

До председателя на Научно жури,
определено със Заповед Р-109-132/02.04.2019
на Ректора на МУ-Варна

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Румяна Донкова Марковска-Давидкова, дм
Катедра по Медицинска Микробиология
Медицински факултет, Медицински Университет – София

относно дисертационен труд на тема: “Микробиологични и молекулярно-
генетични проучвания върху разпространението и механизмите на
резистентност към бета-лактами и хинолони при клинично значими *Enterobacter*
spp. ”

на д-р Добромира Димитрова, докторант на самостоятелна подготовка към
Катедрата по микробиология и вирусология, МУ-Варна, представен за придобиване
на образователна и научна степен „доктор” по научна специалност
“Микробиология” в професионално направление
4.3. Биологически науки

Представените документи по процедурата са изготвени коректно, като са
спазени изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република
България и правилника за прилагането му в МУ-Варна.

Биографични данни

Д-р Димитрова завършва медицина през 2013г в МУ-Варна като още същата
година започва работа като микробиолог в Добрич. През 2015 започва работа в

Катедрата по микробиология и вирусология, Му-Варна като почти веднага започва работа по дисертационния си труд.

Актуалност на научния проблем

Като представители на сем. *Enterobacteriaceae*, видовете от род *Enterobacter* са широко разпространени в околната среда. Те са нормални обитатели на гастроинтестиналния тракт и като такива са подложени на селективен натиск. Заедно с *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. оформят т.нар. ESKAPE група патогени с изключително голямо значение за човешката патология.

През последните десетилетия *Enterobacter* spp. придобиват важно клинично значение, докладват се като причинители на бактериемии, уроинфекции, раневи инфекции, инфекции на дихателната и централна нервна система и септични състояния. Лечението на тези инфекции може да бъде затруднено поради нарастващата резистентност в рода, особено към хинолони, аминогликозиди и β -лактами, като резистентността към последните предимно асоциира с продукцията на β -лактамази. Най-често доказваните и широко разпространени в световен мащаб са ESBLs и AmpC (хромозомно- и/или плазмидно-кодирани) ензими, както и в последните година на карбапенемази. Таксономията и идентификацията на видовете от род *Enterobacter* е затруднена. Контролът върху вътреболничното разпространение на мултирезистентни щамове *Enterobacter* spp. и осъществяването на адекватна антибиотична терапия на инфекциите, асоциирани с тях е истинско предизвикателство. Тези факти отразяват значимостта на темата на дисертационния труд.

Структура на дисертационния труд

Представеният материал е написан на 166 страници и е структуриран в следните раздели:

1/ Увод - 2 стр; Литературен обзор – 40 стр; Цели и задачи – 1 стр; Материали и методи – 17 стр.; Резултати и обсъждане – 64 стр.; Изводи – 2 стр.; Справка за приносите и списъци на публикации и участия в научни прояви – 2 стр.; Библиография – 28 стр.

Съотношението между отделните раздели е добро. Дисертационния труд е онагледен с 22 фигури и 16 таблици и е написан на точен научен език. Изложението се чете лесно, а данните са представени ясно.

Литературният обзор е написан подробно и на високо научно ниво. Историческите данни, таксономията, микробиологичните характеристики, спектъра на инфекциите, причинени от този микроорганизъм, както и основните механизми на резистентност са умело представени. Подробно са разгледани методите за идентификация, както и за типизиране на изолатите. Книгописът съдържа 305 източника (124 от източниците (41%) от последните 5 години). Литературната справка достатъчно задълбочено представя проблема и известните до момента данни, както и очертава необходимостта от допълнителни проучвания.

В резултат на направеният обзор е изведена ясна **цел**, като поставените **шест задачи** ѝ съответстват, научно обосновани са и включват последователното изпълнение на основните етапи в проучването.

Разделът **“Материали и методи“** включва описание на изолатите, както и на методите за тяхното изследване. Проучени са 176 изолата, колекционирани за периода 2014-2017г . Използвани са както стандартните микробиологични методи за идентификация и определяне на чувствителността, така и съвременни молекулярно-генетични методи за идентификация на микроорганизмите (hsp60 секвениране), за определяне на точните механизми на резистентност към бета-лактами и хинолони. Подробното описание на използваните методи дава възможност те да бъдат възпроизведени.

