До Научното жури

Определено със Заповед № Р-109-132/02.04.2019

на Ректора на МУ-Варна

**СТАНОВИЩЕ**

**по процедура за придобиване на образователна и научна степен „доктор”**

по научна специалност „Микробиология” от д-р Добромира Йорданова Димитрова с 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.”

**от доц. д-р Калинка Динева Божкова, д.м.**

Вътрешен член на Научното жури, определено със Заповед № Р-109-132/02.04.2019 на Ректора на МУ-Варна. Представените материали по процедурата отговарят на изискванията на Закона за развитието на академичния състав на Република България и Правилника за развитието на академичния състав на МУ „Проф. Д-р П. Стоянов”-Варна за присъждане на образователна и научна степен „доктор”.

**Биографични данни и кариерно развитие**. Д-р Добромира Димитрова завършва висше образование по медицина в Медицински университет-Варна през 2013 г. В периода 2013-2015 г. работи като ординатор в лаборатория по клинична микробиология на МБАЛ-Добрич. От 2015 г. и понастоящем е лекар-асистент към катедра Микробиология и вирусология на МУ-Варна, както и клиничен микробиолог в Лабораторията по микробиология на УМБАЛ „Света Марина”-Варна.

**Актуалност на разработваната тема.** Дисертационният труд на д-р Добромира Димитрова е посветен на проучвания върху видовия състав, чувствителността, клоналната свързаност и механизмите на резистентност към бета-лактами и хинолони при 433 клинично-значими изолати *Enterobacter* spp. селектирани за период от три години от пациенти на УМБАЛ „Света Марина”-Варна. Избраната тема прави разработката особено актуална, важна и навременна. Неслучайно *Enterobacter* spp. са включени в т.нар. група ESKAPE-патогени с изключително значение за човешката патология. От една страна, те се доказват все по-често като причинители на тежки инфекции при пациенти в критично състояние и такива със сериозни хронични заболявания. От друга страна, вродената резистентност на *Enterobacter* spp. към значим брой антибиотици от различни класове и придобитата им не чувствителност към терапевтично активните препарати, особено към бета-лактами, хинолони и аминогликозиди, ограничават избора на подходящи препарати за терапия. В нашата страна липсват проучвания върху болничната епидемиология на мултирезистентни *Enterobacter* spp. и тяхната роля във вътреболничната патология. Недостатъчни са системните научни данни за нивата на резистентност, както и за епидемиологичния профил на тези инфекции и взривове, причинени от множествено резистентни клинични изолати *Enterobacter* spp.

Дисертационният труд на д-р Добромира Димитрова представлява един съвременен подход за проучване на болничното разпространение и механизмите на резистентността на *Enterobacter* spp., което го определя като много актуален и значим за клиничната микробиология и болничната епидемиология.

**Структура на дисертационния труд.** Дисертационният труд е в обем 166 стандартни машинописни страници, от които 138 стр. текст, 28 стр. литературни източници, 1 стр. справка за приносите и 1 стр. списък на публикациите. Заглавието отразява същността на работата. Трудът е структуриран логично в 7 раздела: Въведение - 3 стр., Литературен обзор - 40 стр., Цел и задачи - 1 стр., Материали и методи - 17 стр., Резултати и Осъждане - 64 стр. и Изводи - 2 стр. Онагледен е оптимално с 22 фигури и 16 таблици.

**Оценка на качествата на литературния обзор.** Литературната справка включва общо 305 литературни източници, всички на латиница. Преобладават публикации от последните години. Това е доказателство за отличната литературна осведоменост на д-р Димитрова и отразява хронологията и съвременното състояние на проблема в световен мащаб.

Структурата на обзора корелира с поставените цел и задачи в дисертационния труд. В литературната справка са разгледани подробно въпросите и проблемите относно таксономията и идентификацията на видовете от род *Enterobacter* spp., механизмите на антибиотичната резистентност към различни групи антибактериални средства, епидемиологичният профил на вътреболничните инфекции и взривове причинени от множествено резистентни *Enterobacter* spp. Обзорът завършва със заключение, мотивиращо целта и задачите на дисертационния труд.

**Цел и задачи на дисертационния труд.** Целта на дисертационния труд е формулирана точно. За нейната реализация са поставени 6 задачи, които са научно обосновани и включват последователно изпълнението на основните етапи в проучването.

**Оценка на раздел „Материали и методи”.** В представената научна разработка са включени 175 клинични изолата *Enterobacter* spp. Използвани са голям брой съвременни микробиологични и молекулярно-генетични методи за идентификация, изпитване на чувствителността към антимикробни средства, фенотипни методи за доказване на продуценти на бета-лактамази, конюгационно предаване на плазмиди, детерминиращи продукцията на ESBLs и гени за хинолонова резистентност, PCR за типиране на репликони и епидемиологичен анализ. Всички опитни постановки са проведени в съответствие с изискванията за научни изследвания.

