

До членовете на научно жури
Определено със Заповед № Р-109-132/ 02.04.2019 г.
на Ректора на МУ-Варна

РЕЦЕНЗИЯ

От проф. д-р Ива Стефанова Христова, д.м.н.
Национален Център по Заразни и Паразитни Болести

На дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен
„ДОКТОР” по докторска програма „Микробиология“ в Професионално
направление 4.3. Биологически науки и научна специалност „Микробиология“

Тема на дисертационния труд:

МИКРОБИОЛОГИЧНИ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ
ВЪРХУ РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО И МЕХАНИЗМИТЕ НА РЕЗИСТЕНТНОСТ
КЪМ БЕТА-ЛАКТАМИ И ХИНОЛОНИ ПРИ КЛИНИЧНО ЗНАЧИМИ
ENTEROBACTER SPP.

Автор на дисертационния труд: д-р Добромира Йорданова Димитрова

Дисертационният труд на д-р Димитрова е изключително актуален. *Enterobacter spp.* е един от най-значимите бактериални видове, причиняващи инфекции, свързани с медицинското обслужване. 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, защото причиняват нозокомиални инфекции, а остават с неизяснени патогенеза, трансмисия и резистентност. Световна е тенденцията за увеличаване нивата на резистентност към антимикробни лекарствени средства и развитието на множествена

резистентност при *Enterobacter* spp. Факторите, благоприятстващи развитието на феномена „множествена резистентност“ при *Enterobacter* spp. са много, но основните от тях са способността му да оцелява продължително време във външната среда, вродената му резистентност поради наличие на хромозомно-кодирана AmpC- β лактамаза, придобиване на нови генетични детерминанти, кодиращи резистентност към антибиотици и др. Ето защо този дисертационен труд е толкова навременен.

Общото ми впечатление от дисертационния труд е, че той представлява един отлично замислен, прецизно изпълнен на високо методично ниво и отлично оформен труд, написан много интелигентно, с изчерпателна информация във всичките му раздели, с много достойнства и приноси. Съдържа богат доказателствен и добре онагледен материал от собствените проучвания.

Трудът съдържа 166 страници. Една част от експерименталната работа е извършена в Катедра „Микробиология и Вирусология“ при МУ-Варна, МБАЛ „Света Марина“-Варна, а молекулярно-генетичните изследвания са проведени в Катедра „Медицинска Микробиология“ при МУ-София.

На базата на 305 литературни източника, от които 120 от последните 5 години, докторантката прави задълбочен литературен обзор на 41 страници. Обзорът е едно от големите достойнства на работата, направен е отлично и бих препоръчала да се издаде отделно, за да бъде в помощ на специалистите. Много хубаво впечатление прави, че няма излишна информация, включена е само тази, която касае собствените проучвания. Информацията е детайлно описана и в същото време стегната.

Обзорът дава представа за отличната теоретична подготвеност на д-р Димитрова. Разгледани са особеностите в таксономията, морфологията, културелните и биохимичните характеристики на род *Enterobacter*, възможностите за видова идентификация с фенотипни и молекулярно-генетични методи. Логично тежестта е поставена върху резистентността към антимикуробни лекарствени средства, съответно към β -лактами, флуорохинолони, аминогликозиди, тетра- и глицилциклини. С вещина и познание са описани β -лактамазите в род *Enterobacter* от клас А, клас В, клас С и клас D; съответно мутациите в гените, кодиращи ДНК-гираза и топоизомераза IV, водещи до хинолонова резистентност, както и

механизмите на плазмид-медираната хинолонова резистентност. Детайлно са представени генетичните детерминанти, кодиращи аминогликозидна резистентност. Накрая са разгледани механизмите на резистентност към тигецилин. Много удачно е представена епидемиологията на инфекциите, причинявани от *Enterobacter* spp., с акцент върху нозокомиалните инфекции, рисковите за това фактори и модерните методи за епидемиологично типизиране.

