

НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР  
ПО ЗАРАЗНИ И  
ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

Изх. № ..... 20.... г.  
Вх. № *МУ7/д.06.196*  
бул. "Янко Сакъзов" № 26  
София 1504, тел: 9446999

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Стефана Донева Събчева, д.м.,  
член на научното жури определено със заповед № 388/01.10.2019 г. на Директора на  
Националния център по заразни и паразитни болести

Относно: дисертационен труд на тема „Проучвания върху клоналното разпространение  
на полирезистентни бактерии в България чрез Мултилокусно ДНК секвениране“ за  
присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по научна специалност 01.06.12  
Микробиология

от Веселин Димитров Добринов, редовен докторант в отдел  
Микробиология на НЦЗПБ

с научен ръководител: доц. Иван Николаев Иванов, дм

Антибиотичната резистентност е проблем от световна значимост. Липсата на нови антибиотични препарати в комбинация с нарастващата честота на инфекциите, причинени от екстензивно и панрезистентни микроорганизми, насочи усилията към разработване на рестриктивни политики за предписване на антибиотици и към увеличаване на данните и знанията за антибиотичната резистентност посредством усъвършенстването на методите за надзор и мониторинг. Проучването филогенетичните връзки при разпространението на особено адаптивни мултирезистентни бактериални клонове с глобално значение се счита за един от най-ефективните съвременни подходи за надзор на антибиотичната резистентност. Това налага внедряване на нови методи и оптимизиране на наличните техники, за да може да се ограничи разпространението и епидемиологичната способност на тези щамове. Проследяването на основните тенденции в епидемиологията на видовете, най-често асоциирани с вътреболнични инфекции би изяснило основните моменти в еволюцията на антимикробната резистентност и повиши разбирането на механизмите за възникване и разпространение на успешни бактериални клонове. Всичко това обуславя актуалността на дисертационния труд и необходимостта от проведените молекулярни епидемиологични проучвания върху клоналното разпространение на полирезистентни микроорганизми в България чрез мултилокусно ДНК секвениране.

Дисертацията е написана на 156 страници и е структурирана по общоприетата схема със съразмерно разпределение на текста в отделните раздели. Изложението е

оптимално илюстрирано с 50 прецизно изработени нагледни материали (31 таблици и 19 фигури). Библиографията включва 292 литературни източника, които показват добрата литературна осведоменост на дисертанта и отразяват хронологията и съвременното състояние на проблема у нас и в световен мащаб.

Литературният обзор е изчерпателен, като включва необходимата като обем и анализ информация за молекулярната епидемиология при изучаване на микробната резистентност, като детайлно и критично са представени използваните молекулярни техники. Подробно са описани секвенционните методи за типизиране с техните предимства, недостатъци, сфери на приложимост и логично се извежда на преден план мултилокусно секвениране (MLST), като най-дискриминативния популационен метод, който дава най-много информация за еволюционното и епидемиологичното развитие на изследваните патогенни микроорганизми.

Систематично и задълбочено авторът подхожда към набелязаните задачи в съответствие с целта на дисертационния труд: изпитване и въвеждане на актуализирани схеми за типизиране, основани на мултилокусното ДНК секвениране (MLST) при някои клинично значими микроорганизми с множествена резистентност в България.

За провеждане на изследванията са използвани класически микробиологични и голям набор съвременни молекулярно-генетични методи за фенотипно и генотипно характеризиране на проучваните микроорганизми, за определяне на генетичните механизми на придобита резистентност и тяхното типизиране.

Извършена е значителна по обем и разнообразна по характер изследователска работа. Получените резултати и тяхното обсъждане следват стриктно поставените задачи. Установено е, че: (1) Всички щамове *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* и *Pseudomonas aeruginosa* са продуценти на карбапенемази, а част от тях (4/14 *K. pneumoniae*, 1/9 *P. aeruginosa*) притежават и хромозомни детерминанти на полимиксина резистентност. При всички щамове *Enterococcus faecium* е установен *vanA* генотип, отговорен за наблюдаваната гликопептидна резистентност; (2) При извършения *in-silico* биоинформатичен анализ, както и експериментално, е потвърдена неефективността на някои от оригинално публикуваните MLST протоколи. (3) Чрез използване на геномни бази данни са конструирани и валидирани нови праймерни двойки и е повишена типабилността на метода при всички изследвани микроорганизми; (4) Изработен е модифициран MLST протокол с използване на универсални праймерни опашки, позволяващ провеждането му при унифицирани условия и с по-малко разходите за MLST анализа; (5)

