



До Председателя на
Научно жури, определено със Заповед
№ 581/01.12.2023 г. на Директора на НЦЗПБ

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Стефан Въчев Панайотов,

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен "Доктор" по научна специалност 01.06.12 Микробиология на тема: **Проучване върху геномните характеристики, обуславящи лекарствената резистентност (резистом) и вирулентността (вирулом) при екстензивно резистентни Pseudomonas spp.**

Автор **Иван Иванов Стойков**, редовен докторант при Национален център по заразни паразитни болести, Отдел "Микробиология", Национална референтна лаборатория "Контрол и мониториране на антибиотичната резистентност" (НРЛ "КМАР").

Научен ръководител: **доц. Иван Николаев Иванов**, д-м.

Научен консултант: **проф. д-р Стефана Събчева**, д-м

Представените документи на кандидата са според изискванията на вътрешният правилник на НЦЗПБ за прилагане на Закона за развитие на академичния състав в Република България.

Декларирам, че нямам конфликт на интереси по смисъла на чл. 4, ал. 5 от ЗРАСРБ.

Кариерно развитие на дисертанта.

Иван Стойков завършва средното си образование в гр. Габрово през 2013 г. През 2019 г. завършва магистратура по „Генно и клетъчно инженерство“ в Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“. От 2020 г. е редовен докторант в Отдел „Микробиология“ в Национална референтна лаборатория "Контрол и мониториране на антибиотичната резистентност" при Национален център по заразни и паразитни болести. Завършва и представя дисертационния си труд в рамките трите години на изследователска работа и обучение.

Актуалност на темата

Темата на дисертационния труд касае проучване на геномните характеристики, обуславящи лекарствената резистентност (резистом) и вирулентността (вирулом) при екстензивно резистентни *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas са повсеместно разпространени бактерии, които са основна част от бактериалните съобщества и изпълняват съществени екологични функции в околната среда. Родът *Pseudomonas* съдържа 314 вида като техният брой непрекъснато нараства. В допълнение към добре познатия човешки патоген *P. aeruginosa*, някои видове *Pseudomonas* предизвикват също заболявания при растения, риби, насекоми или други животни.

Резистентността на *P. aeruginosa* и множество други бактериални патогени към прилагани антимикробни средства се превърна в един от най-значимите проблеми за медицината и общественото здравеопазване, като все по-често тя се определя като глобална заплаха.

P. aeruginosa се нарежда на шесто място в света по отношение на смъртността, свързана с антимикробна резистентност и е част от групата на високо рисковите патогени. Описаните факти в обзора на дисертационния труд подчертават актуалността на темата. Ефективен подход за ограничаване на антимикробната резистентност е детайлното проучване на генетичните механизми водещи до резистентност. Най-съвременният и комплексен подход за решаването на тази задача, е целогеномното секвениране, даващо възможност едновременно да се проучат всички генни детерминанти асоциирани не само с множествената резистентност, но и с патоадаптивните механизми на даден микроорганизъм.

Общо описание на дисертационния труд

Дисертационният труд съдържа 233 страници, 31 фигури и 20 таблици. Библиографията включва 680 литературни източника. Дисертацията е структурирана стандартно и включва: Увод – две страници, Литературен обзор – 63 страници, Цел и задачи – 1 страница, Материали и методи – 39 страници, Резултати и дискусия – 47 страници, Заключение, Изводи и Приноси по 2 страници.

Литературният обзор, подробно и със стегнат стил описва състоянието на изследванията по проблема. Направена е характеристиката на род *Pseudomonas* и общо

геномно описание на вида *P. aeruginosa*. Подробно са описани хромозомно-кодираните механизми на резистентност при *P. aeruginosa*, пеницилин-свързващите протеини, различните видове ефлуксни системи, големи делеции, които обуславят резистентност, биофилм-зависимата резистентност. Описани са вирулентните фактори при *P. aeruginosa*.

Цел и задачи. Целта на дисертационния труд е ясно формулирана – Да се изследват геномните характеристики, обуславящи лекарствена резистентност (резистом) и вирулентност (вирулом) при екстензивно резистентни *Pseudomonas* spp. Поставени са пет задачи.

Материалите и методите са подробно описани. В изследването са включени 100 MDR изолата *Pseudomonas* събрани от цялата страна. Описани са и са успешно приложени повече от 20 най-съвременни лабораторни техники, някои от които са приложени за първи път в страната. От описанието личи високото ниво на лабораторна компетентност на кандидата.

Резултати и дискусия. Проведени са широк кръг от задълбочени изследвания и са получени значими резултати. Чрез комплекс от съвременни фенотипни и генетични методи са подбрани за изследване уникален набор от MDR, XDR и PDR щамове на *Pseudomonas* spp. Щамовете са изпитани за чувствителност към антибиотици от най-ново поколение като цефтазидим/авибактам, цефтолозан/тазобактам, меропенем/ваборбактам, имипенем/релебактам и цефидерокол. Наблюдавани са много високи нива на резистентност към β -лактами и флуорохинолони. За определяне механизмите на резистентност са използвани молекулярно-генетични техники за доказване носителство на карбапенемази, определен е ефекта на ефлуксните системи към различни антимикробни препарати, изследван е пориновия дефицит и др. Паралелно с това са проведени проучвания върху факторите на вирулентност и способността за производство на биофилм.

