

## РЕЦЕНЗИЯ

ОТ ПРОФ Д-Р МАГДАЛЕНА ИВАНОВА ЛЕСЕВА ДМ  
НАЧАЛНИК ЛАБОРАТОРИЯ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ ПРИ  
УМБАЛСМ „Н И ПИРОГОВ”

НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД НА  
ПРОФ. Д-Р СТЕФАНА ДОНЕВА СЪБЧЕВА, ДМ НА ТЕМА:

„Проучвания върху резистома на ентеробактериални патогени при  
онкологично болни”

за придобиване научната степен „доктор на науките”, област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина и научна специалност „Онкология”

**Автобиографични данни.** През периода 1976г.-1978г. Д-р Събчева следва обща медицина във ВМИ, Варна, след което продължава образованието си във ВМИ, Санкт-Петербург, Русия, където се дипломира през 1983 г. От 10.10.1983г до 01.12.1986 г. работи като лекар ординатор в ХЕИ - гр. Перник. През периода 1.12.1986г-16.02.1987г. е ординатор микробиолог в Микробиологичната лаборатория на I-ва АГ болница „Тина Киркова”, София. След тази дата и понастоящем работи в УСБАЛ по онкология „Проф. Иван Черноземски” ЕАД (Национален онкологичен център), София, като до 23.10.1989г. е научен сътрудник в Лабораторията по имунология и вирусология, а след това – Ръководител на Лабораторията по микробиология. През 1989г. придобива специалност по Микробиология. През 2003г след защита на дисертация по научната специалност Микробиология: “Фенотипно и генотипно характеризиране на бета-лактамази с разширен спектър в клинични шамове *Enterobacteriaceae*, изолирани от онкологично болни”, придобива образователна и научна степен „доктор” по научната специалност Микробиология. През 2010 г. ѝ е присъдено научното звание доцент по научната специалност „Онкология”. През 2017г. придобива научното звание професор по научната специалност „Онкология”.

Има 8 специализации в чужбина: Русия, Япония, Институт Пастьор-Франция, предимно свързани със съвременни генетични и други

изследвания на антимикробната резистентност на Грам-отрицателните микроорганизми.

Проф. Събчева е член на Българска асоциация на микробиолозите, Европейско дружество по клинична микробиология и инфекциозни болести (ESCMID), Съюз на учените в България, Европейска асоциация за ракови изследвания (EACR), Дружество за рационално прилагане на антибиотиците (APUA).

Владее френски, английски и руски езици, работа с компютърни програми.

**Научна продукция и преподавателска дейност:** Резултатите от дисертационния труд на проф. Събчева са достояние на широката научна общественост в страната и чужбина. Общият брой публикации на авторката са 93, като 32 от тях са нерецензирани досега и са представени във връзка с настоящия дисертационен труд. В 8 от тях д-р Събчева е самостоятелен или първи автор. Участията ѝ в научни форуми в България и чужбина са общо 102, от които 30 участия в научни форуми с публикувани резюмета (24 в България и 6 в чужбина) са свързани с настоящия дисертационен труд. Статиите са публикувани в престижни списания с импакт фактор  $IF=179, 825$  общо за всичките, като 21 от статиите във връзка с настоящия дисертационен труд формират  $IF=142, 58$ .

Тя участва в 4 научни проекта, свързани с дисертацията и касаещи предимно генетичните механизми на антимикробна резистентност. В един от тях участва като стипендиант с докторска степен на Японското дружество за развитие на науката. Тя е координатор и основен изпълнител за България на проект на Европейския център за превенция и контрол на инфекциите за геномно-базирано проследяване на разпространението на резистентни към карбапенеми и колистин *Enterobacteriaceae*.

Проф. Събчева взема ежегодно участие като лектор в курсове на тема „Съвременна етиологична диагностика и етиотропна терапия на инфекциите при имунокомпрометирани пациенти“ и „Антимикробна химиотерапия“ от програмата на НЦЗПБ за следдипломно обучение на

медицински и немедицински кадри. Била е научен консултант на трима защитили докторанти.

#### Относно наукометричните показатели:

Проф. Събчева има 347.3 точки (при изискване за минимум 100) за покриване на наукометричните изисквания от научната ѝ продукция;

Дисертантката има 228 цитирания на статии във връзка с докторския труд за научна степен доктор на науките, за което ѝ се присъждат 3420 точки (228x15), при изискване за минимум 100.

Съгласно минималните национални изисквания за придобиване на научната степен „Доктор на науките” в научна област 7. Здравеопазване и спорт, кандидатът трябва да има минимум 350 точки, докато Проф. Събчева е реализирала над 10 пъти повече – 3917.3.

