

## РЕЦЕНЗИЯ

от

Проф. д-р Грозданка Томова Лазарова, дм  
Ръководител Катедра Микробиология, Тракийски Университет -  
Медицински факултет, Стара Загора

на

Дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ по Докторска програма Микробиология, направление Медицина на д-р Гергана Неделчева Куюмджиева, асистент в Микробиология и вирусология на Медицински Университет, „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна, на тема : **Епидемиологично типизиране и механизми на антибиотична резистентност в клинично значими *Klebsiella pneumoniae*, изолирани в УМБАЛ „Света Марина”, Варна, с научни ръководители : проф.д-р Теменуга Стоева , д.м. и доц.д-р Румяна Марковска, д.м.**

Д-р Гергана Н. Куюмджиева е родена на 01.03.1965 г. в гр. Варна. Средно образование завършва в Математическа гимназия в гр. Шумен , а през 1990 г. – магистър Медицина , в МУ, Варна ..

Работи последователно като лекар в отделение по педиатрия, лекар Обща медицина, главен експерт и началник отдел в РЗИ, Варна . От 2015 г. досега е асистент по Микробиология и лекар в микробиологична лаборатория – МБАЛ Варна.

Има придобити две медицински специалности : Детски болести и Микробиология

### Академично развитие

Понастоящем ръководи занятия по учебни дисциплини: Микробиология – практически упражнения със студенти – медици.

Владее английски език, писмено и говоримо.



Член е на БАМ.

. Дисертантът работи като асистент в катедра „Микробиология и Вирусология“ на МУ - Варна и като лекар в лаборатория по микробиология във ВМА - МБАЛ - гр. Варна.

Дисертационният труд е лично дело на д-р Куюмджиева , като експерименталната работа е извършена в Катедра „Микробиология и Вирусология“ при МУ - Варна, УМБАЛ „Света Марина“ - Варна и Катедра „Медицинска Микробиология“ при МУ - София.

Дисертационният труд е представен на **188 стр.**, съдържа **22** фигури и **21** таблици. Цитирани са **482** литературни източници, от които **6** на кирилица и останалите на латиница.

Съдържането е правилно структурирано и включва : **увод** , **литературен обзор**, **цел и задачи**, **материали и методи**, **резултати и обсъждане**, **обобщение**, **изводи и препоръки**, **приноси**, **библиография**, **приложение и списък на научни публикации**. във връзка с дисертационния труд.

**Въведението и литературният обзор** съдържат важни данни за *K. pneumoniae* като един от най-значимите бактериални видове , причинители на инфекции, свързани с медицинското обслужване , сред петте най-често изолирани бактериални видове в болничните микробиологични лаборатории.

*K. pneumoniae* заема трето място по честота на изолиране от всички клинични материали на пациенти, вкл. и сред хоспитализирани в УМБАЛ „Света Марина“, и е сред водещите патогени на бактериемиите .в България и Европа



В последните две-три десетилетия се наблюдава тревожна тенденция на нарастване на резистентността на този бактериален вид към различни групи антимикуробни лекарствени средства, като най-често този феномен се асоциира с придобиването на различни плазмиди.

Неслучайно видът *K. pneumoniae* е отнесен към групата патогени означени като ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*.species). Тези бактериални видове са парадигма за множествена резистентност и крос-трансмисия.

С особена острота стои проблемът с лечението на инфекции, причинени от мултирезистентни *K. pneumoniae* и нарастването в глобален план на резистентността към стратегически антибиотици и „антибиотици на последен избор“ особено в интензивните болнични структури.

Всички тези тревожни данни правят настоящият дисертационен труд изключително актуален .

**Целта** на дисертационния труд е формулирана точно и ясно и е насочена към проучване чувствителността и механизмите на резистентността към бета-лактами и хинолони на клинично значими изолати *Klebsiella pneumoniae* от пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ „Света Марина“ - гр. Варна в периода 2014 - 2017г. и да се определи клоналната свързаност на изолатите.

За изпълнение на целта на дисертационния труд са поставени **пет основни задачи**, които са добре формулирани , достатъчно конкретни и осигуряват реализирането на основната цел на дисертационния труд

#### **Материали и методи :**

Извършено е ретроспективно проучване на **158** клинични изолатата *K. pneumoniae* , получени за периода януари 2014 г. - декември 2017г.



Методите са правилно подбрани и систематизирани в 7 подгрупи :  
и включват :. **Методи за идентификация на *Klebsiella pneumoniae***  
; **Методи за изпитване на чувствителността на *Klebsiella pneumoniae***  
**към антимикробни лекарствени средства :** ( Дискново - дифузионен  
метод, Методи за определяне на М П Концентрация ,Определяне на МПК  
чрез използване на МІС стрип (Epsilonometer test), Определяне на МПК на  
colistin и tygescycline чрез микродилуционния метод на серийните  
разреждания в бульон.; **Фенотипни методи за доказване на щамове,**  
**продуценти на бета- лактамази; .Молекулярно-генетична**  
**идентификация** на видовете бета- лактамази (ESBLs, AmpC,  
карбапенемази и механизмите на хинолонова резистентност ) и методи за  
**Епидемиологичен анализ.**

В раздела „**Резултати и обсъждане**“ са представени интересни данни за разпространението, антибиотичната резистентност на клинично значими *Klebsiella pneumoniae* изолати . В проучвания период, *K. pneumoniae* е сред десетте най-често изолирани микроорганизми от всички изследвани клинични материали, като заема трето място по честота на изолируемост ., особено в микробния спектър на бактериемите.

