

Узх. №: 169  
07. 11. 2018 г.

До членовете на Научно Жури  
Назначено със Заповед No РК36-2540/25.10.2018г.  
На Ректора на Медицински Университет - София

## СТ А Н О В И Щ Е

относно дисертационен труд на д-р Юлия Стоянова Мартева-Проевска на тема: „Проучвания върху чувствителността към colistin на проблемни Грам-отрицателни бактерии, изолирани в УМБАЛ”Александровска” ЕАД” с научни ръководители доц. д-р Цветан Борисов Велинов, дм и доц. д-р Румяна Донкова Марковска-Давидкова, дм за придобиване на ОНС „Доктор” по научна специалност “Микробиология”.

Изготвил становището: проф. д-р Теменуга Жекова Стоева, дм,  
Медицински Университет, Варна  
Ръководител Катедра “Микробиология и вирусология”

### Актуалност на избрания научен проблем

Глобалното увеличаване дела на MDR Грам отрицателни бактерии е изключително тревожен факт и представлява сериозна заплаха за общественото здраве и безопасността на пациентите. В последните две десетилетия се наблюдава непрекъснато увеличение на резистентността към пеницилини, цефалоспорици и карбапенеми като резултат от повсеместното разпространение на ESBLs и карбапенемази в различни Грам отрицателни бактерии с важно медицинско значение. Алтернативите за терапия на пациенти, инфектирани с MDR *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, резистентни на карбапенеми и други основни антимикубни лекарствени средства, често се ограничават до комбинирана терапия и до използвани в миналото антибиотици каквито са полимиксините, приемани по настоящем като медикаменти на последен избор за такива случаи. През 2012г. СЗО класифицира colistin като антибактериално средство за хуманната медицина от критична важност. Последните данни на EARS-Net показват значително увеличение на консумацията на този антибиотик за медицински цели в Европейския съюз, което като резултат има бързо развитие на резистентност в карбапенем-резистентни *K. pneumoniae*, медирана предимно от хромозомни механизми. Наскоро откритият плазмидно кодиран *mcr-1* ген за резистентност към colistin доведе до напълно обоснована загриженост, че разпространението му в човешкия микробиом може да



доведе до вътреболнични взривове от практически нелечими инфекции, асоцииращи се с много висока смъртност.

Поради липсата на нови антибиотици с активност към Грам отрицателни бактерии, от изключителна важност е усилията да бъдат насочени към съхраняване активността на colistin. Сред важните мерки за това са подобряване на лабораторните методи за определяне на чувствителността към colistin, детекция на генетичните механизми на резистентност, подобрен сървейланс особено в болнични заведения със спорадични или епидемични взривове от карбапенем-резистентни и MDR *Enterobacteriaceae*. Важно значение в това отношение има и подобряване мениджмънта на такива клинични случаи, свързано с провеждане на подходяща антимикробна терапия, консултирана с клиничен микробиолог, което да осигури най-добрия възможен терапевтичен режим предвид ограничените възможности за лечение. Всичко това ми дава основание да смятам, че избраната тема на дисертационния труд на д-р Ю. Проевска е изключително актуална и много навременна.

### **Структура на дисертационния труд**

Представеният ми за становище дисертационен труд е написан на 181 стр., като е структуриран по общоприетата схема: Използвани съкращения - 2 стр.; Увод - 2 стр., Литературен обзор - 58 стр., Материали и методи - 34 стр., Резултати и Обсъждане - 57 стр., Изводи – 3 стр. Дисертационният труд е онагледен с 42 таблици и 38 фигури.

### **Оценка на качествата на литературния обзор**

Литературният обзор е написан изключително компетентно и на високо научно ниво, като са използвани 259 заглавия, от които 52.5% от последните 5 години, което е доказателство за актуалността на научната информация и богатата литературна осведоменост на д-р Ю. Проевска.

