



До

Председателя на Научното жури,
определено със Заповед № 388/01.10.2019г.
на Директора на НЦЗПБ

СТАНОВИЩЕ

По процедура за защита на дисертационния труд на Веселин Димитров Добринов, за присъждане на образователна и научна степен "Доктор", в област на висшето образование: 4. „Природни науки, математика и информатика“, направление 4.3. „Биологически науки“, по научна специалност "Микробиология".

от Доц. Д-р Иванка Илиева Гергова, д.м., Ръководител на Катедра „Военна епидемиология и хигиена“ и на Лаборатория „Микробиология“, Военномедицинска академия, София, външен член на Научното жури, определено със Заповед № 388/01.10.2018г. на Директора на Националния център по заразни и паразитни болести.

Тема на дисертационния труд: „Проучвания върху клоналното разпространение на полирезистентни бактерии в България чрез Мултилокусно ДНК секвениране, с научен ръководител Доц. Иван Иванов, д.м. и научен консултант Проф. Д-р Стефана Събчева, д.м.

Настоящото становище е изготовено в изпълнение на Заповед № 388/01.10.2018г. на Директора на Националния център по заразни и паразитни болести, гр. София. Представените материали по процедурата изцяло отговарят на изискванията на Закона за развитието на академичния състав на Република България и Правилника за прилагане на ЗРАСБ на Националния център по заразни и паразитни болести, гр. София, за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“.

Устойчивата световна тенденция към нарастване на антимикробната резистентност, наблюдавана през последните десетилетия е основна причина за силното ограничаване на възможностите за адекватно терапевтично повлияване, особено инфекции, при свързани с медицинското обслужване. В дефинирания от СЗО приоритетен списък с патогени, в I-во приоритетно ниво, патогени с критичен статус са включени патогени, изолирани с висока честота в големите болнични заведения в България, като *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, разред

Enterobacteriales. Също често се изолират и включените във II-ро ниво патогени, от същия списък – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*.

Молекулярната епидемиология надгражда традиционните епидемиологични методи, ползвайки се от възможностите за прилагане на съвременните техники за молекулярно типизиране. Анализът на генетичната структура на бактериите предоставя възможности за изследване на геномната организация и еволюция, които приложени в идентификацията на инфекциозните причинители прави възможно проследяването на пътищата за разпространение на инфекциите.

В този аспект считам, че разработената от Веселин Добринов тема „Проучвания върху клоналното разпространение на полирезистентни бактерии в България чрез Мултилокусно ДНК секвениране“ е особено актуална за страната, както в теоретичен, така и в приложен аспект за здравната система в България. Също така, има важно значение за уточняването на някои детайли в патогенезата и вирулентните свойства на мултирезистентните бактерии.

Дисертационният труд е написан на 156 стандартни страници и е структуриран по общоприетата схема: увод – 3 стр., литературен обзор – 47 стр., цел и задачи – 1 стр., материали и методи – 29 стр., резултати и обсъждане – 43 стр., заключение – 5 стр., изводи – 1 стр., приноси – 1стр. Заглавието точно отразява същността на разработваната тема. Дисертационният труд е онагледен оптимално с 31 таблици и 19 фигури. Литературната справка отразява съвременните проучвания и съдържа 292 заглавия, като 79 от тях са публикувани през последните пет години. Литературният указател на цитираните източници не включва заглавия на кирилица.

Обзорът на литературата е изчерпателен и отразява съвременното състояние на проблема. Написан е компетентно, на високо научно ниво и е изграден въз основа на впечатляваща литературна справка. Позовавайки се на достоверни източници са обобщени глобалните тенденции в разпространението на антимикробната резистентност, като са анализирани основните рисковите фактори за разпространение на полирезистентните патогени в болничните заведения.

