

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд, представен пред научно жури, сформирано със заповед № РД 38-379/08.06. 2016 на Ректора на Софийски Университет „Св. Климент Охридски” за получаване на образователната и научна степен “доктор”

Автор на дисертационния труд: д-р Мустафа Гюзел

Тема на дисертационния труд: „Фенотипно и генотипно изследване на метало- β - лактамази в клинични изолати на Грам-отрицателни неферментиращи бактерии”

Рецензент: проф. д-р Венета Иванова Грудева

1. Актуалност и значимост на дисертационната тема

Проблемът с нарастващата антибиотична резистентност е сериозен проблем за съвременната клинична практика. Причините за това са разнообразни и една от тях е свързана със синтезата на специфични ензими - метало - β лактамази(МБЛ), което води до резистентност към β-лактамните антибиотици и карбанемите. Това естествено затруднява силно лечението с тези антибиотици. Когато е налице и множествена резистентност, какъвто е случая с Грам-отрицателните неферментиращи бактерии (НФГБ), ситуацията е силно комплицирана. Понастоящем тези бактерии и особено *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* са сред най-важните фактори за възникване на вътреболнични инфекции.

Изясняването на механизмите на множествената резистентност, генетичната ѝ детерминираност както и разработването на удачен алгоритъм за експресна диагностика са проблеми, обект на интерес на различни специалисти- лекари, биолози, молекулярни биолози, клиницисти.

Ранната диагноза на изолатите, продуциращи МБЛ е изключително важно както за предотвратяване на разпространението на резистентните щамове, така и от гледна точка на информиране на клиницистите с оглед подбор на удачни антибиотици за ефикасно лечение.

В този смисъл представената дисертация е по **особено актуален проблем** с важно фундаментално значение и възможности за решаване на проблеми с

свързани с множествената резистентност и преодоляване на сериозните пречки за успешна анитбиотична терапия.

2. Оценка на структурата на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 104 стандартни страници А4 и съдържа 17 таблици и 19 фигури. Трудът е структуриран по стандартната схема - увод, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, изводи, приноси, литература като отделните раздели са в добро съотношение.

Написан е на добър научен стил, с точно използване на терминологията което показва, че докторантът познава професионално материята.

В библиографската справка са включени 133 източника, главно от последните години, включително и такива от 2015 г., което е показател за отличната осведоменост на докторанта по проблема.

2.1. Литературен обзор

Литературният обзор е написан на 44 страници. В него обстойно е разгледана биологията на Грам-отрицателните неферментиращи бактерии с акцент върху *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Stenotrophomonas maltophilia*. Представени са данни за факторите на вирулентност, механизми на възникващата антибиотична резистентност както и болестните състояния, които тези представители на Грам-отрицателните неферментиращи бактерии причиняват. Представени са и данни за други бактерии от същата физиологична група, причиняващи патологични изменения.

Специално внимание е отделено на механизмите на възникване на резистентност към антибиотици: генетична детерминираност – хромозомна, плазмидна, биохимичните фактори, участващи в развитието на резистентност.

Обстойно са дискутирани β -лактамните антибиотици, механизмите за резистентност към тях като особено подробно са разгледани Бета-лактамазите, тяхната класификация, типовете, механизмите на действие, методите за доказване, инхибиторите им. Обсъдени са и механизмите на резистентност към карбапенеми

Информацията е представена с отличен научен стил, цитирани са значителен брой автори, работещи по проблема и изложеното в обзора е добра аргументация на необходимостта от провежданите от автора изследвания.

Очевидно е, че дисертантът познава в детайли проблема, в състояние е да оценява правилно литературните данни, да ги интерпретира и излага по подходящия начин.

2.2. Цел и задачи

Основната цел на дисертационния труд е проучването с фенотипни и генотипни методи на синтезата на метало-бета-лактамази в Грам-отрицателни неферментиращи глюкозата бактерии, изолирани от различни клинични проби в Турция, с оглед на избор на подходящ рутинен метод, приложим в клиничната практика. Тя е точно и ясно формулирана.

Поставени са 5 основни задачи като изолиране и идентифициране на Грам-отрицателни неферментиращи бактерии от различни клинични проби, определяне на чувствителността им към антибиотици, доказване на способност за синтез на метало- β -лактамази чрез различни методи – няколко фенотипни методи както и доказване на гени за метало-бета-лактамази чрез Real-time PCR.

2.3. Материали и методи

Това е важна част от дисертационния труд, която показва нивото на проведените научни изследвания.

За изолиране на бактериите, обект на изследванията са използвани 33474 клинични проби, постъпили в болницата Дъшкапъ в Анкара в периода януари 2014 – декември 2014 г с различен произход.

