

РЕЦЕНЗИЯ

От доц. Виктория Стефанова Левтерова, д.м.,
зав.отдел „Микробиология” при НЦЗПБ, София,

На дисертационен труд представен пред научно жури, сформирано със заповед № 388/ 01.10.2018 г. на Директора на НЦЗПБ, за присъждане на образователната и научна степен „ДОКТОР” по научната специалност „Микробиология” – шифър 01.06.12. В област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика”. Професионално направление 4.3. „Биологически науки”

Тема на дисертационния труд: „Проучвания върху клоналното разпространение на полирезистентни бактерии в България чрез Мултилокусно ДНК секвениране”

Автор на дисертационния труд: Веселин Димитров Добринов, редовен докторант в Отдел Микробиология на Националния Център по Заразни и Паразитни Болести.

Научен ръководител: доц.Иван Иванов, дм

Представеният ми за официална защита дисертационен труд на тема „Проучвания върху клоналното разпространение на полирезистентни бактерии в България чрез Мултилокусно ДНК секвениране“ на Веселин Димитров Добринов ми дава основание да формулирам рецензията си както следва:

Актуалност на тематиката

Както е известно, бактериалните инфекции остават един от основните проблеми на общественото здраве в световен мащаб. Напоследък съществува тенденция за все по честа поява и разпространение на случаи с трудно лечими, полирезистентни бактериални щамове. През последното десетилетие антимикробната резистентност е сериозно предизвикателство и проблем в световен мащаб. Разпространени са многобройни клонове мулти-резистентни бактерии.

Важен проблем е също така и еволюцията на щамовете, характеризиращи се с множествена антибиотична резистентност на локално ниво. Тази еволюция отразява

селекционния натиск, който е упражнен върху микроорганизмите с прекомерната употреба на антибиотици.

Основна стратегия за ограничаване на развитието и разпространението на резистентност към най-често използваните групи антибиотици са: бързата идентификация на резистентните патогени, както и въвеждане на програми за надзор и проследяване промените и тенденциите в антибиотичната чувствителност сред клинично значимите микроорганизми.

Проследяването на основните тенденции в епидемиологията на видовете, най-често асоциирани с вътреболнични инфекции би прояснило основните моменти в еволюцията на антимикробната резистентност. Така се повишава и разбирането на механизмите за възникване и разпространение на успешни резистентни бактериални клонове. За да се разбере и проследи развитието на този проблем в медицината в световен мащаб, са необходими съвременни молекулярни епидемиологични изследвания.

Дисертационният труд на Веселин Димитров Добринов включва част от тези съвременни молекулярни епидемиологични изследвания. Основната насоченост на разработката е да се направят проучвания върху клоналното разпространение на полирезистентни бактерии в България. Проблемът е много актуален, важен и с голямо икономическо и социално значение, което определя дисертабилността на темата и предлага възможности за оригинални и приложни приноси.

Познаване на проблема

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели - увод, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и дискусия, изводи, приноси и литература. Написан е на 156 компютърни страници и е онагледен с 31 таблици и 19 фигури. Една част от тях са включени в раздели „Литературен обзор” и „Материали и методи” и подпомагат читателя при възприемане на текста. Книгописът включва 292 литературни източника. В него са включени чуждестранни и български автори. Висок процент от тях са след 2010 година, което подчертава неговата актуалност. Всички те изцяло кореспондират с поставените цел и задачи.

На базата на литературните източници използвани в дисертацията, докторанта е направил обстоен литературен **обзор** на 42 страници.

Материала който е включен в обзора е доказателство, че Веселин Добринов, добре познава поставения проблем. Литературният обзор е написан информативно и представя подходите на молекулярната епидемиология и приложението им при изследванията на микробната резистентност към антибиотици.

Описани са тенденциите за глобалното разпространение на антибиотичната резистентност - резистентни и полирезистентни щамове при патогенни микроорганизми. Също така са изтъкнати факторите, влияещи върху възникването на високите нива на резистентност към антибиотиците.

Разгледани са подробно молекулярните методи за анализ на полирезистентните патогенни микроорганизми (пулсовата гел електрофореза, полимеразна верижна реакция, полиморфизъм по дължината на рестриктазните фрагменти /RFLP/, мултилокусен анализ на променлив брой тандемни повторения /MLVA/, амплификация на рестриктазни полиморфни фрагменти /AFLP/ както и мулти локусно секвениране /MLST/.

Докторанта е засегнал и проблемите при получаване на статистически достоверни резултати в хода на тези изследвания.

В литературния обзор са засегнати и подходите за секвениране от „ново поколение” (NGS) и целогеномното секвениране (WGS).

