК, (ванкомицин, ципрофлоксацин, гентамицин) в течение 10 пассажей. Для производных штаммов в динамике проведена оценка скорости роста, РАР-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 бета-лактамам. **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 МПК₅₀ и МПК₉₀ – 1 и 2 мкг/мл, соответственно. Все изоляты характеризовались чувствительностью к линезолиду и тигециклину. Единичные изоляты HA-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 (МПК₉₀ 0,125 мкг/мл). Чувствительность к оксациллину у -положительных *S. aureus* (OS-MRSA) в большей степени встречалась у CA-MRSA (26%). Доля изолятов HA-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 HA-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 преобладали среди CA-MRSA (n=49, 24%), среди HA-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 бета-лактамам была отмечена чувствительность к комбинации пенициллина-клавуланата 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 *tesA* 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 *tesA*.

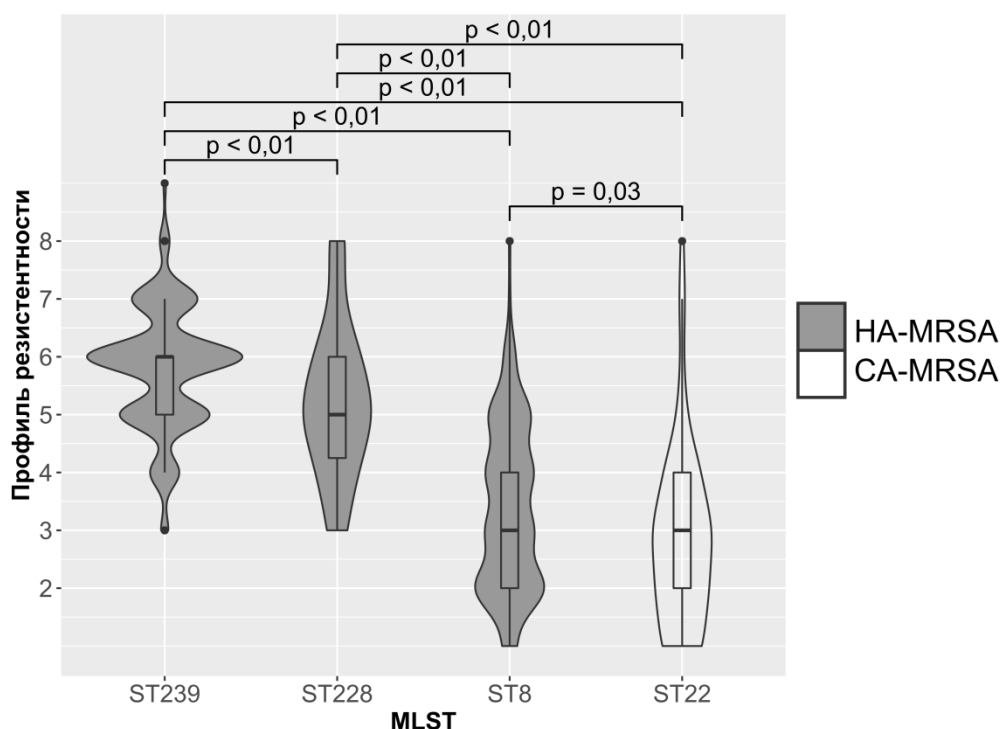


Рисунок 1 – Сравнение профилей резистентности среди представителей доминирующих генетических линий.

При исследовании с использованием PAP-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 PAP-анализе дополнительно культивировали с оксациллином в течение 48 часов. Полученные субпопуляции OS-MRSA характеризовались высокими значениями МПК к бета-лактамам, а также мутациями в генах дополнительных факторов (auxiliary factors), влияющих на фенотипическое проявление устойчивости к бета-лактамам: *relA*, *eno*, *pyk*, *gmk* и *prsA*.