Литературният обзор завършва с обобщение на нерешените въпроси по отношение на резистентността на *Enterobacter* spp. към бета-лактами и хинолони, което логично извежда до целта на дисертационния труд. Задачите са 6, формулирани са ясно и очертават конкретните области на изследване.

Материалите и методите на дисертационния труд са представени изчерпателно и стегнато. Те са в обем общо 17 страници, с описание на използваните 176 клинични изолати *Enterobacter* spp., резистентни на цефалоспорини трета генерация, изолирани в УМБАЛ „Света Марина“ Варна за периода 2014-2017 г. , с представяне на използваните методи за идентификация - мануални, с полуавтоматизирана и напълно автоматизирана система за идентификация и с молекулярно-генетичния подход чрез секвениране на *hsp60* гена. Аналогично при описание на методите за изпитване на чувствителността на *Enterobacter* spp. са описани класически, апаратни и модерни методи. Сред фенотипните методи за доказване на щамове, продуценти на бета-лактамази, искам да отбележа използването на изоелектрично фокусиране за определяне спектъра на продуцираните бета-лактамази. Допълнително, докторантката е овладяла и използвала техниката за конюгационно предаване на плазмиди. Прави впечатление огромният набор от генетични техники, използван при разработване на дисертационния труд.

Начинът на представяне говори за отлична методична подготвеност на д-р Димитрова. Представени са авангардните методи за молекулярно-генетично доказване на гени за резистентност и типизиране.

Освен микробиологичните и молекулярно-генетичните методи, д-р Димитрова е включила и методи от епидемиологичния и статистическия анализ.

Резултатите от собствените изследвания са представени и обсъдени на 64 страници. Дисертацията е илюстрирана адекватно с 16 таблици и 22 фигури.

Описанието на резултатите е точно и информативно. Резултатите са представени в 8 раздела, като следват логичната последователност на поставените задачи. Всеки раздел удачно завършва със заключение и обобщение.

По отношение на видовата идентификация, докторантката установява, че конвенционалните фенотипни методи, включително при използване на автоматизирана система, не идентифицират коректно някои видове, включени в *E. cloacae* complex, което преодолява с *hsp60* секвениране.

Изпитването на чувствителността към бета-лактамни антибиотици на изолатите *Enterobacter* spp. заема основно място в дисертацията. Преди всичко вниманието е насочено към механизмите на резистентност към бета-лактамни антибиотици. С изоелектрично фокусиране докторантката открива бета-лактамази от молекулярни класове А и С в изследваните изолати. Изоелектричното фокусиране в комбинация с биологичния тест за хидролитична активност спрямо cefotaxime ѝ позволяват да установи наличието на тясно- и широкоспектърни бета-лактамази. С полимеразно верижна реакция доказва гените, кодиращи бета-лактамази, а резултатите потвърждава със секвениране. Установява CTX-M ESBLs при 83% (146/176), а SHV в 3.4% (6/176) от изследваните щамове *Enterobacter* spp. В съответствие със световните тенденции разкрива доминиране на CTX-M-15 бета-лактамазите, което буди тревога, предвид мобилността на кодиращите генетични структури. Идентифицира изолат *E. cloacae* complex с плазмид-медиран AmpC ензим от групата на DNA-1, който освен това продуцира CTX-M-3 ESBL. Установява висок процент на асоциация между *bla*_{OXA-1} и *bla*_{CTX-M-15} (98.1%) в положителните за *bla*_{OXA-1} изолати.

За да проучи мобилността на установените гени за резистентност към бета-лактами докторантката, под ръководството на научните си ръководители, предприема конюгационни експерименти. Доказва конюгативно предаване на *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-3} и на маркери на хинолонова резистентност. Установява, че при 29.6% (40/135) от конюгациите успешно са предадени маркери за резистентност към бета-лактами, а при 9.6% (13/135) – към хинолони. Това потвърждава плазмидната им локализация и буди тревога поради възможността за хоризонтален трансфер и дисеминиране.

