



До
Председателя на Научното жури,
определено със Заповед № 581/01.12.2023 г.
на Директора на Национален център по заразни и паразитни болести, гр. София

СТ А Н О В И Щ Е

от Доц. д-р Иванка Илиева Гергова, д.м.,

Началник на лаборатория „Микробиология“, Военномедицинска академия-София

Относно: процедура за защита на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”.

Област на висшето образование: 4. Природни науки, математика и информатика.

Професионално направление: 4.3. Биологически науки.

Научна специалност: „Микробиология”,

Докторска програма за придобиване на ОНС “Доктор”: „Микробиология”

Автор: Иван Иванов Стойков.

Тема: „Проучване върху геномните характеристики, обуславящи лекарствената резистентност (резистом) и вирулентността (вирулом) при екстензивно резистентни *Pseudomonas spp.*“.

Научен ръководител: Доц. Иван Иванов, д.м., н

Научен консултант: Проф. Стефана Събчева, д.м.

Председател на Научното жури: доц. Виктория Левтерова, д.м.

I. ОБЩО ПРЕДСТАВЯНЕ НА ПРОЦЕДУРАТА И НА АВТОРА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Процедура

Настоящото становище е изготвено в изпълнение на Заповед № 581/01.12.2023 г. на Директора на Националния център по заразни и паразитни болести, гр. София, и с решенията

от заседание на назначеното за целта Научно жури, на което съм назначена за външен член на Научното жури.

Декларирам, че нямам конфликт на интереси по смисъла на чл.4, ал.5 от Закона за развитието на академичния състав на Република България (ЗРАСБ). Нямам общи публикации с Иван Стойков.

Представените документи по процедурата изцяло отговарят на изискванията на Закона за развитието на академичния състав на Република България и Правилника за прилагане на ЗРАСБ, за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ на НЦЗПБ, София.

2. Кратки биографични и професионални данни за автора на дисертацията

Иван Иванов Стойков е завършил средното си образование в ПМГ "Акад. Иван Гюзелев", гр. Габрово през 2013 г. През 2017 г. е дипломиран като Бакалавър „Биотехнологии“, а през 2019 г., като Магистър „Генно и клетъчно инженерство“ - Софийски университет „Св. Климент Охридски“.

От 01.11.2019 г. работи в Национална Референтна Лаборатория “Контрол и Мониториране на Антибиотичната Резистентност”, НЦЗПБ, като биолог. Владее отлично английски език.

II. АКТУАЛНОСТ НА ТЕМАТА

Устойчивата световна тенденция към нарастване на микробната резистентност, наблюдавана през последните десетилетия е основна причина за силното ограничаване на възможностите за адекватно терапевтично повлияване, особено при инфекции, свързани с медицинското обслужване.

P. aeruginosa е включен в ESKAPE и ESCAPE групите, обобщаващи водещите проблемни болнични патогени, и се нарежда на шесто място в света по отношение на смъртността, свързана с микробната резистентност. В последните години се отчита повсеместно нарастване на честотата на инфекциите, причинени от *P. aeruginosa*, включително и в България, където са сред честите причинители на инфекции във всички големи лечебни заведения.

Вродената резистентност на *P. aeruginosa* към широк набор от обичайно прилаганите за лечение групи антимикробни средства, както и способността да придобиват устойчивост към стратегическите карбапеними, е основен проблем при провеждането на ефективна антимикробна терапия, особено при имунокомпрометираните, коморбидните и пациентите на интензивно лечение.

Основен компонент в решаването на тези проблеми е детайлното проучване на генетичните механизми на микробната резистентност и на факторите на вирулентност. Най-съвременният и комплексен подход за решаването на тази задача, е целогеномното секвениране, даващо възможност едновременно да бъдат проучени всички гени

детерминанти, асоциирани не само с множествената резистентност, но и с патоадаптивните механизми на даден микробен патоген.