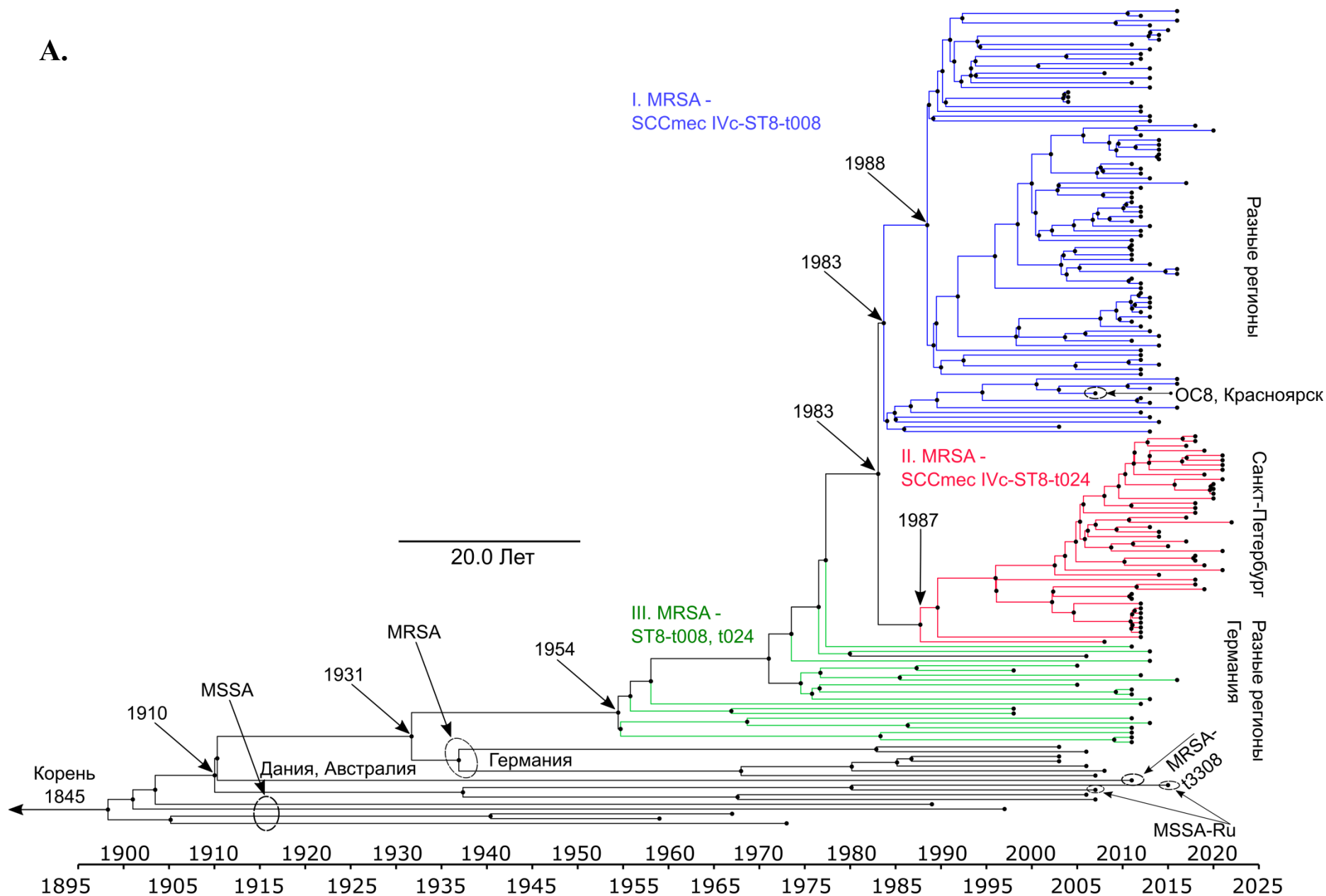
Анализ глобальной и локальной популяционной структуры доминирующих генетических линий, циркулирующих в России (Глава 5). В анализ были включены доступные геномы и их метаданные из NCBI GenBank соответствующих генетических линий (ST8, ST239, ST22, ST59).

Популяционная структура доминирующего клона HA-MRSA ST8. В работе были анализированы 2238 геномов, включая 156 геномов из России. На основе филогенетического анализа и Байесовской кластеризации 29990 core-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 ± 30 г. (PP=1). Геномы изолятов MSSA-ST8 (из Дании и Австралии) образуют максимально длинные ветви с общими предшественниками, произошедшими в 1910 ± 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 ± 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 ± 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 ± 7 г. (PP=1). Появление геномов II кластера датируется 1987 ± 5 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 ± 5 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 HA-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. 2B). Расчетное время появления генетической линии ST239 датируется 1923 ± 8 г. Разделение на два основных кластера (по классификации Monecke) произошло в 1943 ± 8 г.

