



## СТАНОВИЩЕ

проф. д-р Стефана Донева Събчева, дм, Ръководител на лаборатория «Микробиология»  
в Университетска специализирана болница за активно лечение по онкология, София,  
член на научното жури назначено със заповед № 76/06.04.2017 г. на Директора на  
Националния Център по Заразни и Паразитни Болести

относно дисертационен труд на тема: «Бета-лактамази с карбапенемазна активност -  
микробиологични и молекулярно-генетични проучвания» за присъждане на  
образователна и научна степен «Доктор» в област на висше образование: 4. Природни  
науки, математика и информатика по професионално направление: 4.3. Биологически  
науки и научна специалност: Микробиология

от Красимира Русева Иванова  
докторант към отдел «Микробиология» на Националния център по заразни и паразитни  
болести, София

с научен ръководител: доц. Иван Николаев Иванов, дм

Резистентността към карбапенемите при Грам-отрицателните бактерии е сред  
най-актуалните проблеми на съвременната медицина, последиците от които придобиха  
глобални измерения. Този тип резистентност най-често се обуславя от трансфера на  
гени, кодиращи продукция на карбапенемази, вследствие на което разпространението  
му в болниците е изключително бързо. Продуцентите на карбапенемази се асоциират с  
тежки и трудни за овладяване вътреболнични взривове, а често поради  
полирезистентния си профил, терапевтичните опции са изключително ограничени.  
Редица проучвания отчитат в световен мащаб ръст на заболеваемостта и смъртността  
вследствие на инфекции причинени от карбапенемаза-продуциращите микроорганизми.  
Разпространението на карбапенемазите сред ентеробактериите буди притеснение и  
поради потенциала на тези патогени да причиняват инфекции придобити в обществото.  
В тази връзка на 27.02.2017, СЗО публикува списък с бактерии, причиняващи  
инфекци, за които спешно са необходими нови антибиотики. Списъкът е разделен в  
три категории в зависимост от степента на спешност, като първата група с най-висок  
приоритет, обхващаща изцяло продуценти на карабапенемази от видовете *Acinetobacter*  
*baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*, както и от сем. *Enterobacteriaceae*.

В България през последните 5 години рязко зачести нивото на изолиране на карбапенем-резистентни щамове от изброените видове и понастоящем сред представителите на сем. *Enterobacteriaceae* се докладват продуценти на всички класове карбапенемази. Все пак броя на проучванията, касаещи карбапенемаза-продуциращите микроорганизми в България, е сравнително малък и обикновено обхваща ограничен брой щамове в отделни болници. В най-голяма степен това се дължи на затруднената детекция и липсата на надежден фенотипен метод, който успешно да се прилага и при трите основни групи карбапенемаза-продуциращи бактерии.

Предвид изложеното дотук считам, че тематиката е изключително актуална и умело подбрана от ръководителя на дисертационния труд. За това свидетелства и факта, че над 80% от цитираните заглавия в библиографията са публикувани след 2000г.

Дисертацията е написана на 119 стандартни страници и е структурирана по общоприетата схема със съразмерно разпределение на текста в отделните раздели. Изложението е оптимално илюстрирано с 38 прецизно изработени нагледни материали (23 фигури и 15 таблици). Библиографията включва 166 литературни източника, които показват добрата литературна осведоменост на дисертанта и отразяват хронологията и съвременното състояние на проблема у нас и в световен мащаб.

Литературният обзор е структуриран адекватно, текстът е компетентно написан и обхваща всички по-важни аспекти на изследвания проблем. Обстойно са разгледани различните класификации на карбапенемазите, техния субстратен профил, епидемиологията и географското им разпространение, задълбочено и критично са коментирани както фенотипните така и съвременните генетични методи за детекция и диференциация, а също така са изтъкнати техните предимства и недостатъци. Добро впечатление прави стегнатия научен стил на дисертантката и умението ѝ да отсява същественото. В края на литературния обзор логично е разгледана ситуацията в страната в светлината на факта, че много от съседките ни докладват едни от най-високите нива на заболеваемост от инфекции с продуценти на карбапенемази в Европа. В заключението на обзора, дисертантката много подходящо обобщава нерешените до момента проблеми, което логически води към целта на дисертацията.

Целта и задачите за изпълнението ѝ са формулирани правилно и отразяват основните елементи на дисертационния труд.

