

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, главного научного сотрудника лаборатории молекулярной микробиологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский Университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации Чеботаря Игоря Викторовича 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 исследования

Устойчивость к антибиотикам является одной из наиболее серьезных проблем современной медицины, приводящей к высоким рискам негативных исходов инфекционных заболеваний, включая инвалидизацию и летальность. Особую озабоченность вызывает группа нозокомиальных патогенов ESKAPE, в которую входит золотистый стафилококк *Staphylococcus aureus*. Среди клинических изолятов особое внимание уделяется метициллин-резистентным стафилококкам (MRSA), которые проявляют устойчивость ко всем бета-лактамам антибиотикам. Расшифровка механизмов формирования устойчивости к антибиотикам, понимание особенностей клинической экспансии *S. aureus*, а также поиск возможных путей противодействия распространению этого патогена являются важнейшими научно-практическими задачами, стоящими перед медицинской наукой. В связи с этим, тема диссертационной работы Гостева В.В., посвященная исследованию молекулярной эпидемиологии и расшифровке механизмов антибиотикорезистентности *S. aureus*, является актуальной и значимой.

Научная новизна

В работе Гостева В. В. впервые дана детальная характеристика молекулярной эпидемиологии доминирующих генетических линий (клонов) внутрибольничных и внебольничных золотистых стафилококков,

циркулирующих на территории РФ. Выявлены особенности *S. aureus* в зависимости от их эпидемиологической опасности, в частности, среди внутрибольничных стафилококков установлена тенденция к снижению чувствительности к гликопептидным и липогликопептидным антибиотикам. Впервые в России описаны штаммы MRSA, характеризующиеся ложной чувствительностью к бета-лактамам антибиотикам, что может приводить к назначению неадекватной антибактериальной терапии. Впервые в моделировании антибиотикорезистентности *in vitro* установлено, что формирование устойчивости происходит через этап гетерорезистентности.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт Петербург. Научные положения, выводы и заключения, сформулированные в результате диссертационной работы В.В. Гостева, обоснованы и достоверны. В основе научных положений лежит тщательный анализ литературных данных и полученных автором результатов. Достоверность выводов основывается на исследовании более 800 культур золотистых стафилококков, относящихся к различным генетическим линиям. Исследование выполнено с использованием новейшего исследовательского оборудования, современных международных протоколов и стандартов исследований, касающихся оценки чувствительности и молекулярного типирования бактерий. Экспериментальные работы проводились с 2-3-х кратными повторами и включением необходимых контролей (референсные штаммы) для подтверждения полученных результатов. Статистическая обработка полученных данных проведена адекватно с использованием корректных методов статистического анализа.

Выносимые на защиту положения диссертации опубликованы в рецензируемых журналах, доложены на научных конференциях.

Публикации научных трудов и апробация результатов

Результаты работы обсуждались на 40 различных международных и всероссийских конгрессах, научно-практических конференциях в виде устных и постерных докладов. 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 и/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 пять патентов на изобретения.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы Гостева В.В., могут быть использованы в медицинской диагностике, в клинической фармакологии (корректировка существующих схем антибактериальной терапии), а также при разработке новых лабораторно-диагностических технологий. Полученные в ходе выполнения работы результаты молекулярной эпидемиологии могут быть использованы в эпидемиологическом мониторинге эволюции золотистого стафилококка на территории Российской Федерации.

Общая характеристика и содержание работы

Диссертация изложена на 333 страницах машинописного текста, построена по классической схеме и состоит из семи глав, включающих введение, обзор литературы, описание используемых методов исследования,

результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложений. Каждая глава заканчивается заключением, в котором обобщаются собственные результаты и результаты других исследований. Текст диссертации иллюстрирован 54 рисунками и содержит 38 таблиц. Библиографический список состоит из 506 цитируемых источников.

Во введении представлена общая характеристика работы. Актуальность исследования основана на клинической значимости *S. aureus* и растущей устойчивости к антимикробным препаратам, что определило цель и задачи исследования. Описаны теоретическая и практическая значимость полученных результатов, связь проведенного исследования с международными и Российскими программами по мониторингу антибиотикорезистентности и предотвращению распространения устойчивости к антибиотикам. Обоснована степень достоверности полученных результатов и личное участие автора в получении этих результатов, сформулированы положения на защиту.

В обзоре литературы проанализированы современные взгляды на клиническое значение, вирулентность, устойчивость к антибиотикам и глобальную популяционную структуру циркулирующих *S. aureus*. Описаны различные стратегии уклонения от действия антимикробных препаратов, которые реализует золотистый стафилококк, включая толерантность и гетерорезистентность.

Глава 2 содержит описание методов, использованных в исследовании, которые включали: микробиологические фенотипические, молекулярно-генетические, гено-инженерные, биоинформатические и статистические. Представлено описание экспериментов по адаптивной эволюции устойчивости с использованием нескольких стратегий получения устойчивых производных клонов *S. aureus*.

