

НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР
ПО ЗАРАЗНИ И
ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

Изх. №

20...
Вх. № *МУ8/12 с 06/19*

бул. "Янко Сакъзов" № 26
София 1504, тел: 9446999

ДО ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА НАУЧНОТО
ЖУРИ, НАЗНАЧЕНО СЪС ЗАПОВЕД
№388/ 01.10.2018г. на Директора на НЦЗПБ

СТАНОВИЩЕ

относно процедура за придобиване на ОНС „Доктор“ с кандидат Веселин Димитров Добринов, редовен докторант в НЦЗПБ, в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, по научната специалност „Микробиология“

Тема на дисертационния труд: „ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ КЛОНАЛНОТО РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ПОЛИРЕЗИСТЕНТИ БАКТЕРИИ В БЪЛГАРИЯ ЧРЕЗ МУЛТИЛОКУСНО ДНК СЕКВЕНИРАНЕ“

Изготвил рецензията: Доц. Иван Николаев Иванов, дм завеждащ Национална референтна лаборатория по контрол и мониториране на антимикробната резистентност, отд. Микробиология, Национален център по заразни и паразитни болести

Представените документи по процедурата са изгответи коректно и в съответствие със Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и правилника за прилагането му в НЦЗПБ.

Актуалност на темата. Мултирезистентността се счита за ключов индикатор за проблемни бактериални щамове, тъй като от една страна компрометира емпиричните схеми за лечение, забавяйки прилагането на подходяща антибиотична терапия, а от друга драстично намалява опциите за подходяща терапия. И двата фактора допринасят за увеличаване на смъртността и ограничаването на появата и разпространението на мултирезистентни щамове се счита за приоритет при контрола на инфекциите. Независимо от това, само до преди 5-10 години, липсваше строга дефиниция за термина „мултирезистентност“, което бе свързано със противоречивата му употреба в литературата.

Известно е, че мултирезистентните бактерии са реципиенти на разнообразни генетични елементи (гени, интегрони, транспозони и плазмиди), които на практика обуславят фенотиповете на антибиотична резистентност. „Успешният“ бактериален щам представлява изключително ефективно средство за разпространение на тези елементи по най-малко две причини: първо, всички резистентни елементи се предават вертикално посредством разпространението на щама и нарастващото му превалиране; второ, успешният щам действа като донор и може да пренася своите резистентни елементи хоризонтално към други щамове, видове или родове.

Проучвания на мултирезистентността се налагат, особено когато е налице епидемичен взрив в болниците, но напоследък и в общността, и това обикновено води до молекулярно-епидемиологичен анализ на бактериите-причинители и техните гени на резистентност. Доказването на преобладаващ или успешен мултирезистентен щам или клон, обикновено води след себе си допълнителни въпроси: например дали щама наистина е новопоявил се, или пък представлява успешен резидентен щам с по-чувствителен фенотип, който наскоро е придобил нови механизми на резистентност чрез селективен натиск. Тези възможности често са трудни за разграничаване, тъй като напълно чувствителните на антибиотици бактерии привличат по-малко внимание, което осуетява опитите да се разгледат резистентните щамове в контекста на популационната биология на даден вид. Съществуват доказателства, които показват, че при многократни идентични третирания, определени клонове на гостоприемника придобиват сходни гени за резистентност и че еволюцията прецизира тези асоцииации, за да поддържа или увеличава общия виталитет и издръжливост на бактериите (от англ. fitness).

През последните 15 години, в следствие на свръхупотребата на широкоспектърни цефалоспорини и карбапенеми, станахме свидетели на рязко пандемично разпространение карбапенемаза продуциращи клонове. Отчитайки проблема като глобална заплаха, СЗО в категоризира карбапенем резистентните *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и раз. *Enterobacteriales*, в групата с най-висок приоритет, за които спешно се изискват нови терапевтични средства. В България проблема ескалира през последните пет години, като според националната система за надзор на антимикробната резистентност БулСтар, карбапенемната резистентност сред *A. baumannii* е вече над 70%, при *P. aeruginosa* е 12%.,

а при раз. *Enterobacteriales* е около 5%. Щамовете с екстензивна резистентност вече не са рядкост в българските болници, а през последните години се докладваха и първите панрезистентни изолати.

Проучванията върху клоналната структура на тези щамове са едва в начален стадии и са необходими много повече усилия за проследяване връзките и механизмите на разпространение.

