

Резюмета на български език от Научните публикации на гл.ас. д-р Виолета Вълчева Русева

Юни 2020

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),
Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

1. Първи данни за филогеографията на *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium caprae* изолирани от говеда в България

Violeta Valcheva¹, Tanya Savova-Lalkovska², Anna Vyazovaya³, Albena Dimitrova²,
Magdalena Bonovska¹, Hristo Najdenski¹

¹Department of Infectious microbiology, Institute of Microbiology, BAS; ²National Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute, Sofia; ³St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

Резюме

Туберкулозата по говедата (bTB) представлява значителна икономическа важност за селското стопанство. Въпреки програмата за контрол, инфекциите, причинени от *Mycobacterium bovis* при говеда в България продължават да нарастват през последните години. За да получим по-детайлна информация за разнообразието на *M. bovis* щамовете, използвахме сполиготипиране за диференциация на щамовете и данните бяха сравнени с международните бази данни Mbovis.org и SITVIT за определяне на кластери. Пробите включваха 30 изолати от *M. tuberculosis complex* от говеда изолирани от различни региони на България. Изолатите бяха подразделени чрез сполиготипиране на 4 сполиготипа: 2 сполиготипа, с 20 и 8 изолата и 2 единични сполиготипа. Дефинираните от SITVIT сполиготипове SIT645 и SIT647 принадлежат към обикновения и класически говежди екотип *M. bovis* (9 изолата), докато сполиготиповете SIT120 и SIT339 принадлежат към екотипа *M. caprae* (21 изолата). Наблюдава се известен филогеографски градиент на сполиготиповете и кластерите на ниво географско разпределение в страната ни: *M. caprae* е разпространен в централна/ югозападна част, докато класическия *M. bovis* в североизточна България. Четирите сполиготипа имат глобално или европейско разпространение, нито един от тях не е описан в съседните балкански страни. Изолатите на *M. caprae*, идентифицирани в това проучване, принадлежат най-вече към групата от Централна / Източна Европа. Като общо заключение, това проучване ни даде първична представа за филогеографското разпределение на *M. bovis* в България и описа за първи път *M. caprae* като важен причинител на инфекция на bTB в страната ни.

**Резюмета на български език от Научните публикации
на гл.ас. д-р Виолета Вълчева Русева**

Юни 2020

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),
Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

**2. Оценка на класически и бързи методи за изолиране и идентификация на
Mycobacterium bovis при говеда в България**

Savova-Lalkovska, T.¹, M. Bonovska², A. Dimitrova¹, V. Valcheva², Y. Petkov¹, G. Hadjieva¹,
H. Najdenski²

¹National Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute, Sofia, Bulgaria; ² Institute
of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

Резюме

Туберкулозата по говедата все още е сериозен проблем с голям икономически ефект в много страни. Целта на проучването бе да се оценят диагностичните възможности на класическите и някои съвременни, бързи методи за изолиране и идентификация на *Mycobacterium bovis*. В периода 2015–2018 г. от 29 огнища в 10 различни региона на България са изследвани 1193 лимфни възли от заклани говеда чрез патоанатомични, бактериологични, PCR и имунохроматографски методи. От 283 бактериални изолати, 263 са идентифицирани като *M. bovis*– член на *M. tuberculosis* комплекс.

**3. Изолиране на *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* от муфлони в
България**

T. Savova^a, R. Petrova^a, V. Valcheva^b, M. Bonovska^b, H. Najdenski^b

^aNational Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute, Sofia, Bulgaria

^b The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

Резюме

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) е етиологичният агент на паратуберкулозата (болест на Джон) главно при големи и малки домашни и диви преживни животни и предполагаем причинител на болестта на Крон при хора.. В България паратуберкулозата все още е слабо проучена и в двете групи преживни животни. Представяме резултати от първото задълбочено проучване за муфлони, свободно живеещи в един ловен резерват в западния

Резюмета на български език от Научните публикации на гл.ас. д-р Виолета Вълчева Русева

Юни 2020

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),
Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

регион на страната. Целта беше да се докаже наличието на MAP в диагностични материали от уловени и застреляни муфлони със съмнение за паратуберкулоза. Тънки черва и мезентериални лимфни възли от 12 уловени и 4 мъртви муфлона и 10 фекални проби са проучени в периода 2009–2013 г. Характерните за паратуберкулоза патоморфологични лезии са установени в четири муфлона (от 16 изследвани). Чревната стена беше удебелена, силно нагъната и мека, с тежка хиперемия. Мезентериалните лимфни възли бяха увеличени, меки, с мраморен вид. Засегнатият участък на илеума показва хиперплазия на лигавичен корион и субмукоза с дифузна инфилтрация на епителиоидните клетки. Установена е и лимфаденопатия с атрофия на Т и В -лимфоцитив мезентериалните лимфни възли. За бактериологично изолиране на MAP, тъканните и фекалните проби се обработват с NALC-NaOH, култивират се в Middlebrook 7H9 бульон и върху среда на Herrold's. Оцветените по Ziehl-Neelsen препарати и изолати бяха изследвани микроскопски за бързо растящи киселинно устойчиви бактерии. Присъствие на MAP се наблюдава при тъканни проби от 4 (25%) проби от муфлони и 2 (20%) фекални проби. Същите проби бяха потвърдени с IS900 PCR за наличието на специфични за MAP фрагменти с търговски кит. Случаите на паратуберкулоза, открити по различно време в свободно живеещи муфлони в нашето проучване, доказват, че болестта съществува в България и подчертаваме необходимостта от по-сериозния ѝ контрол сред дивите и домашни преживни животни.