**Оценка на раздел „Резултати”.** Извършена е значителна по обем и разнообразна по характер експериментална работа. Получените резултати и тяхното обсъждане следват стриктно поставените задачи.

Установено е, че: (1) Рутинният мануален метод е подходящ само за начална идентификация до *E. сloacae* complex. Доказана е невъзможността на конвенционалните фенотипни методи за правилно идентифициране на видовете, включени в *E. сloacae* complex. Чрез молекулярно-генетични методи е определено, че 99% от проучваните клинични изолати от *E. сloacae* complex са *Е. hormaechei.* (2) Установен е висок процент на резистентни изолати *Enterobacter* spp. към антибиотиците от трета генерация цефалоспорини, gentamicin, ciprofloxacin, piperacillin/tazobactam, trimethoprime/sulphometoxazole. Нивата на резистентност са по-високи от изолираните *Enterobacter* spp. от клиничните материали кръв и урина, в сравнение с тези от раневи секрети. (3) Детекцията на ESBLs чрез фенотипни методи е с незадоволителна чувствителност. (4) Доказани са водещите ензими от ESBLs които са отговорни за резистентността към цефалоспорини от трета генерация. При детекция на гени, асоциирани с плазмид-медиирана хинолонова резистентност сред клинични изолати *E. сloacae* complex резистентни към цефалоспорини от трета генерация се определя висока честота на тези детерминанти. Резултатите на дисертантката демонстрират ясна зависимост между идентифицираните гени на резистентност към хинолони и вида на ESBLs. Установени са конюгативни плазмиди в клонално свързани изолати, което определя големия им потенциал за хоризонтален трансфер и вътревидово дисеминиране, както и широкото разпространение на резистентността към бета-лактами, хинолони и други групи антибактериални препарати сред *E. сloacae* complex. (5) Докладва се за широка вътреболнична дисеминация и трайно присъствие на един основен клон *E. сloacae* complex с изразен инвазивен потенциал.

Обсъждането на резултатите е направено компетентно, задълбочено и изчерпателно. Всички резултати са анализирани и съпоставени с данните от литературата, което е доказателство за отлично познаване на проблема. Д-р Димитрова е формулирала 7 извода, които са в пълно съответствие с получените научни данни.

**Приноси на дисертационния труд.** Като цяло, дисертационният труд има приноси за обогатяване на съществуващите знания в областта на *E. сloacae* complex и за приложение на получените резултати в лабораторната практика при идентификацията на клиничните изолати и определяне на тяхната чувствителност, както и за избора на адекватна антибактериална терапия. Д-р Димитрова формулира три приноси с оригинален характер, които основно са във връзка с детайлния анализ на плазмидните и хромозомни механизми на резистентността към хинолони, доказване превалирането на *Е. homraechei* сред проучваните изолати и идентифицирането на първият български изолат *E. сloacae* complex, произвеждащ AmpC бета-лактамаза DHA-1.

С потвърдителен характер са четири приноси, касаещи доминиращото участие на ESBLs за развитие на резистентността към цефалоспорините от трета генерация, широкото разпространение на различни видове бета-лактамази, потвърдена е ролята на хоризонталното вътревидово плазмидно предаване за разпространението на ESBLs гените и значението на клоналното вътреболнично разпространение на *E. сloacae* complex в епидемиологията на инфекциите, както и ролята на заобикалящата среда като фактор за предаване и вътреболнично разпространение.

Приносите с научно-приложен характер са също четири и представят оценки за възможностите на използваната автоматизирана система за идентификация на *E. сloacae* complex, чувствителността на приложените фенотипни тестове за откриване на различни ензими, кодиращи резистентността към антибактериални препарати, въведена е методика за определяне на плазмидни и хромозомни детерминанти за хинолонова резистентност и е апробирана молекулярно-генетична методика за идентификация на видовете от *E. сloacae* complex.

Резултатите от изследователската работа на д-р Димитрова са отразени в три публикации. Дисертантът представя и три съобщения, изнесени на научни форуми, от които едно е в чужбина. Във всички публикации и съобщения д-р Димитрова е водещ автор, което е безспорно доказателство, че дисертационният труд е нейно лично дело.

**Заключение.** Представеният дисертационен труд от д-р Добромира Димитрова е върху актуален за медицинската микробиология проблем, със съществени приноси в областта на клиничната микробиология, антибактериалната терапия и болничната епидемиология. Считам, че дисертационният труд отговаря по актуалност, обем и съдържание на изискванията на Закона за развитие на академичния състав на Р. България и Правилника за неговото приложение. Давам положителна оценка на дисертационния труд и препоръчвам на членовете на научното жури да присъдят образователна и научна степен „Доктор” на д-р Добромира Йорданова Димитрова.

Изготвил становището:………………………….

/Доц. д-р Калинка Божкова, д.м./

20. 05. 2019