A.



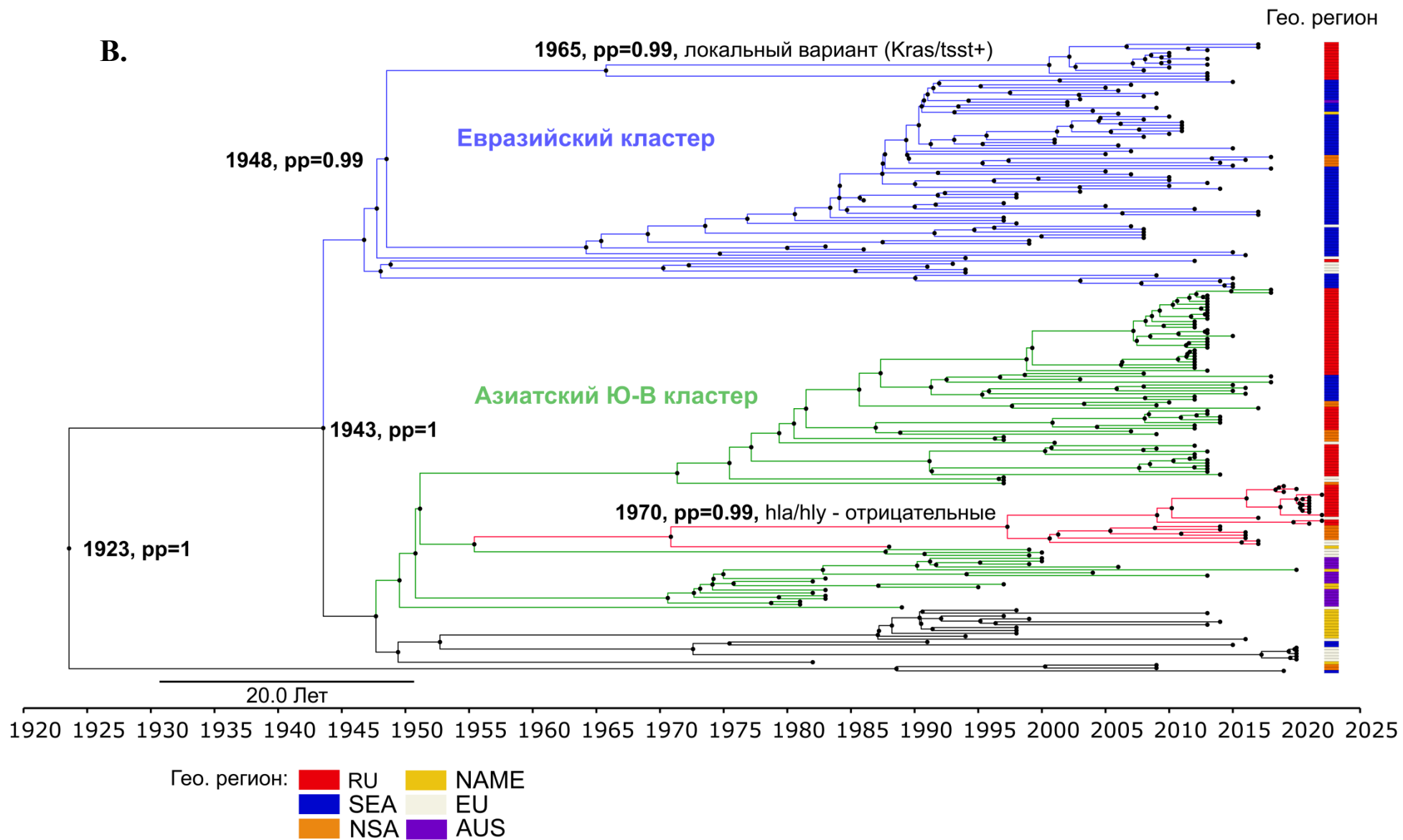


Рисунок 2 – Филогенетический анализ с анализом времени дивергенции, А – геномы изолятов ST8 (n=172); В – геномы изолятов ST239 (n=219). Обозначения географических регионов: Ru – Россия, SEA – Юго-Восточная Азия, NSA – Северная и Южная Америка, NAME – Северная Африка и Ближний Восток, EU – Европа, AUS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

Геномы изолятов из России локализовались вперемешку 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 ± 9 г. Отдельная группа *hla/hly*-отрицательных ST239 входила в состав Азиатского Ю.-В. кластера, время появления которого датировалось 1970 ± 6 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*. Парное 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-клавуланата 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.

