

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук **Мокроусова Игоря Владиславовича** 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. Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) способен вызывать широкий спектр возможных форм заболеваний. Смертность от инфекций, вызванных *S. aureus* в разное время всегда оставалась высокой, даже несмотря на внедрение новых антибактериальных препаратов. Наибольшую клиническую значимость представляют метициллин-резистентные *S. aureus* (MRSA). Популяционная структура MRSA имеет клональный характер, однако, существует географическая и эпидемиологическая зависимость. Изучение особенностей эволюционной истории клонов позволяют реконструировать отдельные этапы циркуляции и клональной экспансии. В частности, установлено, что ST8-USA300, главный эпидемический клон, циркулирующий на территории Америки, произошел от Европейских вариантов *S. aureus* в начале XX века. Клон HA-MRSA ST239, появившийся в 1930 – 1950 гг. и распространившийся на всех континентах в 1980-х гг., является гибридным вариантом, возникшим в результате слияния геномов двух генетических линий *S. aureus* – ST8 и ST30. Оба клона ST8 и ST239 длительно циркулируют на территории РФ, однако детали их эволюции и происхождения до конца не изучены. *S. aureus* способен вырабатывать различные стратегии уклонения от действия антимикробных препаратов – от устойчивости до формирования персистеров. Однако детали переключения фенотипов и особенности таких фенотипических изменений как «гетерорезистентность» и «толерантность» остаются до конца не изученными.

Таким образом, цель и задачи диссертационной работы являются актуальными и отражают современное состояние проблемы оценки чувствительности к антибиотикам, молекулярной эпидемиологии и стратегий уклонения от действия антимикробных препаратов одного из проблемных патогенов человека – *S. aureus*.

Научная новизна. Автором впервые предложены теоретические основы моделей эволюции клонов ST8 и ST239 на территории Российской Федерации. Выявлены черты сходства и различия с другими представителями глобально циркулирующих клонов ST8 и ST239. Полученные результаты будут полезны для эпидемиологического мониторинга за циркуляцией MRSA в РФ, а также для своевременного выявления изменений в популяционной структуре стафилококков. Впервые описаны клоны ST22 («Газа клон») и

ST59 («Восточно-Азиатский кластер»). Основная опасность OS-MRSA – это сложность корректной лабораторной детекции данного фенотипа, которая может привести к назначению неадекватной антибактериальной терапии.

Полученные автором результаты в ходе экспериментов устойчивости *in vitro* демонстрируют разнонаправленность мутационных путей (или траекторий эволюции), которые в разных условиях могут приводить к устойчивости или толерантности у *S. aureus*. Изменение фенотипа (приобретение устойчивости) под влиянием разных антибиотиков способствует изменению скорости роста. Полученные данные могут быть использованы для корректировки схем антибактериальной терапии. Для штаммов, полученных в ходе экспериментов селекции устойчивости *in vitro*, проведена процедура патентования. Изобретения относятся к медицинской микробиологии и могут быть использованы для разработки диагностических платформ.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений.

Цель исследования, задачи, результаты и выводы логичны и не противоречат существующим направлениям в области изучения микробиологии *S. aureus*. Используются соответствующие подходы, широко используемые в настоящее время в микробиологии и молекулярной биологии. Анализ и интерпретация результатов осуществлены с использованием адекватных методов статистики с порогом достоверности не выше 0,05. Приемлемое количество выборки изолятов, воспроизводимость результатов, наличие повторностей экспериментов говорят об обоснованности и достоверности научных положений и выводов.

Публикации научных трудов. Автором опубликовано 24 работы в рецензируемых изданиях, оформлено и получено пять патентов на изобретения, что в полной мере удовлетворяет требованиям ВАК к диссертациям на соискание степени доктора наук.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.

Внесение дополнений в существующие клинические рекомендации разделов по диагностике и лечению инфекционных заболеваний, вызываемых *S. aureus* касательно определения чувствительности к бета-лактамам антибиотикам, возможным путям формирования устойчивости при назначении ванкомицина или даптомицина.

Оценка содержания работы. Диссертация изложена по традиционному варианту и состоит из нескольких глав, включающих введение, обзор литературы, описание методологической части, описание полученных результатов, заключения, списка цитированных научных публикаций. Текст диссертации изложен на 333 страницах. Текст дополнен 54 рисунками, включающих схемы, диаграммы, результаты филогенетического анализа. Рисунки хорошо

читаемы, приемлемого текстового разрешения, имеются поясняющие подписи. Текст содержит 38 таблиц, список литературы включает 506 источников.

Во введение традиционно дана общая характеристика исследования, подчеркнуты актуальность и научная новизна, выделены цель и соответствующие задачи, приведена оценка значимости для науки и практики в целом.

Обзор литературы представлен лаконично и выполнен в стиле «state-of-the-art» проблематики золотистого стафилококка и вызываемых им инфекций.

Описание коллекции изолятов *S. aureus*, а также описание методов использованных в работе приводится во 2 главе. Автором были использованы различные культуральные методы исследования, включая селекцию устойчивости *in vitro*; полногеномное секвенирование и соответствующие методы биоинформатики для анализа полученных данных.

