

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФБУН «Центральный
научно-исследовательский институт
эпидемиологии» Роспотребнадзора,
академик РАН, д.м.н., профессор
В.Г.Акимкин

«25» *апреля* 2024 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации на диссертационную работу Гостева Владимира Валерьевича «Популяционная структура *Staphylococcus aureus* и траектории эволюции устойчивости к антимикробным препаратам» представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Актуальность темы диссертации. Распространение устойчивости к антибиотикам среди бактериальных возбудителей инфекционных заболеваний человека является глобальной проблемой, угрожающей мировой системе здравоохранения. Общемировые тенденции по принятию мер о нераспространении устойчивости к антибиотикам расширяются на все сферы жизнедеятельности человека – системы здравоохранения, питания, и окружающей среды (прежде всего почвы и воды). В настоящее время принята концепция единого здоровья «One health», основанная на взаимном влиянии как антропогенных, так и средовых факторов на формирование и распространение устойчивости к антибиотикам (Velazquez-Meza, et al., 2022). Глобализации, туризм, свободный товарооборот являются одними из ведущих факторов глобального распространения клонов бактерий высокого эпидемического риска. Исследования, направленные на расшифровку механизмов

устойчивости, а также направленные на понимание процессов организации бактериальных популяций и факторов, ассоциированных с формированием и распространением клонов со множественной устойчивостью, являются крайне актуальными для мировой системы здравоохранения. Среди наиболее значимых возбудителей бактериальных инфекций человека можно выделить *Staphylococcus aureus*, который является лидером по числу ИСМП во многих странах мира. Несмотря на прогресс в разработке и внедрении новых антибиотиков, летальность от инфекций, вызванных *S. aureus* остаётся на высоком уровне даже в экономически развитых странах мира (CDC, 2019; GBD, 2022; Tong et al., 2015).

Распространение метициллинрезистентного золотистого стафилококка (MRSA) является значительной глобальной проблемой здравоохранения. Американская организация CDC рассматривает MRSA как серьёзную угрозу общественному здоровью населения. Понимание механизмов устойчивости к противомикробным препаратам у MRSA имеет большое клиническое и эпидемиологическое значение. Исследователи выявили факторы, которые способствуют развитию устойчивости к антибиотикам у MRSA, к их числу относятся не рациональное использование антибиотиков, широкое применение антибиотиков в качестве стимуляторов роста в кормах для животных и относительная легкость, благодаря которой MRSA может преодолевать географические барьеры, распространяясь по континентам. Домашний скот, в частности, свиньи, по-видимому, являются важными резервуарами для MRSA, а соответственно и начальной точкой распространения от животных к человеку. Это подтверждается примером появления успешного эпидемиологического кластера LA-MRSA, который изначально спорадически описывался на территории центральной и северной Европы, а теперь его распространение носит характер эпидемии. Немаловажным является и изучение «классических» вариантов MRSA: это группа нозокомиальных MRSA (HA-MRSA) и внебольничных (CA-MRSA). Примером может служить исследования по глобальной реконструкции эволюции эпидемического клона ST8 с

использованием филогеографических подходов (Strauss et al., 2017). Так было установлено, что длительно и успешно циркулирующий клон на территории США ST8-USA300 изначально появился на территории Европы, и только в первой половине XX века был импортирован в Северную Америку. Методы сравнительной геномики, эволюционного моделирования, методы оценки времени дивергенции позволяют отвечать на такие вопросы как происхождение, детали эволюции и распространения успешных генетических линий микроорганизмов, успешно и эффективно используются в современной эпидемиологии.

В связи с вышеизложенным, диссертационное исследование Гостева В.В., посвященное изучению популяционной структуры *S. aureus* и эволюционного моделирования устойчивости к антимикробным препаратам является актуальным, а цель и задачи поставленные в нем, соответствуют общемировым научно-практическим тенденциям в изучении клонального дрейфа и механизмов резистентности данного возбудителя.

Диссертационная работа посвящена генетической характеристике штаммов *S. aureus*, с использованием полногеномного секвенирования, геномного сравнительного анализа с последующей характеристикой структуры популяции *S. aureus* относительно глобально циркулирующей популяции. В работе использован целый комплекс биоинформатических подходов для анализа, как клональной структуры, так и молекулярных механизмов формирования устойчивости. Изучаемые штаммы *S. aureus*, включенные в исследование были выделены в период с 2011 по 2022 гг., что позволило провести филогенетическое моделирование с оценкой времени появления основных узлов (кластеров) в эволюционной модели, объясняющей происхождение доминирующего клона *S. aureus* ST8 на территории России. Полученные данные актуальны и соответствуют требованиям современной науки и практики.