В тази част от дисертационния труд много детайлно и актуално са представени основните научни данни, отнасящи се до разнообразието от механизмите на резистентност (хромозомни и плазмидно-медирирани) към colistin. Изяснени са понятията “хетерорезистентност” и “адаптивна резистентност”. Особено ценни в практическо отношение са обстойно представените лабораторни методи за определяне на чувствителността към colistin и методологичните проблеми, свързани с тях. Много изчерпателно са разгледани въпросите свързани с дозирането, начина на приложение на colistin, като е поставен акцент върху лечението на VAP пневмония и аерозолното приложение на препарата, менингит/вентрикулит, причинен от MDR Грам отрицателни бактерии и интратекалното/интарвентрикуларното приложение на colistin. Специално внимание е отделено на дозирането на препарата при критично болни пациенти (с конкретни терапевтични режими), както и на възможностите за комбинирано приложение на полимиксини с други антибиотици за лечение на проблемни инфекции, причинени от множество резистентни Грам отрицателни бактерии. Дадени са конкретни примери за двойни и тройни комбинации с colistin, показали ефективност *in vitro*, научна информация, която би представлявала професионален интерес и би била в помощ както на клиничните микробиолози,



така и на клиницистите от интензивните болнични звена при избора им на адекватна антимикробна терапия. Детайлно са представени методите за *in vitro* изследване на комбинираното действие на антибиотиците, прилагани в лабораторната практика.

### Цел и задачи

Поставената цел е ясно формулирана, а задачите (общо 7) съответстват на основната цел.

### Оценка на раздел “Материали и методи”

Дисертационният труд на д-р Ю. Проевска е проучване върху голям брой (210) неповтарящите клинично значими изолати от пет различни, с важно медицинско значение бактериални видове (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae* complex, *A. baumannii* complex и *P. aeruginosa*). Проучването е извършено чрез използване на разнообразие от методи за определяне на чувствителността към антимикробни лекарствени средства, три метода за изследване на комбинираното действие на различни антибиотици с colistin (вкл. такъв разработен в лабораторията), два метода, свързани с определяне на мутант-превантивна концентрация на colistin и молекулярно-генетични методи за идентификация на механизмите на резистентност към карбапенеми, цефалоспорини от трета генерация и colistin и за епидемиологично типизиране на проучваната колекция от изолати.

### Оценка на раздел “Резултати”

Получените резултати са представени в 7 подраздела, като са много добре илюстрирани с 42 таблици и 38 фигури.

Изпитването на антибиотичната чувствителност на колекцията от 210 клинично значими MDR изолати, извършено чрез ДДМ, Е тест и BMD, установява високи нива на резистентност към карбапенеми, а резистентността към colistin е 15.9%, като е най-висока при *K. pneumoniae*. Проблемът “антибиотична резистентност” се очертава като най-сериозен именно при този бактериален вид, а доказването на такива изолати и в амбулаторни пациенти и такива от други болници подсказва за мащаба на този проблем. Резултатите от оценяването и сравняването с референтния BMD на три различни метода за определяне на чувствителността към colistin, както и на два скринингови теста за откриване на колистинова резистентност, е от изключителна полза за ежедневната лабораторна практика предвид факта, че все още не е установен оптималния метод за определяне чувствителността към полимиксиновите антибиотици. Установява се много добра корелация на резултатите, получени чрез MIKROLATEST МПК Colistin (Erba Lachema), което го прави подходящ за ежедневната диагностична практика. Комбинацията от тестове (с включване на скринингова среда) е по-надеждна при откриване на феномена “хетерорезистентност”. Ценен за практиката е резултатът, че комбинираното приложение на colistin с rifampin се асоциира с намаляване на мутант-превантивната концентрация на colistin, което би могло да допринесе за намаляване на риска от селектиране на едно-стъпални colistin-резистентни мутанти, какъвто риск съществува при монотерапия с colistin (поради хетерорезистентност и високи MPC), дори и при използване на



