

До

Председателя на Научното жури,

определено със Заповед № Р-109-132/02.04.2019г.

на Ректора на Медицински Университет “Проф. д-р Параскев Стоянов”,

гр. Варна

## СТ А Н О В И Щ Е

от доц. д-р Иванка Илиева Гергова, д.м.,

Ръководител на Катедра „Военна епидемиология и хигиена“, Военномедицинска академия, София, външен член на Научното жури, определено със заповед №Р-109-132/02.04.2019г. на Ректора на МУ - Варна

по процедура за защита на дисертационния труд на д-р Добромира Йорданова Димитрова, за придобиване на образователна и научна степен “Доктор” по научна специалност “Микробиология”, на тема „Микробиологични и молекулярно-генетични проучвания върху разпространението и механизмите на резистентност към бета-лактами и хинолони при клинично значими *Enterobacter spp.*“, с ръководители доц. д-р Румяна Марковска-Давидова, д.м. и проф. д-р Теменуга Стоева, д.м.

Представените материали по процедурата изцяло отговарят на изискванията на Закона за развитието на академичния състав на Република България и на Правилника за развитието на академичния състав на МУ “Проф. Д-р П. Стоянов”- Варна за присъждане на образователна и научна степен “доктор”.

Наблюдаваната, през последните десетилетия, устойчива световна тенденция към нарастване на антимикробната резистентност е основна причина за силното ограничаване на възможностите за адекватно терапевтично повлияване, особено при свързани с медицинското обслужване инфекции. Оформената група ESKAPE-патогени включва патогени с изключително голямо значение за човешката патология - *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.* В дефинирания от СЗО

приоритетен списък с патогени, род *Enterobacter* е включен в I-во приоритетно ниво, патогени с критичен статус.

В световен мащаб се наблюдава отчетливо нарастване на относителния дял на тежко протичащи инфекции, причинени от представители на род *Enterobacter*, които често попадат сред първите пет, най-често изолирани причинители на нозокомиални инфекции. В допълнение, през последните години се отчита нарастване на резистентността им към бета-лактами и други групи антимикробни лекарствени средства – флуорохинолони и аминогликозиди, което от своя страна силно ограничава възможностите за лечение на широкия спектър от причиняваните от тях инфекции. С особена острота проблемът стои при лечението на пациенти в критично състояние. В този аспект считам, че разработената от д-р Димитрова тема е особено актуална не само за страната, но и в частност за УМБАЛ „Св. Марина“, където *Enterobacter* spp. заемат второ място като най-чести изолати при бактериемии през 2015г. и четвърто - през 2016г. Точната видова идентификация има важно значение за определяне на клоналната свързаност на изолатите в лечебното заведение. Предвид силно затруднената видова идентификация в рамките на комплекса *Enterobacter cloacae*, посредством прилаганите обичайно фенотипни методи, приемам, че представените в дисертационния труд на д-р Димитрова възможности за коректно идентифициране на *Enterobacter* spp., са особено ценни и имат важно значение за уточняване на някои детайли в патогенезата и вирулентните свойства на тези бактерии.

Ето защо избраната тема за дисертационен труд „Микробиологични и молекулярно-генетични проучвания върху разпространението и механизмите на резистентност към бета-лактами и хинолони при клинично значими *Enterobacter* spp.“ е актуална както в теоретичен, така и в приложен аспект за здравната система в България.

Дисертационният труд е написан на 166 стандартни страници и е структуриран по общоприетата схема: увод – 2 стр., литературен обзор – 41 стр., цели и задачи – 1 стр., материали и методи – 17 стр., резултати и обсъждане – 64 стр., изводи – 4 стр., приноси – 1 стр. Заглавието точно отразява същността на разработваната тема. Дисертационният труд е онагледен оптимално с 16 таблици и 22

фигури. Литературната справка отразява съвременните проучвания и съдържа 305 заглавия, като 120 от тях са публикувани през последните пет години. Литературният указател на цитираните източници не включва заглавия на кирилица.

Обзорът на литературата е изчерпателен и отразява съвременното състояние на проблема. Написан е компетентно, на високо научно ниво и е изграден въз основа на впечатляваща литературна справка. Представа кратък исторически преглед на таксономията на род *Enterobacter* и описва последователно настоящия таксономичен статус, морфологията, културелните и биохимичните характеристики на рода, с подробно представяне на фенотипните и молекулярно-генетичните методи за видова идентификация. Детайлно са описани механизмите на резистентност към антимикробни средства - бета-лактами, флуорохинолони, аминогликозиди, тетрациклини. Извършен е и подробен преглед на литературните източници по отношение на епидемиологията на инфекциите, причинени от *Enterobacter* spp., представени по анатомичната им локализация. Описани са и методи за епидемиологично типизиране.

Анализът на литературните данни естествено води към прецизно формулиране на целта на дисертационния труд и набелязаните задачи за нейното постигане. Д-р Димитрова си поставя за цел да проучи видовия състав, чувствителността и механизмите на резистентност към бета-лактами и хинолони при клинично значими изолати *Enterobacter* spp., както и да определи клоналната им свързаност.

В изследванията са обобщени резултатите от 3-годишни проучвания (м. март 2014г – м. януари, 2017г.) , извършени върху изолирани от клинични проби на пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна, *Enterobacter* spp.