4. Случаи на установена паратуберкулоза в сърни в България

Magdalena Bonovska¹, Tanya Savova², Reneta Petrova², **Violeta Valcheva¹**, Hristo Najdenski¹

¹ Institute of Microbiology, BAS, Sofia, Bulgaria; ² National Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute, Sofia, Bulgaria

Резюме

В периода 2009–2013 г. беше проведено първото задълбочено ветеринарно изследване на паратуберкулоза (болест на Джон) при елени в България. Представяме патоморфологични, микробиологични и PCR резултати от изследваните тънки черва и мезентериални лимфни възли на 29 отстреляни елени през ловния сезон и 5 свободно живеещи елени в ловен резерват в Западна България. Бяха изследвани 23 лопатари, 1 червен елен, 2 бели елени, 4 сърни и 4

Резюмета на български език от Научните публикации на гл.ас. д-р Виолета Вълчева Русева

Юни 2020

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),
Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

кошути. Характерни за паратуберкулозата патологични лезии са наблюдавани при 2 лопатара и 1 сърна. Беше наблюдавано удебеляване на чревната мукоза на илеума с еластична текстура, приличаща на церебрален кортекс/мозъчна кора. Мезентериалните лимфни възли бяха увеличени в различна степен. Хистологично се наблюдава грануломатозен ентерит и лимфаденопатия с атрофия на Т и В лимфоцитите в мезентериалните лимфни възли. В микроскопски намазки и бактериологична култура бе потвърдено наличието на MAP. PCR анализ с детекция на инсерционата секвенция IS900 показва наличието на специфични 209-bp фрагменти. Пробите от другите изследвани животни са отрицателни. Изследвани са и фекалните проби от ректума на пет от отстреляните елени. В две от тях чрез Ziehl-Neelsen оцветени намазки бяха наблюдавани бързо растящи киселинно устойчиви бактерии. Те бяха бактериологично и PCR положителни. Единичните случаи на паратуберкулоза, открити през различни периоди в свободно живеещи елени в нашето изследване доказват, че болестта съществува в България. Резултатите показват необходимостта от допълнителни по-обширни проучвания на ловните резервати в България за определяне разпространението на паратуберкулозата при дивите животни.

5. Паратуберкулозата при животни и хора – актуален здравен и икономически проблем

Magdalena Bonovska¹, Tanya Savova², **Violeta Valcheva¹**, Hristo Najdenski¹

¹The Stephan Angeloff Institute of microbiology, Department of Infectious microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, ²National Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute, Sofia, Bulgaria

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* е етиологичният причинител на паратуберкулозата при животните (болест на Джон) и хората (болест на Крон). Този обзор разглежда етиологията, епидемиологията патогенезата и диагнозата на заболяването при домашните и дивите животни и хората, както и новите предизвикателства пред диагностиката, контрола и общественото здравеопазване. Обръща се внимание на големите икономически загуби в световен мащаб, които паратуберкулозата причинява на засегнатите ферми, поради намаленото производство на мляко, месо и продукти от тях, увеличаването на маститите и безплодието при

Резюмета на български език от Научните публикации на гл.ас. д-р Виолета Вълчева Русева

Юни 2020

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),
Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

животните и разходите за лечение на болелите хора – медикаменти и амбулаторно обслужване. Обосновава се и необходимостта от разработване на Национална програма за бърза диагностика, мониторинг и контрол на паратуберкулозата в България, подобно на прилаганите такива в други засегнати от заболяването страни. Тази програма ще позволи провеждане на епидемиологични анализи и съвременна оценка на риска за здравето на животните и хората.

6. LAM (Латиноамерикански-Средиземноморски) кластер на *Mycobacterium tuberculosis* : човешкото влияние върху филогеографията на патогена

Igor Mokrousov^a, Anna Vyazovaya^a, Tomotada Iwamoto^b, Yuriy Skiba^c, Ilva Pole^{d,e}, Svetlana Zhdanova^f, Kentaro Arikawa^b, Viacheslav Sinkov^f, Tatiana Umpeleva^g, **Viолета Valcheva^h**, Maria Alvarez Figueroaⁱ, Renate Ranka^d, Inta Jansone^d, Oleg Ogarkov^f, Viacheslav Zhuravlev^j, Olga Narvskaya^{aj}

^a Pasteur Institute, St. Petersburg Russia, ^bKobe Institute of Health, Kobe, Japan, ^cAitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Almaty, Kazakhstan, ^dLatvian Biomedical Research and Study Centre, Riga Latvia, ^eCenter of Tuberculosis and Lung Diseases, Riga East University Hospital, Riga Latvia, ^fScientific Center of Family Health and Reproductive Problems, Irkutsk, Russia, ^gUral Research Institute of Phthisiopulmonology, Ekaterinburg, Russia, ^hInstitute of Microbiology, BAS, Sofia, Bulgaria, ⁱCentral Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia, ^jResearch Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russia

Резюме

Понастоящем изолати на *Mycobacterium tuberculosis* от латиноамериканското средиземноморско семейство (LAM) могат да бъдат открити далеч отвъд Латинска Америка и Средиземноморския регион. Установихме рамкова филогения на този географски интригуващ и патобиологично важен клон и правим хипотезата как човешката демография и миграция влияят върху нейната филогеография. Филогенетичния анализ на LAM изолати от всички континенти въз основа на 24-VNTR локуси и други маркери идентифицира три глобални подлинии с определени географски афинитети - RD115, RD174 и SIT33. Една малка сублиния (сполиготип SIT388) изглежда, че е ендемичен за Япония. Бяха установени специфични алели на VNTR локуси, които служат като маркери за тяхното търсене в публикуваната литература и географско картографиране. Предполагаме, че LAM произхожда от региона на Западното Средиземноморие. Най-разпространеният подтип RD115 е най-древен и обхваща генетично и географски отдалечени клонове, включително и XDR-KZN в Южна Африка и LAM-RUS

