



РЕЦЕНЗИЯ

На дисертационен труд на тема: Проучване върху геномните характеристики, обуславящи лекарствената резистентност (резистом) и вирулентността (вирулом) при екстензивно резистентни *Pseudomonas spp.*,

разработена от **редовен докторант Иван Стойков**

с научен ръководител: доц. И.Иванов; Научен консултант: проф. С. Събчева, УСБАЛО

Рецензент: проф. С. Данова, дбн, Институт по микробиология "Стефан Ангелов", БАН

1. Относно процедурата по официална защита и изискванията на ЗРАСРБ с кратко представяне на докторанта:

Докторант **Иван Стойков** е зачислен в редовна докторантура в НЦЗПБ, със заповед N 255/ 01.10.2020 г. за срок от 01.10.2020 г до 01.10.2023 г. В рамките на редовния срок той успешно е изпълнил учебния план и научно изследователската програма, в пълно съответствие с изискванията на ЗРАСРБ и Правилниците за неговото прилагане.

Настоящата процедура по придобиване на ОНС „Доктор“ се провежда на основание чл. 31 от Правилника за прилагане на ЗРАСРБ на НЦЗПБ, във връзка с чл. 9 от ЗРАСРБ и на основание на Решение на НС на НЦЗПБ, Протокол № 04/27.11.23

Съгласно Заповед № 581/01.12.2023 г. на Директора на НЦЗПБ съм избрана за член на Научното жури по горепосочената процедура и съм определена за рецензент на първото му заседание. В качеството ми на такава, декларирам, че не съществува конфликт на интереси по смисъла на §1, т.2а от допълнителните разпоредби на ЗРАСРБ между мен и кандидата по процедурата за ОНС „Доктор“ и за мен не са налице ограниченията по чл. 33 от ЗРАСРБ. Представеният ми комплект документи и материали на електронен носител отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилниците за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности. Доказано е по законоустановения ред отсъствие на плагиатство в научните трудове на кандидата. Налице е Декларация за оригиналност и достоверност на представените резултати.

2. Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем:

Представеният ми за рецензия труд представлява иновативно и задълбочено изследване върху генетичните основи на антибиотична резистентност с насоченост към проблемен за ефикасно третиране патоген, какъвто е широко разпространения *Pseudomonas aeruginosa*. Докторантът и неговия научен ръководител таргетират проблема един от най-често изолирани вътреболнични патогени с много широк спектър на патогенеза: доказан главен причинител на вътреболнична пневмония, на инфекции на уринарния тракт и патоген при хирургични рани. Видът е сред мулти-резистентните болестотворни агенти.

Антибиотичната резистентност в момента е най-сериозната глобална заплаха за ефективното лечение на бактериални инфекции. Антибиотичната резистентност изглежда неизбежна и има растяща нужда от нови изследвания. *Pseudomonas spp.* демонстрира своята забележителна адаптивност в неблагоприятната среда на гостоприемника, като използва широк набор от вирулентни фактори, играещи ключова роля в установяването на успешни инфекции и в ускоряването на болестните процеси. Работата разкрива генетичните основа на тези процеси, което ще способства за нови терапевтични подходи и способства за ограничаване на антибиотичната резистентност.

Не на последно място продукцията на устойчиви биофилми представлява огромно предизвикателство в сферата на медицината, тъй като благоприятства персистирането на хроничните инфекции. Всичко това ми дава основание да оценя като много актуална и значима разработваната дисертация.

3. Оценка на структурата и съдържанието на дисертационния труд

Дисертацията е изложена на 235 стандартни страници текст. Спазена е общоприетата схема и препоръчителните съотношения между отделните части на труда, както следва: *Увод* -1 стр., *Литературен обзор* - 63 стр., *Цел и задачи* – 1 стр., *Материали и методи* – 39 стр., *Резултати и обсъждане* – 61 стр., *изводи* – 2 стр., *приноси* - 1 стр.; *Библиография* – 50 стр. Библиографичната справка включва внушителното дори и за голяма докторска теза 680 заглавия. Всичките източници са на латиница и предимно от последните 15 години, което показва отлична теоретична осведоменост по разработвания от докторанта проблем.

Технически работата е много добре оформена, с богат илюстративен материал и отлично представени резултати вкл. от молекулярно-генетичните и биоинформатичните анализи. Те са обобщени в 19 таблици и 28 фигури. Докторантът умело прилага различни модерни софтуерни програми в генетичните анализи на получените данни, видно от представените фигури.

