

# РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Райна Цветанова Гергова, дм,

Доцент в Катедра по медицинска микробиология, Медицински факултет,

Медицински университет, София, Външен член на Научното жури (Назначено  
със Заповед № Р-109-373/18.11.2019.)

относно дисертационен труд на тема:

**„Епидемиологично типизиране и механизми на антибиотична резистентност в  
клинично значими *Klebsiella pneumoniae*, изолирани в УМБАЛ „Света Марина”, Варна”**

за придобиване на научната степен „Доктор”  
в област на висше образование 4. Природни науки,  
математика и информатика, професионално направление  
4.3. Биологически науки, по научната специалност  
Микробиология

Декларирам, че нямам конфликт на интереси от научно и друго естество.

Представеният дисертационен труд е изготвен в съответствие със Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и правилника за прилагането му в МУ-Варна.

Дисертантът д-р **Гергана Неделчева Куюмджиева** работи от 2015 г. като асистент в катедра „Микробиология и Вирусология“ на МУ – Варна и като лекар в лаборатория по микробиология във ВМА – МБАЛ – гр. Варна. Има 2 специалности - по микробиология и по детски болести.

## Актуалност на разработваната тема

Динамично развиващата резистентност към антимикробни средства в редица причинители на инфекции поставя на изпитание уменията на лекуващите лекари, а появата на нови механизми на резистентност изпреварва често терапевтичните възможности. Това налага задълбочено изучаване на тези механизми и на тяхното епидемиологично разпространение в конкретни болнични екосистеми. В представения дисертационен труд е разгледан важен, локален, съвременен проблем, който е част от глобалния проблем с резистентността по света, а именно появата на нови генетични механизми в *Klebsiella pneumoniae* - един от един от най-честите ентеробактерии, причинители на вътреболнични инфекции, свързани с медицинското обслужване. Не случайно този вид е включен в групата, означена като ESKAPE на полирезистентните бактерии с бърза и лесна крос-трансмисия, (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* species). Обикновено такива нозокомиални изолати се асоциират с продукцията на широкоспектърни бета-лактамази (ESBLs) и демонстрират често кръстосана резистентност към други антибиотични групи – аминогликозиди, флуорхинолони, trimethoprim/sulphamothoxazole и др. Появата на карбапенем – резистентните *K. pneumoniae*, продуциращи карбапенемази от различни класове (KPC, NDM, OXA-48, VIM), които често демонстрират резистентност към практически всички налични бета-лактамни антибиотици се превръщат в непреодолим за терапията проблем по света през последните години. Засега *K. pneumoniae*, продуценти на KPC карбапенемази често са нозокомиални изолати, докато тези, продуциращи NDM и OXA-48 бета-лактамази са както свързани с вътреболнични, така и с придобити в обществото инфекции. Тези различия в клиничните изолати представляват особен интерес за съвременната микробиология и епидемиология. Ето защо в групата с най-висок приоритет, определен като “критичен”, СЗО поставя резистентните към III генерация цефалоспорини и към карбапенеми *K. pneumoniae*. Възникването и разпространението на такива множество резистентни микроорганизми се приема като сериозна заплаха за общественото здраве и тяхното проучване е особено актуално и ценно. Голямата значимост на този причинител в УМБАЛ „Света Марина”, Варна се подчертава от факта, че в етиологичната структура на бактериемииите за същия период, *K. pneumoniae* е най-честия изолат от кръв през 2014г. (7.2%), заема второ и трето място през 2017г. (8.8%) и 2016г. (8.4%), а през 2015г. е с относителен дял от 9.7%, което ѝ отрежда четвърто място в микробния спектър на бактериемииите.

## **Раздели на представения труд**

Дисертационният труд е структуриран стандартно, с всички необходими раздели и обхваща 188 страници. Онагледен е с 22 фигури и 21 таблици. Цитирани са 482 литературни източника, от които 6 на български език и 476 заглавия на латиница, като над 45% от библиографската справка е от последните 5 години.