По подробно са разгледани приложението на Мултилокусното ДНК секвениране (MLST) при Грам- отрицателни и Грам- положителни патогенни микроорганизми. Представени са данни на тези изследвания в България. Изяснен е принципът на метода, възможностите за типизиране и приложението му.

Въз основа на този задълбочен анализ е изведена и целта на настоящата дисертация, а именно изпитване и въвеждане на актуализирани схеми за типизиране на базата мултилокусно ДНК секвениране (MLST) при някои от най-значимите видове поли-, екстензивно и пан- резистентни бактерии в България.

Въз основа на поставената цел са формулирани и 8 задачи, които очертават конкретните стъпки за изпълнение на целта на разработката.

Разделът „Материали и методи“ е информативен и методически издържан.

Изследвани са общо 36 щама, от които 14 *Klebsiella pneumoniae* и 2 щама *Citrobacter freundii*, 9 щама *Pseudomonas aeruginosa* и 11 щама *Enterococcus faecium*, специално подбрани да съдържат гени за разнообразни типове карбапенемази, като някои са

били резистентни на аминогликозиди и полимиксини. Изследваните щамове *E. faecium* са подбрани с *van* гени за резистентност към ванкомицин. Всички изследвани изолати са мултирезистентни (MDR), екстензивно резистентни (XDR) или панрезистентни (PDR). Щмовете са част от колекцията на Националната референтна лаборатория по „Контрол и мониторинг на антибиотичната резистентност“ към НЦЗПБ и са изолирани от 12 болници, функциониращи в различни райони на България.

За реализиране на поставените задачи, както е видно от раздела, докторанта е усвоил и приложил подходящи методи. В разработката са използвани, както класически микробиологични методи при изпитване антимикуробната чувствителност на изследваните щамове, така и доста молекулярни и биоинформатични методи, които са описани много подробно в раздела с включено подробно описание на протоколите. Вижда се едно добро ниво и методична подготвеност, с използване на голямо разнообразие от методики.

Постигнати са важни и съществени резултати, представени и обсъдени на 42 страници. Илюстрирани са с 19 фигури и 13 таблици. Описанието на резултатите е точно и ясно и е направено на добър научен език.

Резултатите са представени в няколко раздела, като следват последователността на поставените задачи.

В първия раздел е представено предварителното охарактеризиране и подбор на щамовете за генотипизиране. Докторанта е направил молекулярно-генетичен анализ чрез мултиплексен Real-time PCR комбиниран с капилярна електрофореза на някои детерминанти на придобита резистентност. Доказани са карбапенемази при щамове от разред *Enterobacteriales* и *P.aeruginosa*, проучена е плазмидно-медирана резистентност към полимиксини (*mcr-1*) при *K. pneumoniae* и *P.aeruginosa*. Доказани са механизмите за резистентност към гликопептиди (*van* генотип) и високо ниво на аминогликозидна резистентност при изследваните *Enterococcus faecium*.

Във втория раздел са описани резултатите от проведения *in silico* биоинформатичен анализ, който е направен за да се намерят най-подходящите двойки праймери за прилагане на мултилокусното секвениране (MLST) за типизиране на изследваните бактерии.

Интерес представляват описаните изследвания и резултати в третия раздел за оптимизиране на MLST- протоколите при изолати от *Citrobacter freundii*, *P. aeruginosa* и *E. faecium*, чрез коригиране на секвенциите на праймерите, и въвеждане на

универсални секвенционни опашки, което значително е намалило времето за провеждане на експериментите и риска от грешки. Намален е и обема на реакционните смеси за секвениране, като успешно е намерено правилното съотношение с което е намалена значително себестойността на реакциите за секвениране. Считаю, че това е съществен и оригинален принос в дисертацията на докторанта.

В четвъртия и шести раздел са представени експерименталните резултати за генотипизирането на *Klebsiella pneumoniae* и *P. aeruginosa*. Докторанта установява, че при *K. pneumoniae* RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) метода не дава достатъчно ясни и прецизни резултати. Най-коректни данни се получават с MLST - анализа. MLVA анализът е сравним по дискриминационна способност при типизирането на гени и съответни секвенционни типове, като тези получени при MLST анализа, поради това при щамове на *P. aeruginosa* е отпаднал RAPD метода и те са изследвани само с MLVA и MLST.

