

До председателя на Научно жури,
назначено със Заповед Р-109-373/18.11.2019
на Ректора на МУ-Варна

СТ А Н О В И Щ Е

от доц. д-р Румяна Донкова Марковска-Давидкова, дм
Катедра по Медицинска Микробиология
Медицински факултет, Медицински Университет – София

относно дисертационен труд на тема: „Епидемиологично типизиране и механизми на антибиотична резистентност в клинично значими *Klebsiella pneumoniae*, изолирани в УМБАЛ „Света Марина”, Варна” на д-р Гергана Неделчева Куюмджиева , докторант на самостоятелна подготовка към Катедрата по микробиология и вирусология, МУ-Варна, представен за придобиване на образователна и научна степен „доктор” по научна специалност “Микробиология” в професионално направление 4.3. Биологически науки

Представените документи по процедурата са изготвени коректно, като са спазени изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и правилника за прилагането му в МУ-Варна.

Биографични данни

Д-р Неделчева завършва медицина през 1990 г в МУ-Варна и работи като лекар-ординатор и като педиатър. През 2012г тя завършва специализацията си по микробиология. От 2015 започва работа в Катедрата по микробиология и вирусология, МУ-Варна.

Актуалност на избрания научен проблем

Глобалното увеличаване на мултирезистентните Грам отрицателни бактерии е сериозна заплаха за здравето на пациентите в болниците и на обществото. В последните десетилетия се наблюдава непрекъснато увеличение на честотата на ESBLs и карбапенемаза продуценти при изолати *Klebsiella pneumoniae*. Нараства и резистентността на този бактериален вид към различни групи други антимикробни лекарствени средства (хинолони, аминогликозиди и др.). Видът *K. pneumoniae* е отнесен

към групата патогени ознaзени като ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species*). Тези бактериални видове са парадигма за множествена резистентност и терапевтичен проблем. С особена острота стои проблемът с лечението на инфекции, причинени от мултирезистентни и панрезистентни *K. pneumoniae* особено в интензивните болнични структури. Изключително тревожен е факта, че България е на първо място по резистентност към цефалоспорини трета генерация при този бактериален вид с нива достигащи до над 70%, нивото на резистентност при хинолоните е, за 2018г, 62,7%, като през 2015г е било 37,5% , което ясно показва трайната тенденция за повишаване. Появата на карбапенем резистентни често пан резистентни изолати допълнително усложнява проблема. Тези факти определят контролът върху разпространението на множествено резистентни *K. pneumoniae*, върху тенденциите в развитието на антибиотичната резистентност и изследване на генетичните й механизми при *K. pneumoniae* изолати като много важен.

Структура на дисертационния труд

Представеният ми за становище дисертационен труд е написан на 188 стр., като е структуриран по общоприетата схема: Използвани съкращения - 2 стр.; Увод - 2 стр., Литературен обзор - 46 стр., Цел и задачи – 1 стр, Материали и методи - 17 стр., Резултати и обсъждане - 73 стр., Изводи – 2 стр. Дисертационният труд е онагледен с 21 таблици и 22 фигури.

Оценка на качествата на литературния обзор

Литературният обзор е написан изключително компетентно и на високо научно ниво, като са използвани 484 източници, от които 72 % от последните 5 години, което е доказателство за актуалността на научната информация и богатата литературна осведоменост на дисертантката.

В тази част от дисертационния труд много детайлно и актуално са представени основните научни данни, отнасящи се до таксономията на род *Klebsiella*, характеристиките на рода, разнообразието от механизмите на резистентност (хромозомни и плазмидно-медиирани) към бета-лактами, хинолони и colistin. Разгледана е епидемиологията на инфекциите, причинени от *K pneumoniae*.

Цел и задачи

Поставената цел е ясно формулирана, а задачите (общо 5) съответстват на основната цел и водят до нейното изпълнение.

Раздел “Материали и методи”

Дисертационният труд на д-р Неделчева е проучване върху голям брой (158) клинично значими изолати *K. pneumoniae*. Проучването е извършено чрез използване на

разнообразие от микробиологични и молекулярно-генетични методи за определяне на чувствителността към антимикробни лекарствени средства, за идентификация на механизмите на резистентност към хинолони, карбапенеми, цефалоспорини от трета генерация и за епидемиологично типизиране на проучваната колекция от изолати. Подробното описание на използваните методи дава възможност те да бъдат възпроизведени.

Раздел “Резултати и обсъждане”

Резултатите и обсъждането са обединени логично в общ раздел. Той включва осем подраздела със собствените проучвания.