Научная новизна. На основе детально охарактеризованной популяционной структуры, циркулирующих штаммов *S. aureus*, впервые

предложены эволюционные модели, объясняющие появление доминирующих клонов высокого эпидемического риска – ST8 и ST239, являющихся основными возбудителями стафилококковых ИСМП в медицинских учреждениях на территории всей Российской Федерации. Впервые детально описана популяционная структура внебольничных MRSA, которая может являться скрытым источником новых клонов в потенциальном клональном сдвиге. Впервые среди CA-MRSA описан доминирующий «Газа клон» ST22, установлены его генетические связи относительно глобальной популяции *S. aureus* ST22. Используемые автором филогенетические модели, описывающие популяционную структуру *S. aureus* ST22 подтверждаются исследователями из других стран. Фундаментальным аспектом работы являются результаты, полученные в ходе изучения эволюции резистентности *in vitro*. Выявлено, что формирование устойчивости через образование мутаций не является спонтанным и однонаправленным, а напротив гетерогенно, как в проявлении в фенотипе, так и генотипе. Автором получено пять патентов на изобретения, имеющих важную научно-практическую значимость.

Теоретическая значимость. В работе описаны новые клоны *S. aureus*, ранее не описываемые на территории РФ, с новыми уникальными биологическими свойствами. В работе также описаны новые мутационные паттерны и механизмы резистентности к различным антибактериальным препаратам, широко используемых в клинической практике, что дополняет представления об особенностях формирования антибиотикорезистентности у *S. aureus*. По результатам экспериментов моделирования устойчивости к разным антибиотикам приводится сравнение скорости приобретения мутаций, а также их лимитирующих факторов, таких как цена сопротивления. Полученные результаты определяют вектор разработки новых будущих антибактериальных препаратов: с низкой скоростью формирования мутаций к ним и высокой ценой сопротивления.

Практическая значимость. Данные по анализу клональной структуры могут быть использованы в эпидемиологическом мониторинге за эволюцией

золотистого стафилококка на территории РФ. Автором выявлены уникальные генетические маркеры, ассоциированные с различными генетическими линиями MRSA, циркулирующими в РФ, что может быть использовано для расследования вспышек стафилококковых инфекций, связанных как с оказанием медицинской помощи, так и других внебольничных инфекций. Особую значимость имеют выявленные MRSA изоляты, проявляющие ложную чувствительность к бета-лактамам (OS-MRSA), циркулирующие на территории РФ. Такие фенотипы представляют опасность, вследствие возможного определения ошибочной чувствительности в лабораториях системы здравоохранения РФ. В диссертационной работе приведен сравнительный анализ разных лабораторных методов выявления подобных изолятов, автором подчеркивается наиболее эффективное применение метода ПЦР на выявление гена *tesA* в комбинации с фенотипической оценкой чувствительности к бета-лактамам антибиотикам. 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 как бета-лактамов, так и гликопептидных антибиотиков, что важно учитывать при использовании этих препаратов в клинической практике для лечения стафилококковых инфекций. Автором установлено, что использование цефокситина как маркерного антибиотика для детекции *tes*-независимых механизмов устойчивости не всегда эффективно. Отмечалось, что устойчивые к ванкомицину и даптомицину производные мутанты *S. aureus* характеризовались перекрестной устойчивостью к липогликопептидам: телаванцину, далбаванцину и оритаванцину. Эти результаты свидетельствуют об неэффективности использования липогликопептидов в отношении изолятов со сниженной чувствительностью к ванкомицину и/или даптомицину.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений. Достоверность полученных результатов подтверждается проведением исследовательских работ на сертифицированном оборудовании с

применением современных методов в соответствии с международными протоколами и рекомендациями. В ходе проведения работы были использованы современные микробиологические, экспериментально-микробиологические, молекулярно-генетические и биоинформатические методы исследований. Материалы диссертации изложены в 24 опубликованных работах в различных изданиях, включая издания, входящие в Q1 по индексам Scopus/Web of Science. Материалы диссертации также докладывались и обсуждались на 40 различных конференциях и конгрессах, проводившихся как в РФ, так и за рубежом. Результаты проведенных исследований являются общедоступными: производные штаммы, полученные в экспериментах по селекции устойчивости депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск), данные полногеномного секвенирования загружены в репозиторий NCBI GenBank.