Представени са съвременни микробиологични, биохимични и молекулно генетични методи, които са адекватни на поставената цел и които осигуряват едно прецизно изпълнение на задачите.

Методите са описани точно, ясно без излишни подробности. Комбинирането на различни методи дава възможност докторантът не само да получи нови знания, но и да придобие умения за комплексно решаване на поставените научни задачи.

2.4. Резултати и обсъждане

Резултатите от проведените изследвания са представени последователно съгласно поставените задачи.

Логично започват с изолиране изолиране и идентифициране на Грам-отрицателни неферментиращи бактерии от различни клинични проби. Като вече отбелязах са изследвани 33474 клинични проби. На базата на използваните методи на класическата таксономия значителна част от изолатите са

идентифицирани като представители на род *Pseudomonas* като 95% от тях са идентифицирани като *P. aeruginosa*, 2% - като *Pseudomonas fluorescens* и 3% - като *P. putida*.

За други 650 щамове е доказано, че принадлежат към род *Acinetobacter* като 95% от тях са идентифицирани като *A. baumannii* и 5% - към други видове. Два изолата са идентифицирани като *Borhodellla cepacia*.

След определяне на антибиотичната чувствителност от всички 1152 щамове са отбрани 55 щамове от род *Pseudomonas* и 33 щамове от род *Acinetobacter*, всички идентифицирани като *A. baumannii*, показали резистентност поне към един от антибиотиците IMP, MEM и CAZ. За по-нататъшни изследвания са включени и двата щамове *B. cepacia*, също изолирани от клинични проби.

Това е мащабно по характер изследване и резултатите от него са съществени за клиниката където са извършени изследванията. Анализът на получените резултати показва, че селектираните бактерии от род *Pseudomonas* се изолират най-често от рани, трахеален аспират и урина, докато тези от род *Acinetobacter* – от трахеален аспират. Тези резултати на докторанта имат съществена стойност тъй като позволяват да се направят важни предположения за възникването на вътреболничните инфекции. Освен това те имат и практическа стойност.

Особено подробно е изследвана способността на получените изолати да синтезират металобеталактамази. Направен е сравнителен анализ на шест различни фенотипни методи за доказване на беталактамази, а именно: градиентен E-тест за МБЛ, ROSCO бърз скринингов тест за карбапенемаза, модифициран Hodge тест, комбиниран EDTA дисково дифузионен тест, ROSCO потвърдителен тест за МБЛ и двоен-дисков синергичен тест. Извършено е сравнение на фенотипните методи при различните изолати с различна таксономична принадлежност.

Чрез използването на праймери за гените на IMP, VIM, GIM, SPM и SIM МБЛ, всички щамове са анализирани за присъствие на тези гени с Real-time PCR (RT PCR), който се счита за особено информативен в молекулно-генетичните методи. За установяване на честотата на срещаемост на МБЛ във всеки бактериален вид резултатите за всеки фенотипен метод са сравнявани с тези, получени чрез RT PCR.

Всички резултати са обработени статистически, което е важно за тяхната достоверност.

В резултат на получените данни авторът установява че по отношение на видовете от род *Pseudomonas*, най-съвместимият с RT PCR фенотипен метод е модифицираният Hodge тест, а за *Acinetobacter baumannii* за предпочитане са комбинациите на ROSCO потвърдителен тест (IMP+DPA), двойно-дисков синергичен тест (IMP+ДПК) и (MEM+ДПК). Когато е необходимо да се използва общ метод за *Pseudomonas spp.* и за *A. baumannii*, за предпочитане е методът ROSCO потвърдителен тест (IMP+DPA). Двата щам на *B. cepacia* са отрицателни по отношение на синтеза на МБЛ, което е установено както с фенотипните методи, така и чрез използвания молекулно-генетичен метод (RT PCR). Това са резултати, които имат съществена фундаментална и приложна стойност.

Поради ограничените възможности за лечение на инфекциите, предизвикани от бактерии, продуциращи МБЛ, предотвратяването на разпространението на тази резистентност в болнична среда е много важно. Навременното идентифициране на патогените да продуцират МБЛ има голямо значение и представлява полезна информация за клиницистите при определяне на хода на лечението.

Дисертационният труд завършва с обобщение, в което се прави обстоен критичен анализ на получените от автора резултати и наличните в литературата данни относно различните методи за доказване на металобеталактамази, предимствата и недостатъците на всеки един от тях, възможните причини за възникването на грешни преценки. Това отново потвърждава отличната подготовка на диокторанта, детайлното познаване на проблема и уменията му да интерпретира и анализира получените резултати.

2.5. Изводи и приноси

На базата на проведените експерименти по поставените задачи са формулирани 11 извода. Те са логично следствие от проведената експериментална работа и напълно отразяват получените резултати.