Материалите и методите са представени много изчерпателно. Подробно са описани проучените бактериални изолати, използваните хранителни среди и консумативи (антибиотични субстанции и дискове). Извършен е прецизен подбор на методите, прилагани за идентификация на *Enterobacter* spp. - фенотипни (конвенционални методи, идентификация чрез полуавтоматизираната система Crystal E/NF, Vecton Dickinson, и чрез автоматизирана система Phoenix 100, Vecton Dickinson) и молекулярно-генетични (полимеразо-верижна реакция (PCR), доказване на алелният вариант – aac (6')-Ib-cr и ДНК секвениране. Подробно и прецизно са

описани и методите за изпитване на чувствителността на изолираните *Enterobacter* spp. към набор от антимикробни лекарствени средства (дисково-дифузионен метод), фенотипните методи за доказване на щамове, продуценти на бета-лактамази (двойно-дисков синергичен тест за доказване на щамове, продуценти на широко-спектърни  $\beta$ -лактамази; доказване на наличие на хиперпродукция на AmpC ензими), както и методите за потвърждаване на продукцията на ESBL и определяне на спектъра на продуцирани бета-лактамази чрез изоелектрично фокусиране и конюгационно предаване на плазмиди, детерминиращи продукцията на ESBL и гени за хинолонова резистентност. Д-р Димитрова прилага детайлно описание на PCR-техника за типирание на репликони, епидемиологичен анализ и молекулярно-генетичен метод за идентификация на видовете от *E. cloacae* complex чрез *hps60* секвениране. Начинът на представяне на техниките показва добрата методична подготвеност на докторанта.

Резултатите от проведените собствени изследвания са представени и обсъдени на 64 страници, като са илюстрирани богато с 22 фигури и 16 таблици. Описанието на резултатите е стегнато и информативно. Получените резултати и проведеното обсъждане е представено в 8 раздела, които следват логичната последователност на поставените задачи.

Прави впечатление, че всички резултати са подробно анализирани и сравнени с голям брой проучвания от всички континенти. Същевременно, д-р Димитрова е била силно затруднена при извършване на сравнение с данни от страната, тъй като в България до момента не са осъществявани комплексни проучвания върху идентификацията и епидемиологичните аспекти на инфекциите, причинени от *Enterobacter* spp. и свързани с медицинското обслужване. Ето защо натрупването на информация по тези важни въпроси има важно теоретично и практическо значение при решаването на проблеми, касаещи както терапията на инфекциите, причинени от множество резистентни *Enterobacter* spp., така и контрола върху разпространението в болнична среда. Считаю, че едно от съществените достойнства на дисертационния труд е уточняването на част от интимните механизми на резистентност при *Enterobacter* spp. към антимикробни средства, важни за лечението на причинени от тях инфекции, което е от несъмнено значение за правилния терапевтичен подход.

На базата на получените резултати, д-р Димитрова формулира общо 7 извода, които отговарят на поставените цел и задачи. Получени са съществени оригинални приложни и потвърдителни приноси, по-важните от които могат да се обобщят по следния начин:

- Три приноса с оригинален характер, изразяващи се в използване на молекулярно-генетичния метод *hsp60* секвениране за идентификация на видовете в *E. cloacae* complex, идентифициране на плазмид-кодираната AmpC  $\beta$ -лактамазата DNA-1 и извършене на детайлен анализ на плазмидните и хромозомни механизмите на резистентност към хинолони в голяма колекция от клинични изолати *Enterobacter* spp., като бяха доказани *qnrB1*, *qnrB9*, *qnrA* и *qnrS* алелите – за първи път в България;
- Четири приноса с потвърдителен характер: потвърждаване на доминиращото участие на ESBLs при развитието на резистентност към цефалоспорини от III-та генерация, на широкото географско разпространение на CTX-M  $\beta$ -лактамазите и в частност на CTX-M-15, CTX-M-3 и SHV-12 в *Enterobacter* spp., на ролята на хоризонталното вътревидово плазмидно предаване за разпространението на ESBLs гените и на ролята на заобикалящата среда като фактор за предаване и разпространение на нозокомиалните патогени;
- Четири приноса с научно-приложен характер – оценяване на възможностите на автоматизираната система Phoenix 100 (BD) за идентифициране на микроорганизмите от *E. cloacae* complex и на чувствителността и специфичността на фенотипните тестове за детекция на ESBLs и AmpC  $\beta$ -лактамази при изолати *Enterobacter* spp., резистентни на III-та генерация цефалоспорини; апробирани са методика за определяне на плазмидни и хромозомни детерминанти за хинолонова резистентност и *hsp60* секвениране, за идентификация на видовете от *E. cloacae* complex.

Значимостта на постигнатите резултати се илюстрира с приложения списък с общо три публикации в авторитетни български научни списания, в които тя е първи автор. Това говори за водещата ѝ роля в проведените и описани в дисертацията изследвания. Резултати от извършените проучвания, д-р Димитрова е представила на 3 научни форума, два от които международни.

**В заключение**, представеният ми за становище дисертационен труд представлява широко мащабно проучване върху много актуална тема, с добра теоретична основа, извършено с многообразие от конвенционални и съвременни

молекулярно-генетични методи. Получените резултати изпълняват напълно поставените конкретни задачи, поради което приемам, че целта на дисертационния труд е постигната. Тези резултати са обсъдени задълбочено, а формулираните приноси са лично дело на дисертанта. Считам, че по структура, съдържание и обем представения дисертационен труд отговаря на всички нормативни изисквания и правилника на МУ - Варна за присъждане на образователна и научна степен "Доктор".

Преценявайки обосноващите изводи на дисертацията и приносите ѝ, с пълна убеденост давам положителна оценка 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.

20.05.2019г.

София

д.м.

Рецензент:



доц. д-р Иванка Илиева Гергова,