**Резюмета на български език от Научните публикации
на гл.ас. д-р Виолета Вълчева Русева**

Юни 2020

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),
Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

разпространен в Северна Евразия. Подтип RD174 вероятно е започнал активното си разпространение в Бразилия; неговият по-ранен клон е относително доминантен в изолати от Южна Америка, а производният от него е доминиращ сред португалски и южно/югоизточно африкански изолати. Сравнително най-новата подлиния SIT33 се открива в цяла Америка и включва южноафриканския тип F11/RD761, който вероятно се е появил в рамките на субпопулацията SIT33 след появата си в Африка. В допълнение към SIT388-подлиннията, други дълбоко ендемични LAM подлинии могат да съществуват, които трябва да бъдат открити. Като заключение, миграцията на човешката популация е основният фактор, който формира филогеографията на *M. tuberculosis* през големи времеви периоди.

**7. Разпространение на LAM (Латиноамериканско-Средиземноморско)
генетично семейство в популационната структура на *Mycobacterium
tuberculosis* в България**

Violeta Valcheva^a, Nalin Rastogi^b, Igor Mokrousov^c

^a Department of Infectious Microbiology, Institute of Microbiology, BAS, ^b WHO Supranational Tuberculosis Reference Laboratory, Tuberculosis and Mycobacteria Unit, Institut Pasteur de Guadeloupe, Franc, ^c Laboratory of Molecular Microbiology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

Резюме

Контролът върху туберкулозата остава важен приоритет за общественото здраве за България. Популационната структурата на *Mycobacterium tuberculosis* е клонална и някои генетични семейства от вида (напр. латиноамериканско-средиземноморско (LAM) привличат по-голямо внимание поради тяхното глобално разпространение и / или специфични патогенни свойства, напр., мултирезистентност (MDR). Целта на това проучване беше да се определи разпространението на семейство LAM в България, въз основа на използването на различни молекулярни маркери. Общо 101 щамове *M. tuberculosis* предварително типирани със метода сполиготипиране са изследвани чрез LAM-специфичен PCR анализ за откриване на инсерционната секвенция IS6110 в специфичния регион на генома. Като цяло за повечето щамове се получиха ясни резултати, които се препокриха с тези получени от сполиготипирането. В същото време получените двойни сигнали/бендове за някои от щамове дават основание за допълнително проучване на LAM-специфичния PCR. Наблюдава се по-

Резюмета на български език от Научните публикации на гл.ас. д-р Виолета Вълчева Русева

Юни 2020

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),
Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

висока честота на MDR сред LAM щамове спрямо другите генотипове ($P = 0,04$). В заключение, тези резултати предполагат ниска честота на разпространение (<4%) на LAM в България (което е подобно на балканските съседи) и подчертава значението на използването на по-точни маркери за правилното откриване на семейство LAM.

8. Генетично разнообразие на популацията на *Mycobacterium tuberculosis* в България

Viолета Valcheva¹, Igor Mokrousov², Olga Narvskaya², Nalin Rastogi³, Nadya Markova¹

¹Department of Pathogenic Bacteria, The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria ²Laboratory of Molecular Microbiology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia ³Unité de la Tuberculose et des Mycobactéries, Institut Pasteur de Guadeloupe, Abymes, Guadeloupe

Резюме

Туберкулозата остава важен проблем за общественото здраве за България, балканска страна разположена в регион на света с контрастна епидемиологична ситуация на туберкулоза. Тук представяме резултати от последните проучвания за генетичното разнообразие на популацията на *M. tuberculosis* в България, която е оценена с различни ДНК методи (spoligotyping, 24-MIRU-VNTR и IS6110-RFLP типирание). Според сполиготипирането популационната структура на *M. tuberculosis* в България се оказва доста разнородна. Доминиращи са няколко световно разпространени сполиготипа ST53 и ST47 и специфични за Балканите сполиготипове ST125 и ST41. Щамове с Weijing генотип не са открити в България, въпреки тесните връзки с Русия през последните години и в историческото минало. Сравнението с международната база данни SITVIT2 (Институт Пастьор Гваделупа) показва, че сполиготип ST53 се намира в подобен и доста висок дял в съседна Гърция и Турция и почти еднакво разпределени в различните региони на България. Обратно, ST125 не се среща в другите Балкански страни и е специфичен за България; а и е разпространен основно в южната част на страната. Новият 15/24-MIRU-VNTR локусен формат беше установен, че е с най-висока дискриминираща способност в сравнение със сполиготипирането и IS6110-RFLP за *M. tuberculosis* щамове в България. Освен това, VNTR типиранието се оказва полезно за разрешаване на двусмисленната филогения на някои сполиготипове, по-специално на тези, класифицирани като LAM / S след

Резюмета на български език от Научните публикации на гл.ас. д-р Виолета Вълчева Русева