препоръчваните по настоящем дозови режими. Определянето на мутант-превантивната концентрация на тестваните изолати е извършено по протокол, разработен в хода на дисертационния труд. След сравнение с метода на El-Azizi и Time Kill Assay (след модификации на оригиналните протоколи), са оценени възможностите на разработения в лабораторията скринингов метод с пре-дифузия за изследване на различни антибиотични комбинации с colistin при карбапенем-резистентни изолати *K. pneumoniae*. Преимущества на този метод са бързината и лесното техническо изпълнение, което го прави подходящ да бъде използван в ежедневната диагностична практика за бърз скрининг на голям брой антибиотични комбинации. Д-р Проевска доказва, че най-често комбинациите на colistin с rifampin, но така също с azithromycin, meropenem и gentamicin се асоциират със синергистичен ефект, но с по-висока честота при colistin-резистентни щамове.

Резултатите от молекулярно-генетичните изследвания върху механизмите на резистентност към карбапенем и полимиксини представляват съществен принос в натрупването на допълнителна научна информация и познание по тези въпроси на местно, национално и Европейско ниво. Д-р Проевска доказва, че резистентността към карбапенем в проучваната колекция от изолати се медира от продукцията на NDM-1, KPC-2 и OXA-48 карбапенемази, с водещото значение на NDM-1 ензима. Резистентността към colistin се дължи основно на хромозомни мутации: за първи път в България се доказват изолати *K. pneumoniae* с промяна в *mgrB* гена (инактивиране от IS903, наличие на stop кодон или големи промени на локуса *mgrB*) като основен механизъм на резистентност към colistin. Карбапенемната резистентност и тази към colistin (вкл. хетерорезистентност) се асоциират основно с един клон *K. pneumoniae*, за който е характерна широка интраболнична дисеминация. Колистиновата резистентност по-често се асоциира с карбапенем-резистентни изолати (предимно NDM-1 продуценти), отколкото с карбапенем-чувствителни.

Обсъждането на резултатите е важна част от дисертационния труд. Всички получени резултати са анализирани задълбочено и в детайли, като са сравнявани с подобни проучвания от научната литература. Това дава основание на д-р Ю. Проевска да формулира 9 основни извода от своята работа, които са логично и правилно формулирани, следват данните от резултатите и отговарят на поставените цел и задачи. Приемам релевантността на направените изводи.

### **Оценка на приносите на дисертационния труд**

От получените резултати и направени изводи д-р Ю. Проевска формулира 13 приноса: 4 с оригинален характер, 4 с потвърдителен характер и 5 с научно-приложен характерен, които аз напълно приемам. Изключително ценни за мен са практически ориентирани приносите, които, въведени в ежедневната лабораторна практика реално ще подпомогнат разрешаването на важни диагностични проблеми, а така също ще спомогнат за вземането на адекватни терапевтични решения в случаите на проблемни инфекции, станали вече ежедневие в интензивните звена на големите българските болници.

### **Наукометрични показатели**



Направените публикации във връзка с дисертацията са 4 - в едно чуждестранно с IF и три български реномирани научни издания. В три от статиите д-р Проевска е първи автор, което е доказателство, че дисертационният труд е нейно лично дело. Има едно участие в научен форум.

### **Заклучение**

Представеният ми за становище дисертационен труд на д-р Юлия Проевска представлява задълбочено проучване по много актуален клинично-микробиологичен проблем, извършено с разнообразие от класически и съвременни генетични методи, както и статистически методи. По структура, съдържание и обем дисертацията отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и на критериите на МУ-София. Работата съдържа множество резултати, които са в съответствие и изпълняват поставените цел и конкретни задачи. Тези резултати са задълбочено обсъдени и са формулирани няколко основни извода, както и оригинални, потвърдителни и приноси с научно - приложен характер, които са лично дело на дисертанта.

Въз основа на гореизложеното давам положителна оценка на дисертационния труд и убедено предлагам на членовете на научното жури да гласуват положително за присъждане на образователна и научна степен "доктор" по научна специалност "Микробиология" на д-р Юлия Стоянова Мартева-Проевска.

05.11.2018г.

проф. д-р Т. Стоева, дм

