

До членовете на Научно Жури
Назначено със Заповед No
На Ректора на Медицински Университет - Варна

P - 109 - 132 / 2.04.19

РЕЦЕНЗИЯ

относно дисертационен труд на д-р Добромира Йорданова Димитрова на тема: „Микробиологични и молекулярно-генетични проучвания върху разпространението и механизмите на резистентност към бета-лактами и хинолони при клинично значими *Enterobacter spp.* ” с научни ръководители доц. д-р Румяна Донкова Марковска-Давидкова, дм и проф. д-р Теменуга Стоева, дм за придобиване на ОНС „Доктор” по научна специалност “Микробиология”.

Изготвил рецензията: проф. Д-р Тодор Кантарджиев, дм, дмн, от НЦЗПБ

Нямам общи публикации и нямам конфликт на интереси от друг характер по смисъла на ал.1, т.3 и 5 от ДР на ЗРАСРБ с докторанта

Актуалност на избрания научен проблем

През последните десетилетия *Enterobacter spp.* придобиват важно клинично значение като причинители на инфекции, свързани с медицинското обслужване, вкл. вътреболнични епидемии, предимно при пациенти в критично състояние. Представителите на род *Enterobacter* са сред петте най-често изолирани бактериални вида в болничните микробиологични лаборатории и трети по честота причинители на бактериемии. Често се докладват и като етиологични агенти на

уроинфекции, раневи инфекции, инфекции на дихателната и централна нервна система и септични състояния. Удължена продължителност на болничния престой, предхождащ прием на антимикробни лекарствени средства (особено цефалоспорини от трета генерация), наличие на централен венозен или артериален катетър, интубация и други инвазивни манипулации, асоцииращи се с нарушение на естествените механични бариери, тежки заболявания като диабет, онкохематологични заболявания, солидни тумори и трансплантация са документирани рискови фактори за възникване на *Enterobacter* spp. инфекции, особено на бактериемии. Лечението на тези инфекции може да бъде затруднено поради увеличаващата се устойчивост в рода към различни антимикробни лекарствени средства.

В последните години особено нараства резистентността в представителите на род *Enterobacter* към хинолони, аминогликозиди и β -лактамни антибиотици, като резистентността към последните предимно се асоциира с продукцията на β -лактамази. Най-често доказваните и широко разпространени в световен мащаб са ESBLs и AmpC ензими (хромозомно- и/или плазмидно-кодирани). В началото на 2017г. СЗО дефинира приоритетен списък с патогени с цел откриване и разработване на нови антимикробни лекарствени средства срещу множествено резистентни Грам-отрицателни бактерии. В този списък резистентните към трета генерация цефалоспорини *Enterobacter* spp. се отнасят към групата означена като "I-во приоритетно ниво с критичен статус", което показва значимостта и тежестта на инфекциите, с които те се асоциират. Всички тези факти ми дават основание да смятам, че избраната тема на дисертационния труд на д-р Д. Димитрова е изключително актуална и много навременна.

Структура на дисертационния труд

Представеният ми за становище дисертационен труд е написан на 166 стр., като е структуриран по общоприетата схема: Използвани съкращения - 2 стр.; Увод - 2 стр., Литературен обзор - 41 стр., Материали и методи - 17 стр., Резултати и Обсъждане - 64 стр., Изводи - 2 стр. Дисертационният труд е онагледен с 16 таблици и 22 фигури.

Оценка на качествата на литературния обзор

Литературният обзор е написан изключително компетентно и на високо научно ниво, като са използвани 305 заглавия, от които 120 от последните 5 години, което е доказателство за

актуалността на научната информация и богатата литературна осведоменост на д-р Д. Димитрова.

В литературния обзор много детайлно и актуално са представени основните научни данни, отнасящи се до настоящия таксономичен статус на род *Enterobacter* с фокус върху представителите на *Enterobacter cloacae* complex и основните методи (фенотипни и молекулярно-генетични) за видова идентификация на включените в този комплекс видове.

Систематизирано и изчерпателно са разгледани биохимичните и генетични механизми на резистентност към бета-лактамните антибиотици и флуорохинолоните, описани в представителите на *Enterobacter cloacae* complex. В обзора е отделено специално внимание на епидемиологията на инфекциите, причинени от *Enterobacter* spp., като са изяснени местообитанието и разпространението на тези микроорганизми в болничната среда и подробно е представен спектъра от инфекции, асоциирани с *Enterobacter* spp. Разгледани са разнообразието от методи, които се използват за целите на епидемиологично типизиране.

Цел и задачи

Поставената цел е ясно формулирана, а задачите (общо 6) съответстват на основната цел.

Оценка на раздел “Материали и методи”

Дисертационният труд на д-р Д. Димитрова е проучване върху голям брой (176) неповтарящите клинично значими изолати *Enterobacter* spp., изолирани от пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ “Света Марина”, Варна. Проучването е извършено чрез използване на разнообразие от методи за определяне на чувствителността към антимикробни лекарствени средства и съвременни молекулярно-генетични методи за определяне видовата принадлежност на изолатите, за идентификация на механизмите на резистентност към цефалоспорини от трета генерация и хинолони и за целите на епидемиологичното типизиране на проучваната колекция от изолати *Enterobacter* spp.

Оценка на раздел “Резултати”

Получените резултати са представени в 8 подраздела и са много добре илюстрирани с общо 16 таблици и 22 фигури.

Видовата идентификация на колекцията от изолати *Enterobacter cloacae* complex е извършена чрез фенотипни методи и потвърдителен молекулярно-генетичен метод, като последния доказва принадлежността на изолатите в 99% към вида *E. hormachaei*. Д-р Димитрова установява, че автоматизираната Phoenix 100 система няма достатъчна дискриминираща сила да разграничи видовете от *E. cloacae* complex.

