

До Председателя научното жури
определено със заповед № 3-85/07.03.2025
на Изпълнителния директор на
УСБАЛО “Проф. Иван Черноземски”
Доц. д-р Димитър Димитров, д.м.

РЕЦЕНЗИЯ

**От проф. д-р Ива Стефанова Христова, д.м.н.
Национален Център по Заразни и Паразитни Болести**

На дисертационен труд за присъждане на научната степен „ДОКТОР НА НАУКИТЕ” в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина и научна специалност „Онкология”

Тема на дисертационния труд:

**ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ РЕЗИСТОМА НА ЕНТЕРОБАКТЕРИАЛНИ ПАТОГЕНИ ПРИ
ОНКОЛОГИЧНО БОЛНИ**

Автор на дисертационния труд: проф. д-р Стефана Донева Събчева, д.м.

Биографична справка

Проф. д-р Стефана Събчева завършва медицина през 1983 г. в Медицински университет в гр. Санкт-Петербург. Започва трудовата си дейност в Микробиологичната лаборатория на ХЕИ-Перник (1983 г. - 1986 г.) и продължава в Микробиологичната лаборатория на Първа АГ болница „Тина Киркова”, София (1986 г.-1987 г.). От 1987 г. е член на колектива на Националния онкологичен център с правоприемник УСБАЛ по онкология “Проф. Иван Черноземски” ЕАД, София. Последователно заема длъжностите ординатор-микробиолог, научен сътрудник III, II и I степен в Национален онкологичен център и Ръководител на Лаборатория по микробиология на УСБАЛ по онкология, София. Придобива клинична специалност по Микробиология в Медицинска академия, София през 1989 г. През 2003 г. защитава докторска дисертация на тема „Фенотипно и генотипно

характеризиране на бета-лактамази с разширен спектър в клинични щамове *Enterobacteriaceae*, изолирани от онкологично болни” като докторант на самостоятелна подготовка в НЦЗПБ по научна специалност „Микробиология”. От 2010 г. е избрана за доцент, а от 2017 г. – за професор по научна специалност „Онкология”. Има множество специализации – Всесъюзен Онкологичен Научен Център (ВОНЦ), Москва, Русия, Институт Гюстав-Руси и Институт Пастьор, Франция. Била е стипендиант на Японската агенция за международно сътрудничество (JICA) в Токио и на Японското общество за развитие на науката (JSPS) като стипендиант с докторска степен в Медицинския университет „Тохоку”, Сендай.

Актуалност на дисертационния труд

През последните години балансът между темповете на възникване на нови механизми на антимикробна резистентност и въвеждане на нови антибиотици с активност срещу тях е нарушен в полза на микроорганизмите. В тази ситуация осъществяването на ефективен надзор за ограничаване разпространението на множествено-резистентните бактерии и тяхното навременно лечение придобива първостепенно значение. В съвременните условия провеждането само на фенотипен надзор е недостатъчно, тъй като не дава познания за пътищата на дисеминация на гените за резистентност. Геномният надзор, обаче, основан на целогеномното секвениране на микроорганизмите предоставя цялостна информация за всички геномни характеристики, обуславящи лекарствената резистентност (резистом) при ентеробактериалните патогени, което позволява не само провеждането на ефективни противоепидемични мерки, но и геномно насочена антимикробна терапия. В тази връзка настоящият дисертационен труд, целящ провеждането на геномно проучване върху множествено-резистентните патогени, експресиращи нови механизми на антимикробна резистентност, е навременен и актуален.

Структура на дисертационния труд

Дисертацията е написана на 292 страници и е структурирана по общоприетата схема със съразмерно разпределение на текста в отделните раздели, както следва: използвани съкращения – 1 стр.; въведение – 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., и литература – 51 стр. Към дисертационния труд е приложен и списък с публикации и съобщения във връзка с дисертацията – 8 стр. Изложението е оптимално илюстрирано с 68 изработени нагледни материали (36 фигури и 32 таблици). В дисертацията са цитирани 432 литературни източници: 10 са на кирилица и 422 – на латиница, повечето от тях са от последните 10 години – доказателство за актуалността на разработвания дисертационен труд.