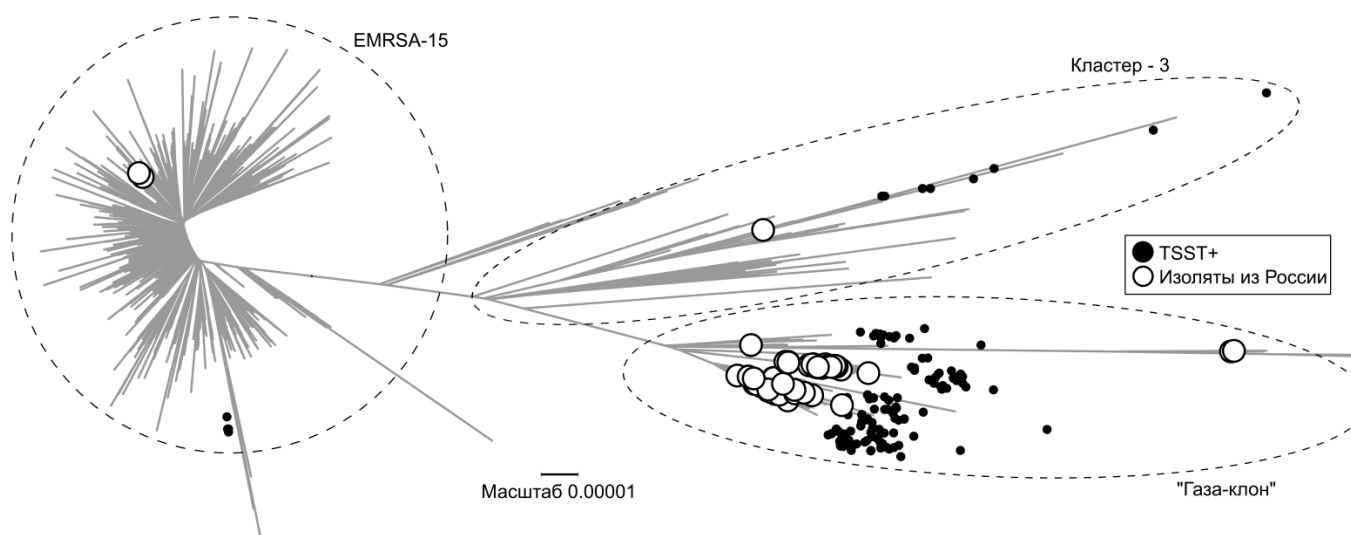


Рисунок 3 – Глобальная популяционная структура генетической линии ST22 (1343 геномов).

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>tecA</i>
	VAN	A	○→○/●→●	↓↓	P	<i>walk</i> , <i>mprF</i> , <i>yucH</i> , <i>yucI</i> , <i>rpoB</i> , <i>vraG</i>
	DAP	A	○→●●●, Д	↓↓ ↓	P	<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	○→○ T	–	НД	<i>pth</i>
	GEN	B	○→●●, ○→○ T, 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*: (А) – стратегия многократных пересевов на возрастающих концентрациях антибиотиков (40 пассажей), (В) – воздействие шокowymi концентрациями (10 пассажей); Изменение фенотипов: → – селекция, ○ – нет изменений МПК, ● – степень увеличения МПК (резистентность), ○/● – гетерорезистентность, ○ T – толерантность, Д – фенотипическая диссоциация, SCV – мелкоколониевые варианты; СР – степень выраженности снижения скорости роста; АЛ – оценка индуцированного аутолизиса, (P) – устойчивость, (Ч) – чувствительность, НД – нет данных.

