

ДО
ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА НАУЧНОТО ЖУРИ,
НАЗНАЧЕНО СЪС ЗАПОВЕД № Р-109-388/28.08.2023
НА РЕКТОРА НА МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ”- ВАРНА

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Стефана Донева Събчева, дм,
ръководител на Лаборатория по микробиология в
Университетска специализирана болница за активно лечение по онкология
„Проф. Иван Черноемски” ЕАД, гр. София

на дисертационен труд за придобиване на научната степен „доктор на науките” в
областта на висшето образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално
направление 7.1. Медицина и научна специалност „Микробиология”

**на тема: „Антибиотична резистентност на
най-честите причинители на бактериемии и леталитет, свързан с тях”**

от проф. д-р Теменуга Жекова Стоева, дм

Декларирам, че нямам общи научни трудове с автора на дисертацията.

След завършване с отличен успех на медицинското си образование в Медицински университет - Варна през 1994 г., проф. Теменуга Стоева започва успешното си развитие като учен и всеопаден преподавател по микробиология в Медицинския университет и университетската болница „Света Марина”. През 2003 г. постъпва като асистент, през 2006 г. придобива медицинска специалност по микробиология, а през 2009 г. защитава дисертационен труд на тема „Микробиологични и молекулярно-генетични изследвания върху епидемиологията и резистентността към антимикробни средства в клинични изолати *Acinetobacter baumannii*” и получава научната и образователна степен „доктор” по научната специалност „Микробиология”. След спечелени конкурси, през 2012 г. е назначена

на академичната длъжност „доцент“ и през 2018 г. – на академичната длъжност „професор“ по научната специалност „Микробиология“ в МУ - Варна. От 2014 г. е ръководител на Лабораторията по микробиология на УМБАЛ „Св. Марина“, а от 2016 г. оглавява и катедра „Микробиология и вирусология“ на МУ - Варна. Умелото съчетаване на ежедневната лечебно-диагностична и научно-преподавателска дейност обуславя спецификата на научните интереси на проф. Стоева, насочени към значими за лекуваните от нея болни области на медицината – инфекции, свързани с медицинското обслужване, инфекции в имунокомпрометирани/трансплантирани пациенти и механизми на резистентност към антимикробни лекарствени средства в клинично значими бактериални видове.

Актуалност на дисертационния труд

Настоящият дисертационен труд е посветен на инфекциите на кръвта – водеща причина за заболяемост и смъртност, особено при имунокомпрометирани пациенти, на най-честите причинители на бактериемии и антибиотичната им резистентност. Медицинският напредък и възможностите за лечение на редица заболявания, съпътствани от непрекъснато нарастване на имунокомпрометираните пациенти, от една страна, и нарастващата антибиотична резистентност на причинителите на бактериемии на фона на единични нови антибиотици, от друга, определят изключителната актуалност на представения за рецензиране дисертационен труд.

Структура на дисертационния труд

Дисертацията е написана на 296 страници и е структурирана по общоприетата схема със съразмерно разпределение на текста в отделните раздели, както следва: въведение – 3 стр., литературен обзор – 73 стр., цел и задачи – 1 стр., материали и методи – 16 стр., резултати и обсъждане – 124 стр., изводи – 5 стр., приноси – 2 стр., и литература – 49 стр. Към дисертационния труд е приложен и списък с публикации и съобщения във връзка с дисертацията. Изложението е оптимално илюстрирано с 73 прецизно изработени нагледни материали (27 фигури и 46 таблици). В дисертацията са цитирани 655 литературни източници: 5 са на кирилица и 650 – на латиница, повечето от последните 10 години – доказателство за актуалността на разработвания дисертационен труд.

Въведението обосновава актуалността на проучванията върху инфекциите на кръвта, причинени от резистентни микроорганизми. Подчертано е значението на болничния надзор и анализ на етиологичния спектър и антибиотичната чувствителност на патогените, рисковите фактори и леталитета, който ги съпътства, за създаването на лечебни алгоритми и програми за профилактика и контрол на локално ниво, както и приноса на получените данни за създаването на политики, насочени към ограничение и контрол на антибиотична резистентност на национално и световно ниво.