Докторанта доказва, че доминиращ тип в страната за резистентните към всички бета-лактамни антибиотици, притежаващи гени за различен клас карбапенемази е ST11. Интересен е факта, че разпространението му се свързва само със болниците в столицата. Също така се открива за първи път в България щам *K. pneumoniae* с клас D карбапенемаза (**OXA-48**), който е със секвенционен тип ST530 (MDR). Този секвенционен тип е изключително рядко срещан в световен мащаб. В хода на работата е доказано, че преобладаващата част от изследваните секвенционни типове на резистентни и мултирезистентни щамове на *K. pneumoniae* принадлежат към клонален комплекс - CC17. Секвенционният тип, който дава названието на целия комплекс е един от основните причинители на вътреболнични инфекции в световен мащаб.

При изследваните чрез MLVA и MLST щамове *P. aeruginosa* се доказва, че се разпределят в 4 различни генотипа, като 6 от тях са филогенетично много близки, т.е. те имат общ произход, а един от тях се различава съществено. Доказва се, че секвенционният тип ST233 е най-разпространен в болниците в нашата страна. За него е известно по литературни данни, че той е един от най-често изолираните и в световен мащаб от болнични заведения.

Секвенционният тип, който се различава съществено от останалите е ST111. Той е от щам *P. aeruginosa* 2232 изолиран в Стара Загора, който е панрезистентен и устойчив на 7 групи антибиотици, включително и колистин. Този секвенционен тип е един от трите най-широко разпространени у нас и причиняващ най-голям брой вътреболнични инфекции, както у нас така и по света.

В пети раздел са представени експерименталните резултати за MLST анализ на два щама на вид *Citrobacter freundii*. Установени са секвенционни типове: за щам *C. freundii*

ST21 и ST63. При направеното сравнение с базата данни на MLST е установено, че те се срещат рядко. Поради ниската степен на причиняване на вътреболнични инфекции, докторанта установява, че регистрираните изолати с тези секвенционни типове са малко и не могат да послужат за тяхната характеристика.

В седми раздел са представени експерименталните резултати за молекулярно-таксономичното типизиране на ванкомицин резистентни щамове ентерококи (VRE). Докторанта доказва, че всички щамове притежават ген за ванкомицинова резистентност - *vanA*. Част от тях са изолирани от епидемия, възникнала в болница в страната. Чрез пулсова гел електрофореза (PFGE) са определени 6 пулсотипа, като са доказвани близки филогенетични връзки между повечето от тях. Групирани са в т.нар. Пулсотип1. Чрез MLST анализ се установява наличието на еднакъв секвенционен тип - ST203. Резултатите ясно показват, че тази група щамове е доминираща при възникналата епидемия.

Чрез MLST са изследвани и ванкомицин резистентни *Enterococcus faecium*, изолирани от болница в Плевен. Установени са 6 секвенционни типа, принадлежащи към клонален комплекс CC17, сред които отново доминира ST203.

Докторанта на базата на проведените анализи прави важно заключение, че щамове от този тип са основни причинители на вътреболнични инфекции за България, като успешно се приспособяват и изместват щамове с други секвенционни типове и към края на 2015-та година се отчита, че близо 90% от регистрираните ентерококови инфекции са причинени от щамове със ST203.

Дисертационният труд на Веселин Добринов приключва със Заключение, в което са обобщени резултатите от MLST за най-рисковите типове *K. pneumonia*, *P. aeruginosa* и *E. faecium* - причинители на вътреболнични инфекции в България. Той изказва мнение за необходимостта от бъдещи проучвания в тази насока и въвеждането на адекватни мерки за ограничаване развитието и разпространението на антимикробната резистентност в страната.

В обобщение разделът „Резултати и дискусия“ е написан компетентно, илюстриран и документиран е много добре. Видно е познаването на проблема от докторанта в световен мащаб.

Изводите са коректно формулирани и обобщават основните акценти в работата. Дисертанта представя седем научно-теритични приноса с оригинален характер и три научно-приложни приноса с които съм напълно съгласна.

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 5 статии в реферирани научни списания, и една в нереферирано научно списание.

Данните са представени също така и с 3 постера в 1 международен конгрес, 2 доклада в два конгреса на БАМ и 1 доклад в Национална докторантска конференция. Трябва да се подчертае, че в три от публикациите си Веселин Добринов е първи автор, което е доказателство, че той има личен принос и основно участие за тяхното осъществяване.

В заключение, дисертационният труд на Веселин Добринов отразява високо професионално ниво на извършените изследвания, той е иновативен и с научно и приложно значение.

Поради гореизложеното считам, че рецензията на дисертационен труд отговаря напълно на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Р. България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото приложение и Правилника на НЦЗПБ за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“.

Давам положителната си оценка и подкрепям присъждането на образователната и научна степен „Доктор“ по научна специалност Микробиология на Веселин Добринов.

11.06.2019 г.

Рецензент:



доц. Виктория Левтерова, дм