

До Председателя на Научното жури
за защита на дисертационен труд за придобиване на
научната степен „Доктор на науките”
по научната специалност 01.06.12 „Микробиология”
за Катедра Микробиология и вирусология,
Медицински университет - Варна

Рецензия

От проф. Д-р Людмила Боянова Георгиева, дм, дмн

**Професор в Катедра медицинска микробиология
на Медицински университет-София**

Тел. 08877 39 086; e-mail l.boyanova@hotmail.com

Научна специалност – микробиология

Член на научното жури

със заповед на Ректора на МУ – Варна с № Р-109-388/28.08.2023г.

Относно

по процедура за защита на дисертационен труд на тема:

**АНТИБИОТИЧНА РЕЗИСТЕНТНОСТ НА
НАЙ-ЧЕСТИТЕ ПРИЧИНИТЕЛИ НА БАКТЕРИЕМИИ И ЛЕТАЛИТЕТ,
СВЪРЗАН С ТЯХ**

на

проф. д-р Теменуга Жекова Стоева, дм

Катедра “Микробиология и вирусология“,

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ

„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” - ВАРНА

за присъждане на научна степен «Доктор на науките»

Кратки биографични данни за докторанта

Проф. д-р Теменуга Жекова Стоева завършва езикова гимназия с английски език през 1988 г. и медицина в Медицински Университет, гр. Варна през 1994 г. Тя придобива специалност по Микробиология през 2006 г. От 2004 г. работи в УМБАЛ "Света Марина" като израства прогресивно от асистент до доцент през 2012 г. и професор от 2018 г. Специализирала е в Института по медицинска микробиология, имунология и хигиена в Кьолн, Германия и в Атина, Гърция. Дисертацията ѝ за придобиване на ОНС „доктор“ е защитена на тема „Микробиологични и молекулярно-генетични изследвания върху епидемиологията и резистентността към антимикробни средства в клинични изолати *Acinetobacter baumannii*“.

Понастоящем е Ръководител катедра "Микробиология и вирусология" в МУ-Варна. Тя има много голям брой отговорности както професионални и организационни, така и учебно-методични. Проф. Стоева е също така член на Експертния съвет по медицинската специалност "Клинична микробиология" със заповед на Министерството на здравеопазването.

Раздели на дисертационния труд

Дисертационният труд е 296 стр., от които 234 страници текст. Работата е много добре и най-подробно онагледена с 36 таблици, 27 фигури, и приложение от 10 таблици. Разделите включват: заглавна страница, съдържание и съкращения- 5 стр., 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 на дисертационния труд 2 стр., научни публикации и участия във връзка с дисертационния труд 4 стр., използвана литература 49 стр., приложения 13 стр. и благодарности 1 стр.

Актуалност на разработвания проблем

Клинично значимата бактериемията (наричана също бактеремия според термина на английски), или наличието на бактерии в кръвта и клинични симптоми, които могат да доведат до сепсис и септичен шок, е спешно състояние застрашаващо живота на пациентите. Леталитетът при тези инфекции е тревожно висок, средно между 14% и 37%) и е най-висок сред пациенти в отделения за интензивно лечение. Микроорганизмите причинители на инфекциите на кръвта са още по-сериозен проблем поради наличието на честа и нарастваща антибиотична резистентност и множествена резистентност на причинителите.

Дисертационният труд на проф. Стоева е посветен на тези проблеми с голямо диагностично, клинично и терапевтично значение и един от приоритетите в инфекциозната патология. Проф. Стоева задълбочено обхваща честотата и характеристиката на клинично значимите бактериемии в в УМБАЛ "Света Марина" за продължителния период от 10 години (от 2011 до 2020 г.), определя групите пациенти с най-висок риск от леталитет, както спектъра, така и динамиката на честотата на причинителите и тяхната фенотипна и генотипна характеристика и антибиотична резистентност. Тя също посочва необходимостта от по-широкото въвеждане и предимствата на по-новите бързи и акуратни методи

за идентификация и определяне на бактериалната чувствителност към антибиотици в диагностичната работа в микробиологичните лаборатории.

Литературна осведоменост по проблема

В литературния обзор от 73 стр., проф. Стоева се спира подробно на всички свързани с темата на изследването въпроси, вкл. от дефинициите на видовете бактериемии, критериите за лабораторно потвърдените инфекции, сравнение на тяхната честота, леталитет и еволюция през годините в различни държави до спектъра на причинителите на инфекциите. Тя дискутира най-важните рискови фактори за клинично значимите бактериемии, превалирането на отделните бактериални причинители в различни региони на света и в нашата страна.