В 3 – 6 главах приводятся результаты исследования. Для коллекции собранных изолятов *S. aureus*, собранных в различных регионах РФ, в разное время из различного биологического материала была проведена оценка чувствительности к разным антибиотикам. Проведено молекулярное типирование с использованием разных схем типирования на основе которого автором выполнен сравнительный анализ чувствительности к антибиотикам у различных генетических линий. Выявлены особенности чувствительности к антибиотикам среди различных сиквенс-типов. Проведен анализ механизмов резистентности. Для анализа эволюции и особенностей геномной эпидемиологии основных описываемых сиквенс-типов проведен «анализ локальной и глобальной популяционной структуры доминирующих генетических линий». По результатам проведенных исследований выявлены взаимосвязи *S. aureus* с глобально циркулирующими клонами, выдвинуты гипотезы об импорте доминирующих клонов, сформулирована модель эволюции с оценкой возможного происхождения клонов, относящихся к ST8 и ST239. Результаты основаны на использовании нескольких подходов филогенетического анализа. Эксперименты по формированию устойчивости в условиях проведения лабораторных пассажей на средах с антибиотиками демонстрировали появление нескольких фенотипических и генотипических изменений. К устойчивости к антибиотикам можно отнести факт значительного увеличения МПК и выявления «целевых» мутаций. Так, были получены штаммы, устойчивые к ванкомицину, даптомицину, цефтаролину. К гетерорезистентности автор относит изменение соотношения чувствительных и устойчивых клеток в колонии или жидкой культуре, а также наличие смешанных нуклеотидных позиций в прочтениях с данных секвенатора («гетеромутации»). Толерантность автор описывает как «увеличение времени эффективного киллинга без изменения МПК». В работе приводится анализ влияния приобретения

устойчивости на чувствительность к другим антимикробным препаратам, а также на изменение скорости роста.

В главе 7 автор проводит обсуждение и сопоставляет полученные результаты с аналогичными исследованиями F. Vaquero, R. Lenski, R. Kishony и других исследователей.

В заключении суммированы все полученные результаты, выводы соответствуют задачам.

Соответствие диссертационного исследования специальности 1.5.11.

Микробиология. Диссертация Гостева В.В. соответствует паспорту специальности 1.5.11. Микробиология по следующим пунктам: использование подходов для оценки филогении и эволюционной изменчивости микроорганизмов; использование подходов сравнительного анализа геномов; объект исследования – бактериальный патоген человека и животных, имеющий важное медицинское значение.

Вопросы и замечания по диссертационной работе.

Принципиальных замечаний к работе нет, однако в процессе изучения диссертации возникло несколько вопросов:

1. В чем причины различия структур и доминирующих типов вне- и внутрибольничных популяций в России и в целом мире. Есть ли различия в причинах для разных стран?
2. Вопрос про цель и задачи работы – цель звучит как общая по глобальной популяции, но задачи конкретно по российским штаммам. Тот же вопрос про Положение на защиту 1 - речь о российской или глобальной популяции?
3. Откуда и как попал секвенс-тип из Газы в Российскую популяцию внебольничных штаммов? Есть ли подтвержденная информация или гипотеза?
4. С. 123 «Деление от общего предка на современные немецкие и российские MRSA-ST8 определяется 1931 ± 16 годом ($PP=1$). ... В настоящем исследовании геномы изолятов, максимально близкие к геномам из Германии, формировали отдельный кластер (зеленая ветка на рисунке – кластер III), который произошел от гипотетического предка в 1954 ± 10 году»
Где мог находиться географически этот общий предок? в Германии? как попал в Россию? Есть ли какая-то подтвержденная информация или гипотеза?
5. С. 134. «Как показывают филогеографические и молекулярно-эпидемиологические исследования [26, 367, 368], *S. aureus* ST239 не является монофилитической генетической линией, а представлен разными субклонами. ... можно сделать вывод, что в России циркулируют сразу несколько субклонов – это геномы изолятов Азиатского Ю.-В., Европейского и Евразийского кластеров.»

Строго говоря, одно не исключает другого и возможно, что монофилетическая группа состоит из субклонов, которые возникли в ходе ее распространения и эволюции. Рисунок 24 (с. 133) показывает, что ST239 действительно гетерогенный, но вполне монофилетический. В ином случае его вообще надо было бы исключить из классификации как научно не обоснованный.

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 представлены подходы к решению научной проблемы, связанной с геномной эпидемиологией и эволюционной изменчивостью золотистого стафилококка и имеющей важное практическое значение для системы здравоохранения страны. Диссертационная работа соответствует всем 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.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Федерального бюджетного учреждения 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,

Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14
Телефон: +7 (812) 6446380; e-mail: imokrousov@mail.ru

доктор биологических наук

Мокроусов Игорь Владиславович

Подпись И.В. Мокроусова заверяю

Ученый секретарь

/Г.Ф. Трифонова/

15.04.2024