Относно изискванията на Правилника на УСБАЛО за придобиване на научната степен „Доктор на науките” са необходими 22 нерецензирани публикации (при налични 32 на Проф. Събчева), в поне 8 от които да е първи автор, както е в случая. Необходимо е поне 5 от списанията, в които са публикувани статиите, да са с импакт фактор (при 21 на Проф. Събчева), а цитиранията на научните трудове да са поне 20 (228 са за проф. Събчева). Извън тези минимални изисквания авторката представя допълнително: 7 публикации в реферирани/индексирани списания без импакт фактор; 3 публикации в нереферирани списания с научно рецензиране; 1 участие в монография; 24 участия в национални и 6 – в международни научни форуми; в 2 научни проекта и ръководство на 3 успешно защитили докторанти.

#### **Актуалност и значимост на дисертационния труд**

Множествената резистентност при Грам-отрицателните патогени и по-специално – при *Enterobacteriaceae*, е сред най-актуалните проблеми на съвременната медицина, последиците от които придобиха глобални измерения. Тази резистентност често се обуславя с трансфера на гени, кодиращи продукция на разграждащите различни антибиотични групи

ензими, вследствие на което разпространението ѝ в болниците е изключително бързо. Множествено резистентните *Enterobacteriaceae* (MDR E) се асоциират с тежки, трудни за овладяване и живота-застрашаващи вътреболнични инфекции и взривове с изключително ограничени терапевтичните опции. Редица проучвания отчитат в световен мащаб ръст на заболяемостта и смъртността вследствие инфекции, причинени от карбапенемаза-продуциращи, а отскоро – и от колистин-резистентни микроорганизми. Не случайно в публикувания от СЗО списък с бактерии, причиняващи инфекции, за които спешно са необходими нови антибиотици, първата група с най-висок приоритет обхваща изцяло продуценти на карбапенемази от видовете *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*, както и 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 *Enterobacteriaceae* се докладват продуценти на всички класове карбапенемази. Високо-инвазивни и трудно повлияващи се от лечение вътреболнични щамове, разпространени вече в почти всички болници, са метало-бета-лактамаза (MBL) продуциращите *Klebsiella pneumoniae*, в повечето случаи – NDM продуценти. Те са запазили чувствителност към единични антимикробни агенти, най-често пазените в резерва тигециклин и колистин. Напоследък зачестява изолирането на резистентни и към тези препарати щамове, включително пан-резистентни. Установяват се и MBL(+) щамове от други видове *Enterobacteriaceae*, като *E.coli*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp* и други. Особено голямо притеснение буди потенциалът на всички тези патогени да причиняват придобити в обществото инфекции.

Основна предпоставка за поставяне под контрол разпространението на MDR *Enterobacteriaceae* и подобряване на терапевтичните опции е извършването на детайлни генетични проучвания върху геномните им характеристики, обуславящи лекарствената резистентност (резистом) и механизмите на тяхното вътревидово и междувидово предаване.

Онкологично болните пациенти са с множество нарушения на хуморалния и клетъчния имунитет и редица придружаващи заблявания, много често са подложени на инвазивни процедури, което ги прави особено уязвими към инфекции, включително причинени от MDR щамове.

Предвид изложеното дотук считам, че темата на дисертационния труд е възможно най-актуалната понастоящем и с изключително висока научна и клинична значимост.

### **Структура на дисертационния труд**

Дисертационния труд обхваща 292 стандартни страници, онагледена е с 36 фигури и 32 таблици. Библиографията съдържа 432 заглавия, от които 10 на кирилица. Работата е структурирана по общоприетата схема: Използвани съкращения - 1 стр.; Увод – 3 стр., Литературен обзор - 75 стр., Цел и задачи 1 стр., Материали и методи - 35 стр., Резултати и обсъждане - 113 стр., Изводи - 3 стр., Приноси – 2 стр., Публикации и участия в научни форуми - 8 стр., Библиография – 51 стр.

*Литературният обзор* е структуриран адекватно, текстът е компетентно написан и обхваща всички по-важни аспекти на изследвания проблем. Обстойно са разгледани причинителите на инфекциозните усложнения при онкологично болните, сред които бактериите от разред *Enterobacterales* са водещите. Подробно са разгледани механизмите на действие, механизмите на резистентност, фенотиповете на резистентност и методите за тяхното откриване при всяка една от антибиотичните групи с антибактериална активност, използвани за лечение на инфекции при болните със злокачествени заболявания. Задълбочено и критично са коментирани както фенотипните така и съвременните генетични методи за детекция и диференциация на детерминантите на антимикробна резистентност, 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

заклучението на обзора, много подходящо обобщава нерешените до момента проблеми, което логически води към целта на дисертацията.