Только у одного штамма MRSA (ST228) при селекции на цефтаролине были выявлены мутации в *tecA*. 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, YucI/YucH, 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 пассажиру 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), тейкопланина, оритаванцина и далбаванцина. МПК телаванцина находилась в диапазоне 0,125–0,25 мкг/мл. Показатель PAE/AUC в PAE -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 ридях 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 тейкопланина до 2 мкг/мл. Уровень МПК даптомицина менялся с 0,25 – 1 мкг/мл до 0,25 - 2 мкг/мл. По результатам PAE -анализа отмечалось увеличение параметра

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

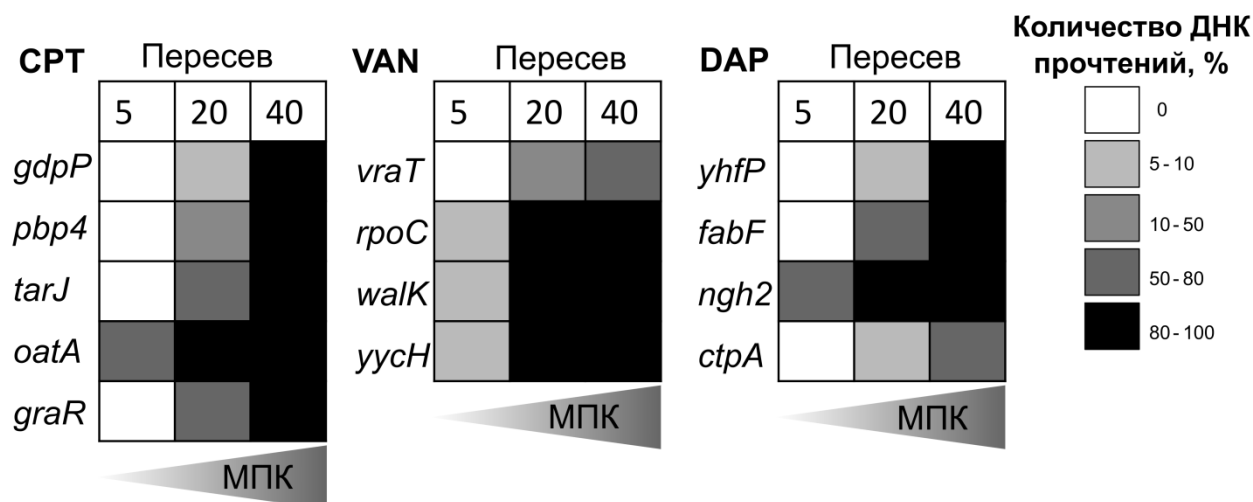


Рисунок 4 – Примеры переходов гетеромутаций (количество ДНК прочтений < 90%) в гомомутации (90 – 100%) в разных генах при селекции на трех антибиотиках.

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 $MDK_{99,99}$ с 6 – 14 часов до 24 – 38 часов ($p < 0,01$). Увеличение $MDK_{99,99}$ 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_{99,99} увеличился до 14 – 18 часов ($p < 0,01$). Для оксацилина отмечалось незначительное увеличение MDK_{99,99} с 24 – 38 часов до 38 – 48 часов ($p < 0,05$) для штаммов после селекции. Более существенная разница отмечалась для цефтаролина, так MDK_{99,99} 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_{99,99}. Изменения в кривых отмирания для перечисленных антибиотиков не оказывало влияния на уровень МПК.

Влияние шоковых концентраций гентамицина на формирование устойчивости и мелкоколониальных 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_{99,99} 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: мелкоколониальный вариант (SCV) характеризовался наличием мутаций в гене *menA*; колонии нормального размера характеризовались устойчивостью к даптомицину за счет мутации в *mprF*; 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-мишенях, 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. 5D). 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. 5E). Может наблюдаться и другой эффект – потеря какого-то механизма устойчивости (Seesaw Effect).

