

Изм. №: 166
от 11.2018 год.

Рецензия

за защита на дисертационен труд
за присъждане на
образователна и научна степен „Доктор”

Направление 7.1 Медицина
Научна специалност „Микробиология”
на тема

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

Автор на дисертацията

Д-р ЮЛИЯ СТОЯНОВА МАРТЕВА-ПРОЕВСКА

Научни ръководители

1. Доц. д-р Цветан Борисов Велинов, дм
2. Доц. д-р Румяна Донкова Марковска, дм

Рецензент

Проф. д-р Людмила Боянова Георгиева, дм, дмн

Професор в Катедра медицинска микробиология

На Медицински университет- София

E-mail l.boyanova@hotmail.com

Научна специалност – микробиология

Член на Научното жури със заповед № PR36-2540/25.10.2018 г.

на Ректора на Медицински университет-София

УВОД

Д-р Проевска завършва медицина през 1996 г. и придобива специалност Микробиология през 2008 г. Сега работи като главен административен лекар в Централна лаборатория по микробиология на УМБАЛ „Александровска“ и също така е асистент в нашата Катедра медицинска микробиология на Медицински университет-София. Докторант е на самостоятелна подготовка по докторска програма Микробиология.

Личните ми впечатления са за един компетентен и колкото скромнен, толкова и трудолюбив и силно мотивиран в работата и изследователската си насока специалист.

АКТУАЛНОСТ НА ТРУДА

Д-р Проевска с подкрепата на своите научни ръководители е избрала една стратегически важна за разрешаване тема в микробиологията и в медицината като цяло.

В ерата на постоянно растящата резистентност на бактериите, особено на Грам-отрицателните ферментативни и неферментативни видове, резистентност която може да бъде множествена и към стратегическите антибиотици за животозастрашаващи инфекции, карбапенемите, медицината отново обръща поглед към някои почти „забравени антибиотици“ като полипептидните антибиотици, въведени в 40те години на 20ти век и почти изоставени около 30 години по-късно поради рисковете от тяхната нефро- и невротоксичност. Колистинът (Polymyxin E) принадлежи към тези антибиотици, има бърз концентрационно-зависим ефект и неговата употреба самостоятелно, или често в комбинация с други антибиотици може да бъде спасителна за пациента с инфекция от полирезистентни Грам-отрицателни бактерии.

От друга страна, постепенно увеличаващата се употреба на колистина води до нарастване и на резистентните към него бактериални изолати, напр. *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*. Методите за определяне на чувствителността към този антибиотик са разнообразни и притежават различни предимства и недостатъци, но не всички са еднакво надеждни и още повече, хетерорезистентността на изолатите не може да бъде открита с всеки един от тези методи.

Колистинът е едно важно лекарствено антимикробно средство за животозастрашаващи инфекции от Грам-отрицателни бактерии с множествена резистентност и в много от тези случаи, за съжаление, може да бъде „последна възможност.“ Това определя актуалността на проучването в ерата на непрекъснато нарастващата антибиотична резистентност на бактериите и все по-разпространяващите се щамове с множествена резистентност.

СТРУКТУРА И РАЗДЕЛИ НА ПРЕДСТАВЕНИЯ ТРУД

Дисертационният труд е написан на 181 страници и включва: Съдържание и съкращения (7 стр.), Въведение (2 стр.), Литературен обзор (58 стр.), Цел и задачи (2 стр.), Материали и методи (33 стр.), Резултати и обсъждане (56 стр.), Изводи (3 стр.), Справки за приносите (2 стр.), Библиография (17 стр.) и Публикации свързани с дисертацията (1 стр.).

ВЪВЕДЕНИЕТО

Във Въведението са фокусирани тревогите и трудностите в терапията на инфекциите от множествено резистентни Грам-отрицателни бактерии, особено при резистентност и към карбапенемите, които налагат „подновяване“ на употребата на colistin, чиято резистентност обаче също се повишава, както и необходимостта от акуратно доказване на резистентността.