За целите на епидемиологичното типизиране цялата колекция от *Enterobacter* spp. изолати (n=176) е изследвана с ERIC PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR). Идентифицирани са 15 различни ERIC типа. Тип А е доминиращ (31.8%), следван от тип С (18.2%), тип V (10.8%) и тип Е. Типове D, H, I, J и P са само с по един изолат.

Установена е зависимост между клоналността на изолатите и *hsp60* групата. Много висок процент (70.2%) от изолатите *E. cloacae complex* от хемокултури са отнесени към клон А, което илюстрира инвазивния им потенциал. Получените резултати илюстрират как вътреболничното разпространение на клон А допринася за появата на CTX-M-15 продуциращи *Enterobacter* spp. Установени са също и два по-малки клона: II и III съответно с пет и три изолата от хемокултури, продуциращи CTX-M-15 ESBL и демонстриращи ERIC тип С и V респ. Идентифицирането на изолати от един и също клон в продължение на години в различни отделения на болницата е доказателство за кръстосана трансмисия и продължителна вътреболнична дисеминация. При *E. aerogenes* е идентифициран един клон с шест изолата, ERIC тип G, продуциращи CTX-M-3 ESBL.

Със специфични праймери при 59% (103/176) от изследваните *Enterobacter* spp. са установени гени, кодиращи плазмид-медирана хинолонова резистентност. Най-често установените алели на *qnr* гените са *qnrB1* и *qnrB9*. Потърсена е връзка между типа ESBL и гените за плазмид-медирана резистентност към хинолони. Установено е, че CTX-M-15 доминиращо се асоциира с *qnrB* гени, докато при CTX-M-3 и AmpC продуцентите по-често не се доказват *qnr* гени. Д-р Димитрова задълбочава проучванията си чрез изследване на *gyrA* и *parC* гените, асоциирани с хромозомно-медирана хинолонова резистентност и ги открива при 3% от изследваните изолати *Enterobacter* spp. Тук също предприема конюгационни експерименти и доказва пренос на генетични детерминанти на хинолонова резистентност при 13 изолата *Enterobacter* spp., продуценти на CTX-M-15 ESBLs, като заедно с тях са пренесени и детерминанти на аминогликозидна резистентност. Епидемиологичното типизиране не открива асоциация между конкретен *qnr* вариант и определен клон.

Получен е голям обем от ценни експериментални данни. Постигнати са значими приноси. От съществено значение са приносите с оригинален характер,

сред които са доказване за първи път в страната на *E. cloacae* complex, произвеждащ AmpC бета лактамаза DNA-1, установеното превалиране на *E. homraechei* сред изследваните изолати *Enterobacter* spp., както и детайлният анализ на плазмидните и на хромозомните механизми на резистентност към хинолони на проучените изолати. Високо оценявам и приносите с потвърдителен и научно-приложен характер.


Приложен е списък с 3 публикации и 3 участия в научни форуми, свързани с дисертацията, на всички от които тя е първи автор.

В заключение, дисертационният труд на д-р Добромира Димитрова е на много високо методично ниво, използвани са модерните генетични методи за детайлно и пълно характеризиране на резистентността към бета-лактами и хинолони на проучваните *Enterobacter* spp. изолати, получени са много ценни резултати, направени са съответните анализи за един много съществен по своето значение проблем, свързан с нарастващата антибиотична резистентност на *Enterobacter* spp. и нуждата от модернизиране на методите за определяне на чувствителността им.

Считам, че рецензираният дисертационен труд напълно отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Р. България и Правилника за неговото приложение. Като давам положителната си оценка, убедено предлагам на членовете на научното жури да присъдят на д-р Добромира Йорданова Димитрова образователната и научна степен „Доктор” по докторска програма „Микробиология”.

София
20.05.2019 г.

Рецензент:


(проф. д-р И. Христова, дмн)