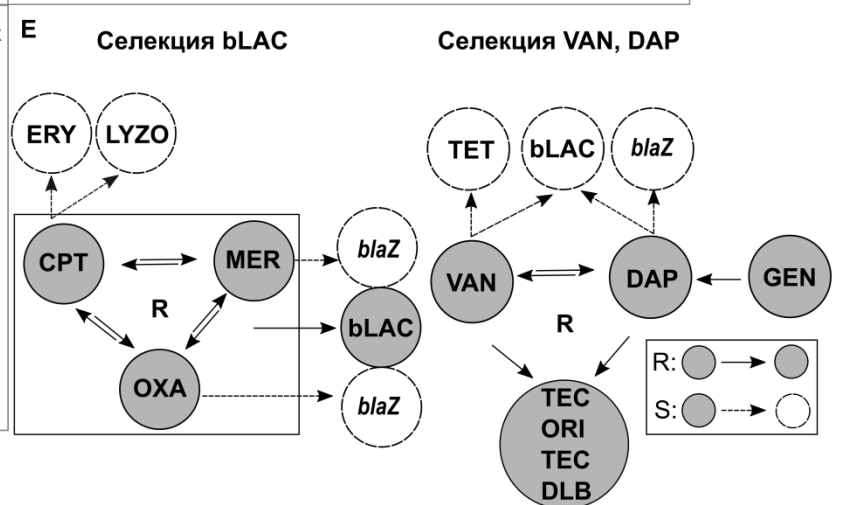
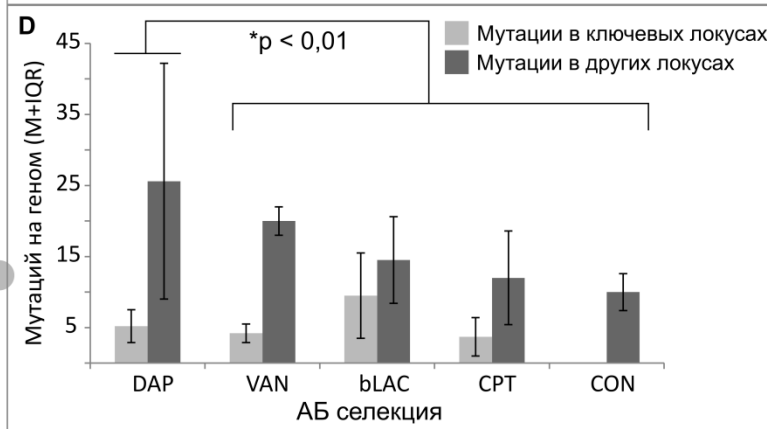
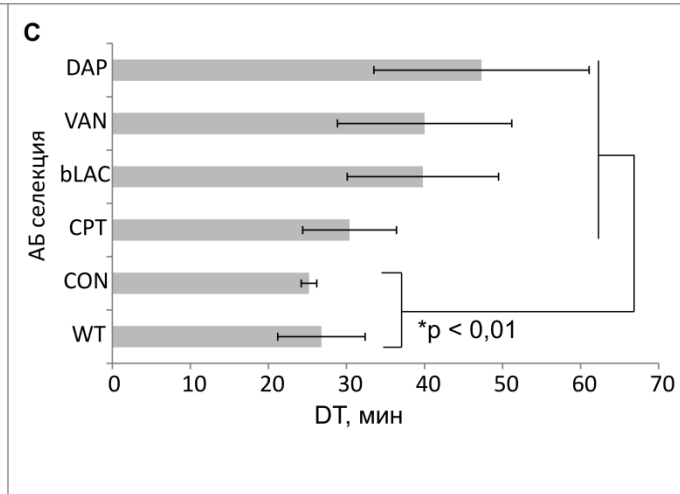
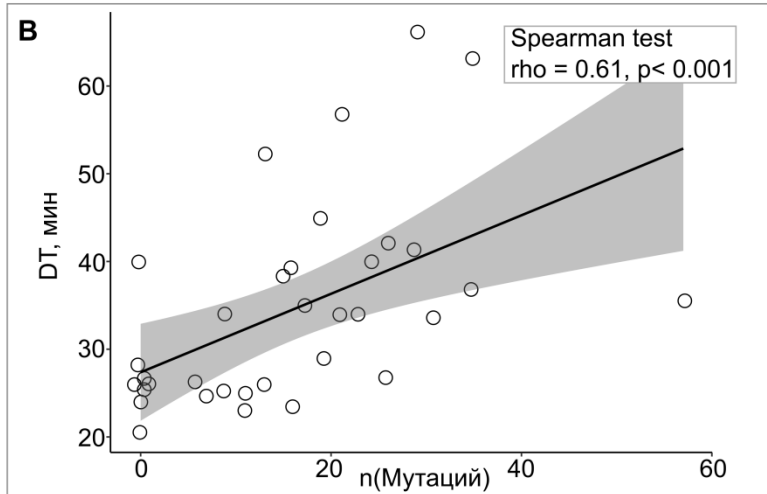
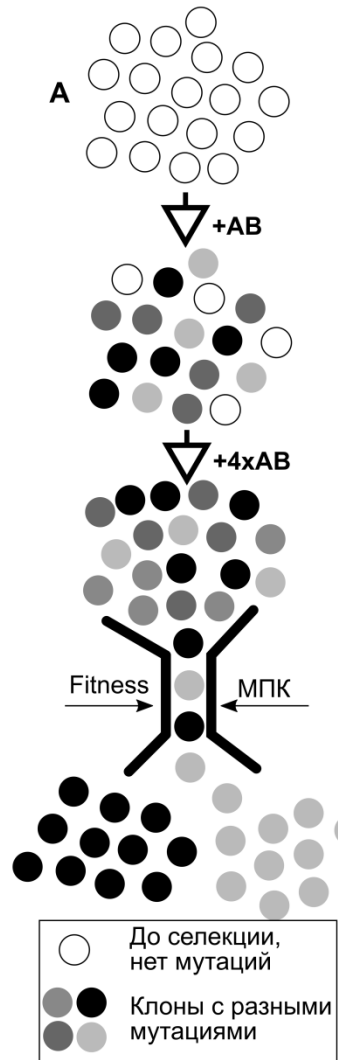