Оценка на литературния обзор

Литературният обзор е построен логично и разглежда всички аспекти на инфекциите на кръвта. В детайли са дефинирани понятията бактериемия и инфекции на кръвта. Подробно са описани съвременната класификация и епидемиология на инфекциите на кръвта, както и етиологията на бактериалните инфекции с акцент върху онкохематологични пациенти с фебрилна неутропения поради високия леталитет при тях. Специално място в обзора заема съвременната микробиологична диагностика на инфекциите на кръвта. Направен е критичен анализ на съвременното състояние на антибиотичната резистентност сред основните бактериални причинители на инфекции на кръвта и генетичните механизми, които я обуславят.

В заключението на обзора е разгледана ситуацията в България и тъй като у нас не са провеждани комплексни болнични проучвания при инфекциите на кръвта, включващи микробиологията, епидемиологията, рисковите фактори и леталитета, предвид високата смъртност при трансплантирани и онкохематологични пациенти логично се извежда необходимостта от извършване на системно проучване върху антибиотична резистентност на най-честите причинители на бактериемии и леталитет, свързан с тях.

Цел и задачи

Систематично и задълбочено авторът подхожда към набелязаните задачи в съответствие с целта на дисертационния труд: да се извърши микробиологично и епидемиологично проучване върху антибиотичната резистентност на най-честите причинители на бактериемии за 10-годишен период и на леталитета, свързан с тях.

За осъществяване целта на проучването са поставени 5 задачи, които определят последователността на планираните изследвания, а именно: (1) да се анализира етиологичният спектър на лабораторно потвърдените бактериални инфекции на кръвта, доказани при хоспитализирани пациенти в УМБАЛ “Света Марина“ за 10-годишен период (2011-2020), както и антибиотичната резистентност на най-честите причинители на бактериемии; (2) да се проучат генетичните механизми на резистентност към цефалоспорины от трета генерация и карбапенеми в репрезентативни карбапенем-резистентни *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* complex и *Acinetobacter baumannii* изолати от кръв и да се извърши епидемиологично типизиране; (3) да се определи и анализира етиологичният спектър на лабораторно потвърдените бактериалните инфекции на кръвта, доказани при хоспитализирани пациенти с онкохематологични заболявания в периода 2010-2020 г. и да се проучи резистентността към антимикробни лекарствени средства на най-честите причинители на бактериемии, асоцииращи се с тези инфекции, като се оцени и трендът в развитие на резистентността във времето; (4) за всички болнично лекувани пациенти с инфекции на кръвта, причинени от седем бактериални вида в периода 2016-2020 г. (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* complex, *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex, *P. aeruginosa*), да се извлече, обобщи и асоциира информация, свързана с 27 променливи; (5) да се изчисли показателят „30-дневен леталитет“ (общ и специфичен - по възрастови групи, пол, вид на клиниката, място на придобиване, микробен вид, комбинация „микроорганизъм/антибиотик“) в групата на всички болнично лекувани пациенти с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта, причинени от 7-те бактериални вида в периода 2016 – 2020 г., както и да се идентифицират рисковите факторите, които влияят върху 30-дневния леталитет.

Оценка на раздела „Материали и методи“

За провеждане на изследванията са използвани голям набор класически микробиологични и съвременни молекулярно-генетични методи за фенотипно и генетично характеризиране на неповтарящи се микробни изолата, получени от кръв при септични епизоди. Използваните методи са високоинформативни и подходящи за решаване на поставените задачи.