В раздела „Материали и методи“ са описани подробно изследваните щамове, включващи както клинични така и референтни изолати от сем. *Enterobacteriaceae*,

*Pseudomonas* spp. и *Acinetobacter* spp. Изолатите са събиирани в периода 2009-2016 г. от 17 лечебни заведения от пет области. Предвид методичния характер на работата, считам че обема и разнородността на извадката, е напълно достатъчен, за гарантиране на представителния характер на проучването. Щамовете са идентифицирани чрез комплекс от културелни и биохимични методи, които са описани. Антимикробната чувствителност е определена чрез стандартни методи, използвайки препоръките на EUCAST, към седем антимикробни средства от три класа, най-често прилагани за терапия на инфекции от Грам-отрицателни бактерии. Първоначалният скрининг на щамовете, за потенциална карбапенемазна активност, е извършен съобразно съвременните изисквания посредством зоната на меропенем и гранична стойност  $< 25$  мм.

По-нататък детайлно са разгледани протоколите за извършване на значителен набор от фенотипни методи, като специално място се отделя на различните варианти на Carba NP методиката. Прави впечатление разнообразието и внушителния брой молекулярно-генетични техники (PCR, Real-time PCR, плазмиден анализ, пулсова електрофореза, ДНК секвениране и тн.), които е използвала и усвоила докторантката. От прецизното им описание лъжа увереност и разбиране на тънкостите и спецификите на проблема.

Считам, че при подобен тип дисертации обединяването на резултатите и обсъждането в общ раздел, е уместно с цел по-лесното проследяване на взаимовръзките и логиката на отделните експерименти, получените резултати и следствията от тях.

В началото на раздела е извършен сравнителен анализ на установените нива на антимикробна чувствителност, при което се доказва мултирезистентния характер на значителна част от изследваните продуценти на карбапенемази.

Текста касаещ използвания панел от отрицателни контроли, както и таблица 12 са с методична насоченост и би следвало да се преместят в предходния раздел.

Резултатите от референтните PCR методи за класифициране на карбапенемази, са илюстрирани много добре, но е необходима по-задълбочена дискусия, на получените данни, тъй като те са основата за по-нататъшните разработки при усъвършенстване на колориметричните методи.

Дисертантката изпитва ефективността на най-малко три публикувани варианта на Carba NP теста, преди да се насочи към своя собствена модификация. За изпълнението на тази задача са изпитани множество реакционни параметри (солева концентрация, лизиращи условия и др.), всеки от които специфично повлиява

определен аспект от ензимната реакция. В резултат е получен нов тест, който се характеризира с необходимите качества липсващи при предходните варианти, а именно висока стабилност, приложимост при всички значими продуценти на карабапенемази и висока чувствителност при проблемните представители от клас D. Тестът допълнително дава възможност за диференциране на отделните класове карбапенемази. Целият раздел е онагледен с богат снимков материал, свидетелстващ за достоверността на резултатите от проведените експерименти.

Ефективността на нововъдената Carba NP модификация логично е съпоставена с възможностите на класическите фенотипни методи, при което допълнително са потвърдени високата специфичност и чувствителност.

Втората част от дисертационния труд е посветена на детайлното охарактеризиране и проучване на първия български изолат *K. pneumoniae* продуцент на OXA-48. Посредством съвременни молекулярно-генетични техники са регистрирани редица уникални особености в генетичното обкръжение на гена, отличаващи този изолат от срещащите се до момента в литературата. В търсене на обяснение за получените необичайни резултати, докторантката изпитва оригинално разработен от нея праймер с цел изясняване групата на съвместимост на плазмид. Независимо от получения негативен резултат при конкретния щам, новият тест успешно детектира проблемните OXA-48 плазмиди от група IncL/M и е съвместим със стандартния мутиплексен протокол за репликоново типизиране, повишавайки неговата чувствителност .

В заключителната част са обобщени основните резултати от гледна точка на тяхната значимост за общественото здраве и се набелязват насоки за бъдещи проучвания.

Изводите са формулирани правилно, не повтарят елементи от резултатите и отразяват основните находки в работата.

Приносите са категоризирани по общоприетия начин. Намирам, че смислово са изложени адекватно и показват достойнствата на дисертацията.

Красимира Иванова е първи автор в две от представените шест публикации по темата, една от които е публикувана в престижно международно списание с импакт фактор. Взела е и участие в три научни форума, два от които с международно участие в чужбина. Публикациите свидетелстват за водещото участие на дисертантката в дизайна и провеждането на експерименталната работа, демонстрирайки много добри умения за анализ и тълкуване на резултати.

В заключение смятам, че темата е актуална и клинично значима. Представената от автора дисертация е завършен и задълбочен труд със съществен принос в областта на карбапенемаза-медираната бета-лактамна резистентност. Дисертацията многократно надхвърля изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и Правилника на НЦЗПБ. Това ми дава основание за положителна оценка на дисертационния труд, въз основа на която предлагам на уважаваното научно жури да присъди образователната и научна степен “Доктор” по научната специалност “Микробиология” на Красимира Русева Иванова.

16.06.2017 г.

Рецензент:

/Проф. д-р Стефана Събчева, дм /