В този аспект считам, че разработената от Иван Стойков тема е особено актуална, както в теоретичен, така и в приложен аспект за здравната система в страната.

III. СТРУКТУРА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Дисертационният труд съдържа 233 стандартни страници (вкл. и приложенията) и е онагледен оптимално с 31 фигури (35, вкл. и подфигури) и 20 таблици (36, вкл. и подтаблици).

Заглавието представя точно същността на разработваната тема. Дисертационният труд е структуриран правилно и включва заглавна страница, благодарности, съдържание, използвани съкращения, увод, литературен обзор, ясно формулирани цел и задачи, материали и методи, резултати и дискусия, заключение, добре изведени изводи и научни приноси, списък с публикации и участия в научни прояви, свързани с дисертационния труд, и библиография. Библиографската справка съдържа 680 заглавия (всички на латиница), като 95 от представените източници (14 %) са от последните 5 години, а от последните 10 години са 205 от източниците (30 %).

Авторефератът е представен в синтезиран вид, в 128 страници, и отразява адекватно съдържанието на дисертационния труд, като при изготвянето му са спазени всички изисквания на ППЗРАСРБ.

IV. АДЕКВАТНОСТ НА ФОРМУЛИРАНИТЕ ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Стойков си поставя за цел да бъдат проучени геномните характеристики, обуславящи лекарствената резистентност (резистом) и вирулентността (вирулом) при екстензивно резистентни *Pseudomonas* spp.

Целта е точно и ясно формулирана и от нея логически произтичат поставените пет задачи, които напълно отразяват темата на дисертационния труд.

V. ОБЩА ХАРАКТЕРИСТИКА И ОЦЕНКА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Литературен обзор

Литературният обзор е представен в обем от 63 страници, и е добре структуриран, балансиран, информативен, с дефиниции и факти. Изграден въз основа на впечатляваща литературна справка, обзорът е написан компетентно и на високо научно ниво.

Представя обстоен преглед на таксономията, разгледан в исторически аспект. Изключително детайлно са описани детерминантите и механизмите на резистентност към

отделните групи антимикробни средства. Факторите на вирулентност са разгледани обстойно, включително генетичните детерминанти и ролята им в патогенезата на причинените от тях инфекции.

Обзорът на литературата е изчерпателен и обобщава съвременното състояние на проблема.

2. Материал и методи

Материалите и методите са представени подробно в 39 страници.

Проучванията по темата са базирани на данните от проведените изследвания на 100 клинични изолата *Pseudomonas* (96 *P. aeruginosa*, 2 *P. soli*, 1 *P. kurunegalensis* и 1 *P. protegens*), от колекцията на НРЛ по „Контрол и мониторинг на антибиотичната резистентност“ към НЦЗПБ. Всички подобрени изолати са с характеристиките на MDR, XDR или PDR, и са събрани през последните 14 години.

Всички приложени методи (за идентификация, определяне на чувствителност към антимикробни средства, молекулярно-биологични методи, изпитване способността за формиране на биофилми, биоинформатичен анализ) са подобрени прецизно, в съответствие с поставените задачи и са представени много изчерпателно, с педантично описание на използваните консумативи и техники. Разработен е метод за бърза екстракция на висококачествена РНК от *P. aeruginosa*, като критично са оценени предимствата и лимитациите на приложението му.

Начинът на представяне на техниките показва отличната методична подготвеност на докторанта.

3. Резултати и дискусия

Получените резултати от проведените собствени изследвания са представени и обсъдени в рамките на 61 страници и са добре онагледени със съответните таблици и фигури. Те са високо информативни, представени са по раздели, следващи логичната последователност на поставените задачи.

В дискусията е направен задълбочен анализ на получените резултати при проведените експерименти за доказване на карбапенемази, експресия на ефлуксни системи и гени свързани с резистентността към антимикробни препарати (RT-qPCR), анализ на способността за формиране на биофилм, генотипизиране по MLVA9 и MLST, плазмидно репликационно типизиране чрез PCR, конюгация и анализ на плазмидния профил на всички щамове, посредством линейизиране на плазмидите и електрофореза в пулсово поле (PFGE).