Представени са данни за високи нива на резистентност при изолираните *K. pneumoniae* към основните антибиотични групи, използвани в клиничната практика. , като най-високо ниво на резистентност е установено в групата на цефалоспорините от трета и четвърта генерация (ceftazime, cefotaxime, 54.8%, cefepime, 52.7%, piperacillin/tazobactam 47.4%), следвано от това към хинолоните (ciprofloxacin, levofloxacin - 47.1%, 42.8%) и към gentamicin (38.3%).



Установено е , че антибиотичната резистентност на тестваните изолати *K. pneumoniae* варира според анатомичното място на изолиране , като инвазивните изолати *K. pneumoniae* от хемокултури демонстрират сигнификантно по-високо нива на резистентност към всички тествани антибиотици в сравнение с изолатите от други видове клинични материали. Най-високо ниво на резистентност сред тази група изолати е доказано към цефалоспорините от трета генерация cefotaxime и ceftazidime (81%). Голяма част от от cefotaxime - резистентните инвазивни изолати *K. pneumoniae*, изолирани от хемокултури, демонстрират множествена резистентност, което създава сериозно терапевтично затруднение и е значим фактор за изхода от инфекциите на кръвта, асоциирани с такива изолати. След бета-лактамна група антибиотици (*ceftazidime, cefotaxime, piperacillin/tazobactam*), най-високи нива на резистентност са доказани за хинолоните *ciprofloxacin* и *levofloxacin*, както в цялата проучвана група, така в групата на изолатите от хемокултури (65% и 59% съответно).

Високи нива на антибиотична резистентност се установяват и сред групата изолати *K. pneumoniae* от урини: cefotaxime (59%), cefepime (57%), piperacillin/tazobactam (53%), gentamicin (41%), ciprofloxacin (52%) и levofloxacin (48%).

Резистентността към карбапенеми сред всички изолати е 4%, като при инвазивни изолати *K. pneumoniae* е най- висока - 11% ( над средното за Европа ) . Сред причините за повишената изолируемост на инвазивни, карбапенем - резистентни *K. pneumoniae* в УМБАЛ "Света Марина" - Варна, се обсъждат възможна *вътреболнична дисеминация* на епидемични, карбапенем-резистентни клонове *K. pneumoniae*, *вътревидов хоризонтален трансфер на гените*, кодиращи резистентност към карбапенемни антибиотици или *вносяне на различни (в генетично отношение) карбапенем-резистентни K. pneumoniae изолати в болницата*. По данни от мониторирането на КПР щамове в УМБАЛ



„Света Марина“ показват , съхранена активност на карбапенемните антибиотици срещу инвазивни изолати *K. pneumoniae* . Това е безспорно резултат от рестриктираната употреба на тези стратегически антибиотици в УМБАЛ.

Определена е чувствителността към три антимикробни лекарствени препарата, определяни като стратегически антибиотици и средства на последен избор при инфекции, причинени от карбапенем-резистентни изолати *K. pneumoniae* - ceftazidime/avibactam, colistin и tigecycline. Представените резултати показват ,че в групата на карбапенем-резистентните *K. pneumoniae*, с най- добра активност заедно с amikacin са *ceftazidime/avibactam* (10.5%), следван от *colistin* (21%) и *tigecycline* .

Установена е липса на синергизъм и/или наличие на синергизъм/антагонизъм при DDST при 29 изолата. Анализирани са резултатите от двойно-дискос синергичен тест с цефалоспорини трета генерация и amoxicillin/clavulanic acid (20/10) за установяване наличието на ESBLs бета-лактамази в изолати от *K. pneumoniae* . Доказана е добра чувствителност ( 81 % ) , както и при използване на модифицирания тест за наличие на карбапенемази ( 92%.) .

Интерес представляват използваните **молекулярно-генетични методи** за доказване на **гени, кодиращи бета –лактамази :**

гени, кодиращи CTX-M и SHV ESBLs; ; гени, кодиращи AmpC ензими; гени, кодиращи OXA бета-лактамази; гени, кодиращи бета-лактамази с карбапенемазна активност..

За определяне вида на бета-лактамазата е използван метод **изоелектрично фокусиране IEF** и **биологичен тест за бета-лактамазна хидролитична активност**. С помощта на IEF е потвърдена продукцията на установените при PCR експериментите групи бета-лактамази, като те са съответствали на броя на доказаните с IEF ензими.



Обобщените данни показват , че една от възможностите за определяне вида и броя на бета-лактамазите е методът на **изоелектрично фокусиране**.