Оценка на литературния обзор

Литературният обзор на дисертационния труд е построен логично и започва с анализ на инфекциите при болни със злокачествени заболявания. И тъй като в етиологичния спектър на инфекциозните усложнения при болни със солидни тумори водещи са Грам-отрицателните бактерии, и по-специално бактериите от разред *Enterobacterales*, проф. Събчева целенасочено концентрира научните си проучвания върху механизмите на резистентност при тях. В детайли са разгледани механизмите на действие, механизмите на резистентност, фенотиповете на резистентност и методите за тяхното откриване при всяка една от антибиотичните групи. Обзорът завършва с анализ на фенотипния и геномен надзор на антимикробната резистентност, като се извеждат предимствата на последния, който позволява да се проучат геномните характеристики, обуславящи лекарствената резистентност в тяхната съвкупност, обозначени като резистом. Изводите от литературния обзор са конкретни и обосновават **целта и задачите** на научната разработка, а именно: проучване на геномните характеристики, обуславящи лекарствената резистентност (резистом) при ентеробактериални патогени, изолирани от онкологично болни за изясняване механизмите на резистентност, динамиката на предаване на детерминантите на антибиотичната резистентност и подобряване на терапията на инфекциите причинени от тях.

За осъществяване целта на проучването са поставени **4 задачи**:

1. Фенотипно характеризиране на клинични щамове *Enterobacterales*, изолирани през периода 2000-2024 година и селекция на множествено-резистентни щамове за генетични изследвания.

2. Доказване на генетични механизми на резистентност и геномен анализ на ентеробактериални патогени, продуциращи 16S рРНК метилтрансферази.

3. Доказване на генетични механизми на резистентност и геномен анализ на карбапенемаза-продуциращи ентеробактериални патогени.

4. Доказване на генетични механизми на резистентност и геномен анализ при colistin-резистентни, *mcr-1*-позитивни клинични щамове *Enterobacteriales*.

Оценка на раздел „Материали и методи”

В изпълнение на поставените задачи е използвана унифицирана методика, която се основава на фенотипното откриване на вродени механизми на резистентност и диференцирането на придобитите такива чрез системен фенотипен скрининг. Така селектираните множествено-резистентни ентеробактериални патогени впоследствие са характеризирани чрез PCR-базирани методи (multiplex PCR за детекция на: карбапенемази от клас А, В и D, *armA*, *rmtA-F* и *npmA* метилтрансферазни гени и *mcr* гени; Плазмидно репликоново типизиране; MLVA+ за типизиране на *K. pneumoniae*), конюгация и целогеномно секвениране (Illumina и Nanopore).

Оценка на раздел „Резултати и обсъждане”

Получените резултати и тяхното обсъждане следват стриктно поставените задачи.

В първи раздел са изследвани 14 254 ентеробактериални изолата (по един изолат от пациент) от хоспитализирани и амбулаторни пациенти в периода 2000-2024 г. с фенотипен дисков метод за определяне на фенотиповете на вродена и придобита резистентност. Установено е статистически значимо нарастване на фенотиповете на придобита β-лактамна резистентност и поява на нов фенотип „карбапенемаза”. Установено е също така възникването на „панаминогликозиден” резистентен фенотип и „colistin-резистентен” фенотип при бактериалните видове, които нямат вродена колистинова резистентност.

Във втория раздел, чрез специално създаден дисков тест за системен фенотипен скрининг на високо ниво на резистентност към аминокликозиди, са селектирани 195/12 048 (1.6%) случая с продуценти на 16S рРНК метилтрансферази за периода 2004-2024 г. Идентифицирани са *armA*, *rmtB* и *rmtF* гени, кодиращи 16S рРНК метилтрансферази при 13 бактериални вида (*K. pneumoniae*, *E. hormaechei*, *E. asburiae*, *P. mirabilis*, *S. marcescens*, *E. coli*, *C. freundii*, *C. portucalensis*, *K. oxytoca*, *K. michiganensis*, *M. morgani*, *K. aerogenes* и *P. stuartii*), като *rmtF* е идентифициран за първи път в страната. Установено е статистически