Юни 2020

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),

Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

биоинформатичен анализ. На практика, намалената 5-локусова схема, специфична за България (MIRU40, Mtub04, Mtub21, QUB-11b, QUB-26) осигури достатъчно висока дискриминация и може да бъде предложена за първично генотипиране на щамове *M.tuberculosis* в България, въпреки че са необходими допълнителни изследвания, за да се валидира тази схема. В същото време цялостно вторично подтипиране на кластеризираните изолати трябва да се тества със всички 15 дискриминационни локуса. Допълнително изследвахме молекулната основа на лекарствената резистентност на изследваните щамове. Три вида мутации на *groB* са открити при 20 от 27 RIF-устойчиви изолати; *groB* S531L беше най-честият. Единадесет (48%) от 23 INH резистентни изолати имат мутация в *katG* S315T. *inhA* -15C> T мутация беше открита в един INH-устойчив изолат (който също има мутация в *katG*315) и три INH-чувствителни изолати. Мутация в *embB*306 бе открита в 7 от 11 изолати, устойчиви на ЕМВ. Следователно, *groB* и мутации *embB*306 могат да служат за бързо генотипно откриване на по-голямата част от RIF и устойчиви на ЕМВ щамове в България; резултатите за устойчивост на INH са сложни и е необходимо по-нататъшно изследване на повече гени. Комбинираният анализ от сполитотипиране и 24-MIRU-VNTR метода, показва, че придобиването на лекарствена резистентност и разпространението на резистентни щамове в България не е свързано със популационната структура на *M. tuberculosis*, в частност преобладаване на определен генотипен клон в страната ни. Локалната циркулация на специфичните клонове изглежда, че е важен фактор при молекулярно-епидемиологичните изследвания на туберкулозата в България.

9. Актуални аспекти на туберкулозните проучвания в България: епидемиология и лекарствена резистентност

Valcheva V., Markova N.

Department of Infectious Microbiology, Laboratory of Genetics and Drug Resistance of Mycobacteria, The *Stephan Angeloff* Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

Резюме

Туберкулозата остава важен здравен проблем за България, страна разположена в регион с контрастираща епидемиологична ситуация по отношение разпространението на туберкулозата. Представените резултати отразяват нашите изследвания върху генетичното разнообразие на *Mycobacterium tuberculosis* в България въз основа на различни ДНК фингърпринтинг методи.

Резюмета на български език от Научните публикации на гл.ас. д-р Виолета Вълчева Русева

Юни 2020

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),
Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

Популационната структура на *M.tuberculosis* е доста хетерогенна и в нея преобладават няколко глобално разпространени международни (ST53, ST47, ST34) и балкански (ST125, ST41, ST284) сполиготипа. Щамове със сполиготип Вејѝнг не са открити, въпреки дълготрайните връзки и миграция на населението между Русия и България през 20 век. Сполиготип ST53 присъства в приблизително еднакво висок процент в съседните ни по географско разположение страни Гърция и Турция и почти навсякъде в България. Значителният процент на разпространение на ST125 и слабото му присъствие в други страни по света, както и отсъствието му в съседните ни държави доказва филогеографската специфичност на този сполиготип за страната ни. Новият 15/24- локусов формат на MIRU-VNTR метода показва най-висока дискриминираща способност в сравнение със сполиготипирането и IS6110-RFLP. Охарактеризирана е молекулярната основа на лекарствената резистентност на изследваните щамове. Мутациите в *rpoB*(507- 533) и *embB*306 могат да се използват за бърза генетична детекция на рифампицин- и етамбутол-резистентни щамове. Сравнението на сполиго- и 24-VNTR типиранието показва, че придобиването и разпространението на (мулти)резистентна туберкулоза не е свързано с популационната структура на *M. tuberculosis* в страната ни (сполиго- и MIRU-VNTR генотип). Локалната циркулация на клонове е съществен фактор, който трябва да се отчита при молекулярно-епидемиологичните изследвания на туберкулозата в България.

10. Лекарствена резистентност на *Mycobacterium tuberculosis*: молекулярни основи и генотипна детекция

Violeta Valcheva¹ and Igor Mokrousov²

¹The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, BAS, ²St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

Резюме

Появата на мултирезистентни щамове *Mycobacterium tuberculosis* и тяхното глобално разпространение налагат развитие, оценка и сравнение на бързите молекулярни тестове, насочени към генетични детерминанти на бактериална резистентност към лекарства. Понастоящем е наличен широк набор от такива методи и изборът на най-подходящите е сред задачите на Националната програма за борба с туберкулозата. Неадекватната и/ или прекъсната терапия позволява подбора на спонтанни мутации в полза на резистентните щамове, докато последователното придобиване на тези мутации в различни локуси на генома води до развитие

**Резюмета на български език от Научните публикации
на гл.ас. д-р Виолета Вълчева Русева**

Юни 2020

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),
Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

на резистентност към множество лекарства. Стандартният DOTS курс включва петте лекарства от първа линия: рифампин (RIF), изониазид (INH), стрептомицин (STR), етамбутол (EMB) и пиазинамид (PZA). Мултирезистентната туберкулоза (MDR) се определя като резистентност към най-малко RIF и INH. Лекарствената резистентност се характеризира с мултигенен контрол (*rpoB*, *katG*, *inhA*, *ndh*, *embB*, *rpsL*, *rfs*, *rncA*, *gyrA*) и различно географско разпространение на мутациите. Правилната и бърза детекция на лекарствената резистентност улеснява точната и навременна терапия и намалява общите разходи за лечение. Определянето на лекарствената резистентност на *M. tuberculosis* чрез молекулярни методи представлява бърза алтернатива в сравнение с културалните методи за фенотипна чувствителност. Сред използваните досега генотипни методи са директно секвениране, технологията на микрочипове, PCR-SSC полиморфизъм, РНК / РНК несъответствие, молекулни “*beacons*” и други анализи. Генотипичните методи позволяват бързо определяне на резистентността към основните антитуберкулозни лекарства в значителна част от *M. tuberculosis* щамовете, циркулиращи в райони с висока степен на MDR-TB.