**Цел и задачи.** Целта е формулирана ясно и точно. Четирите задачи описват последователните стъпки, извършени за постигане на поставената цел: 1. Разработване и въвеждане в рутинната диагностика на фенотипни методи за мониториране на нововъзникнали механизми на антибиотична резистентност; 2. Последващо доказване на генетичните механизми на резистентност и на асоциираните детерминанти на резистентност, както и динамиката на тяхното разпространение, които са в основата на съвременния геномен антибиотичен надзор. Важна задача на труда е разработката на терапевтичен подход, основан на данните от геномния анализ при ентеробактериални патогени с голям болестен товар (като например продуцентите на карбапенемази), за подобряване резултатите от лечението на пациентите, в помощ на клиницистите.

**Материали и методи.** За провеждане на изследванията са използвани голям набор класически микробиологични и съвременни молекулярно-генетични методи за фенотипно и генотипно характеризиране на ентеробактералните патогени, причинители на инфекциозни усложнения при онкологични пациенти. Впечатляващ е големият брой включени клинични щамове (14,234), изолирани последователно в продължение на дългогодишния период на проучването, на принципа на обособени клинични случаи от един изолат за пациент.

Идентификацията на изолираните щамове е извършена с най-съвременни методи и апаратура: MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, Bremen, Germany); Crystal BD; ApiE; Vitek-1/2. Същото важи и за методите за определяне на антимикробната им чувствителност; за екстракция на нуклеинови киселини и методите, базирани на PCR, конюгация, целогеномно секвениране и биоинформатичен анализ.

**Резултати и обсъждане.** Считаю, че 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 анализ на генетични механизми на резистентност при ентеробактериални патогени, продуциращи 16S рРНК метилтрансферази. Характерно за тях е обуславянето на високо ниво на резистентност както към гентамицин, така и към амикацин и че често са свързани с детерминанти на резистентност към  $\beta$ -лактами и хинолони.

Д-р Събчева въвежда от 2004 г системен фенотипен скрининг за високо ниво на резистентност към аминогликозиди като част от рутинната антибиограма. За периода 2004-2024 тя изследва 12,048 щама *Enterobacteriales*, изолирани от хоспитализирани и амбулаторни пациенти. С помощта на multiplex PCR тя идентифицира гените (*armA*, *rmtB* и *rmtF*), кодиращи 16S рРНК метилтрансферази в 1.6% от клиничните случаи при 13 бактериални вида. Те причиняват предимно уроинфекции и значително по-рядко други (раневи, респираторни, инфекции на кръвта). Най-често техен причинител е *Klebsiella pneumoniae*, която зачестява особено през последните години, на фона на намаляващо разнообразие на изолираните патогени.

Що се касае до гените, кодиращи 16S рРНК метилтрансферази, в 83.1% от случаите се установява *armA*, докато *rmtB* се открива само при *Klebsiella pneumoniae* и *E.coli*, а другите видове гени – само при *Klebsiella pneumoniae*.

Конюгацията и плазмидното репликационно типирание разкриват, че метилтрансферазните гени са кодирани в различни конюгативни плазмиди (IncL/M, IncA/C, IncR, IncFIB и IncFII), което предполага различен произход и източници на придобиване. Наред с това повечето от тях носят и гени, кодиращи CTX-M ESBLs локализиращи на същия IncL/M плазмид. В голяма част от случаите са налице и карбапенемазни гени – NDM-1, NDM-5, VIM-1, VIM-4, VIM-86 и OXA-48.

Проф. Събчева определя антимикробната чувствителност на 195 ентеробактериални патогени, продуциращи 16S рРНК метилтрансферази към широк набор антимикробни препарати. Прави впечатление високата, над 60% резистентност към най-новите антибиотици и комбинации с бета-лактамазни инхибитори: ceftazidim/avibactam, imipenem/relebactam, colistin

дори tigecyclin и meropenem/vaborbactam. Единствено към cefiderocol (който не е наличен в България) са чувствителни почти всички щамове. Въз основа на това, авторката предлага ценни терапевтични схеми в различните случаи.

В следващия раздел Проф. Събчева извършва анализа геномните характеристики на colistin-резистентни, *mcr-1*-позитивни клинични щамове *E. coli*.