**Литературният обзор** е написан компетентно и показва задълбочен и всеобхватен поглед върху проблема. Той синтезира научния обхват на дисертацията. На базата на обзора логически е изведена и правилно формулирана **целта**: да се проучи чувствителността и механизмите на резистентността към бета-лактами и хинолони при клинично значими *Klebsiella pneumoniae*, изолирани от пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ „Света Марина“ - гр. Варна в периода 2014 - 2017г. и да се определи клоналната свързаност на изолатите. За изпълнение на поставената цел са формулирани ясно и конкретно 5 задачи.

**Материалите и методите** са описани детайлно и дават възможност протоколите да бъдат прилагани успешно и в бъдещи проучвания. Използвани са най-модерни автоматизирани системи и методи за биохимична идентификация на клиничните изолати. Освен фенотипните методи за изпитване на антимикуробната чувствителност и продукция на бета-лактамази, са приложени различни молекулярно-генетични методи като PCR и ДНК секвениране на доказани гени, кодиращи механизми на резистентност. Видът на беталактамазата е определян чрез изоелектрично фокусиране IEF и биологичен тест за  $\beta$ -лактамазна хидролитична активност. С конюгационно предаване на плазмиди, носещи гени за ESBLs и хинолонова резистентност са доказани конюгативните плазмиди, които са основен фактор за бързо разпространение на CTX-M в *K. pneumoniae*. С ERIC PCR и MLST е извършено епидемиологичното типизиране. Прави впечатление големият брой изолати (1084), които са подложени на скрининг, а от тях с доказана резистентност на цефалоспорини трета генерация са над 54% - 589 изолата.

**Резултатите и обсъждането** са представени и анализирани съответно на поставените цели и задачи и са много добре онагледени с таблици и илюстрирани с фигури. Установен е висок процент на резистентност към цефалоспорини от III генерация (54.8%) в проучваната колекция от 1084 изолата *K. pneumoniae*. Резистентните на цефалоспорини трета генерация изолати са демонстрирали във висока степен резистентност към антибиотици от други групи. По-високи нива на резистентност се намират при изолати *K. pneumoniae* от кръв и урина в сравнение с тези от раневи секрети и секрети от респираторния тракт. В групата на карбапенем-резистентните *K. pneumoniae*, ceftazidime/avibactam и amikacin са демонстрирали

най-добра *in vitro* активност. Чрез IEF в комбинация с биологичния тест за хидролитична активност потвърждава в групата на проучваните изолати *K. pneumoniae* продукцията на два вида ESBLs (представени предимно от CTX-M и при един изолат от SHV тип). В част от изолатите са доказани карбапенемази от KPC групата, VIM и OXA-48. AmpC ензими (DNA) са доказани както самостоятелно продуцирани така и в комбинация с CTX-M. При четири изолата е установена продукция на два вида CTX-M ензими. Основният механизъм на резистентност към цефалоспорини от трета генерация в колекцията 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 (81.1%), следван от CTX-M-3 (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%). В единични изолати са доказани NDM-1 и VIM-1 метало-карбапенемази. При положителните за *bla*CTX-M-15 изолати е доказано присъствие на IncF и нетипируеми плазмиди, а при положителни за *bla*CTX-M-3 – присъствие на IncL/M плазмиди. Проведените успешни конюгационни експерименти с *bla*CTX-M-15 и *bla*CTX-M-3 позитивни изолати потвърждават плазмидната локализация на тези гени. В положителни за *bla*CTX-M-15 и *bla*KPC-2 изолати *K. pneumoniae* са установени IncFII плазмиди. В единствения изолат ко-продуцент на *bla*CTX-M-15 и *bla*OXA-48 е доказано наличие на IncR плазмид. Епидемиологичното типизиране чрез ERIC PCR и MLST показва широко вътреболнично разпространение на няколко клона множествено резистентни *K. pneumoniae*, продуциращи CTX-M-15 ESBL. ST15, съответстващ на ERIC тип А, е доминиращият секвенциален тип, персистиращ през целия проучван период (2014-2017г.), следван от ST11 (ERIC тип Р), появяващ се през 2015г. и присъстващ до края на проучвания период. Доминиращият ST15 тип демонстрира висок епидемичен и инвазивен потенциал и потенциал за крос-трансмисия и персистиране. Карбапенемаза-продуциращите изолати *K. pneumoniae* се асоциират с няколко различни STs:

ST15, ST76, ST11, ST1350, ST151, ST35, ST395 и ST147. ST15 е носител на *bla*<sub>KPC-2</sub> и *bla*<sub>OXA48</sub>, ST76, ST1350, ST151, ST35 и ST395 – на *bla*<sub>KPC-2</sub>, а ST11 и ST147 – на *bla*<sub>NDM-1</sub> и *bla*<sub>VIM-1</sub> съответно. В изследваните изолати *K. pneumoniae* е установено широко разпространение на *oqxA* (100%), *oqxB* (93%) и *qnrB* (40%) в асоциация с *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Доминиращият *qnrB* ген е представен от *qnrB9* (47.6%), следван от *qnrB1* (36.5%), *qnrB4* (16%) и слаба разпространеност на *qnrS1*, *qnrA* и Аас-(6')-Ib-сг. В над 70% от изолатите са доказани хромозомни мутации за *gyrA* и/или *parC* гените, като в 66% се установиха едновременни мутации в двата гена. Субституциите в позиции Ser83Phe /Asp87Ala, Ser83Ile, Asp87Asn, Asp87Tyr за *gyrA* и позиции Ser80Ple за *parC* са доказани в изолатите с високо ниво на хинолонова резистентност. В проучените изолати *K. pneumoniae* не са доказани *mcr* гени, асоцииращи се с плазмид-медирана резистентност към colistin.

**Изводите** са написани подробно и освен обобщаване на резултатите и обсъждането дават и оценка на проучването.

**Приносите** са представени ясно и категорично, обобщавайки научните достойнства на работата. Най-важните и **оригинални приноси** са два и е особено важно е да се подчертае, че: **1)** Извършено е детайлно проучване на плазмидните и хромозомните механизми на резистентност към хинолони в голяма колекция от клинични изолати *K. pneumoniae*, като са доказани предимно *qnrB* гени, единични изолати с *qnrA* и *qnrS* алели и слаба разпространеност на Аас-(6')-Ib-сг. В над 70% от изолатите са доказани хромозомни мутации в *gyrA* и/или *parC* гените. **2)** Проучена е с MLST структурата на колекция от 159 изолати *K. pneumoniae*, събрани в рамките на 4 годишен период от пациенти на УМБАЛ "Света Марина" - Варна, като е установено разнообразие от циркулиращи секвенциални типове на фона на широко доминиране и персистирание на "успешния" международен клон *K. pneumoniae* ST15 и в по-малка степен на ST11.

Във връзка с темата на дисертацията, са представени **3 публикации** (2 на български език и 1 на английски език) и 2 участия в научни прояви. Първата статия е в списание с импакт фактор (в текста това не е отбелязано), като за годината на публикацията справката показва **IF<sub>2017</sub> - 2,341**. В две от публикациите докторантката е първи автор, което категорично затвърждава впечатлението от активното участие на **д-р Гергана Неделчева Куюмджиева** в самостоятелното изработване и написване на дисертационния труд.

**В заключение**, считам че дисертационния труд е планиран и извършен на високо научно ниво, интересен и значим не само за микробиолози, но и за различни други медицински специалности. Трудът отговаря на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и правилника за прилагането му в МУ-Варна. Имайки предвид достойнствата на представената дисертация, постигнатите ценни научни приноси, наукометричните показатели, предлагам на уважаемите членове на Научното жури да присъдят на докторанта научната и образователна степен „**ДОКТОР**”.

29.11. 2019 г.

Рецензент:

доц. д-р Райна Цветанова Гергова, дм

