

ИЗХ. № 168
07.11.2018 г

ДО
ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА НАУЧНОТО ЖУРИ
ПО МИКРОБИОЛОГИЯ ПРИ МУ - СОФИЯ
ОПРЕДЕЛЕНО СЪС ЗАПОВЕД № РК36-2540/
25.10.2018г НА РЕКТОРА НА МУ- СОФИЯ

СТ А Н О В И Щ Е

върху дисертационния 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 за
присъждане на образователната и научна степен “ доктор” по докторска програма
„ Микробиология” в професионално направление 7.1. Медицина, Научна
специалност „ Микробиология” от проф. Енчо Запрянов Савов дмн, ВМА – София.

Възникването и разпространението на множествоно-резистентните /MDR/ щамове Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa и Acinetobacter baumannii, продуциращи широко-спектърни бета-лактамази /ESBL/ и карбапеменази, представлява нарастваща глобална заплаха като терапевтичен проблем през последните няколко десетилетия. Тези микроорганизми показват значителни нива на резистентност към карбапенеми, като най-значими стойности на резистентност – над 90% се наблюдават в изолираните щамове A.baumannii. При тези обстоятелства полимиксините и в частност колистинът се оказват една от последните терапевтични възможности за третиране на инфекции, причинени от подобни MDR щамове в големите болнични комплекси. За нещастие, научните съобщения за развитие на резистентност на тези микроорганизми към колистин, бяха регистрирани с нарастваща честота в целия свят, включително и в България през последните няколко години. Осъзнаването на този проблем трябва да бъде възприето от всички специалисти твърде сериозно, тъй-като медицинското обслужване е изложено на риск от връщане към състоянието на предантибиотичната ера. Ето защо, темата и съдържанието на

представения ми за рецензия дисертационен труд са твърде актуални и важни за епидемиологията и клиничната практика и в значителна степен оправдават усилията на дисертанта за провеждане на едно сериозно проучване в тази област.

Дисертацията съдържа общо 181 страници и е структурирана съгласно изискванията за един дисертационен труд: въведение 2 страници, литературен обзор 55 страници, цел и задачи – 1 страница, материали и методи 31 страници, резултати и обсъждане 50 страници и изводи 3 страници. Онагледена е с 42 таблици и 38 фигури. Библиографията е от 18 страници и включва 259 литературни източника, от които 2 на кирилица и 257 на латиница.

В литературния обзор са изложени твърде подробно основните моменти относно характеристиката на полимиксините - Polymyxin B и Polymyxin E (colistin) като възможност за третиране на инфекции, причинени от проблемни за болничната патология множество-резистентни, включително и на карбапенеми, Грам-отрицателни микроорганизми. Описани са много добре химическата структура, биосинтезата на полимиксините, техния антимикробен спектър, характеризиращ се с проявена бактерицидна активност срещу повечето Грам-отрицателни бактерии, но все още с проблеми и неизяснен механизъм на действие. Доктор Проевска се е постарала максимално да разкрие хромозомните механизми на резистентност / появата на хромозомни мутации / като описва подробно ролята и значението в този процес на O-антигена, сърцевинния олигозахарид и липид А като структурни елементи на липополизахарида (LPS) във външната мембрана на Грам - отрицателните бактерии. Изтъква се, че основен регулатор на гените, които модифицират химично липополизахарида при много видове бактерии като *Salmonella enterica*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Citrobacter rodentium*, *P. aeruginosa* е двукомпонентната система PmrA/PmrB, която може да се активира и индиректно, посредством друга двукомпонентна система PhoP/PhoQ. Обръща се внимание и върху възможността за възникването на мутация или инактивация на гена mgrB, който осъществява негативна обратна връзка в регулаторната система PhoP/PhoQ, което съответно води до развитие на резистентност към полимиксини. Описани са добре развитието на хетерогенност и адаптивна резистентност като феномени на резистентност към полимиксини при някои Грам-отрицателни бактерии като *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и др.

Представени са и данни относно плазмидно-медираната резистентност към колистин, като първата информация в литературата е от 2015г и е свързана с плазмид *mcr1*. Установено е, че този механизъм на резистентност е свързан с 8-16 пъти увеличение на Минималната потискаща концентрация / МПК/ при изследваните щамове *K.pneumoniae* и *P.aeruginosa*. Допълнително в обзора са разгледани някои генетични методи за определяне резистентостта към колистин, методите за определяне *in vitro* резистентността към колистин с техните предимства и недостатъци, разгледани са възможностите на някои автоматизирани системи в това отношение, въведени са понятията „Мутант превантивна концентрация” / МРС /и „ Хипотеза за мутант селектиращ прозорец” /МСП/, разгледана е фармакокинетиката и фармакодинамиката на полимиксините, тяхната клинична употреба със съответната дозировка и оценка на токсичността им, както и възможностите за комбинирана терапия чрез изследване *in vitro* на различни антибиотични комбинации с колистин.