Типизирането с актуализираните MLST протоколи показва, че всички щамове *K. pneumoniae*, продуценти на карбапенемази NDM-1 и KPC-2 в България се групират в клонален комплекс 11 (CC11), като доминиращия секвенционен тип е ST11 в асоциация с NDM-1. По-слабо епидемиологично значение имат четири други секвенционни типа - ST29, ST15, ST37, ST 258, установени при продуценти на KPC-2. Двата карбапенем-резистентни щама *C. freundii* са със секвенционни типове ST21 и ST63, при които липсва епидемиологична и филогенетична връзка; (6) При VIM-продуциращи щамовете *P. aeruginosa* е налице тенденция към успешно разпространение на ST233, установен в четири областни болници. Единственият пан-резистентен щам *P.aeruginosa* принадлежи към ST111, често асоцииран с MDR фенотип в световен мащаб; (7) Проучването на нозокомиален взрив, причинен от ванкомицин-резистентни *E.faecium*, установи доминиращ MLST тип - ST203. (8) Високата степен на корелация в клоналното разпределение на изолатите типизирани чрез MLST и MLVA, позволява последния надеждно да се използва като по-достъпна алтернатива на скъпия, бавен и трудоемък MLST.

В дисертационния труд Веселин Добринов е постигнал значителни оригинални и потвърдителни научно-теоретични и практически приноси, сред които бих откроила следните: (1) Изработена е цялостна методология за приложение на мултилокусното ДНК секвениране, която включва както оригинални праймери, така и нови методи за пречистване на продукти от амплифицираща и секвенираща PCR. Всичко това допринася за повишаване типабилността на метода и намаляване разходите за провеждане на MLST анализа; (2) Изработени са актуализирани протоколи за мултилокусното ДНК секвениране при *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii* и *Enterococcus faecium*; (3) Установена е принадлежността на 14 национални щама *Klebsiella pneumoniae* с четири вида карбапенемази към седем секвенционни типа: ST11 (7 щама NDM-позитивни), ST258 (2 щама KPC- позитивни) и по един щам от ST15 (KPC- позитивен), ST29 (KPC- позитивен), ST37 (KPC-позитивен), ST147 (VIM-1-позитивен) и ST530 (OXA-48 позитивен). Следва да се отбележе, че ST37 (KPC- позитивен), ST147 (VIM-1-позитивен) и ST530 (OXA-48 позитивен) са установени за първи път в България, както и наличието на филогенетичното родство на 13 от изследваните щамове с изключение на ST530; (4) За първи път в България са установени секвенционните типове на щамове *Citrobacter freundii* (ST21 – OXA-48-позитивен, ST63 – VIM-4-позитивен), на щамове *P. aeruginosa* (ST233, ST111 с VIM-тип карбапенемази) и на ванкомицин резистентни щамове

*E.faecium* (ST9, ST26, ST80, ST117, ST203, ST1249); (5) Изработени са ефективни MLVA методи за типизиране на щамове *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*, които поради високата степен на корелация в клоналното разпределение на щамове типизирани чрез MLST, могат да се използват за генотипиране на болнично ниво с висока степен на дискриминация.

Резултатите от обемната изследователска работа на Веселин Добринов са отразени в 6 публикации. В половината от публикациите той е първи автор, което свидетелства за съществен принос в изследванията. Пет от публикациите са на латиница в реферирано и индексирано в Scopus българско научно издание – Problems of Infectious and Parasitic Diseases, достъпно за цялата научна общност. Дисертантът има и 6 конгресни участия (3 в български научни форуми и 3 – на ECCMID), като в 2 от тях той е първи автор – представящ научните резултати.

В заключение смяtam, че темата е актуална и клинично значима. Представената от автора дисертация е завършен и задълбочен труд с фундаментален принос в изработването на ефективна методология за приложение на мултилокусното ДНК секвениране за типизиране на патогенни микроорганизми с множествена резистентност. Дисертацията многократно надхвърля изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и Правилника на НЦЗПБ. Това ми дава основание с положителната си оценка убедено да подкрепя присъждането на образователната и научна степен „Доктор” по научната специалност 01.06.12 - Микробиология на Веселин Димитров Добринов.

12.06.2019

Изготвил становището:



/Проф. д-р Стефана Събчева, д.м./