Предвид изложеното считам, че тема е актуална и с важно значение за здравеопазването в България.

Структура на дисертационния труд. Дисертационният труд е написан по общоприетата схема на 156 страници, включва стандартните глави и 19 фигури и 31 таблици. Библиографията съдържа 292 източника, като 79 от тях са публикувани през последните пет години.

Литературният обзор е написан на стегнат научен стил и предвид мащабната тема, представя кратко и същевременно изчерпателно най-важните аспекти на молекуларната епидемиология в контекста на антибиотичната резистентност. Разгледани са в хронологичен ред молекуларно-генетичните методи за типизиране, като е акцентирано върху ДНК секвенирането и най-новите технологии базирани на новогенерационно секвениране с техните предимства и недостатъци. По-нататък са описани различните схеми на MLST при видовете обект на работата и някои други значими бактерии. В заключителната част на обзора са разгледани досегашните проучвания по темата в страната, и са обобщени настоящите предизвикателства и проблеми, насочвайки читателя към целта на дисертацията.

Цел и задачи. Целта и осемте основни задачи са прецизно формулирани, отразявайки същността на дисертационния труд.

Материали и методи. В работата по темата са включени мулти, екстензивно и панрезистентни щамове *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterococcus faecium*. Усвоен и приложен е разнообразен, огромен по обем комплекс от съвременни молекуларно-генетични методи като например PCR, мултиплекс PCR, Real-

time PCR, пулсова електрофореза, ДНК секвениране и др. Протоколите са детайлно описани и позволяват тяхното възпроизвеждане в други лаборатории.

Резултатите и обсъждането са обединени в общ раздел, което в значителна степен улеснява проследяването на множеството проведени експерименти, получените резултати и следствията от тях. Логично, първо са установени основните генетични детерминантни на мулти-резистентност, а при ентерококите и някои гени обуславящи повишена вирулентност. Докторантът изпитва и анализира при всеки от изследваните видове модификации на няколко от класическите генетични методи (RAPD, MLVA и PFGE) базирани на фрагментен анализ и фингърпринтинг, при което установените недостатъци насочват към прилагането на по-прецизния MLST анализ. Експериментално е установено, че публикуваните в литературата MLST протоколи се оказват неефективни за всички изследвани щамове, което се потвърждава и от извършения *in-silico* анализ в GenBank. В резултат, Добринов извършва редица модификации, както и цялостен редизайн и валидиране на нови праймерни двойки за проблемните гени, което е едно от достойнствата на работата. Допълнително са изпитани и въведени бързи и достъпни методи за пречистване на PCR продуктите, което намалява драстично иначе значителните разходи за провеждането на MLST.

С новите протоколи са установени преобладаващите секвенционни типове при мултирезистентни щамове *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *P. aeruginosa* и *E. faecium* от различни ЛЗ в страната и е определена принадлежността им към високо – рискови световни епидемични клонове. Така при *K. pneumoniae*, продуцентите на NDM-1 карбапенемази се асоциират с ST11, докато KPC-2 предимно с ST258 и ST15, всички принадлежащи към високо рисковия CC11. При VIM продуциращите *P.aeruginosa* се очертава доминиращ клон ST233, докато панрезистентния щам е докладван като ST101. Детайлно са охарактеризирани изолати VRE от продължителен взрив в университетска болница, като очевидно основния епидемичен клон е ST203 (CC17), характеризиращ се с висок адаптивен потенциал и разпространен в повечето отделения.

Считам , че осемте извода са коректно формулирани и обобщават основните акценти в работата.

Дисертантът представя **седем оригинални и три научно-приложни приноса**, които смяtam за реални.

Представени са общо шест публикации по темата. Пет са в реферирано списание, като в три от тях, Добринов е първи автор и шест участия в научни форуми (три от които в престижен международен конгрес).

В заключение считам, че дисертационният труд представлява съвременна разработка върху един много актуален проблем, резултатите от който притежават безспорна теоретична и практическа стойност.

На базата на изложеното, считам че Веселин Добринов напълно изпълнява критериите за придобиване на ОНС Доктор и давайки своя положителен вот, предлагам на уважаемите членове на научното жури да одобрят кандидатурата му.

Дата: 11/06/2019

Изготвил становището:.....


/Доц. Иван Иванов/