Глава 3 посвящена сравнительной оценке чувствительности к антибиотикам при помощи фенотипических методов. Представлено описание коллекции изолятов *S. aureus*, которая включала изоляты, собранные за

десятилетний период. Автор выделяет две группы метициллин-резистентных стафилококков: 1) нозокомиальные (HA-MRSA) и 2) внебольничные (CA-MRSA), собранные среди условно-здоровых носителей. Детально проанализирована чувствительность к бета-лактамам и гликопептидным антибиотикам, как основным препаратам, применяемых в клинической практике для лечения инфекций, вызванных золотистым стафилококком.

В главе 4 представлены результаты молекулярного типирования изолятов нозокомиальных (HA-MRSA) и внебольничных (CA-MRSA) стафилококков с использованием методов типирования стафилококковых *mec*-кассет (SCC*mec*), мультилокусного сиквенс-типирования (MLST), типирования стафилококкового протеина A (*sra*-типирование). Приводятся результаты сравнения чувствительности к антибиотикам у разных генотипов. Представлена подробная характеристика механизмов резистентности к бета-лактамам и гликопептидам среди клинических изолятов MRSA с использованием фенотипических и молекулярно-генетических подходов. Большой раздел посвящен сравнению фенотипической и генотипической характеристики изолятов, проявляющих чувствительность к оксациллину (OS-MRSA), несмотря на наличие гена *mecA*. Автором проведена сравнительная оценка чувствительности и специфичности разных лабораторных подходов для выявления фенотипа OS-MRSA. Результаты, полученные в данной главе, имеют прямое практическое значение, что и было отражено в описании практической значимости диссертационной работы.

В пятой главе автор, используя данные полногеномного секвенирования, проводит сравнительный филогенетический анализ доминирующих генетических линий, циркулирующих на территории России. При этом сравнение осуществлялось с использованием нескольких стратегий: сравнение геномов российских изолятов; сравнение геномов российских изолятов и геномов изолятов, циркулирующих в других странах, доступных в публичных международных депозитариях. На основе полученных результатов автор

предлагает модель эволюции генетической линии ST8. Детально охарактеризован «Газа клон» ST22 и выявлено восточноазиатское происхождение клона MRSA-ST59, впервые описанного на территории России.

В главе 6 представлены результаты экспериментального исследования адаптивной эволюции устойчивости *S. aureus* к бета-лактамам, ванкомицину, даптомицину с использованием стратегии ступенчатых пересевов на увеличивающихся концентрациях антибиотиков в среде с динамическим мониторингом изменения фенотипа и генотипа. Мутации в генах формирования устойчивости к бета-лактамам были верифицированы с помощью методов генной инженерии. Автор подчеркивает, что наряду с мутациями в целевых генах было обнаружено большое количество других мутаций в других генах, контролирующих различные метаболические пути бактериальной клетки.

Седьмая глава представлена обсуждением полученных результатов.

В заключении автор резюмирует основные результаты микробиологического, молекулярно-эпидемиологического и экспериментального исследования по селекции устойчивости.

Выводы отражают результаты диссертационного исследования и соответствуют задачам.

Соответствие диссертационного исследования специальности 1.5.11.

Микробиология

Диссертационное исследование Гостева В.В. соответствует следующим пунктам паспорта специальности: 1. Систематика и филогения микроорганизмов; 2. Эволюция микроорганизмов; 11. Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ; 12. Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности. Таким образом, диссертационная работа полностью соответствует специальности 1.5.11. Микробиология.

Вопросы и замечания

Возникшие в ходе рецензирования работы замечания касаются только отдельных грамматических погрешностей. Примером таких ошибок является написание слова «метициллинрезистентный» (стр. 20), которое в правильном варианте должно быть написано как «метициллин-резистентный» или «метициллинорезистентный».

Указанные замечания не принципиальны и не умаляют высокой оценки представленной работы.

При анализе содержания диссертации к диссертанту возникли вопросы:

1. Насколько корректно сравнивать антибактериальную активность равноценных концентраций антибиотиков (например, ванкомицина, стр. 222) в эксперименте и в организме человека (в сыворотке крови)?

2. Полученные диссертантом антибиотикорезистентные штаммы-мутанты демонстрировали снижение бактериального фитнеса (стр. 164, 175, 209). Можно ли на основании этого говорить о том, что распространение антибиотикорезистентности является полезным для клинической медицины?

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 представлено решение актуальной научно-практической проблемы, связанной с расшифровкой различных стратегий уклонения *S. aureus* от действия антимикробных препаратов. Представленные на защиту положения диссертации можно квалифицировать как научное достижение в современной микробиологии. Актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, полученные результаты и выводы диссертации соответствуют 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 № 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:

Главный научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России) (117997, г. Москва, ул. Островитянова, дом 1. Телефон: +7 (495) 434-14-22, e-mail: uchsovet@rsmu.ru)

Доктор медицинских наук  Чеботарь Игорь Викторович

«19» апреля 2024 года

Подпись Чеботаря Игоря Викторовича заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России) (117997, г. Москва, ул. Островитянова, дом 1. Телефон: +7 (495) 434-14-22, e-mail: uchsovet@rsmu.ru)

Кандидат медицинских наук,
доцент



Демина Ольга Михайловна