3.1. Литературен обзор

Литературният обзор е много добре структуриран и разглежда в логическа последователност ключовите за работата теоретични знания и нова информация по отношение на:

1. Характеристика на род *Pseudomonas* – като правилно са отбелязани най-новите данни към 24.11.2022 за видовото представяне от 314 валидно наименовани видове според *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (Parte, 2018)
2. Обща геномна характеристика, със специално внимание на аксесорните елементи, с импакт в разбиране на механизмите на Антибиотична резистентност при вида
3. Резистом и детайлно обсъдени механизмите обуславящи факторите на резистентност и генетичните им основи
4. Специално внимание авторът е отделил и на вирулома – като правилно оценява значението, забележителната адаптивност на *Pseudomonas aeruginosa* в неблагоприятната среда на гостоприемника, и са дискутирани широкия набор от вирулентни фактори, играещи ключова роля в установяването на успешни инфекции и в ускоряването на болестните процеси.

Всяка една от горепосочените точки е разгледана много аналитично в светлината на най-новите научни доказателства и данни. Прави много добро впечатление цитирането на

българския опит и публикации. Това показва отлична теоретична подготвеност и търсене на нови знания за решаване проблема с растящата антибиотична резистентност.

3.2. Цел и задачи

Целта: „Проучвания върху геномните характеристики, обуславящи лекарствената резистентност (резистом) и вирулентността (вирулом) при екстензивно резистентни *Pseudomonas* spp.“ е формулирана ясно и точно. Тя е много амбициозна, но отговаря на спешната нужда от знания в борбата с нарастващата антибиотична резистентност в глобален мащаб, липсата на нови препарати, както и проблема със злоупотребата с наличните средства.

За постигането и в логическата последователност и много добро структуриране са поставени 5 експериментални задачи, от които едната е с 3 подзадачи, както следва:

1. Селекция и фенотипно характеризиране на мулти-резистентни щамове *Pseudomonas* spp.

2. Предварителни анализи за формиране на репрезентативна извадка от изолати за по-нататъшен целогеномен анализ.

2.1. Доказване на генетични механизми на резистентност към беталактами чрез молекулярно-генетични техники (карбапенемази, ефлукс, поринов дефицит и др.).

2.2. Доказване на вирулентни фактори чрез PCR и определяне продукция на биофилм .

2.3. Генотипизиране (MLVA, MLST) и селекция на щамове за целогеномно секвениране (WGS).

3. Детайлно геномно охарактеризиране на новооткрит вариант на плазмидно-медирана имипенемаза IMP-100 както и други IMP-продуценти при *P. aeruginosa*.

4. Биоинформатичен геномен анализ на детерминантите на резистентност и вирулентност.

5. Публикуване/депозирание на секвенираните геноми в световните бази данни.

3.3. Материали и Методи:

Дисертационният труд е разработен на базата на огромен набор от модерни молекулярно-генетични методи до пълногеномно секвениране с необходимите биоинформатични анализи. Те са приложени в изследване на впечатляващ брой клинични изолати – 100 MDR (екстензивно резистентни) изолата *Pseudomonas*, от които 96 - *Pseudomonas aeruginosa*, 2-*Pseudomonas soli*, 1- *Pseudomonas protegenes* и 1- *Pseudomonas kurunegalensis* (*P. putida* complex). Те са част от колекцията на Националната референтна лаборатория по „Контрол и мониторинг на антибиотичната резистентност“ (КМАР) към Националния център по заразни и паразитни болести. Събраният панел от клинични изолати е много голям, но докторантът оценява правилно необходимостта от охарактеризиране генетичните детерминанти при различни представители на вида. Докторантът използва рутинните техники по изолиране на ДНК и РНК, като внася адаптация на протоколите, умело използвайки опита и разработките на научния ръководител и екипът на Лабораторията КМАР. Впечатляващ е броят на методи, базирани на PCR, като: Детекция на карбапенемази от клас А, В и D, чрез мултиплексен EVAGREEN Real Time PCR; PCR за детекция на вирулентни фактори; Мултилокусен анализ на вариабелен брой от тандемни повтори (MLVA9) за типизиране на *P. aeruginosa*; Мултилокусно секвенционно типизиране; Плазмидно репликационно типизиране; RT-qPCR за анализ на ефлуксни системи и други гени, свързани с антибиотична резистентност и др.

Подробно са представени етапите и техническите детайли за Клонизиране – PCR за амплификация на инсерти и линеаризиране на вектори. Целогеномно секвениране,

Биоинформатичните анализи. Този впечатляващ набор от методи доказва, че Иван Стойков е изграден молекулярен биолог с отлична теоретична подготвеност и практически умения да ги прилага при това в работа с патогенни микроорганизми.