Тя правилно отбелязва, че colistin е едно от последните средства за лечение на животозастрашаващи инфекции от карбапенемаза-продуциращи бактериални патогени. Известно е, че през 2016, Liu et al. откриват първия плазмидно-медиран ген за резистентност към colistin (*mcr-1*) в *E. coli* от животински и човешки произход. От 2017 г. Д-р Събчева въвежда в рутинната практика още един систематичен скрининг - за колистинова резистентност с помощта на селективна среда, използвана заедно с рутинната антибиограма. Така са изследвани 2669 щамове *E. coli*, изолирани през периода 2017-2023 г., от амбулаторни и хоспитализирани пациенти. На щамове с позитивен фенотипен тест е извършен multiplex PCR, при което е идентифициран *mcr-1* гена в 3 (0.1% ) от скринираните colistin-резистентни клинични щамове *E. coli* от урини на амбулаторни пациенти. МПК на colistin при трите *mcr-1*-позитивни щамове е 4 mg/L. Авторката извършва биоинформатичен геномен анализ на тези 3 щамове. При един от тях е открит конюгативен IncI2 плазмид, а при другите два генът е в хромозомата. Съществено е, че се открива хромозомен *mcr-1* ген във високорискови щамове *E. coli* от ST131. Освен това тя установява, че щамове с плазмидно кодиран *mcr* ген притежава мутации за резистентност към хинолони (*gyrAD87N*, *gyrAS83L*, *parCS80I*), гени за резистентност към  $\beta$ -лактами (*bla*<sub>TEM-30</sub>) и аминогликозиди (*aadA1*, *aac(3)-IIa*).

**В Заключителната част са** обобщени основните резултати от гледна точка на тяхната значимост за общественото здраве

**Оценка на изводите и приносите на дисертационния труд**

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

В изследванията си Проф. Събчева е постигнала значителни **оригинални и потвърдителни научни приноси, както и приноси с научно-приложен характер**, по-значимите от които могат да се обобщят, както следва:

1. Използването на фенотипни методи дава възможност да се разкрие появата на нови механизми на резистентност, което налага прилагане на генетични методи за тяхното идентифициране;

2. Геномният анализ доказва генетичните механизми на резистентност на ентеробактериалните патогени, които продуцират определени, разграждащи антибиотиците ензими: 16S rRNA метилтрансферази, карбапенемази, др;

3. Конюгативните експерименти и геномният анализ разкриват поидвижните генетични елементи – плазмиди и др., които пренасят гените на резистентност. Разнообразието на конюгативните плазмиди предполага различен произход и източници на придобиване на гените за резистентност;

4. Генетичните изследвания установяват наличието на различни гени за резистентност (към различни групи антибиотици), които водят до ко-продукция на ESBLs, карбапенемази и други ензими, причиняващи множествена, екстремна и дори пан-резистентност на ентеробактериите. Въз основа на всичко това се правят препоръки за антимикробна терапия;

5. Характеризирани са първите *mcr*-позитивни изолати *E. coli* от човешки произход в България. Потвърдена е ролята на конюгативните плазмиди IncI2 в разпространението на *mcr* гените. Откриването на хромозомен *mcr-1* ген във високорискови щамове *E. coli* от ST131, изолирани от амбулаторни пациенти, подчертават необходимостта от провеждането на систематичен скрининг за колистинова резистентност при всички пациенти.

6. Най-важен принос на този дисертационен труд е неговата практическа приложимост. Въз основа на резултатите от проучванията на Проф. Събчева върху механизмите на антимикробна резистентност и

начините за разпространението им, клиничните микробиолози от най-големите многопрофилни болници и клиницистите, лекуващи пациенти с инфекции от екстремно резистентни вътреболнични патогени, разработихме съвместно и приложихме на практика успешни терапевтични схеми, довели до спасяване на живота на много пациенти. Резултатите от проучванията на проф. Събчева ще са в основата на разработването на мерки за профилактика и лечение на инфекции от MBL(+) *K. pneumoniae*, които все повече се разпространяват не само в болничните заведения, но и в обществото. Както е видно от презентацията на дисертантката, пред подобни проблеми скоро ще ни изправи и разпространяващата се колистинова резистентност.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ:**

Проф Събчева е един от най-изтъкнатите клинични микробиолози и учени в България и най-голям експерт в областта на антимикробната резистентност на микроорганизмите. За това свидетелстват извънредно големият брой на публикациите, на импакт фактора им, на цитиранията, 10-кратно по-големият брой точки, в сравнение с изискванията за присъждане на научната степен „Доктор на науките”.

Предложеният за рецензия материал е изключително актуален и обемен и изпълнява напълно изискванията на ЗРАСРБ и Правилника към него. Темата е високо значима, материалът – богат и методично съвършено обработен, получените резултати са с важна научна и практическа стойност. Приемам напълно приносите на разработката и представените публикации, свързани с нея. Всичко това ми дава основание да поставя положителна оценка на дисертационния труд и убедено да подкрепя присъждането на научната степен „Доктор на науките” по научна специалност Онкология на Проф. Д-р Стефана Донева Събчева.

21.03.2025г

София

Рецензент:

(Проф. д-р Магдалена Лесева, дм)