Докторантката прилага скринингови фенотипни методи за детекция на ESBLs при проучваните клинични изолати *Enterobacter* spp., резистентни на цефалоспорини от трета генерация (двойно-диск синергистичен метод и за хиперпродукция на AmpC ензими), които показват незадоволителна чувствителност.

Съществена част от работата представляват резултатите, получени от молекулярно-генетичните изследвания върху механизмите на резистентност към цефалоспорини от трета генерация. Чрез PCR и секвениране д-р Димитрова установява продукция на ESBLs ензими в над 85%, с водещото значение на CTX-M-15 за *E. cloacae* complex и CTX-M-3 ESBLs за *E. aerogenes*.

Сред главните достойнства на дисертацията са резултатите, свързани с идентификация на генетичните механизми на резистентност към хинолони. В 59% от изследваните изолати *Enterobacter* spp. докторантката установява наличие на PMQR с доминиране на *qnrB* (*qnrB1*, *qnrB9*) (90%) и слабо разпространение на *qnrA*, *qnrS* и *aac(6')-Ib-cr* (единични изолати). В над 50% от изолатите са доказани хромозомни мутации, свързани с *gyrA* и *parC* гените.

Чрез епидемиологичното типизиране и филогенетичния анализ д-р Димитрова доказва широка вътреболнична дисеминация и трайно присъствие на един основен клон *E. cloacae* complex с изразен инвазивен потенциал. При микробиологичното изследване на болнична среда е доказан изолат *E. cloacae* complex, генетично идентичен с клинични изолати от различни клиники на болницата, което е доказателство за ролята на заобикалящата среда като фактор за предаването и вътреболничното разпространение на този микроорганизъм.

Обсъждането на резултатите е важна част от дисертационния труд. Всички получени резултати са анализирани задълбочено и в детайли, като са сравнявани с подобни проучвания от научната литература. Това дава основание на д-р Д. Димитрова да формулира 7 основни извода от своята работа, които са логично и правилно формулирани, следват данните от резултатите и отговарят на поставените цел и задачи. Приемам релевантността на направените изводи.

Оценка на приносите на дисертационния труд

От получените резултати и направени изводи д-р Д. Димитрова формулира 11 приноса, които напълно приемам:

Приноси с оригинален характер (3):

1. Извършен е детайлен анализ на плазмидните и хромозомни механизмите на резистентност към хинолони в голяма колекция от клинични изолати *Enterobacter* spp., като са доказани предимно *qnrB* гени, както и единични изолати с *qnrA* и *qnrS* алели.
2. Идентифициран е първият български изолат *E. cloacae* complex, произвеждащ AmpC β -лактамазата DHA-1.
3. Чрез *hsp60* секвениране е доказано превалиране на *E. hormaechei* в изследваната колекция от клинични изолати *E. cloacae* complex.

Приноси с потвърдителен характер (4):

1. Установено е доминиращото участие на ESBLs при развитието на резистентност към цефалоспорини от III-та генерация.
2. Потвърдено е широкото разпространение на CTX-M β -лактамазите и в частност на CTX-M-15, както и в по-малка степен на CTX-M-3 и SHV-12 в *Enterobacter* spp.
3. Потвърдена е ролята на хоризонталното вътревидово плазмидно предаване за разпространението на ESBLs гените.
4. Потвърдено е значението на клоналното вътреболнично разпространение на *E. cloacae* complex в епидемиологията на инфекциите, причинени от този микроорганизъм, както и ролята на заобикалящата среда като фактор за предаването и вътреболничното му разпространение.

Приноси с научно-приложен характерен (4):

1. Оценени са възможностите на автоматизираната система Phoenix 100 (BD) за идентифициране на микроорганизмите от *E. cloacae* complex.
2. Оценена е чувствителността на фенотипните тестове за детекция на ESBLs и AmpC β -лактамази при изолати *Enterobacter* spp., резистентни на III-та генерация цефалоспорини.
3. Въведена е методика за определяне на плазмидни и хромозомни детерминанти за хинолонова резистентност.

4. Апробирана е молекулярно-генетична методика – *hsp60* секвениране, за идентификация на видовете от *E. cloacae* complex.

Наукометрични показатели

Направените публикации във връзка с дисертацията са 3 - в две български реномирани научни издания. И в трите публикации д-р Димитрова е първи автор, което е доказателство, че дисертационният труд е нейно лично дело. Има участия в 3 научни форума, един, от които международен.


Критични бележки

Д-р Д. Димитрова се е съобразила с направените от мен забележки като вътрешен рецензент.

Заключение

Представеният ми за становище дисертационен труд на д-р Д. Димитрова представлява задълбочено проучване по много актуален клинично-микробиологичен проблем, извършено с разнообразие от класически и съвременни генетични методи. По структура, съдържание и обем дисертацията отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и на критериите на МУ-Варна. Работата съдържа множество резултати, които са в съответствие и изпълняват поставените цел и конкретни задачи. Тези резултати са задълбочено обсъдени и са формулирани няколко основни извода, както и оригинални, потвърдителни и приноси с научно - приложен характер, които са лично дело на дисертанта.

Въз основа на гореизложеното давам положителна оценка на дисертационния труд и предлагам на членовете на научното жури да гласуват положително за присъждане на образователна и научна степен “доктор” по научна специалност “Микробиология” на д-р Добромира Йорданова Димитрова.



Проф. Тодор Кантарджиев