3.4. Резултати и обсъждане

Дисертационният труд представлява едно съвременно молекулярно-генетично изследване базирано на 100 щамове клинични изолати, доминантно от вида *P. aeruginosa*, произхождащи от общо 14 града в България. Те са включени на базата на разлики в техния спектър на антибиотична чувствителност, вариращи от мултирезистентни (MDR), през екстензивно резистентни (XDR) до панрезистентни (PDR). Събраният панел от клинични изолати е много голям, но докторантът оценява правилно необходимостта от охарактеризиране генетичните детерминанти при различни клинични представители на вида. Всички те са събрани за период от 14 години – от 2010 г. до 2023 г. Оценявам високо избора на докторанта и неговия ръководител, за мултивариантен генетичен анализ на тези клинични щамове.

Прави впечатление логическата последователност на експерименталните етапи, започвайки от обща характеристика на използваните изолати и тяхното видово идентифициране, последвано от определяне на антимикробна резистентност. Независимо от големия брой изпитвани щамове докторантът определя тяхната резистентност с използване на 19 различни антимикробни препарата, включително такива от ново поколение като Меропенем/Ваборбактам, Цефтазидим/Авибактам, Цефтолозан /Газобактам, Имипенем-релебактам и Цефидерокол. Прилага както дисково дифузионни, така и бульон дилуционни методи с използването на комерсиални панели. Резултатите са правилно интерпретирани според стандартите на EUCAST (www.eucast.org).

Високо оценявам работата на докторанта по оптимизиране на част от молекулярно-генетичните методи, необходими за решаване на експерименталните задачи по:

- Доказване на генетични механизми на резистентност към беталактами чрез молекулярно-генетични техники (карбапенемази, ефлукс, поринов дефицит и др.);
- Доказване на вирулентни фактори чрез PCR;
- Генотипизиране (MLVA, MLST) и селекция на щамове за целогеномно секвениране (WGS)

Оригинален и приносен характер има работата по RT-qPCR за доказване на експресия на ефлуксни системи и гени свързани с антимикробната резистентност

На различни етапи от работата докторантът е приложил успешно оптимизиране и валидиране на протоколите напр. по типизиране чрез високо-дискриминативните методи MLVA9 (девет локуса) и MLST, като са подбрани най-информативните публикувани праймери и локусни схеми. В тази връзка искам да отбележа разработената нова схема за *Плазмидно репликоново типизиране PCR (PBRT)*. Основана първо на *in silico* биоинформатичен анализ, върху който се базира разработването и дизайнът на нови оригинални праймери, покриващи някои от по-редките и/или новооткрити плазмидни репликони при *Pseudomonas* като IncG/U/P6, IncP-2, IncP-10, pMOS94-like, pKLC102-like, последвано от PCR-базирано плазмидно репликоново типизиране (PBRT). Тази схема е реализирана коректно при всички изолати с праймери за 10 от по-честите репликони (IncP-1abyde, IncP-4, IncP-7, IncP-9, IncW, IncQ, IncA/C, IncN и др.), както и за наскоро описаните pMOS94 и pKLC102-like плазмидни семейства.

Отличната подготвеност на докторанта личи не само от експерименталната , но и от частта в която са реализирани модерни биоинформатични анализи. Започва с анализ на качеството на получените къси и дълги прочити и оценка на качеството на получените геноми.

Докторантът критично коментира получените къси прочити от секвенирането извършено с използването на Illumina и предоставената ценна информация за качеството на данните. Надграждащо на тези изследвания е третогенерационно дълговерижно секвениране на което са подложени 17 генома. В комбинация с късоверижно секвениране (или т. нар. хибридно асемблиране), тази технология предоставя възможност да бъде извършен допълнителен scaffolding на получените геноми, както и да бъде циркуляризирана хромозомата и наличните плазмиди. Подборът на изолатите е направен по различни критерии: 1) предполагаемо наличие на плазмиди; 2) потенциална резистентност към цефидерокол; 3). потенциално наличие на нови гени/алели; 4). екстензивно резистентен фенотип. След обстоен анализ са избрани най-качествените асемблирани геноми от късоверижното и дълговерижното секвениране и са депозираны в геномната банка на NCBI (Genbank), което е заложено като задача. Този експериментален алгоритъм е позволил да се идентифицират 96 от изолатите *P. aeruginosa*, включително и на 4 изолата, първоначално определени като *P. putida* complex чрез MALDI-Tof. Точният вид е прецизно определен като два от тях (Pput3333 и Pput3334) са идентифицирани като *Pseudomonas soli* и *P. protegenes*, а щам с номер 3229 е доказано, че принадлежи към вида *Pseudomonas kurunegalensis*. Важно е да се отбележи, че три от тези изолати се оказват носители на VIM карбапенемази, което потвърждава нарастващата роля на видовете различни от *P. aeruginosa* като клинично значими патогени.