Оценка на раздела „Резултати и обсъждане“

Извършена е значителна по обем и разнообразна по характер изследователска работа. В съответствие с дизайна на ретроспективното клинично-микробиологично и епидемиологично проучване са представени и анализирани резултатите от изследваните пациенти и техните кръвни изолати за 10-годишен период. Получените резултати и тяхното обсъждане следват стриктно поставените задачи, както следва:

1) През периода 2011-2020 г. относителният дял на положителните хемокултури е 16%, като този на клинично значимите хемокултури е 9.9%. Етиологичният спектър на лабораторно потвърдените бактериални инфекции на кръвта в неселектираната популация от пациенти се доминира от Грам отрицателните бактерии (58.9%), но се доказва статистически значим тренд за увеличаване в годините на дела на Грам положителните бактерии и намаляване този на Грам отрицателните бактерии и гъбичките. Най-често изолираният бактериален вид от хемокултури за целия период е *S. aureus* (17.2%), следван от *E. coli* (14.6%), *K. pneumoniae* (12.0%), *E. cloacae* complex (8.0%), *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex (6.3%) и *E. faecalis* (6.3%). Делът на ESKAPEЕс патогените в етиологичния спектър е много висок, като достига 66.8%, а този на мониторираните от EARS-Net бактериални видове - 64.7%. В хода на 10-годишното проследяване се доказва статистически значим тренд за увеличаване относителния дял на *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus viridans* изолатите и намаляване дела на *Klebsiella pneumoniae*. Относителният дял на резистентните към цефалоспорины трета генерация и флуорохинолони *E. coli* от кръв е висок (над 25%), но без сигнификантен тренд за увеличаване или намаляване в годините. Активността на аминопеницилините спрямо *E. coli* е силно редуцирана, като резистентността към тази антибиотична група е най-висока (63.2%). Карбапенемите и amikacin са със съхранена активност спрямо *E. coli* (резистентност <1% и <5% съответно), което ги прави подходящ избор за емпирична терапия в случаите на инфекции на кръвта, асоциирани с този бактериален вид. Доказва се много високо ниво на резистентност към цефалоспорины от трета генерация сред изолатите *Klebsiella pneumoniae* (74.9%), значително надвишавайки дела на резистентните към същата

антибиотична група *E. coli* и по-високо от това сред *Enterobacter* spp. Цефалоспориините от трета генерация са групата с най-силно редуцирана активност спрямо *K. pneumoniae*. Много високи нива на резистентност (над 50%) се отчитат също към флуорохинолони и gentamicin, макар за последния да се установява статистически значим тренд за намаляване на резистентността от 73% през 2011 г. до 40.9% през 2020 г. Карбапенемите и amikacin са антимикробните препарати с най-висока активност спрямо *K. pneumoniae* (11.8% и 13.9% резистентност съответно). За 10-годишния период на проучването най-динамични и драматични промени се доказват по отношение резистентността към карбапенемни антибиотици, която от 0% през 2011 г. достига 32.7% през 2014 г. и 18.2% и 13.6% през 2019 г. и 2020 г. В групата на карбапенем-резистентните *K. pneumoniae*, colistin и amikacin демонстрират най-добра in vitro активност (6% и 17.9% резистентност), което ги прави препарати на избор за лечение в случай на инфекция, причинена от карбапенем-резистентни изолати.

2) Сред проучените механизми на резистентност *bla*_{CTX-M-15} се идентифицира като главен механизъм на резистентност към цефалоспориини от трета генерация в карбапенем-резистентни изолати *K. pneumoniae* от кръв, а *bla*_{KPC-2} и в много по-малка степен *bla*_{NDM-1} медираат ензимния механизъм на карбапенемна резистентност в тези изолати. Карбапенем-резистентните *K. pneumoniae* се асоциират с 5 различни ST типа: ST15, ST76, ST151 и ST1350 за KPC-2 продуцентите и ST11 - за NDM-1 продуциращите изолати. Доказва се широка вътреболнична дисеминация на KPC-2 и/или CTX-M-15 продуциращи ST15 *K. pneumoniae*. Този клон персистира няколко години, демонстрирайки висок крос-трансмисивен, епидемичен и инвазивен потенциал. В допълнение към ST15 резистентността към цефалоспориини от трета генерация и карбапенеми се асоциира с вътреболнична дисеминация и на други ST типове, съществуващи едновременно с доминиращия ST15. В този смисъл, въпреки че клоналното разпространение на ST15 допринася значително за дисеминирането на карбапенем-резистентни *K. pneumoniae*, не-ST15 щамове също се появяват и имат принос. Доказва се много висок относителен дял на изолатите *Enterobacter* spp. от кръв, резистентни към цефалоспориини от трета генерация (над 65%), както и високи нива на