Рисунок 5 – Траектории эволюции устойчивости у *S. aureus*. А – Модель формирования множества клонов в популяции под воздействием антибиотиков (АВ), клональное разнообразие увеличивается по мере селекции и увеличения воздействующей концентрацией (4хАВ). По мере селекции возрастает биологическая цена 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 воздействие 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 плазмиды, 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 шокowymi 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 HA-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 изоляты 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 HA-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 HA-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 SCC $_{mec}$ IVc циркулирующими MSSA. Геном HA-MRSA-ST8 характеризуется выраженной стабильностью, несмотря на длительность циркуляции. Уровень ассоциированной устойчивости HA-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 бета-лактамным 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 Lopotkin и соавт. В-третьих, устойчивость формируется через гетерорезистентность и толерантность, что находит подтверждение в работах группы Valaban и соавт. (2014 – 2021). Для изучения гетерорезистентности в диссертационной работе было использовано два методологических подхода: это определение фенотипической гетерорезистентности с использованием RAP-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 бета-лактамным 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 антибиотикотолерантности 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 клональная структура, среди HA-MRSA доминировали ST8 и ST239, среди CA-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. CA-MRSA изоляты характеризовались высоким уровнем чувствительности к не бета-лактамам антибиотикам. Среди HA-MRSA и CA-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 клональном обмене или многократном импорте. Расчетное время появления локальных уникальных вариантов ST239_{Kras} 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*, *yusH*, *yusI*, *proB*), 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 шокowymi концентрациями ванкомицина приводит к формированию мутаций в *walk*, что опосредует появление гетерорезистентности и снижение чувствительности к даптомицину. Под воздействием шокowych концентраций ципрофлоксацина 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 шокowymi 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-лактамам 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 мелкоколониальных 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-лактамам / 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. Агеев, В. А. Агеев, Т. В. Черненко // 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. Скленова, 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-лактамовых 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. Ямамото // 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. Klotchenko, 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-лактамам антибиотикам (варианты) / **Гостев В.В.**, Калиногорская О.С., Сопова Ю.В., Велижанина М.Е., Цветкова И.А., Сидоренко С.В.; заяв. и патентообл. 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-лактамам антибиотикам / **Гостев В.В.**, Калиногорская О.С., Сопова Ю.В., Велижанина М.Е., Агеев И.В., Агеев 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.

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

патентообл. 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 патентообл. 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 патентообл. 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

СС – Клональный комплекс

CIP – Ципрофлоксацин

CON – Контрольные штаммы, которые пассировались на среде без антибиотиков

core-SNP – Однонуклеотидные

мутации основного (ядерного) генома

CPT – Цефтаролин

DAP – Даптомицин

GEN – Гентамицин

HA-MRSA – Внутрибольничные MRSA

MDK_{99,99} – Минимальный период времени, необходимый для киллинга 99,99% клеточной популяции

MER – Меропенем

M-IQR – Медиана и межквартильный интервал

MLST – Мультилокусное сиквенс-типирование

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