Посочени са и 4 приноси. Тези приноси, макар и скромно посочени от д-р Гюзел имат фундаментален характер и значение за правилния избор на лечение при инфекции с тези бактерии.

Те представляват съществен принос в изследванията на разпространение на полирезистентни бактерии в клиниките, тяхната експресна диагностика и механизмите на антибиотична резистентност като цяла. местообитанията с ниска температура и биогеохимичните процеси в тях. Освен фундаментален характер изводите и приносите на д-р Гюзел могат да бъдат важна опорна точка в работата на клиницистите при определяне на правилния ход на лечението.

3. Участие на докторанта в изработването на дисертацията

Докторантът е разработвал дисертацията си в катедрата по Обща и приложна микробиология и медицинската микробиологична лаборатория на болницата Йълдъръм Беязът Дъшкапъ, Анкара.

Личните ми впечатления ми дават основание да считам, че изпълнението на дисертационния труд е негово дело.

4. Публикации, участия в научни форуми и проекти

Дисертантът е представил списък с две публикации по темата на дисертацията.

Резултати от дисертацията са докладвани на 2 научни форуми.

Във публикациите и участията д-р Гюзел е първи автор.

5. Препоръки, забележки и въпроси

Дисертационният труд е оформен перфектно, не са допуснати съществени технически грешки поради което е трудно да се направят забележки. Естествено има незначителни стилни неточности, които обаче в никакъв случай не намаляват достойнствата на труда като се има предвид, че докторантът не е с български произход.

Към докторанта имам следните въпроси :

1. Кои други видове Грам-отрицателни неферментиращи бактерии предизвикват вътреболнични инфекции и представляват интерес да бъдат скринирани за продукция на метало-бета-лактамази?
2. Съществуват ли и други фенотипни методи за установяване на продукцията на метало-бета-лактамази, освен тези, използвани в дисертационния труд?
3. Освен Real-time PCR, какви други генотипни методи могат да се използват за доказване и идентификация на МБЛ?
4. Какви са вашите бъдещи планове във връзка с изследванията, които сте направили в дисертацията? Как виждате продължението на тези изследвания?

6. Придобрита компетентност в съответствие с изискванията на образователната и научна степен „доктор”

Представеният дисертационен труд е едно завършено изследване, което предоставя ценна научна информация и разкрива възможности за практическо приложение. Дисертационният труд има сериозни приноси. Приносите могат да се групират като такива с подчертано фундаментален характер, приноси с потвърдителен характер, оригинални приноси и такива с потенциална възможност за практическо приложение.

Като по съществени приноси на дисертацията могат да се посочат :

⇒ Определянето на таксономичната принадлежност и доминиращите видове наНФГБ анализирани клинични проби

⇒ Данните относно антибиотичната резистентост на изолатите и доказването на полирезистентност при значителна част от тях

⇒ Данните относно сравнителния анализ на различни фенотипни методи за доказване на продукцията на металобеталактамаи

⇒ Установяването на най-подходящите комбинации от тестове за доказване на метало-бета-лактамази според таксономичния статус на тестираните бактерии

⇒ Използуването на съвременен молекулно-генетичен метод за определяне на генетичната детерминираност на метало-бета-лактамазите

⇒ Заключениета на дисертанта относно ефективността на използваните методи за доказване на МБЛ и заключението за необходимостта от използването на молекулярно-генетичен метод за тяхната окончателна идентификация.

Получените резултати са от съществен интерес лечението на инфекции, причинени от бактерии с множествена резистентност, за тяхното диагностициране със съвременни методи и съм убедена, че те ще намерят практическа реализация.

Авторефератът е изготвен съгласно изискванията и отразява вярно основните резултати и изводи на дисертационния труд.

Изхождайки от изложеното мога да обобщя, че са изпълнени основните цели на докторантурата – образователна и научна. Дисертацията е разработена на високо научно ниво и изцяло отговаря на изискванията. Очевидно е, че докторантът е придобил значителни компетенции, усвоил е широк набор от съвременни методи, изградил се е като отличен експериментатор, квалифициран клиничен микробиолог.

Имам лични впечатления от докторанта по време на работата му в катедрата и те са за особено сериозен, амбициозен човек, който отлично се справя с поставените задачи.

Изложеното по-горе ми дава основание да считам, че дисертацията е на високо ниво, придобити са компетенции в съответствие с изискванията и горещо препоръчвам на научното жури да оцени достойнствата на дисертационния труд и да присъди на д-р Мустафа Гюзел Образователната и научна степен „Доктор”.

02.07. 2016.

Рецензент :
(Проф. д-р Венета Грудева)