ЛИТЕРАТУРНИЯТ ОБЗОР

Много добре структуриран и изключително подробен обзор, хубаво илюстриран с фигури и таблици. Личи задълбочено и комплексно познаване на проучваните проблеми в детайли.

Методите за откриване на резистентност към colistin са критично оценени с фокусиране на предимствата и недостатъците им в търсене на най-акуратните и оптимални тестове, или комбинации от тестове. Анализирани са също така балансите между клинично-терапевтичните дози и токсичността на полимиксините, както и методи за предотвратяване появата на резистентни субпопулации чрез анализиране на мутант-селекционирания прозорец. Мога да предложат обзорът да бъде популяризиран и публикуван и в медицинско списание.

ЦЕЛТА

Целта на дисертационния труд обхваща използване и сравняване на различни подходи и множество методи, класически и най-нови, поотделно и в комбинация помежду им, за определяне на чувствителността към colistin на клинично-значими Грам-отрицателни бактерии с множествена резистентност, както и на ефекта от комбинациите му с различни други антибиотици и проучване на резистентността към агента с молекулярни методи.

ЗАДАЧИ

Д-р Проевска поставя 7 задачи в дисертационния си труд, които отразяват най-съществените диагностични и като тяхно отражение терапевтични проблеми в проучването на colistin резистентността на щамовете Грам-отрицателни бактерии с множествена, включително резистентност включително към карбапенеми. Главната цел е да се осигури надеждното и оптимално за практически цели доказване и търсенето на възможност преодоляване на тази резистентност.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В дисертационната работа е използван голям брой класически и по-нови тестове за идентификация и определяне на чувствителност, както и голям брой, всъщност на практика всички налични досега търговски и някои други тестове. Между класическите тестове са напр. дисково-дифузионния метод на Bauer-Kirby, идентификация с BBL Crystal, определяне на минималните потискащи концентрации (МПК) чрез разреждане в агар, определяне на чувствителността с градиентен МПК метод и др.

Щамовата резистентност е след това проучена задълбочено и обхванато с препоръчания метод на микроразреждане в бульон (BMD), търговския кит на Rosco diagnostica, Microlatest MIC Colistin на Erba Lachema, метода на пре-дифузия за чувствителност към colistin, Rapid Polymyxin NP тест, скрининговия SuperPolymyxin Medium, използвани са също така различни молекулярни тестове.

Важно е използването с някои модификации на методи за определяне на мутант-превантивната концентрация на колистина (концентрацията на антибиотика при които мутантите не показват растеж) и на мутант-селекционирания прозорец. Това е приложимо и необходимо и за други бактерии като *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* и много други.

От първостепенно значение е изследването и сравнението на методите за доказването на хетерорезистентност на изолатите към colistin, защото такива изолати могат да бъдат пропуснати с рутинно използваните методи, а от друга страна, могат да бъдат причина за неуспешна терапия при използване на този антибиотик.

Изследването на комбинациите на colistin с други антибиотици е също толкова диагностично и клинично значимо, поради риска от неуспех на монотерапията с този агент и особено ако се прилага в субоптимални дози. В дисертационния труд е проучвано комбинираното действие на антибиотици върху мутант-превантивната концентрация на колистина. Това е насока за преодоляване на високите мутант-превантивните концентрации на този антибиотик и съответно за успеха на терапията.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Получените резултати и техният анализ разкриват тревожната картина на наличието и профилите на резистентност на клинично значимите бактерии *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* complex, *Acinetobacter baumannii* complex и *P. aeruginosa*.