Изпитването на антибиотичната чувствителност на цялата колекция от 1084 клинично значими изолати, установява високи нива на резистентност към цефалоспорини трета генерация - 54.8% , а по отношение на карбапенемите – 3,5%. В колекцията от цефалоспорин резистентни изолати прави впечатление високите нива на резистентност към хинолони – 97%. В групата на карбапенем-резистентните *K. pneumoniae* алармиращо е откриването на 21% colistin резистентни и 34,2% нечувствителни към tigecycline, единствено ceftazidime/avibactam и amikacin демонстрират най-добра *in vitro* активност. Проведените PCR реакции доказват наличието на ензими от CTX-M и при един изолат от SHV тип. По отношение на карбапенемазите се доказват основно KPC групата и единични VIM и OXA-48. AmpC ензими (DNA) са доказани както самостоятелно продуцирани така и в комбинация с CTX-M. Изоелектричното фокусиране потвърждава наличието на тези ензими. Секвенирането показва, че основният механизъм на резистентност към цефалоспорини от трета генерация в колекцията изолати *K. pneumoniae* е продукцията на 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. Докторантката установява, че хоризонталният пренос на *bla*_{KPC-2} се асоциира с IncFIIAS плазмиди, а на *bla*_{OXA-48} с IncR плазмиди. При положителните за *bla*_{CTX-M-15} изолати се доказва присъствие на IncF и нетипируеми плазмиди, а при положителни за *bla*_{CTX-M-3} – присъствие на IncL/M плазмиди.

Значим е резултатът от епидемиологичното типизиране на изолатите. Установено е широко вътреболнично разпространение на няколко клона множествено резистентни *K. pneumoniae*, продуциращи CTX-M-15 ESBL. Основният клон, ERIC тип А, принадлежи на ST15 секвенционен тип. Той е доминиращ и персистира през целия проучван период (2014-2017г.). ST15 е носител още на *bla*_{KPC-2} и *bla*_{OXA-48}. Останалите ST типове асоцииращи се с продукция на карбапенемаза бяха ST76, ST1350, ST151, ST35 и ST395 – на *bla*_{KPC-2}, а ST11 и ST147 – на *bla*_{NDM-1} и *bla*_{VIM-1} съответно.

По отношение на механизмите на хинолонова резистентност в дисертационният труд са проучени както хромозомните така и плазмидните механизми на резистентност. В над

70% от изолатите са доказани хромозомни мутации за *gyrA* и/или *parC* гените, като в 66% от тях се установиха едновременни мутации в двата гена. Субституциите в позиции Ser83Phe /Asp87Ala, Ser83Ile, Asp87Asn, Asp87Tyr за *gyrA* и Ser80Ile за *parC* бяха доказани в изолатите с високо ниво на хинолонова резистентност.

В изследваните изолати *K. pneumoniae* е установено широко разпространение на *oqxA* (100%), *oqxB* (93%) и *qnrB* (40%) в асоциация с *bla*_{CTX-M-15}. Доминиращият *qnrB* ген бе *qnrB9* (47.6%), следван от *qnrB1* (36.5%), *qnrB4* (16%) е установена слаба разпространеност на *qnrS1*, *qnrA* и *aac*-(6')-Ib-cr.

Всички получени резултати са анализирани задълбочено и в детайли, като са сравнявани с подобни проучвания от научната литература. В резултат дисертантката формулира 9 основни извода от своята работа, които отговарят на поставените цел и задачи.

Оценка на приносите на дисертационния труд

От получените резултати и направени изводи д-р Неделчева формулира 10 приноса: 2 с оригинален характер, 5 с потвърдителен характер и 3 с научно-приложен характерен, които аз напълно приемам.

Наукометрични показатели

Направените публикации във връзка с дисертацията са 3 - в едно чуждестранно списание с IF и две български научни издания, едното от тях реферирано от световните бази данни. В две от статиите д-р Неделчева е първи автор, което е доказателство, че дисертационният труд е нейно лично дело. Има две участия в научен форум.

Заклучение

В заключение, считам, че представеният дисертационен труд на д-р д-р Гергана Неделчева е актуален, извършен с голямо разнообразие на микробиологични и молекулярно-генетични методи, със съществен приложен и теоретичен принос в областта на съвременната микробиологичната практика. Като научен ръководител личните ми впечатления от докторантката са много добри. По структура, съдържание и обем дисертационният труд напълно отговаря на критерии в ЗРАСРБ и Правилника на МУ-Варна за ОНС "доктор". Предлагам на членовете на Научното жури да гласуват за присъждане на образователната и научна степен „доктор” по научна специалност “Микробиология” на д-р Неделчева.

24.11.2019г.

Изготвил становището:



/Доц д-р Румяна Марковска-Давидкова/