Своеобразен акцент на дисертационния труд е биоинформатичния анализ, включващ анализ на качеството на получените къси и дълги прочити, с оценка на качеството на получените геноми и тяхното депозиране в NCBI GenBank; идентификация на изолатите; определяне на детерминантите на антимикробна резистентност; анализ на *oprD* и плазмиден анализ. Детайлно са обсъдени резултатите от MLST- и cgMLST-типизирането на изолати *P. aeruginosa* и определянето на детерминантите на вирулентност. Уточнени са характеристиките на IMP-продуциращите *P. aeruginosa* и появата на IMP-100, нов плазмиден

вариант, съществуващ в комбинация с хромозомен VIM-4. Изследвана е антимикуробната чувствителност към всички налични за лечение препарати и скрининг за детерминанти на резистентност, извършени са плазмиден анализ, клониране, трансформация и конюгация, както и филогения и анализ на генетичното обкръжение на blaIMP-100.

Натрупването на информация в тази насока, има важно теоретично и практическо значение при решаването на проблеми, касаещи както терапията на инфекциите, причинени от *P. aeruginosa*, така и контрола върху разпространението им в болнична среда.

Считам, че едно от съществените достойнства на дисертационния труд е идентифицирането на механизми, обуславящи резистентност, включващи голямо разнообразие от ензими и мутации. Открити са различни типове β -лактамази, включително CARB, GES, PER, VEB и TEM, и са идентифицирани 3 вида карбапенемази от клас B (VIM, NDM, IMP), като сред тях е детектиран и охарактеризиран новооткрит вариант IMP-100.

Изяснени са интимните механизми на резистентност спрямо основните групи антимикуробни средства, прилагани при терапията на инфекциите, причинени от *P. aeruginosa* и подробно са проучени и обсъдени факторите на вирулентност.

Дисертационният труд има напълно завършен вид, поставените цел и задачи са изпълнени.

4. Изводи и приноси

На базата на литературните данни и извършените собствените проучвания, правилно и логично са изведени шест извода, които пряко кореспондират с поставените цел и задачи. Направените изводи имат теоретична и практическа стойност и отразяват същността на дисертационния труд.

Получени са съществени приноси с оригинален (6 приноса) и научно-приложен характер (5 приноса). Приемам посочените от Стойков приноси, които са адекватно и реалистично изведени от разработения дисертационен труд.

5. Научни публикации и участия в научни форуми, свързани с дисертацията

Значимостта на постигнатите резултати се илюстрира с приложения списък с общо четири публикации в авторитетни научни списания, две от които с Импакт фактор (постигнат общ импакт фактор: 6.17). В три от посочените публикации, Стойков е първи автор, а в четвъртата – втори, което недвусмислено доказва водещата му роля в проведените и описани в дисертацията изследвания.

Резултати от извършените проучвания са представени на пет научни форума, един от които международен, като в три от тях, Стойков е първи автор.

VI. АВТОРЕФЕРАТ

Представеният автореферат съответства на изискванията, отразявайки напълно съдържанието на дисертационния труд.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд представлява широко мащабно проучване върху много актуална тема, с добра теоретична основа, извършено с многообразие от съвременни молекулярно-генетични методи.

Научната стойност на дисертационния труд произтича от направените задълбочени проучвания, изводи и препоръки, и от формулираните приноси. Считаю дисертационния труд за напълно завършен, полезен, аналитичен и прецизен в заключенията си. Всичко това е основание да дам положителна оценка и да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури да гласуват единодушно за присъждането на образователна и научна степен (ОНС) “Доктор“ по научна специалност “Микробиология” на Иван Иванов Стойков.

26.01.2024 г.

Рецензент:

гр. София

доц. д-р Иванка Илиева Гергова, д.м.