Идентифицираните механизми на резистентност от докторанта включват голямо разнообразие от ензими и мутации. Открити са различни типове β -лактамази, включително CARB, GES, PER, VEB и TEM. Идентифицирани са 3 вида карбапенемази от клас B (VIM, NDM, IMP), като сред тях е установен и охарактеризиран нов вариант IMP-100.

Сред голяма част от изследваните изолати е установена свръхекспресия на различни ефлуксни системи. Доказаната от дисертанта повишена експресия на различни

ефлуксни системи има силна корелация с резистентността към β -лактами и хинолони. Установени са редица важни мутации свързани с резистентността към антимикробни препарати.

Подбраните 100 MDR изолата *Pseudomonas* spp. са целогеномно секвенирани. Използвайки различни биоинформатични подходи докторантът идентифицира и охарактеризира детерминантите на резистентност и вирулентност и е изследван техният потенциал за дисеминация чрез задълбочен анализ на мобилни генетични елементи като плазмиди, интегративни конюгативни елементи, транспозони и др. Посредством core genome multilocus sequence typing (cgMLST) е извършен мащабен филогенетичен и филогеографски анализ на изследваните изолати. Секвенираните геноми са депозираны в базата данни NCBI. В резултат от целогеномния анализ при някои изолати са открити VIM карбапенемази, локализираны в интегративни конюгативни елементи. Предоставената информация със свободен достъп е богат и информативен ресурс, на базата на който могат да бъдат извлечени стратегически изводи за епидемичния потенциал и разпространението на ключови детерминанти на антибиотична резистентност и вирулентност. За първи път в страната е проучен резистома и вирулома на редки или погрешно идентифицирани в миналото видове като *P. soli* и *P. protegens*, чиято роля като болнични патогени нараства през последните години.

Изводи и приноси на дисертационния труд

Дисертантът формулира 6 извода. От тях най-съществени са:

- Преобладаващата част от гените кодиращи карбапенемази при *Pseudomonas* spp. се откриват в хромозомни мобилни генетични елементи, повечето локализираны в интегративни конюгативни елементи.
- Клиничните изолати *P. aeruginosa* се характеризират с множество и разнообразни фактори на вирулентност класифициращи се във всички познати категории, като 85% показва умерена до силна продукция на биофилм.
- По-голямата част от доказаните от дисертанта плазмиди при *Pseudomonas* spp. не могат да бъдат отнесени към познатите плазмидни семейства.

Могат да се изброят следните приноси с оригинален характер на дисертанта:

- Открит е нов генетичен вариант на карбапенемаза IMP-100, асоцииран с новооткритите мобилни генетични елементи - интегрон In4886 и транспозон Tn7700 локализираны в нов плазмид.

- За първи в България се доказват щамове *P. aeruginosa* резистентни на цефидерокол и е доказана плазмидно медирана резистентност.
- Разработена е нова схема за PCR-базирано репликационно типизиране на 13 плазмидни семейства асоциирани с резистентност при *Pseudomonas* spp..

От приносите с научно-приложен характер може да се подчертаят:

- Установени са генетичните механизми на резистентност към беталактами, аминогликозиди и хинолони при изследваните *Pseudomonas* spp.
- На базата на cgMLST включващ 3876 SNP локуса е проведен мащабен сравнителен филогенетичен и филогеографски анализ на българските изолати спрямо колекция от 2470 изолата от цял свят.

На базата на представените резултати от дисертационния труд може да се направи заключението, че докторантът Иван Стойков е работил задълбочено и с усърдие. Правилно е интерпретирал получените резултати. Поставената цел и задачи на дисертационния труд са постигнати. Нямам забележки по планирането, начина на изпълнение и постигнатите резултати по дисертационния труд. Нямам забележки по оформлението и текста на дисертацията и автореферата.

Публикации и личен принос на докторанта

По темата на дисертацията докторантът Иван Стойков прилага четири статии в списания с импакт фактор и импакт ранг. Две от статиите са в списания с импакт фактор и той е водещ автор - *Microorganisms* – ИФ 4.1, Q2 и *Biotechnology and Biotechnology Equipment* – ИФ 1.67, Q3. Общият импакт фактор е 6.17. Резултатите са докладвани на 1 международен и 4 национални научни конгреса. Приложените публикации имат пряко отношение към целите и резултатите от дисертационния труд. Представените резултати и приноси са оригинални и не са заимствани от изследвания и публикации, в които дисертантът няма участие. Набраните кредитни точки по време на докторантурата надхвърлят необходимия минимум.

Видно е, че докторантът Иван Стойков има основен принос за разработването на дисертационния труд. Той е положил особено старание за усвояване и прилагане на иновативни молекулярнобиологични методи за решаване на трудна научна задача.

Заклучение.

Дисертантът Иван Стойков е постигнал целта и поставените задачи. Дисертационният труд е иновативен и е с научно и приложно значение. Представените дисертационен труд, публикации и други документи от кандидата покриват всички наукометрични критерии според ЗРАСРБ за защита на дисертационен труд за образователна и научна степен „доктор“.

Убедено давам своята **положителна оценка** и препоръчвам на Научното жури да присъди придобиването на образователна и научна степен „доктор“ на Иван Иванов Стойков в област на висшето образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, направление 4.3 „Биологически науки“ по научна специалност „Микробиология“.

София, 8/02/2024 г.

Изготвил рецензията:

/проф. дн Стефан Панайотов /