

Уж. № 167  
07. 11. 2018 год

До членовете на научно жури  
Определено със Заповед № РК36-2540/ 25.10.2018 г.  
на Ректора на МУ-София

## 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 7.1. Медицина

Тема на дисертационния труд:

ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ЧУВСТВИТЕЛНОСТТА КЪМ COLISTIN НА  
ПРОБЛЕМНИ ГРАМ - ОТРИЦАТЕЛНИ БАКТЕРИИ, ИЗОЛИРАНИ В УМБАЛ  
„АЛЕКСАНДРОВСКА“ ЕАД

**Автор на дисертационния труд: д-р Юлия Мартева-Проевска**

Дисертационният труд на д-р Проевска е посветен на актуален и сериозен световен проблем, а именно проблемът с нарастващата антибиотична резистентност. Много подходящо е избран обектът на изследванията – известните със своята множествена резистентност *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa*. Изследванията в дисертационния труд са фокусирани върху методите за доказване на резистентност към colistin, а е известно, че няма установен оптимален метод за определяне на чувствителността към полимиксини.

Общото ми впечатление от дисертационния труд е, че той представлява един отлично замислен, изпълнен и 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. Считаю, че дори надхвърля нивото за дисертация за присъждане на ОНС „доктор“.

На базата на 259 литературни източника, основно от последните 5 години, докторантката прави задълбочен литературен обзор на 58 страници. Обзорът е едно от големите достойнства на работата, направен е отлично и бих препоръчала да се издаде като монография, 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 Проевска. Разгледани са характеристиките на полимиксините, хромозомно- и плазмидно-медираните механизми на резистентност и генетичните методи за определяне на резистентност към полимиксини. Много задълбочено са описани лабораторните методи за определяне на чувствителност към colistin, включително Rapid Polymyxin NP test, Superpolymyxin medium, Micromax test. С вещина и познание са обосновани мутант превантивната концентрация и хипотезата за мутант селектиращия прозорец. Много удачно е включена клиничната употреба на полимиксините – фармакокинетика, фармакодинамика, индикации, дозировка, особености на приложението при пневмония, свързана с апаратна вентилация и при лечение на менингит, лекарствени взаимодействия, комбинирана терапия с colistin. В обзора са разгледани ин витро методи за изследване на комбинираното действие на антибиотиците – метод на шахматната дъска, метод на шахматната дъска с гранични антибиотични комбинации, multiple combination bactericidal test, модифицирания метод на шахматната дъска на El Azizi, ТКА (Time-kill assays) и методите, основани на E-тест.

Литературният обзор завършва с обобщение на многото нерешени въпроси по отношение на colistin, касаещи ин витро определяне на бактериалната чувствителност и подходите за комбинирана терапия, което логично извежда до целта на дисертационния труд. Задачите са 7, формулирани са ясно и точно, като очертават конкретните области на изследване.

Материалите и методите на дисертационния труд са представени изчерпателно и стегнато. Те са в обем общо 33 страници, с описание на използваните клинични изолати и референтни щамове и представяне на използваните класически, модерни и апаратни методи за определяне на чувствителността им към антимикробни средства и специално към colistin, всички подробно представени преди това в литературния обзор. Допълнително, за доказване на основните групи карбапенемази са приложени Real-time PCR и multiplex PCR; PCR техники за доказване на гени на често срещани  $\beta$ -лактамази и на гени за резистентност към colistin; ERIC-PCR за епидемиологично типизиране.

Начинът на представяне говори за отлична методична подготвеност на д-р Проевска. Това са авангардните методи за фенотипно определяне на чувствителност и молекулярно-генетично доказване на гени за резистентност и типизиране.

Освен микробиологичните и молекулярно-генетичните методи, д-р Проевска е включила и методи на дескриптивната статистика за сравнение и анализ на получените от различните методи резултати спрямо референтния метод.

Резултатите от собствените изследвания са представени и обсъдени на 56 страници. Дисертацията е илюстрирана богато с 42 таблици и 38 фигури. Описанието на резултатите е точно, ясно, стегнато, информативно. Резултатите са представени в 7 раздела, като следват логичната последователност на поставените задачи. Много удачно всеки раздел от резултатите завършва с обсъждане и сравнение със световния опит.

Трудът е от изключително значение с проведените изследвания върху 210 клинично значими множествено резистентни щамове, 39 от които от 2018 г., включващи *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae* complex, *A. baumannii* complex и *P. aeruginosa*, изолирани в Централна лаборатория по микробиология на УМБАЛ „Александровска“ ЕАД за периода 2013 г. – 2018 г.

За основа за проучванията докторантката прави сравнение и дава оценка на методите за определяне на чувствителност към colistin спрямо референтния BMD (Broth Microdilution) метод. Установява, че тестът MICROLATEST MIC Colistin (Erba Lachema) показва добра корелация с референтния метод и може да се използва надеждно в рутинната практика, докато методът на разреждане в агар

показва по-слаба корелация с референтния метод. Установява, че чрез метода с пре-дифузия (ROSCO-Diagnostica), както и със Superpolymyxin Medium скрининговия агар по-добре се откриват хетерорезистентните на colistin щамове, определени чрез BMD като чувствителни.