- Създадена е голяма колекция от 210 Грам-отрицателни бактерии с множествена антибиотична резистентност изолирани в периода 2013-2018 г. и е установена много висока честота на резистентност към карбапенеми при тях, която варира между 73 и 100% при видове *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* complex и *P. aeruginosa*. Резултатът налага още по-предпазливо използване на широкоспектърните антибиотици и съобразно с получените микробиологични резултати.
- Намерена е colistin резистентност при *K. pneumoniae* (в 27.9% от щамовете), *P. aeruginosa* (14.3%) и *E. coli* (2.4%). Много полезно и информативно е сравнението на различните налични методи за доказване на тази резистентност и определяне на ползите и недостатъците им. Някои примери са недостатъкът на BMD поради феномена на пропуснати ямки, предимно за *K. pneumoniae*, предимството на теста с пре-дифузия на ROSCO DIAGNOSTICA спрямо BMD за откриване на някои colistin хетерорезистентни щамове, но който води до забавяне на резултата поради дълга при-дифузия, както и ползата от новия скрининг метод със Superpolymyxin Medium, който е позитивирал при всички изследвани colistin резистентни изолати, вкл. хетерорезистентните и чувствителни според референтния метод. Обосновава се необходимостта от комбинация на два метода, напр. BMD и Superpolymyxin medium за доказване на colistin резистентността.
- Определянето на мутант превантивната концентрация е един сравнително нов и ценен метод за избягване на терапевтичния неуспех поради наличие на резистентни към даден антибиотик мутанти в бактериални популации с висока гъстота. При колистина проучването показва рисковете от селектиране на резистентни мутанти поради голямата ширина на мутант-селектиращия прозорец между МПК и много високите мутант-превантивни концентрации. Със скрининг-теста за синергизъм с colistin с пре-дифузия и новия метод на El-Azizi е търсен възможен изход посредством комбинация с други антибиотици, напр. colistin+rifampicin, която да намали мутант-превантивните концентрации на колистина при *K. pneumoniae*.
- С различни молекулярни методи да проучени карбапенемазите на изследваните бактериални изолати и клоналната свързаност на тези с colistin резистентност, както и генетичните механизми на colistin резистентността. В около една трета от colistin-резистентните изолати *K. pneumoniae* са утановени хромозомни мутации в *mgrB* гена за трансмембранен протеин.

ИЗВОДИ

Д-р Проєвска е оформила оригинални изводи като се е съобразила с моя съвет да се фокусират тези с приоритетно значение и особено тези с наднационален мащаб.

ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

В дисертационния труд са включени 259 литературни източници, една много голяма част от тях от международната медицинска литература. От тях около половината са от последните пет години (2014-2018 г.), което показва добро познаване на съвременното състояние на проблема.

ПРИНОСИ

Ще се спра на резултатите, които ми направиха най-силно впечатление в дисертационния труд на д-р Проєвска.

ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ

Както от теоретическо значение, така и от практическа полза е намирането на по-висока честота на синергизъм на антибиотичните комбинации с colistin при colistin-резистентните щамове при сравнение с чувствителните към агента.

Един тревожен резултат от щамовото типирание в настоящия труд разкрива наличието и широкото разпространение на един клон *K. pneumoniae*, с наличие на карбапенем резистентност на повечето (85%) от изолатите, предимно NDM-1 продуценти, при който клон е установена резистентност, или хетерорезистентност в почти половината (>45%) от тях.

В хода на работата са направени са някои практически полезни модификации, напр. на метода на Blondeau et al. [2009] за определяне на мутант превантивната концентрация на колистина в броя на инокулираните изходни петрита и с повишаване гъстотата на инокулума.

ПОТВЪРДИТЕЛНИ приноси за нашата страна

По мое мнение един голям принос за нашата страна е комплексното проучване на чувствителността към colistin, за съжаление едно от последните средства на избор за терапия на инфекции от полирезистентни Грам отрицателни бактерии. Повишено внимание изисква изразеното рязко нарастване на нечувствителните към карбапенеми изолати *K. pneumoniae* от началото на 2017 г.

Освен това дисертантът разработва скрининг метод с използване на средата SuperPolymyxin medium (ELITechGroup, Puteaux, France), понастоящем лицензирана за употреба в Европа за доказване на изолати с намалена чувствителност към полимиксини. Тази среда е предназначена да предотврати пълзенето на *Proteus* spp., както и да потисне Грам-позитивните бактерии и гъбите, както и да разграничи изолатите според лактозата. Това проучване е само по себе си един значителен принос защото за ползите от използването на тази среда все още има много малко публикации в световната литература.

НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ приноси

Този дисертационен труд дава много на брой и ценни научно-приложни приноси за оптимално извършване, интерпретиране и прилагане на резултатите от определянето на чувствителността към colistin на т. нар. „проблемни“ Грам-отрицателни бактерии. Ще се спра на тези, които ми направиха най-силно впечатление.