**11. Специфичност и спорна филогеография на българския сполиготип
Mycobacterium tuberculosis ST125–BGR**

**Violeta Valcheva¹, Igor Mokrousov², Stefan Panaiotov³, Elizabeta Bachiiska³, Thierry Zozio⁴,
Christophe Sola⁴, Nadya Markova¹, Nalin Rastogi⁴**

¹The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, BAS, ²St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, ³National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria, ⁴ Institut Pasteur de Guadeloupe, Guadeloupe, France

Резюме

Локалната специфичност на бактериалните клонове може да се обясни с дълготрайно присъствие или наскоро принесен или бързо разпространение в даден регион. *Mycobacterium tuberculosis* сполиготип ST125, разпространен сред специфичните за България сполиготипове има характерно „съкратен“ профил и неизяснена позиция (семействата LAM или S).

Резюмета на български език от Научните публикации на гл.ас. д-р Виолета Вълчева Русева

Юни 2020

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),
Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

Сравнението с базата данни SITVIT2 (Институт Пастьор, Гваделупа) показва негово голямо присъствие в България (14,3%) в сравнение с нищожното присъствие в останалия свят. Последващото типизиране на всички налични български щамове ST125 разкри, че те: (i) са монофилетично клъстеризирани в 21-MIRU локусово дърво от всички български щамове; (ii) са тясно групирани със сполиготип ST34, прототип от семейство S; и (iii) не съдържат LAM-специфична IS6110 секвенция. Сравнението на 21-MIRU локусовата схема с географските данни разкри сложния модел на разпространение на ST125 в България. Интересното е, че VNTR схемата, се потвърждава хипотеза на единична загуба на повтор като основен начин на еволюция на VNTR локуси при *M. tuberculosis*. В заключение, *M. tuberculosis* сполиготип ST125 е филогеографски специфичен за България. Този сполиготип не е свързан с лекарствената резистентност или увеличената трансмисивност, неговото разпространение в България може по-скоро да се дължи на историческата/локалната му циркулация в страната.

12. Популация на *Mycobacterium tuberculosis* в затвори в Киргизстан: изключително високо разпространение на генотип Beijing и неговия специфичен за Русия подтип

Igor Mokrousov ^a, Violeta Valcheva ^b, Nurmira Sovhozova ^c, Almaz Aldashev ^c, Nalin Rastogi ^d,
Jainagul Isakova ^c

^a Laboratory of Molecular Microbiology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia ^b Department of Pathogenic Bacteria, The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria ^c Institute of Molecular Biology and Medicine, Bishkek, Kyrgyzstan, ^d Unite de la Tuberculose et des Mycobacteries, Institut Pasteur de Guadeloupe, France

Резюме

Представяме резултати от първото изследване на циркулиращите генотипове *Mycobacterium tuberculosis* в Киргизстан. Съсредоточихме се върху популация от хора в затвори, за която се знае, че е с висок риск от туберкулоза и със значително влияние върху заболяемостта от туберкулоза в общата популация. Генотип Beijing е открит в 42 от 56 ДНК-проби от храчка, изолирани от пациенти с диагностицирана белодробна туберкулоза. RIF и INH резистентността е генотипно открита в 28% и 55% проби; 13 от 15 MDR щамове принадлежат на генотипа Beijing. 12-MIRU-VNTR локусова схема показва, че 8 от 56 проби са микс-инфекции; 7 от тях съдържат

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),

Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

генотип Beijing. MIRU анализът показва висока хомогенност на изследваната колекция (HGI = 0,66), и 28 от 56 щамове имат профил 223325153533, съответстващ на Beijing/M2 подтип, преобладаващ в различни руски райони. Три хипервариативни локуса, QUB-3232, VNTR-3820 и VNTR-4120, позволиха по-нататъшно подразделяне на 28-те Beijing/M2 подтипа на 11 подтипа, от 1 до 9 щамове. В заключение, всички маркери взети заедно, показват, че популация на *M. tuberculosis* в затвори в Киргизстан проявява силен генетичен афинитет към Русия и слаба свързаност с Източна Азия.

13. Лекарствено-резистентна туберкулоза в България: молекулярни аспекти

Violeta Valcheva¹, Nadya Markova¹, Nalin Rastogi², Olga Narvskaya³, and Igor Mokrousov³

¹The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, BAS, Sofia, Bulgaria ² Unité de la Tuberculose et des Mycobactéries, Institut Pasteur de Guadeloupe, France ³St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

Резюме

Туберкулозата заразява значителна част от световното население и представлява основен проблем за общественото здраве, особено в развиващите се региони. Повторното заразяване с туберкулоза придружено с увеличеният брой на лекарствено резистентни щамове *Mycobacterium tuberculosis*, включваща моно и полирезистентност към лекарства се наблюдава още от средата на 80-те години. В България честотата на мултирезистентна туберкулоза (MDR-TB) се изчислява на 10,7% сред ново диагностицираните пациенти с туберкулоза през 2006 г., който процент е много по-висок в сравнение със съседните страни. Нарастващият процент на MDR-TB изисква наблюдение на устойчивостта и бързото ѝ откриване. Характеристиката на молекулната основа на лекарствената резистентност в областта на изследване е първа стъпка преди прилагането на такива методи. Тук представяме данни за молекулната основа на лекарствената резистентност на *Mycobacterium tuberculosis* щамове, които в момента циркулират в България. Сравнихме и разпространението на мутациите за резистентност към лекарства в рамките на основните генотипни кластери, идентифицирани чрез сполиготипизиране и VNTR типизиране на нашите щамове. Изследователският панел се състоеше от 133 (включително 37 резистентни към лекарства) *Mycobacterium tuberculosis* щамове, изолирани от ново диагностицирани, епидемиологично несвързани, белодробно болни пациенти с туберкулоза от различни региони на България през 2005-2006 г. Три типове на