Базиран на знанията и опита Иван Стойков подчертава необходимостта от съчетаване на различни методи за прецизна идентификация на бактериални изолати, като най-надеждни са резултатите получени чрез целогеномно секвениране. Това е фактически заключителен етап и успешно изпълнение на поставената задача.

Характеристика на IMP-продуциращите *P. aeruginosa* и поява на IMP-100, нов плазмиден вариант, съществуващ в комбинация с хромозомен VIM-4. След извършен пълен фенотипен и геномен анализ на три клинични изолати *P. aeruginosa* е установено наличието на 3 различни варианта IMP карбапенемази. До този момент в България не са били докладвани карбапенемази от този тип при *P. aeruginosa*. Трите щама (Paer3541, Paer3796A и Paer4782MK) са изолирани в София, България, между 2018 и 2022 г. Новата карбапенемаза IMP-100 е локализирана в неописани досега мобилни генетични елементи интегрон *In4886* и транспозон *Tn7700*, което е принос в епидемиологичните данни не само за страната.

Правилният методичен подход и професионално подбрани, оптимизирани и изведени молекулярни анализи са в основата на много нови научни данни и информация. Те са оценени и от рецензентите на реферирани български и международни научни издания. Докторантът е публикувал резултатите си в списание на издателство MDPI -Microorganisms 2023, с висок IF 4.5, Q2; в Biotechnol & Biotechnol Eq. (2023, с F 1.67, Q3), в Probl Inf Parasit Dis., 2023, Q4, H-INDEX 6; и в Acta Microbiol. Bulg. 39, 2023, с Q4, H -INDEX 3. При това Иван Стойков е първи автор, което доказва личното му участие . Оценявам високо тази публикационна активност, като гарант за нивото на научните изследвания, които са обобщени в дисертационния труд.

Прави много добро впечатление заключението на раздела *Резултати и обсъждане*, като в 4 страници докторантът е обобщил постигнатото, очертавайки приноса за широк кръг специалисти, не само като научни постижения , но и като научна основа за клиницисти в борбата с антибиотичната резистентност и изменчивост на патогените. В тази връзка бих

искала да попитам докторанта: „Как резултатите от това съвременно молекулярно проучване доказващи експресия на ефлуксни системи и гени, свързани с резистентността към антимикробни препарати, както и новите данни за аксиларния геном може да допринесат за позитивни промени в клиничната практика и в какъв времеви диапазон?

Безспорните резултати от труда са обобщени в 6 добре и точно формулирани изводи. Докторантът много стегнато е обобщил многото получени данни под формата на изводи, което е още едно доказателство за неговия професионализъм и знания.

Много висока оценка давам на проведеното първо в страната геномно проучване върху колекция от клинични мултирезистентни щамове *Pseudomonas aeruginosa* (n=100) за период от 14 години (2010-2023г), което е оригинален научен принос, със значение за клиничната практика, каквито имат формулираните други такива:

- 1) Открит е нов генетичен вариант на карбапенемаза IMP-100, асоцииран с новооткритите мобилни генетични елементи - интегрон *In4886* и транспозон *Tn7700* локализиращи в нов плазмид p4782-IMP от семейство pMOS-94
- 2) За първи в България се доказват щамове *P. aeruginosa* резистентни на цефидерокол и е доказана плазмидно медирана резистентност
- 3) Разработена е нова схема за PCR-базирано репликоново типизиране на 13 плазмидни семейства, асоциирани с резистентност при *Pseudomonas spp.*
- 4) Секвенирани са 100 генома на мултирезистентни щамове *Pseudomonas spp.* и 96 са депозиранни в генбанката на NCBI. Разработен е нов метод за екстракция на висококачествена интактна РНК от *Pseudomonas* и други бактерии

Те имат както научен, така и научно-приложен характер и потвърждават категорично стойността на дисертационния труд. “

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Иван Стойков обобщава получените научни и приложни резултати като демонстрира както задълбочени теоретични знания, така и способност за самостоятелни, логично построени и задълбочени молекулярно-генетични изследвания. Поставените задачи са изпълнени на съвременно ниво и много успешно е реализирана целта. Експериментите и използваните методични подходи са на ниво и в обем, който може да бъде оценен като предизвикателство дори за голям изследователски екип. Работата е много актуална и мултидисциплинарна, съчетаваща комплексна подготвеност и умения. Въз основа на приведените аргументи за актуалност на проблематиката, гореизложените доказателства за получени отлични научни резултати и оригиналните приноси, отразени в дисертационния труд давам своята висока оценка и убедено препоръчвам на членовете на уважаемото Научно жури да присъдят на **редовен докторант Иван Стойков** за получаване на образователната и научна степен „Доктор” по професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност Микробиология.

02.02.2024 г.

Рецензент :

проф. Светла Данова, дб