значимо нарастване на такива случаи с 9.99 средногодишно и пик през 2023 г. Те причиняват предимно уроинфекции (81%), а *Klebsiella pneumoniae* е най-честият метилтрансфераза-продуциращ патоген. Доказва се доминация на *armA* гена (83.1%), който е открит при всички бактериални видове, за разлика от *rmtB* – открит само при *E.coli* и *K. pneumoniae*, чиито щамове единствено кумулират и трите метилтрансферазни гена самостоятелно или в комбинацията *rmtB+rmtF*. Метилтрансферазните гени са открити в различни конюгативни плаزمиди (IncL/M, IncA/C, IncR, IncT, IncFIB и IncFII), което предполага множество източници на придобиване чрез хоризонтален трансфер на гените. *armA* генът е трансфериран съвместно с β -лактамазни гени (*bla*_{CTX-M-3/15}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM-1/4/86}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{CMY-4} *bla*_{OXA-1/10},) и гени за хинолонова резистентност (*aac(6')-Ib-cr*, *qnrB*, *qnrS*), докато *rmtF1* е трансфериран съвместно с *bla*_{SFO-1} ESBL, *bla*_{OXA-9} и *aac(6')-Ib*, което доказва мултирезистентния характер на тези плазмиди. Открита е нова асоциация от гени за резистентност, които кодират метилтрансферази, карбапенемази и други β -лактамази в изолати *K. pneumoniae* от секвенционен тип (ST) 6260, която включва *rmtB1* и *bla*_{NDM-5} в хромозомата, *bla*_{OXA-232} в конюгативния ColKP3 плазмид и *rmtF1* с *bla*_{SFO-1} и *bla*_{OXA-9} в конюгативните плазмиди IncFIB и IncFII.

В третия раздел, чрез системен фенотипен скрининг за продукцията на карбапенемази, са селектирани 184/10 275 (1.8%) случая с карбапенемаза-продуциращи *Enterobacterales* (CPE) за периода 2007-2024 г. Идентифицирани са гени, кодиращи KPC, OXA-28-like, VIM и NDM карбапенемази в 8 бактериални вида (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. marcescens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *P. mirabilis*, *E. hormaechei* и *P. stuartii*). Установено е статистически значимо нарастване на такива случаи със 17.35 средногодишно и пикове през 2018 г. и 2023 г. CPE причиняват предимно уроинфекции (72.8%), а *Klebsiella pneumoniae* е най-честият (70%) карбапенемаза-продуциращ патоген. Доказва се доминация на метало-карбапенемазите (90.5%), представени от NDM-1/5 и VIM-1/4/86. В седем случая (3.8%) се идентифицират едновременно NDM-5 и OXA-232. NDM-1 карбапенемазата е дисеминирана сред 6/8 бактериални вида, докато VIM-86 е доказана само при *P. stuartii*, а NDM-5 само при *K. pneumoniae* самостоятелно или в комбинация с OXA-232. Доказано е, че карбапенемазните гени са локализиращи, както в различни конюгативни плазмиди (IncL/M, IncA/C, IncT, IncX3, IncFII, IncFIB, IncR, IncX3, IncH), така и в хромозомата на изолати от определени бактериални видове (VIM-1 при *P. mirabilis*, VIM-4 при *S. marcescens*, NDM-5 при *K.*

pneumoniae). Установеното разнообразие на карбапенемазна генна локализация е доказателство, че разпространението на този тип резистентност се извършва клонално и чрез конюгативни плазмиди.

В четвъртия и последен раздел, чрез системен фенотипен скрининг за колистинова резистентност с помощта на селективна среда, са изследвани 2 669 щамове *E. coli*, изолирани през периода 2017-2024 г. от амбулаторни и хоспитализирани пациенти. Идентифициран е *mcr-1* гена в 3 (0.1%) от скринираните colistin-резистентни клинични щамове *E. coli* от урини на амбулаторни пациенти. В *E. coli* от секвенционен тип (ST) 2067 *mcr-1.1* гена е открит в конюгативен IncI2 плазмид, докато *mcr-1.32* е локализиран в хромозомата при останалите два изолата. Съществено е, че се открива хромозомен *mcr-1* ген във високорискови щамове *E. coli* ST131 при амбулаторни пациенти. Освен това е установено, че щамът с плазмидно кодиран *mcr* ген притежава мутации за резистентност към хинолони (*gyrA*^{D87N}, *gyrA*^{S83L}, *parC*^{S80I}), гени за резистентност към β-лактами (*bla*_{TEM-30}) и аминогликозиди (*aadA1*, *aac(3)-IId*).

Много удачно в заключителната част са на всеки раздел са предложени терапевтични схеми за лечение на базата на данните от геномния анализ.