При комбиниране на този метод с полимеразо-верижна реакция и секвениране могат да се идентифицират основните типове бета-лактамази. В настоящия дисертационен труд изоелектричното фокусиране е показало присъствие на различни бета -лактамази и наличието и продукцията на всички ензими, доказани с PCR експериментите, а комбинацията на този метод с биологичния тест за хидролитична активност спрямо cefotaxime показва присъствие на тясноспектърни и широкоспектърни ензими с бета-лактамазна активност, както и карбапенемази.

Представени са обобщени данни , показващи , че основният механизъм на резистентност към цефалоспорини от трета генерация в настоящата колекция от изолати *K. pneumoniae* се асоциира с продукцията на ESBLs в 96.9%, като най-чести са CTX-M бета-лактамазите в 93%, с водещото значение на CTX-M-15 в 81.1% и CTX-M-3 в 9.4%. Резистентността към карбапенемни антибиотици се медира от продукцията на карбапенемази, като KPC-2 е най-често продуцираната бета-лактамаза с карбапенемазна активност (21%). NDM-1 и VIM-1 продуцентите са единични.

Проведени са успешни конюгационни експерименти с *bla*<sub>CTX-M-15</sub> и *bla*<sub>CTX-M-3</sub> позитивни изолати и потвърдена плазмидната локализация на тези гени. В положителни за *bla*<sub>CTX-M-15</sub> и *bla*<sub>KPC-2</sub> изолати *K. pneumoniae* се установиха IncFII плазмиди. ложителните трансконюганти, както и IncR - за b/a<sub>CTX-M-15</sub> и b/a<sub>оХА-48</sub>.



#### 4.4. Епидемиологично типизиране

Всички изолати *K. pneumoniae* – 159 , са типизирани чрез ERIC-PCR. Репрезентативни изолати от всеки ERIC бяха подложени на мултилокусно секвениране. Идентифицирани са **17 основни ERIC** типа и **4 подтипа** със следните означения: ERIC A, A1, B, D, D1, E, F, G, H, I, K, L, M, O, P, P1, P2, S, T, W, X . Всички ERIC типове (с изключение на F, O, W) са представени от **клонални групи**, съставени от 2 до 64 щама всеки.

В резултат на обемистия научен труд и анализирани данни , са представени 8 изводи, които приемам изцяло и оценявам като изключително значими и съществени.

В представената справка за приносите на дисертационния труд сред приносите с оригинален и научно-приложен характер на дисертационния труд, бих искала да акцентирам върху огромния по обем проучвания и уникалността на по-голямата част от приложените методики. , особено **Принос 1** , отнасящ се до проучване на плазмидните и хромозомни механизми на резистентност към хинолони и деказаните хромозомни мутации в повече от 70% от изолатите. Бих искала да отлича и **Принос 2** , анализиращ MLST структурата на колекция от 159 изолата *K. pneumoniae* и установеното **разнообразие от циркулиращи секвенциални типове** на фона на широко доминиране и персистирание международен клон *K. pneumoniae* ST15 и в по-малка степен на **ST11**.



В раздела **Приложение** са представени голям брой фигури и таблици и снимки , прегледно илюстриращи дисертационния труд.

Данните са анализирани и обработени със прецизни статистически методи. които удостоверяват и илюстрират получените резултати и следващите от тях изводи и приносите на дисертационния труд.

Считам, че като цяло дисертационния труд отговаря и надхвърля изискванията за присъждане на образователната и научна степен „доктор“, поради : **актуалност** на проблема, **голям обем** на проучената литература и **собствена интерпретация** на данните , добре развито и структурирано съдържание на темата, представяне на текста , точна аргументация и добросъвестно цитиране.

Посочените постижения могат да се определят като основни достойнства на представената дисертация

**В заключение** : **оценявам положително** избора на темата, положените усилия в този колосален по обем научен труд , анализа на използваните материали и литература, оригиналните интерпретации и нововъведения.

Предложените от д-р Г.Куюмджиева оригинални, основани на научно-доказателствения материал резултати, комплексни диагностични системи и диагностични методи за повишане качеството на диагностиката. на проблемни клинични изолати *K.pneumoniae*.

Дисертационният труд и материалите по темата показват, че д-р Г.Куюмджиева притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научната специалност Микробиология и възможности за самостоятелно провеждане на научни изследвания.

Предвид на всичко казано, **давам своята категорично положителна оценка** за представения ми за рецензия труд, постигнатите резултати и приноси, автореферата, както и комплексната преценка за преподавателската, диагностична и научна дейност, езикова и медицинска



култура , и предлагам на почитаемите членове на научното жури, да присъди на Д-р Гертана Куиумджиева образователна и научна степен „Доктор” в Докторска програма „ Микробиология” .

29.11.2019 г.

Стара Загора

Рецензент:.....

Проф. Д-р Грозданка Т.Лазарова, д.м.

Р-л катедра Микробиология

Мед.факултет, ТУ-Стара Загора