При колистина е важно да бъде определяна не само резистентността, но и хетерорезистентността на изолатите. Диагностично важна е препоръката за откриването на хетерорезистентност към colistin в комбинация с препоръчвания референтен метод на микроразреждания в бульон - BMD, което е от полза за успеха на терапията и по-точно на терапевтичното поведение, в които случаи се налага промяна на дозата, или продължителността на терапията, а комбинацията на колистина с други антибиотици може да бъде синергична и терапевтично лечебна.

Важно за терапията на свързаните инфекции е определянето на мутант-превантивните концентрации на colistin, винаги много по-високи от МПК на антибиотиците, особено при *K. pneumoniae* (MPC₉₀ превишава 128 mg/l), което показва, че мототерапията с този антибиотик е свързана с много висок риск от селекция на colistin-резистентни мутанти. Субоптималното дозиране на този агент е свързано с високи рискове от неуспех на лечението. За терапевтична цел е важен резултатът за синергичното действие на комбинациите на колистина с някои други антибиотици, особено на комбинацията на colistin и rifampicin, която понижава мутант-превантивната концентрация на колистина на 36% от щамовете в проучването с метода на El-Azizi и би могла да бъде използвана за терапия на инфекции от colistin-резистентни щамове *K. pneumoniae*.

ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Д-р Проевска съобщава 4 публикации, свързани с дисертационния труд и това, което е показателно за личния ѝ принос е че на три от тях тя е първи автор. Публикацията в J Antimicrob Chemother от 2016 г. има висок (4.9) импакт фактор. Това показва както актуалността на проучвания проблем, така и значимостта на самото проучване.

Тук бих искала отново да посъветвам дисертанта да публикува всички свързани с темата ѝ проучвания и самия обзор и да ги популяризира.

ПРЕПОРЪКИ ЗА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Имам само две бележки, които по никакъв начин не засягат приносите на дисертационния труд на д-р Проевска, но могат да бъдат от полза за бъдещи публикации:

---стр.: По последни данни в проучването на Jayol et al. [2018], чувствителността и специфичността на SuperPolymyxin Medium вече не са 100%, а около 95% и за двата параметра.

--- Справка за приносите, стр. 162: Изразът: „високи нива на резистентност“ би следвало да се промени на „високи честоти“ защото нивото на резистентност засяга по-скоро МПК на агента, отколкото честотата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Запознаването с представения ми дисертационен труд ми достави удоволствие и удовлетворение защото е един навременен и задълбочен отговор на един мащабен и тревожен за света и за нашата страна диагностичен и терапевтичен проблем- този за множество резистентните, включително към карбапенеми, а понякога и към вероятно „най-последния избор“- колистина, Грам-отрицателни бактерии.

Ползата от този труд може да се прилага индивидуално, за подобряване на терапията на конкретния пациент с инфекция от множество резистентни бактерии, но също така и много по-мащабно- за оптимизиране на лабораторната диагностична практика и клинично за разпознаване и търсене на мерки за ограничаване на разпространението на множество резистентните щамове.

Проучването на д-р Проевска дава сравнение на широк набор от методи и техники за задълбочено и цялостно проучване на проблема и цени резултати, приноси и насоки за определяне, както и за начини за преодоляване и на резистентността към colistin на множество резистентни Грам-отрицателни бактерии причинители на инфекции, такива които затрудняват терапевтичния избор и живота на пациентите.

Като преценявам актуалността и комплексното проучване на проблема, при което дисертантът се стреми по всякакъв начин да свърже микробиологичните резултати с тяхната терапевтична полза в клиничната практика, множеството използвани методи и изследвания, както и полезните за специалисти от много специалности изводи и приноси, предлагам на членовете на научното жури да дадат напълно заслужено **образователната и научна степен „доктор“ на Д-р Юлия Стоянова Мартева-Проевска.**

София, 04.11.2018 г.

Проф. Д-р Людмила Боянова Георгиева, дм, дмн.