Оценка на изводите и приносите на дисертационния труд

В дисертационния си труд проф Събчева е постигнала значителни оригинални и потвърдителни научно-теоретични и практически приноси, сред които бих открито следните:

1. За първи път в страната е направено дългосрочно системно проучване (2000-2024 г.) на механизмите на резистентност към β-лактами, аминогликозиди и полимиксини чрез фенотипни и молекулярно-генетични методи в клинично значими *Enterobacterales*, изолирани от онкологично болни.
2. Проведено е първото в страната геномно проучване върху панаминогликозидната резистентност, медирана от 16S рибозомни РНК метилтрансферази в изолати *Enterobacterales* от онкологично болни, изолирани последователно от 2004 до 2024 г.
3. Метилтрансферазните гени *armA*, *rmtB* и *rmtF* са открити в изолати от 13 бактериални вида (*K. pneumoniae*, *E. hormaechei*, *E. asburiae*, *P. mirabilis*, *S. marcescens*, *E. coli*, *C. freundii*,

C. portucalensis, *K. oxytoca*, *K. michiganensis*, *M. morgani*, *K. aerogenes* и *P. stuartii*), като *rmtF* е идентифициран за първи път в страната.

4. Доказано е, че метилтрансферазните гени са локализираны в конюгативни плазмиди от различни групи на несъвместимост (IncL/M, IncA/C, IncR, IncT, IncFIB и IncFII), които кодират резистентност и към β -лактамите, хинолоните, сулфонамиди, триметоприм и други антибиотици и са отговорни за дисеминацията на панаминогликозидната резистентност при онкологично болните.

5. Открита е нова асоциация от гени за резистентност, които кодират метилтрансферази, карбапенемази и други β -лактамази в изолати *K. pneumoniae* от секвенционен тип (ST) 6260, която включва *rmtB1* и *bla_{NDM-5}* в хромозомата, *bla_{OXA-232}* в конюгативния ColKP3 плазмид и *rmtF1* с *bla_{SFO-1}* и *bla_{OXA-9}* в конюгативните плазмиди IncFIB и IncFII.

6. Проведено е първото в страната геномно проучване върху карбапенемаза-продуциращи *Enterobacterales* от онкологично болни, изолирани последователно от 2007 г. до 2024 г.

7. Резистентността към карбапеними в изолати от 8 бактериални вида (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. marcescens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *P. mirabilis*, *E. hormaechei* и *P. stuartii*) е свързана с *bla_{KPC-2/3}*, *bla_{OXA-48/232}*, *bla_{VIM-1/4/86}* и *bla_{NDM-1/5}* гени.

8. Доказано е, че карбапенемазните гени са локализираны, както в различни конюгативни плазмиди (IncL/M, IncA/C, IncT, IncX3, IncFII, IncFIB, IncR, IncX3, IncH), така и в хромозомата на изолати от определени бактериални видове (VIM-1 при *P. mirabilis*, VIM-4 при *S. marcescens*, NDM-5 при *K. pneumoniae*), което предполага клонално дисеминиране в допълнение към конюгативния пренос на гените.

9. Създаден е културелен метод със 100% чувствителност и специфичност за скрининг на резистентни към colistin изолати, напълно приложим в рутинната практика.

10. Характеризирани са първите *mcr*-позитивни изолати *E. coli* от човешки произход в България.

11. Разработени са терапевтични схеми за лечение карбапенемаза-продуциращи *Enterobacterales*, обосновани с данните от геномния анализ.

Публикации, свързани с дисертационния труд

Резултатите от дисертационния труд на проф. Събчева са отразени в 31 публикации и една глава в монография, 21 от които са в списания с Impact Factor. Общият им IF е изключително висок - 135.695 (Справка IF №РТ159/13.03.2025г. от ЦМБ). Публикациите, свързани с дисертационния труд имат 228 цитирания в Web of Science (Цитатна справка №РТ158/13.03.2025 г. ЦМБ). Приложена е справка с 30 конгресни участия, от които 6 в чужбина.

Заклучение:

Дисертационният труд на проф. д-р Стефана Събчева е изключително едромасщабен и новаторски. Прави впечатление с получения огромен обем значими резултати, голяма част от които за първи път в страната. Дисертационният труд се отличава със своята задълбоченост, прецизно изпълнение и анализ, с прилагане на модерни молекулярно-генетични методи за доказване гени на резистентност, както и с широкото прилагане на целогеномно секвениране за резистомен анализ. Получени са много съществени резултати, направени са брилянтни анализи за един критично важен и недостатъчно проучен проблем, какъвто са изключително проблемните за лечение инфекции, причинени от високо резистентните енторабактерии при онкологично болни пациенти.

Считам, че рецензираният дисертационен труд не само напълно отговаря, но и значително надхвърля изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Р. България и Правилника за неговото приложение.

Като давам категоричната си положителна оценка, убедено предлагам на членовете на научното жури да присъдят на проф. д-р Стефана Донева Събчева, дм научната степен „Доктор на науките”.

Рецензент:



(Проф. д-р И. Христова, дмн)