резистентност към флуорохинолони и gentamicin (над 45%). Делът на amikacin- и карбапенем-резистентните *Enterobacter* spp. остава много нисък, което прави тези антимикробни средства подходящ избор за лечение на инвазивни инфекции, причинени от *Enterobacter* spp. NDM-1 метало-карбапенемаза е механизмът, медиращ резистентността към карбапеними в единствения карбапенем-резистентен изолат *Enterobacter* spp. (*E. asburiae*) за този период. В групата на кръвните изолати *Pseudomonas aeruginosa* се доказва резистентност над 20% към всички антипсевдомонадни групи препарати, като най-силно е редуцирана активността на флуорохинолоните (40%). Не се установяват статистически значими тенденции към понижаване или повишаване на резистентността в различните години за нито една от изследваните групи антимикробни препарати. Карбапенемите и amikacin са най-активните агенти сред проучваните антипсевдомонадни средства, макар резистентността да е в диапазона 20-30%, което предполага внимателно приложение на тези антибиотици в случаите, в които се подозира *P. aeruginosa* асоциирана инфекция. В целия 10-годишен период на проучването кръвните изолати *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex трайно демонстрират много високи нива на резистентност спрямо всички изпитвани антимикробни средства (над 60%) с изключение на colistin. В сравнение с всички други Грам отрицателни бактериални видове делът на карбапенем-резистентните *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex е най-висок (68.4%), като 60% от изолатите са с фенотип на XDR. Резистентността към карбапеними се асоциира с присъствието на *bla*_{OXA-24/40-like} и/или *bla*_{OXA-23-like} гени в асоциация с *ISAbal*. Високият относителен дял на карбапенем-резистентни изолати *A. baumannii* се свързва с вътреболнична дисеминация и трайно присъствие на няколко OXA-продуциращи MDR клона *A. baumannii* с характеристика на ендемични. В периода 2011-2020 г. е установено относително ниско ниво на MRSA инвазивни изолати, като през 2020 г. делът им е по-нисък от средния за Европа и много близък до средния за България. С изключение на макролидите всички останали антибиотични групи запазват добра активност, с дял на нечувствителните изолати под 20%. Установява се сигнификантен тренд за увеличаване дела на vancomycin-резистентните *Enterococcus faecium* от кръв – от 0% в периода 2011-2018г. до 11.1% през 2019 г. и

18.2% през 2020 г. Изолатите *E. faecium* демонстрират много високо ниво на резистентност към аминопеницилини (95.3%), флуорохинолони (84.7%) и HLAR (90.3%). За разлика от *E. faecium* дялът на ampicillin-резистентните *E. faecalis* остава нисък (9.4%), което прави групата на аминопеницилините подходящ избор за терапия на *E. faecalis* асоциираните инфекции. Активността на флуорохинолоните за същия период сред *E. faecalis* е значително редуцирана (над 35%) при висок дял на HLAR (над 45%). Въпреки сигнификантния тренд за увеличаване на резистентността към vancomycin гликопептидите и linezolid все още са антибиотиците с най-добра активност спрямо изолати *Enterococcus* spp.