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),
Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

groB мутации са открити в 20 от 27 RIF-резистентни щамове, а groB S531L беше най-често срещаният. Десет (45,5%) от 22 INH-устойчиви изолати имат katG S315T мутация. inhA -15C> T мутацията е открита при 3 INH-чувствителни щамове и един INH-резистентен щам, който също има мутация в katG315. Мутация в embB306 е намерена в 7 от 11 EMB-устойчиви щамове. Не са открити мутации в gprL43 в изследваната селекция от резистентни на STR и чувствителни към STR щамове. Сравнението на сполиготипизирането и 24- VNTR не разкриха значителна разлика в разпределението на лекарствената устойчивост между кластеризирани и некластеризирани изолати. В заключение, i) groB и мутациите в embB306 могат да служат за бързо генотипично откриване на по-голямата част от RIF и устойчиви на EMB щамове в България; (ii) резултатите за устойчивост на INH са сложни и е необходимо по-нататъшно изследване на повече гени; (iii) появата и разпространението на лекарствено-устойчиви и MDR-TB в България не е свързана с някакъв специфичен сполиготип или MIRU-VNTR кластер.

14. Еволюция на лекарствената резистентност в различни подлинни на региони на *Mycobacterium tuberculosis* от Beijing генотип

Igor Mokrousov¹, Wei Wei Jiao,² Gui Zhi Sun,³ Jia Wen Liu,³ Violeta Valcheva,⁴ Mo Li,² Olga Narvskaya,¹ A Dong Shen²

¹Laboratory of Molecular Microbiology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia; ²Public Central Laboratory, Beijing Pediatric Institute, Beijing Children's Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing, China, ³Clinical Laboratory, Beijing Chest Hospital, Wenquan Town, Haidian District, Beijing China ⁴ Department of Pathogenic Bacteria, The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

Резюме

Сравнихме популационната структурата и лекарствената резистентност на щамове *Mycobacterium tuberculosis* циркулиращи в района на Пекин, Китай. Сто и тринадесет от 123 щамове принадлежат към Beijing генотиповете, определени чрез сполиготипиране. Щамовете с Beijing генотип допълнително се подразделиха на древни и нови подлинни на базата на анализ в NTF локуса. Наблюдавана бе по-силна връзка с резистентността към наскоро въведените

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),

Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

анти туберкулозни лекарства за древните срещу новите щамове на Beijing генотипа, което предполага, че различните му подлинии могат да се различават в техните механизми на адаптация към селективното въздействие на лекарството.

15. Демонстриране на персистиращи и лекарствено-толерантни L-форми на *Mycobacterium tuberculosis* по време на инфекция при плъхове

Nadya Markova¹, Lilia Michailova¹, Mimi Jourdanova¹, Vesselin Kussovski¹, **Violeta Valcheva¹**, Igor Mokrousov², Tatyana Radoucheva¹

^a Department of Pathogenic Bacteria, The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria, ^b Laboratory of Molecular Microbiology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

Резюме

Установеният модел за изследване на микобактериалната L-форма *in vivo* демонстрира способността на *M. tuberculosis* да се държи като устойчива на лекарства L-форма. Плъховете бяха заразени по интраназален (i.n.) и интраперитонеален (i.p.) начин с 1×10^8 клетки / ml с *M. tuberculosis*. На седмични интервали за период от пет седмици, проби от белия дроб, далака, черния дроб, бъбреците, мезентериалната и ингвиналните лимфни възли, бронхоалвеоларна и перитонеална промивна течност се посяват едновременно върху среда на Левенщайн-Йенсен (LJ) или инокуирани в специален обогатен за L-форми бульон Dubos (без лекарства и съдържащи лекарства варианти). Използването на течна среда позволява изолирането на микобактериални L-образни култури през целия период на експеримента, включително през последните две седмици, когато туберкулозните бацили не са били изолиран върху LJ среда. Уникална особеност на микобактериалните L-форми е способността им да растат по-бързо от класическите туберкулозни бацили. Изолирането и растежът на културите на L-форми в първична среда съдържаща лекарства, показва техните лекарствено-толерантни свойства. Електронната микроскопия на изолати от течни среди показва, че те се състоят от морфологично хетерогенни популации, свързани с мембрана и от променливи L-тела, на които напълно липсват клетъчните стени. Идентичността на изолираните не киселинно бързо растящи и морфологично модифицирани L-форми беше верифицирано чрез молекулярно генетичен метод

**Резюмета на български език от Научните публикации
на гл.ас. д-р Виолета Вълчева Русева**

Юни 2020

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),
Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

– сполиготипиране. Резултатите допринасят за специални аспекти, свързани с важноста на микобактериалния феномен на L-форми за персистентност и латентност при туберкулозата, фенотипна лекарствена толерантност, както и за диагностициране на трудно идентифицирани морфологично променени туберкулозни бацили, които често се бъркат като замърсители.