Извършен е и подробен преглед на литературните източници по отношение на молекулярногенетичните методи, прилагани за анализ на полирезистентни патогени, като е акцентирано върху най-съвременните варианти на генетичните техники. Предоставената информация е анализирана с оглед възможностите на разгледаните

методи за откриване на гени, свързани с резистентността и за установяване на взаимовръзките между отделните щамове, причиняващи инфекции, свързани с медицинското обслужване. Важен елемент е анализът на техническото изпълнение и стойността на извършваните изследвания, което подсказва детайлно познаване на практическите проблеми при изпълнението на описаните техники.

Анализът на литературните данни естествено води към прецизно формулиране на целта на дисертационния труд и набелязаните задачи за нейното постигане. Добринов си поставя за цел да изпита, актуализира и въведе в практиката схеми за типизиране някои от най-значимите видове поли-, екстензивно и пан-резистентни бактерии в България, на базата Мултилокусно ДНК секвениране (MLST). Поставените осем задачи са формулирани целенасочено и в необходимия обем.

Материалите и методите са представени много изчерпателно. Прилаганите протоколи са описани подробно и прецизно. Начинът на представяне на отделните техники показва добрата методична подготвеност на докторанта.

Резултатите от проведените собствени изследвания са представени и обсъдени на 43 страници, като са илюстрирани богато с 19 фигури и 31 таблици. Предвид обема на извършените изследвания, описанието на резултатите е направено стегнато и информативно. Получените резултати и проведеното обсъждане е представено в 7 раздела, които следват логичната последователност на поставените задачи.

В работата по темата са включени щамове *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterococcus faecium*. Изследваните общо 36 щама са подбрани така, че да дадат цялостен поглед върху водещите проблемни патогени в страната – изолирани са от 12 болнични заведения от различни райони на страната. Извършените изследвания доказват, че всички включени изолати са мултирезистентни (MDR), екстензивно резистентни (XDR) или панрезистентни (PDR).

Подбрани са най-подходящите праймерни двойки за прилагане на мултилокусното секвениране (MLST) за типизиране на бактериалните щамове посредством *in silico* биоинформатичен анализ.

Съществен оригинален принос са актуализираните протоколи за провеждане на MLST при изолати *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterococcus faecium*, чрез коригиране на секвенциите на праймерите, както и въвеждане на универсални секвенционни опашки. Описаните подобрения значимо намаляват

времето за провеждане на експеримента, снижават риска от грешки и финансовия разход. Извършените експерименти върху щамовете *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* доказват, че MLST – анализа дава по-прецизни резултати и сравними данни, в сравнение с метода RAPD. Чрез MLST анализ са изследвани и два щама *Citrobacter freundii*. Въз основа на извършените експерименти са определени секвенционните типове и е направен анализ на принадлежността им към установените в други географски области секвенционни типове. Прави впечатление, че всички резултати са подробно анализирани и сравнени с голям брой проучвания от всички континенти и обсъдени в контекста на разработваната тема.

Важен елемент от разработката са проучванията върху изолати *Enterococcus faecium*, събрани в условия на епидемия в българска болница. При изследваните и анализирани 42 щама *Enterococcus faecium*, Добринов установява, че всички щамове са носители на ген за резистентност към ванкомицин – vanA. Прилагайки PFGE той определя 6 пулсотипа и ясно доказва близките филогенетични връзки между 36 от тях (групирани в Пулсотип 1). Посредством MLST анализ, Добринов установява наличието на еднакъв секвенционен тип за цитираната група щамове, а именно ST 203. Извършените изследвания категорично определят групата като доминираща при възникналата епидемия. Подробното проучване на генетичните характеристики при анализираните щамове *Enterococcus faecium*, дава възможност да бъде направено заключение относно водещата роля на ST203 сред причинителите на инфекции, свързани с медицинското обслужване в страната.

В раздела Заключение, са обобщени получените данни от извършените изследвания, които охарактеризират детайлно проучените щамове, причинители на инфекции, свързани с медицинското обслужване.