В края на обзора, след направената критична оценка на литературната информация, докторантът мотивира необходимостта от провеждането на задълбочени проучвания по проблема резистентност на изследваните MDR щамове със съответните решения и интерпретации, което е отразено в настоящия дисертационен труд .

Целта на дисертационния труд е правилно формулирана. Поставените за проучване задачи – седем на брой, са точно дефинирани и отразяват основните моменти от съдържанието на дисертационния труд.

В главата “ Материали и методи” са описани изследваните в дисертацията 210 непоставяращи се клинично значими щамове *K.pneumoniae*, *E.coli*, *E.cloacae complex*, *A.baumannii complex* и *P.aeruginosa*, описани са много подробно използваните методи за определяне чувствителността/ резистентността към антимикробни средства, като по специално внимание заслужават тестът с прецифузия на ROSCO Diagnostica, който открива по-добре хетерорезистентните на колистин щамове в сравнение с BMD метода, който ги определя като чувствителни, както и използването на средата Superpolymyxin medium като скрин агар, а също и като възможност за определяне на хетерогенност при изследваните щамове. Молекулярно-генетичните изследвания, свързани с доказване на бета-лактамази, основните групи карбапенемази, гени на резистентност към колистин,

включват различни модификации на PCR – Real time PCR, Multiplex PCR и др. Заслужават внимание и методите, използвани за статистическата обработка на получените резултати.

В глава “ Резултати и обсъждане“ са представени данните от направените изследвания за чувствителността/резистентността *in vitro* на изследваните щамове към антимикробни лекарствени средства, като те са оценени като множествено резистентни, съгласно дефиницията на Magiorakos et al., 2012г. Регистрирана е и значителна резистентност на изследваните щамове *K.pneumoniae* *A.baumannii* и *P.aeruginosa*, към карбапенеми и колистин , което според дисертанта е тревожен факт, тъй-като част от тези щамове са изолирани от амбулаторни пациенти и пациенти, хоспитализирани в друга болница, което показва, че проблемът е сериозна заплаха, не само за болниците, но и за обществото. В тази връзка е установено, че резистентността към colistin на включените в проучването щамове се дължи на хромозомни мутации, като в 31% от изследваните щамове *K. pneumoniae* са установени промени в гена *mcrB*. В настоящото проучване не са установени щамове с плазмидно кодираните *mcr-1*, *-2*, *-3*, *-4*, *-5* гени за резистентност към полимиксини. Заслужават внимание и резултатите от използването *in vitro* на различни антибиотични комбинации с colistin за установяването на синергизъм при резистентни на карбапенеми щамове *K.pneumoniae*. Доктор Проевска приема, че въз основа на направените изследвания, комбинираното приложение на colistin с rifampicin, azithromycin, meropenem, doxycycline или gentamicin би могло да бъде от полза при лечение на инфекции, причинени от карбапенем-резистентни и colistin резистентни *K. pneumoniae*.

Предложените изводи - 9 на брой, отразяват основните моменти от разработването на дисертационния труд. Съгласен съм със справката за приносите с две забележки. Да отпадне като принос – принос 1 от приносите с оригинален характер, а също принос 4.4. от приносите с потвърдителен характер да бъде обединен с приноса 1 от приносите с научно-приложен характер.

В списъка на научните публикации и съобщения във връзка с дисертационния труд са представени 4 публикации, като 3 от тях са публикувани в българския периодичен печат, а 1 в международно списани с IF. Представено е 1 съобщение, изнесено на научен форум у нас.

Представеният за оценка автореферат отговаря на изискванията и включва основните моменти от дисертационния труд.

Заключение:

Имайки предвид достойнствата на дисертационния труд, направените научни приноси, както и личните качества на д-р Юлия Стоянова Мартева - Проевска, предлагам на Научното жури по микробиология при МУ- София да бъде присъдена за нуждите на Катедрата по Медицинска микробиология при МУ- София на д-р Юлия Стоянова Мартева - Проевска образователната и научна степен "доктор".

07.11 2018г

С О Ф И Я

Изготвил становище

проф / Енчо З. Савов / дмн