3) В периода 2010-2020 г. в етиологичния спектър на бактериемииите, асоциирани с инфекции на кръвта в пациенти с онкохематологични заболявания, преобладават Грам отрицателните над Грам положителните бактерии (54.3% срещу 38.0%), като най-честите бактериални патогени са *S. aureus* (17.3%), *E. coli* (16.0%), *Enterobacter* spp. (10.9%), *Klebsiella* spp. (10.3%) и *Enterococcus* spp. (8.8%). Доказва се статистически значим тренд за намаляване относителния дял на *S. aureus* и увеличаване този на коагулаза-негативните стафилококи в етиологичния спектър на инфекциите на кръвта в тази група пациенти. Проучването, извършено в групата на пациентите с онкохематологични заболявания, демонстрира възникването и персистирането в годините на проблемни за лечение MDR микроорганизми, предимно Грам отрицателни бактерии, асоцииращи се с инфекции на кръвта в тази популация от пациенти, феномен, който е отражение на увеличаващата се антибиотична резистентност в обществото и следва тренда в неселектираната популация болнични пациенти с инфекции на кръвта. Установява се персистираща във времето тенденция за високо ниво на резистентност към трета генерация цефалоспорини сред представителите на семейство *Enterobacteriaceae* (49.4%) и появата след 2014 г. на инвазивни карбапенем-резистентни изолати от същото семейство, като най-засегнатият вид по отношение и на двата типа резистентност е *K. pneumoniae* (57.8% и 6.7% съответно). Доказва се статистически значим тренд за увеличаване резистентността към трета генерация цефалоспорини, аминогликозиди и флуорохинолони в групата на изолатите от вида *Enterobacter cloacae* complex; персистиране на висок относителен дял на карбапенем-резистентни *A. baumannii* -

calcoaceticus complex на фона на статистически значим тренд за увеличаване на тази резистентност, както и увеличаване дела на MDR *Enterococcus faecium*. Подобно на общата популация пациенти, положителен резултат е установеният нисък относителен дял на MRSA кръвни изолати. В периода на проучването не са идентифицирани изолати *Staphylococcus* spp. и *Enterococcus* spp., резистентни на гликопептидни антибиотици и оксазолидинони, което прави тези антибиотици препарати на избор, предпочитани за начално лечение в случаите на съмнение за стафилококова или ентерококова инфекция на кръвта или фебрилна неутропения до поставяне на етиологичната диагноза.

4) Показателите „възраст“, „вид на клиника“, „предшестваща хоспитализация“, „вид на провеждана терапия (ICU и/или хирургическо лечение)“, „бактериален вид“ и „инфекциозен синдром“ са идентифицирани като независими фактори, които влияят съществено на прогнозата за преживяемост до 30 дена (предсказващи фактори за смърт). Групирани според бактериалния вид в случаите на *E. coli* инфекции, факторите „резистентност към цефалоспорини от трета генерация“, „предхождаща хоспитализация“, „хирургично/ICU лечение“ са значимо свързани с риска за умиране, а при *S. aureus* инфекциите - такива са „възраст“ и „хирургическо/ICU лечение“. За *P. aeruginosa* и *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex инфекциите, статистически значим предиктивен фактор за смърт е променливата „хирургическо лечение“, а в случаите на инфекции на кръвта, причинени от *K. pneumoniae* - „хирургическо/ICU лечение“.

5) Установен е висок 30-дневен леталитет (26%) в групата на проучваните 798 пациенти с инфекции на кръвта, причинени от *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex и *P. aeruginosa*, като този показател е по-висок в случаите на вътреболнични инфекции, в сравнение с тези, придобити в обществото (31.3% срещу 20.8%). С изключение на възрастта всички останали демографските показатели не се доказват като значими рискови фактори за леталитет в проучваната група пациенти. Най-висок 30-дневен леталитет се доказва в интензивните структури на болницата (35.8%), следвани от хематологичните клиники (27.3%). *E. coli* (23.6%), *S. aureus* (20.7%) и *K. pneumoniae* (19.2%) се асоциират с най-голям брой смъртни случаи. При сравнение

между бактериалните видове най-висок 30-дневен леталитет се доказва при инфекциите, причинени от *A. baumannii - calcoaceticus complex* (53.6%). При оценка на 30-дневния леталитет спрямо комбинацията „бактериален вид/антибиотик“, аминогликозид, хинолон и meropenem-резистентните *A. baumannii - calcoaceticus complex* (15.9-16.3%) се асоциират с най-голям брой смъртни случаи, следвани от ampicillin-резистентните *E. coli* (15.9%) и резистентните на цефалоспорины трета генерация *K. pneumoniae* (14.9%).

Оценка на научните приноси

В дисертационния труд проф. Стоева е постигнала значителни оригинални и потвърдителни приноси с научен и научноприложен характер.