На базата на получените резултати, Добринов формулира общо 8 извода, които отговарят на поставените цел и задачи. Получени са общо 10 съществени приноса - 7 с оригинален характер и 3 с потвърдителен, по-важните от които могат да се обобщят по следния начин:

Приноси с оригинален характер:

- Конструирани са и са валидирани нови праймерни двойки за провеждане на MLST при *C. freundii* (при гени aspC, clpX и fadD) и *E. faecium* (при гени adk, atpA, gdh, gyd, purK, pstS), повишаващи повишават типабилността на метода;

- Определени са секвенционните типове на 14 щама български екстензивно резистентни *K. pneumoniae*, продукенти на карбапенемази от типовете NDM-1 (7), KPC-2 (5), VIM-1 (1) и OXA-48 (1), три от които с резистентност и към колистин;
- Установени са секвенционните типове на два екстензивно резистентни щама *C. freundii*, продуктиращи карбапенемази VIM-4 и OXA-48;
- Чрез MLST са определени секвенционните типове на един пан-резистентен и 8 екстензивно резистентни щама *P. aeruginosa*, продуктиращи различни варианти на карбапенемаза VIM;
- Установени са секвенционните типове на 11 щама *E. feacium*, резистентни към ванкомицин, изолирани при нозокомиален взрив в множество отделения на едно болнично заведение;
- За първи път в страната е изолиран и охарактеризиран генетично пан-резистентен щам *P. aeruginosa* ST111;
- Определен е доминантният секвенционен тип *E. feacium* при епидемичен взрив в областна болница – ST203.

Приноси с научно-приложен характер:

- Въведени са универсални праймерни опашки, позволяващи провеждането на метода при унифицирани условия, което е свързано с намаляване на разходите, вероятността от системни грешки и времето за провеждане на MLST анализа;
- Валидирани са и са въведени достъпни и евтини методи за пречистване на продукти от амплифицираща и секвенираща PCR, което драстично редуцира разходите за провеждане на MLST метода;
- Модифицирани са и са въведени MLVA методи за типизиране на щамове *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*.

Значимостта на постигнатите резултати се илюстрира с приложения списък с общо шест публикации в български научни списания, пет от които на английски език. В три от публикациите, включени в приложения списък, Добринов е първи автор, което говори за водещата му роля в извършените изследвания, както и за способността му за работа в екип. Резултати от извършените проучвания, Добринов е представил на шест научни форума, три от които на значим международен форум.

В заключение, представеният ми за становище дисертационен труд представлява широко мащабно проучване върху много актуална тема, с добра теоретична основа, извършено с многообразие от съвременни молекуларно-генетични методи. Получените резултати изпълняват напълно поставените конкретни задачи,

поради което приемам, че целта на дисертационния труд е постигната. Резултатите са обсъдени задълбочено, а формулираните приноси са лично дело на дисертанта.

Считам, че едно от съществените достойнства на дисертационния труд е уточняването на част от интимните механизми на резистентност към антимикробни средства при проблемни болнични изолати, което е изключително важно за оптималното лечение на причинени от тях инфекции. Получените резултати кореспондират с набелязаните проблеми от анализа на литературния обзор и допринасят за изясняване на важни детайли по отношение на подходите за ограничаване на разпространението на резистентността към антимикробни средства. Добаването на правилна представа за възможните варианти на мултирезистентни патогени в страната е от несъмнено значение за правилния терапевтичен подход и има пряко отношение към изграждането на насоки за определяне на подходяща емпирична терапия при хоспитализираните пациенти.

Приемам, че по структура, съдържание и обем представеният дисертационен труд покрива всички нормативни изисквания и на Правилника за прилагане на Закона за развитието на академичния състав на Република България на Националния център по заразни и паразитни болести, гр. София, за присъждане на образователна и научна степен "Доктор".

Преценявайки обоснованите изводи на дисертацията и направените приноси, с пълна убеденост давам положителна оценка и предлагам на членовете на научното жури да гласуват положително за присъждане на образователна и научна степен "Доктор" по научна специалност "Микробиология" на Веселин Димитров Добринов.

11.06.2019г.

София

Рецензент:

Доц. д-р Иванка Илиева Гергова, д.м.