**16. Липсата на клетъчна стена и нейният ефект върху метицилин
хетерорезистентни щамове *Staphylococcus aureus***

Nadya Markova^a, Irina Haydoushka^b, Lilia Michailova^a, Rumyana Ivanova^b, **Viолета Valcheva^a**,
Mimi Jourdanova^a, Tatyana Popova^b, Tatyana Radoucheva^a

^a Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria, ^b Plovdiv University Hospital, Plovdiv, Bulgaria

Резюме

Клинични щамове на *Staphylococcus aureus* с различни фенотипни характеристики на чувствителност към метицилин, с или без *mecA* ген, бяха тествани за тяхната способност да се трансформират при липса на клетъчна стена при специални условия на култивиране. Преобразуването в L-форма с образуване на типични L- колонии „пържено яйце” и наличието на резистентност към оксацилин се наблюдават при чувствителни (*mecA*-отрицателни) и хетерорезистентни (*mecA*-положителни) щамове. Електронно микроскопското изследване на тези щамове разкри плеоморфни популации от клетки с липса на клетъчна стена с ултраструктурна морфология, подобни на контролната L-форма на *S. aureus*. Резултатите показаха, че тази експресия на фенотипна метицилинова резистентност е свързана с липсата на клетъчна стена в щамовете *S. aureus*, което може да бъде в основата на явлението хетерорезистентност.

Резюмета на български език от Научните публикации
на гл.ас. д-р Виолета Вълчева Русева

Юни 2020

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),
Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

17. Синтез, антимикробактериална активност и докинг изследване на 2-aroyl-
[1]benzopyrano[4,3-c]pyrazol-4(1H)-one производни и свързани с тях хидразид-
хидразони

Violina T. Angelova ^a, **Violeta Valcheva** ^b, Tania Pencheva ^c, Yulian Voynikov ^a, Nikolay Vassilev
^d, Rositsa Mihaylova ^a, Georgi Momekov ^a, Boris Shivachev ^e

^aFaculty of Pharmacy, Medical University of Sofia, ^bInstitute of Microbiology, BAS, ^c Institute of Biophysics and Biomedical Engineering, BAS, ^dInstitute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, BAS, ^e Institute of Mineralogy and Crystallography, BAS

Резюме

Използван е нов удобен метод за получаване на производни на 2-aroyl-[1]benzopyrano[4,3-c]pyrazol-4(1H)-one - 5b-g и кумарин, съдържащи хидразид-хидразонови аналози 4a-e. Тествани са *in vitro* антимикробактериалната активност срещу референтен щам *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv и *in vitro* цитотоксичност срещу човешката ембрионална бъбречна клетъчна линия HEK-293. Всички съединения показаха минимална инхибираща концентрация (MIC), варираща от 0,28-1,69 μ M, сравними с тези на изониазида. Цитотоксичността (IC₅₀ > 200 μ M) срещу HEK-293T, показва, че 22-aroyl-[1]benzopyrano[4,3-c]pyrazol-4(1H)-one - 5b-g, е по-добра в сравнение с тази на техните хидразонови аналози 4a-e (IC₅₀ 33–403 μ M). Молекулярни докинг изследвания на съединенията 4a-e и 5b – g също бяха проведени за изследване тяхното свързване с ензима 2-транс-еноил-АСР-редуктаза (InhA), който участва в биогенезата на клетъчната стена на *M. tuberculosis*. Моделът на свързване предполага един или повече водород свързващи и / или арен-Н или арено-аренови взаимодействия между хидразони или пиразол-свързани кумаринови производни със InhA ензима за всички синтезирани съединения.

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),
Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

18. Антимикобактериална активност на нови хидразид-хидразон производни с 2Н-хромен и кумаринов скелет

Violina T. Angelova^a, **Violeta Valcheva**^b, Nikolay G. Vassilev^c, Rosen Buyukliev^a, Georgi Momekov^d, Ivan Dimitrov^a, Luciano Saso^e, Mirjana Djuki^{cf}, Boris Shivachev^g

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Sofia, ^b Institute of Microbiology, BAS, ^c Laboratory of Nuclear Magnetic Resonance, Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, BAS, ^d Laboratory of Experimental Chemotherapy, Department of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Medical University-Sofia, ^eDepartment of Physiology and Pharmacology "Vittorio Erspamer", Sapienza University, ^fDepartment for Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, ^gInstitute of Mineralogy and Crystallography, BAS

Резюме

Това проучване представя синтезата на нови 2Н-хромен или кумарин свързани ацилхидразони на които са оценени *in vitro* антимикобактериалната активност срещу референтен щам *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv и сравнени с тези на противотуберкулозните лекарства от първа линия - изониазид (INH) и етамбутол (EMB). Най-активните съединения 7m (MIC 0.13 µM), 7o (MIC 0.15 µM) и 7k (MIC 0.17 µM) демонстрират антимикобактериална активност и забележително минимална цитотоксичност срещу човешка ембрионална бъбречна клетъчна линия HEK-293T. Установена е и връзката между структура-активност за този клас съединения.