Сред приносите с оригинален характер се открояват следните: (1) Извършен е анализ на етиологичния спектър на бактериемииите и антибиотичната резистентност на ESKAPEЕс патогените, свързани с тях в неселектирана група хоспитализирани пациенти с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта за една декада, като са оценени трендовете във времето и са сравнени с европейските и световни тенденции. (2) Извършен е детайлен анализ на етиологичния спектър на бактериемииите и антибиотичната резистентност на ESKAPEЕс патогените, свързани с тях в групата на онкохематологични пациенти с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта за 11-годишен период и са оценени трендовете във времето. Получените резултати са основа, върху която да се дефинират препоръките за емпирично антибиотично лечение в случаите на фебрилна неутропения или при съмнение за инфекциозни усложнения в тази група имунокомпрометирани пациенти. (3) Проучен е 30-дневния леталитет (общ и специфичен) и рисковите фактори за фатален изход при инфекции на кръвта, причинени от 7 бактериални вида (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae complex*, *A. baumannii - calcoaceticus complex* и *P. aeruginosa*) сред 798 хоспитализирани пациенти за 5-годишен период и е демонстриран сериозният товар, с който тези заболявания се асоциират. (4) Извършеното проучване разширява наличните данни и научна информация за антибиотичната резистентност сред водещи причинители на инфекции на кръвта и товара на тези инфекции за България и може да послужи като основа при създаването на

политики, насочени към ограничение и контрол на проблема на локално и национално ниво. (5) Извършеното проучване доведе до генериране на висококачествени и сравними данни и тяхното интегриране в много широка международна база данни, чиято цел е оценка на товара на антибиотичната резистентност при различни инфекции, вкл. инфекции на кръвта.

Приносите с потвърдителен характер се отличават с ясно изразена концентрация върху проблемите на клиничната микробиология. Проучени са генетичните механизми на карбапенемната резистентност сред основните патогени (*K. pneumoniae*, *A. baumannii*), асоцииращи се с клинично значими бактериемии, като е доказана тяхната широка вътреболнична дисеминация и асоциация с определени секвенциални типове и международни клонове.

Сред приносите с научноприложен характер с голяма клинична значимост са изводите от подробното проучването на факторите „Антибиотична резистентност“ и „Леталитет“, съпътстващи инфекциите на кръвта при хоспитализирани пациенти, особено при имунокомпрометирани. Получените резултати ясно показват необходимостта от въвеждане на съвременни лабораторни методи за експресна микробна идентификация и определяне на чувствителност към антимикробни лекарствени средства при животозастрашаващите инфекции на кръвта.

Публикации, свързани с дисертационния труд

Резултатите от обемната изследователска работа на проф. Теменуга Стоева са отразени в 18 публикации, в 11 от които тя е първи или втори автор – доказателство за водещ принос в изработването на публикацията. Дисертантът има и 6 конгресни участия, от които 2 са в чужбина. Трябва да се отбележи, че резултатите от изследванията на проф. Стоева са публикувани в престижни списания с общ Impact Factor 287.926. Като цяло тези наукометрични показатели представят дисертанта като изграден и уважаван учен със съществен принос за развитието на клиничната микробиология и познанията в областта на инфекциите, свързани с медицинското обслужване, инфекциите при имунокомпрометирани пациенти и механизмите на резистентност към антимикробни лекарствени средства в клинично значими бактериални видове.

Заклучение

Представеният дисертационен труд е по изключително важен за медицинската наука и практика проблем със съществени научни и научно-приложни приноси, свързани с всички клинични и микробиологични аспекти на бактериемииите при хоспитализирани пациенти. Дисертацията многократно надхвърля изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и Правилника на МУ - Варна. Това ми дава основание убедено да подкрепя присъждането на научната степен „доктор на науките” по научната специалност 01.06.12 - Микробиология на проф. д-р Теменуга Жекова Стоева, дм.

Рецензент:



/Проф. д-р Стефана Събчева, дм/

16.10.2023 г.

гр. София