Д-р Проевска провежда изследвания за определяне на мутант-превантивната концентрация на colistin при представителна извадка от 40 изследвани щамове. Установява голяма ширина на мутант-селекционирания прозорец, особено при *K. pneumoniae*, което крие голям риск от селектиране на мутант-резистентни едно-стъпални мутанти при монотерапия с colistin. Изпитва промените в мутант-превантивната концентрация на colistin при комбинации с rifampicin и meropenem при 18 щамове *K. pneumoniae*. Установява, че в присъствие на rifampicin мутант-превантивните концентрации се понижават значително, докато комбинацията с meropenem ги понижават минимално.

Проучва ефекта на различни антибиотични комбинации с colistin при карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* чрез скрининг тест за синергизъм с предифузия, метод на El Azizi и ТКА (Time kill assay). На базата на проведените тестове за синергизъм прави заключение, че комбинираното приложение на colistin основно с rifampicin, но също и с azithromycin, meropenem, doxycycline и дори gentamicin може да е от полза при лечение на инфекции, причинени от карбапенем-резистентни и colistin-резистентни *K. pneumoniae*.

От съществено значение са проучванията на д-р Проевска върху спектъра на произвежданите карбапенемази при *K. pneumoniae*, *E. coli* и *E. cloacae* complex чрез RT-PCR и multiplex PCR, както и епидемиологичното типизиране чрез ERIC-PCR за определяне клоналната свързаност на изолатите. Установява, че резистентността към карбапенемите на включените в проучването представители на сем. *Enterobacteriaceae* е най-висока при *K. pneumoniae* (73.8%) и се дължи основно на широко разпространение на *bla<sub>NDM-1</sub>* (79.7%). В единични случаи са установени *bla<sub>OXA-48</sub>* и KPC-2 продуциращи *K. pneumoniae*. 14.63% (6/41) от включените в проучването щамове *E. coli* са резистентни към карбапенемите. Резистентността се дължи на производство на NDM-1 и KPC-2 ензими. При един щам *E. cloacae* complex доказва носителство на *bla<sub>OXA-48</sub>*.

Резултатите от епидемиологичното типизиране показват преобладаване на един клон *K. pneumoniae* – в 80,4%. Карбапенем-резистентните изолати на този клон са 84,9% (73 от 86) - 62 щама *bla<sub>NDM-1</sub>* положителни и 5 щама *bla<sub>KPC-2</sub>* положителни. Тридесет и девет щама (45.3%) от този клон са резистентни и хетерорезистентни на colistin. Тридесет и два щама (37.2%) от този клон са NDM положителни, както и колистин резистентни или хетерорезистентни. Всички KPC-2 продуциращи изолати са колистин чувствителни. Единични colistin-резистентни изолати принадлежат на други три клона.

Епидемиологично типизиране при *E. coli* показва доминиране на един широко разпространен клон, в който от началото на 2018 г. се появява *bla<sub>NDM-1</sub>*.

Д-р Проевска задълбочава проучванията си върху резистентността на колистин като проучва внимателно генетичните механизми, обуславящи тази резистентност с помощта на PCR тестове за доказване на плазмидно кодирани *mcr* гени и на PCR тестове и секвениране за откриване на хромозомните гени *mgrB*, *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ*. Плазмидно кодирани гени за резистентност към колистин не са открити. Доказан е обаче хромозомния ген *mgrB*, чието секвениране показва промени (инсерция, делеция) при някои от щамовете.

Получен е голям обем от информация. Постигнати са съществени приноси. От съществено значение са приносите с оригинален характер, сред които са доказване за първи път в страната на *K. pneumoniae* изолати с промени в *mgrB* гена като основен механизъм на колистинова резистентност, установената по-висока честота на синергизъм на комбинациите с colistin при colistin-резистентни щамове в сравнение с colistin-чувствителни, както и резултатите от епидемиологично типизиране и определяне на клоналната свързаност на изолатите.

Високо оценявам и приносите с потвърдителен характер, сред които изследванията за определяне на мутант-превантивната концентрация на colistin и намаляването ѝ в присъствие на rifampicin, синергизма на комбинациите на colistin с rifampicin, azithromycin, doxycycline, meropenem и оценката на 4 фенотипни метода за определяне на чувствителността към колистин.

Важен елемент от работата на д-р Проевска е значението на резултатите за практиката. Апробирането на Superpolymyxin medium като допълнение към

бульонните методи като бърз и лесен скринингов метод за доказване на колистин-хетерорезистентни изолати, разработените протоколи за определяне на мутант превантивна концентрация и за Time kill assay, апробирането на модифицирания метод на шахматната дъска на El Azizi на скрининг тест за синергизъм с колистин, са приноси на дисертационния труд на д-р Проевска с научно-приложен характер.

Приложен е списък с публикации и едно участие в научен форум, свързани с дисертацията, който включва 4 публикации на д-р Проевска, една от които е в престижното списание Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Впечатление прави, че тя е първи автор на 3 от представените 4 публикации.

Всичките ми технически забележки като вътрешен рецензент са съобразени.

В заключение, дисертационният труд на д-р Юлия Проевска е изпълнен прецизно, с впечатляваща теоретична основа, значими научни приноси за един много съществен по своето значение проблем, свързан с нарастващата антибиотична резистентност на проблемни Грам-отрицателни бактерии и увеличаващата се роля на полимиксините и нуждата от оптимизиране на методите за определяне на чувствителността към тях.

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

София  
05.11.2018 г.

Рецензент:   
(проф. д-р И. Христова, дмн)