19. Антимикобактериална активност на хирални аминокиселини с камфанов скелет

Zhanina Petkova^a, **Violeta Valcheva**^b, Georgi Momekov^c, Petar Petrov^d,
Vladimir Dimitrov^a, Irini Doytchinova^c, Georgi Stavrakov^c, Malinka Stoyanova^a

^aInstitute of Organic Chemistry with Center of Phytochemistry, BAS, ^b Institute of Microbiology, Bulgarian BAS, ^c Faculty of Pharmacy, Medical University of Sofia, ^d Faculty of Chemistry and Pharmacy, Sofia University St. Kliment Ohridsky

**Резюмета на български език от Научните публикации
на гл.ас. д-р Виолета Вълчева Русева**

Юни 2020

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),

Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

Резюме

Поредица от аминокислотни производни бяха синтезирани чрез реакция на аминизиране на камфорни производни. Съединенията бяха тествани за тяхната *in vitro* активност срещу *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Десет от новите структури показват много по-висока активност от противотуберкулозния антибиотик етамбутол. Някои от най-активните съединения са тествани срещу мултирезистентен *Mycobacterium tuberculosis* щам N43 и четири от тях демонстрираха добри активности с МИК 0.27- 0.72 mM. Определена е и цитотоксичността на представителна извадка от съединенията показали добра антимикулобактериална активност. Направено е и количествено определяне на структура - активност (QSAR) модел и е показан принос на всеки структурен фрагмент към активността. Камфорсвързаните аминокислотни производни са обещаващи съединения за по-нататъшно разработване на нови антимикулобактериални агенти.

20. Ефективен синтез на нови (R)-2-амино-1-бутанол урея производни, тиюрея и ацил тиюрея и *in vitro* оценка на тяхната антимикулобактериална активност

Georgi M. Dobrikov ^a, Violeta Valcheva ^b, Yana Nikolova ^a, Iva Ugrinova ^c, Evdokia Pasheva ^c, Vladimir Dimitrov ^a

^a Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, BAS, ^b The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, BAS, ^c Institute of Molecular Biology, BAS

Резюме

Синтезирани са 22 структурно разнообразни производни на карбамид, тиюрея и ацилтиюрея, съдържащи (R)-2-амино-1-бутанол мотив. Оценката на тяхната *in vitro* активност срещу *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv и MDR-TB N43) показва обещаващи резултати в полза на производни на ацилтиюрея (МИК обхват 0,36e7,46 mM за Mtb H37Rv щам).

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),
Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

21. Нови анти-туберкулозни средства на базата напроизводни на камфан с наномоларна активност

Georgi Stavrakov ^a, **Violeta Valcheva** ^b, Irena Philipova ^c, Irini Doytchinova ^a

^a Faculty of Pharmacy, Medical University of Sofia, ^b Institute of Microbiology, BAS, ^c Institute of Organic Chemistry, BAS

Резюме

Поредица от нови амидоалкохоли и амидодиоли са проектирани на основата на камфорния скелет и е оценена тяхната *in vitro* активност срещу *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv и мултирезистентен щам 43. Някои от новите съединения показват 25 пъти по-висока активност от класическото противотуберкулозно лекарство етамбутол. Малки структурните промени в страничната верига изместват активността от микромолярни към наномоларни инхибиторни концентрации. Направено е количественото определяне на връзката структура- активност (QSAR). Две водородни връзки и до три пръстена в молекулите са оптимални за наномоларна активност. Амидите на базата на камфан представляват нови обещаващи структури за антимикобактериални агенти.

22. Синтеза и антимикобактериална активност на нови диамидни производни на манделовата киселина

G. Stavrakov¹, I. Philipova², **V. Valcheva**³

¹Faculty of Pharmacy, Medical University of Sofia, ² Institute of Organic Chemistry, BAS, ³ Institute of Microbiology, BAS

Резюме

Нов диамидо-диол, получен от манделова киселина, беше синтезиран на основата на (1R, 2R) - 1,2-диаминоциклохексанов скелет и оценен за неговата *in vitro* активност срещу *M. tuberculosis* H37Rv. Съединението показва активност, сравнима с тази на класическото противотуберкулозно лекарство етамбутол.

За участие в конкурс за „Доцент” в проф.направление 4.3. Биологически науки (Микробиология),
Обява ДВ бр. 47/22.05.2020г.

**23. Антимикобактериална активност на нови камфан-производни на
изоиндолина**

G. Stavrakov¹, V. Valcheva², G. Dobrikov³

¹Faculty of Pharmacy, Medical University of Sofia, ²Institute of Microbiology, BAS, ³Institute of Organic Chemistry, BAS

Резюме

На основата на камфорния скелет беше синтезиран нов изоиндолин, съдържащ amino-алкохол и беше оценена неговата *in vitro* активност срещу *M. tuberculosis* H37Rv. Съединенията показват активност съпоставима с тази на класическото противотуберкулозно лекарство етамбутол. Наличните структури на основата на камфан са нови обещаващи съединения за използването им като антимикобактериални средства.

**24 Синтез и *in vitro* антимикобактериална активност на съединения, аналози
на (R) - и (S) -2-амино-1-бутанол - решаващата роля на конфигурацията**

Georgi M. Dobrikov^a, Violeta Valcheva^b, Margarita Stoilova-Disheva^b, Georgi Momekov^c,
Pavleta Tzvetkova^a, Angel Chimov^a, Vladimir Dimitrov^a

^a Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, BAS, ^b The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, BAS, ^c Department of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Medical University, Sofia

Резюме

Синтезирани са 47 структурно разнообразни съединения, включващи (R) -2-амино-1-бутанолов мотив. Установено е, че десет от тези съединения проявяват *in vitro* специфична активност срещу *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv в МИК диапазон 0,65 mM-14,03 mM. Пет от най-активните съединения 11, 22, 23, 31 и 42 (5.7 - 11.1 пъти по-активни от етамбутола) могат да бъдат очертани с много ниска цитотоксичност към човешки ембрионални бъбречни нетуморни клетки (SI варира от 91.2 до 375.4). За сравнение (S)-енантиомерите на тези най-активни съединения са синтезирани и тяхната активност е оценена срещу *M. tuberculosis* H37Rv, но не показват активност дори при 20- 32 пъти по-високи концентрации.