Личный вклад автора. Соискателем выполнен сбор информации, организованы эпидемиологические и лабораторные исследования, систематизация первичных данных, их статистическая обработка, с участием в обобщении полученных результатов, формулировании положений, выводов, практических рекомендаций и внедрении результатов исследования.

Общая характеристика диссертационной работы. Диссертация изложена на 333 страницах машинописного текста, построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложений. Текст диссертации иллюстрирован 54 рисунками и содержит 38 таблицы. Список литературы содержит 506 источников, опубликованных преимущественно за последние несколько лет.

Во Введении автор раскрывает актуальность проблемы, описывает степень разработанности темы исследования, формулирует цель и задачи исследования, отражает научную новизну работы, теоретическую и практическую значимость, описывает методологию и методы исследования, формулирует положения, выносимые на защиту, описывает степень

достоверности и апробации результатов, а также личное участие автора в получении результатов.

В Главе 1 (обзоре литературы) отражены современные представления о клинической значимости *S. aureus*, проблема глобального распространения MRSA, особенности его чувствительности к различным антибактериальным препаратам.

В Главе 2, посвященной описанию материалов и методов, дана подробная информация о коллекции изолятов *S. aureus*, включенных в исследование. Описаны стандартные фенотипические методы исследования, а также описан большой круг используемых в работе методов молекулярно-биологического типирования и полногеномного секвенирования. В тексте перечислено оборудование, на котором проводились исследования. Приведена информация о наборах реактивов, программном обеспечении, использованных биоинформатических алгоритмах и web-ресурсах, которые были применены для анализа.

В Главе 3 приводится описание коллекции клинических изолятов MRSA, полученных от пациентов с ИСМП, и изолятов, выделенных при бессимптомном носительстве. Приведены результаты исследования чувствительности к разным традиционным и новым антибактериальным препаратам у MRSA. Приведена сравнительная оценка ассоциированной устойчивости среди внебольничных и внутрибольничных изолятов.

Глава 4. Приведены результаты молекулярного типирования HA-MRSA и CA-MRSA с использованием традиционных подходов для оценки клональности *S. aureus*. Автор приводит описание результатов MLST-, spa-, и SCCmec – типирования. Всего среди HA-MRSA было выявлено 15 сиквенс-типов и 47 spa-типов. Среди представителей CC8 преобладали два клона: ST8-t008/t024-SCCmec IVc и ST239-t037/t030/t632-SCCmec III; из представителей CC5 – ST228-t041-SCCmec I. Изоляты, относящиеся к ST8 и ST239 доминировали во всех географических регионах и встречались во всех изученных медицинских центрах. По результатам молекулярного типирования

стафилококков, выделенных у носителей, было выявлено 20 сиквенс-типов, относящихся к десяти клональным комплексам; 41 spa-тип и три основных варианта SCCmec – кассет. Наиболее часто встречающиеся генетические линии включали: ST22-t223-SCCmec IVa, ST8-t008/t024-SCCmec IVc, ST59-t1950-SCCmec V. Также в данной главе представлены результаты исследования механизмов устойчивости к цефтаролину и ванкомицину среди клинических изолятов. Раскрыты особенности формирования устойчивости, их связь с разными клонами, а также представлена их молекулярная характеристика. Детально описаны механизмы формирования OS-MRSA фенотипов. Приведена сравнительная оценка методов выявления OS-MRSA.

Глава 5. Даная глава посвящена сравнению геномов основных доминирующих генетических линий (ST8, ST239, ST22, ST59), как в локальном, так и глобальном контексте. Установлены генетические взаимосвязи с глобально циркулирующими клонами, выделены уникальные генетические маркеры, а также проведено эволюционное моделирование.

Глава 6. Данная глава включает результаты экспериментов по селекции устойчивости *in vitro*. Все штаммы после селекции *in vitro* приобретали устойчивость к антибиотикам, на которых проводилась селекция. При этом степень увеличения МПК была различна для разных антибиотиков. После селекции на всех антибиотиках, отмечались изменения в скорости роста, отражающиеся в замедлении всех ростовых характеристик. Аутолитическая активность была штаммоспецифической. При селекции стафилококков на любом из бета-лактамовых антибиотиков приводило к появлению перекрестной устойчивости ко всем бета-лактамам. При селекции MSSA на меропенеме приводило к появлению устойчивости к цефокситину, основному маркеру определения резистентности стафилококков к бета-лактамовым антибиотикам. Анализ чувствительности к новым липогликопептидам у устойчивых к ванкомицину и даптомицину мутантов показал, что наблюдается перекрестная устойчивость к новым липогликопептидам. Автор приводит описание различных мутаций, приведших к появлению устойчивости. Отмечается также,

что селекция на разных антибиотиках приводит к формированию разных мутаций. Для всех изолятов при селекции на всех антибиотиках были выявлены мутации в «не целевых» генах, то есть не принимающих непосредственное участие в формировании устойчивости. Это гены систем генерального метаболизма, транспортных систем, и гены, кодирующие белки с неизвестной функцией. Автор приводит обсуждение о возможной роли таких мутаций в формировании устойчивости.