Резултатите и обсъждането са обединени логично в общ раздел. Той включва осем подраздела със собствените проучвания.

Представени са разпределението на *Enterobacter cloacae* complex изолатите, съобразно вида на клиниката и материала, от които са изолирани. Идентификацията на изолатите е извършена със автоматизирани и полуавтоматизирани системи и молекулярно-генетично чрез hsp60 секвениране. Установено е наличието на *E. hormaechei* - в 99% от изолатите и един изолат *E. ludwigii*., както и немъжността на автоматизираната система Phoenix 100 да идентифицира коректно *E. hormaechei*, макар и заложен в база данни. Определянето на чувствителността показва, че висок процент от изолатите за периода 2014-2017г са резистентни към цефалоспорини трета генерация – 57%, както и, че те демонстрират във висока степен резистентност и към представители и на други антибиотични групи – gentamicin, piperacillin/tazobactam и trimethoprim/sulphamethoxazole. Изолатите са нечувствителни към ciprofloxacin в 85%. След карбапенемите imipenem и meropenem, с най - голяма активност срещу *Enterobacter* spp. се отличава amikacin. Предимство на работата е анализа на чувствителността съобразно спектъра на инфекциите. По-високи нива на резистентност се установяват при изолати *Enterobacter* spp. от кръв и урина в сравнение с тези от раневи секрети. Проведените фенотипни методи за детекция на ESBLs при клинични изолати *Enterobacter* spp. показват незадоволителна чувствителност. В дисертационния труд се проучват механизмите на резистентност към цефалоспорини трета генерация и се установява, че тя се дължи предимно на продукция на CTX-M-15 за *E. cloacae* complex и CTX-M-3 ESBLs за *E. aerogenes*. При изолатите без продукция на ESBLs резистентността се дължи най-вероятно на хиперпродукцията на AmpC ензими. Само при един изолат е доказана продукция на DNA-1 ензим. Предимство на дисертационния труд е епидемиологичното типизиране, което установява през целия проучван период и във всички клиники на един основен клон (клон А) *E. cloacae* complex с изразен инвазивен потенциал. Особен интерес представлява подразделът разглеждащ механизмите на хинолонова резистентност. В 59% от изследваните изолати *Enterobacter* spp. се установяват

наличие на PMQR с доминиране на *qnrB* (*qnrB1*, *qnrB9*) и сравнително слабо разпространение на *qnrA*, *qnrS* и *aac(6)-Ib-cr* (единични изолати). *QnrB* се асоциира с продукцията на СТХ-М-15, *qnrA* - с SHV-12, а *qnrS* - с продукцията на СТХ-М-3. Единственият изолат с алел *qnrB4* продуцира СТХ-М-3 и ДНА-1. В над 50% от изолатите се доказват хромозомни мутации за *gyrA* и *parC* гените. Получените резултати са анализирани и съпоставени с данни от литературата, което показва отлично познаване на проблема.

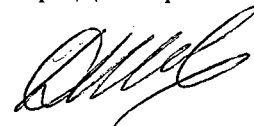
Формулираните седем извода са правилно формулирани, те кореспондират на поставените задачи и получените резултати. Приемам формулираните научни приноси на дисертационния труд,

Получените резултати в дисертационния труд са обобщени в 3 публикации и участия в 3 научни форуми. Докторантката е първи автор и в трите представени статии, което показва водещата ѝ роля. Съобщенията са изнесени на национални форуми. Всички публикации и съобщения са по темата на дисертационния труд. Броят на публикациите и представените участия на научни форуми отговарят на изискванията на МУ-Варна.

В заключение, считам, че представеният дисертационен труд на д-р Добромира Димитрова е актуален, извършен с голямо разнообразие на микробиологични и молекулярно-генетични методи, със съществен приложен и теоретичен принос в областта на съвременната микробиологичната практика. Като научен ръководител личните ми впечатления от докторантката са много добри. По структура, съдържание и обем дисертационният труд напълно отговаря на критерии в ЗРАСРБ и Правилника на МУ-Варна за ОНС "доктор". Предлагам на членовете на Научното жури да гласуват за присъждане на **образователната и научна степен „доктор” по научна специалност “Микробиология”** на д-р Добромира Димитрова.

София, 18.05.2019

Изготвил рецензията:



/Доц д-р Румяна Марковска-Давидкова/