В Главе 7 автор обобщает полученные результаты, проводит анализ собственных изысканий в рамках концепции траекторий эволюции устойчивости, рассматривая клональную эволюцию и формирование механизмов устойчивости.

В разделе Заключение подведен итог по проделанной работы, обобщены и проанализированы полученные данные.

Выводы, сформулированные автором, отражают результаты диссертационного исследования и соответствуют поставленным во введении задачам.

В работе даны рекомендации по использованию результатов диссертационного исследования.

В приложениях представлена дополнительная информация, касающаяся различных разделов диссертации.

Содержание автореферата отражает основные результаты диссертации.

Рекомендации по использованию результатов исследования. Результаты исследования могут быть рекомендованы для использования как в научно-исследовательских, так и в практических лабораториях системы здравоохранения при определении чувствительности к антибиотикам и расшифровки механизмов резистентности у *S. aureus*. Филогенетические подходы для анализа клональной популяции *S. aureus* могут быть полезными при расследовании вспышек стафилококковых инфекций, а также в мониторинге за распространением ИСМП, связанных с MRSA в лабораториях системы Роспотребнадзора. Полученные автором результаты могут быть

использованы при разработке лекций для студентов медицинских ВУЗов в рамках курсов общей и частной медицинской микробиологии.

Соответствие диссертационного исследования специальности 1.5.11. Микробиология. Объект изучения в исследовании – бактериальные культуры (коллекция штаммов) вида *S. aureus*. Предмет изучения – закономерности формирования устойчивости к антибактериальным препаратам. Методология – использование методов общей микробиологии в комбинации с молекулярно-генетическими методами исследования. Цели, задачи, полученные выводы полностью соответствуют паспорту специальности. Таким образом, тема диссертационного исследования, основные положения и выводы, представленные автором, соответствуют специальности 1.5.11. Микробиология.

Результаты, полученные в диссертационном исследовании, носят как практическую, так и теоретически-фундаментальную значимость, относящуюся к пониманию механизмов распространения и формирования устойчивости у одного из наиболее значимых клинических патогенов – *S. aureus*. Принципиальных и критических замечаний нет, однако в процессе ознакомления с диссертационной работой возникли следующие вопросы:

1. В разделе диссертации «3.1. Описание коллекции изолятов MRSA» автор относит изоляты, выделенные из носоглотки от больных с COVID-19, к группе внутрибольничных (HA-MRSA), требуется уточнение, какими критериями руководствовался автор?

2. Насколько правомерно использовать термины «гетеромутации» и «гомомутации» применительно к прокариотам? Автору следовало бы дать более детальное определение терминам «гетерорезистентность» и «гетеромутация».

3. Почему филогенетический анализ с расчетной оценкой времени дивергенции узлов и кластеров был выполнен не для всех доминирующих генетических линий, включенных в исследование?

4. В какой степени данные о накоплении мутаций в «нецелевых» генах в ходе экспериментов по селекции устойчивости к антибиотикам могут быть экстраполированы на процессы, происходящие при распространении эпидемических клонов *S. aureus* в стационарах и в популяции человека? Отмечаются ли какие-либо закономерности, связывающие накопление мутаций антибиотикорезистентности с изменениями в генах факторов патогенности или их глобальных регуляторов?

Заключение

Диссертационная работа Гостева В.В. на тему: «Популяционная структура *Staphylococcus aureus* и траектории эволюции устойчивости к антимикробным препаратам», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология, является законченной 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 30.07.2014г. №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.

Отзыв на диссертационную работу Гостева В.В. был обсужден и одобрен на заседании Ученого совета ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (протокол №4 от 25.04.2024г.).

Заместитель директора
по эпидемиологии
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
доктор медицинских наук



Подколзин Александр Тихонович

Подпись *А. Т. Подколзин*
заверяю
Ученый секретарь *Л. В. Железняков*
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3а. Тел. 8-495-672-10-69, e-mail: crie@pcr.ru