Подробно са разгледани класическите и най-съвременни методи за микробиологична диагностика на инфекциите на кръвта, вкл. автоматизираните системи за хемокултури, предимствата на MALDI TOF MS, MALDI Sepsityper и молекулярни методи като Флуоресцентна *in situ* хибридизация с използване на проби от пептидни нуклеинови киселини (PNA FISH), PCR и Multiplex PCR и ДНК секвениране за ускоряване на идентификацията и/или тестването на бактериалната чувствителност директно с кръвта. Разгледани са честотите, механизмите и еволюцията на резистентността на най-честите причинители на инфекциите. Много от цитираните публикации са от последните 5 години, вкл. до 2022 и 2023 г., което показва тяхната актуалност.

Накратко казано, обзорът е детайлно разработен и аналитично и същевременно критично разглежда съвременното състояние на проблемите. Той показва разбиране и познаване на най-важната и актуална литература по темата на дисертацията. Затова считам, че заслужава да бъде публикуван и като отделна монография.

Цел и задачи

Цел на дисертацията е микробиологичното и епидемиологично изследване на клинично значимите бактериемии и леталитета при тях, вкл. в най-рисковите групи пациенти, както и определяне на честотата и резистентността на най-честите причинители в рамките на период от 10 години.

За тази цел, дисертантът си поставя пет отговарящи на целта задачи, свързани с дефинирани критерии и множество (общо 27 на брой) показатели. Като пример мога да дам определянето на 30-дневния леталитет на пациентите с инфекции на кръвта със шест критерии, или комбинации. Проличава стремеж за най-комплексно и подробно обхващане на поставените цел и задачи, който е отразен и от използваните методи, резултати, тяхното обсъждане и изводите.

Оценка на използваните материали и методи на изследване

Едно от достоинства на дисертационния труд е обхващането на много продължителен период от време (10 години) и огромен брой пациенти (15 602), което реално охарактеризира динамиката и сегашното състояние на клинично значимите бактериемии у нас. Изследвани са впечатляващо голям брой (3954) хемокултури на болни с онкохематологични заболявания и са изолирани и

проучени 457 клинично значими изолати от пробите на 442 от болните в тази група.

Проф. Стоева използва голям брой методи за постигане на целта и задачите на дисертационния труд. Ще изброя някои от тях, защото те обуславят пълнотата и достоверността на получените резултати:

- автоматизираната ВАСТЕС система за инкубиране и постоянно мониториране на хемокултурите,
- методи за идентификация, вкл. класически биохимични тестове, Crystal и автоматизираната система за идентификация и тестване на чувствителност Phoenix, както и молекулярно-генетични тестове като PCR за *gyrB* за *A. baumannii* и *hps60* секвениране за *E. cloacae* complex,
- методите за тестване на чувствителността, също така както класически напр. дисково-дифузионния метод, така и най-съвременни като автоматизираната система Phoenix,
- молекулярни методи (PCR и ДНК секвениране) за гени за широкоспектърни бета-лактамази (ESBL) и карбапенемази,
- методи за епидемиологично типизиране като Ентеробактериална повтаряща се междугенна консенсусна полимеразна верижна реакция (ERIC-PCR), Случайна амплифицирана полиморфна ДНК (RAPD), PCR с повтарящи се елементи (Rep-PCR) и Типизиране на многолокусни последователности (MLST).
- За статистическа обработка на резултатите е използвана съвременната програма IBM SPSS версия 21.0.

Накратко казано, изследователската работа на проф. Стоева е с много голям обем и е подкрепена с многостранни методи, което показва нейната голяма професионална компетентност.

Резултати и обсъждане

Резултатите са представени ясно, с използване на подходящи контроли и анализирани чрез статистически методи. Всички получени резултати са обсъдени много подробно в сравнение с изследванията в други страни, включително с данните на Европейската мрежа за наблюдение на антимикробната резистентност (EARS Net).

Определена е честотата (9.9%) на клинично значимите хемокултури за десет годишния период на проучването при стриктно придържане към критериите, посочени в секцията Материали и Методи. Намерена е висока честота (66.8%) на т. нар. ESKAPEEs причинителите, вкл. *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. и *Escherichia coli*.

Определена е смъртността в различни групи пациенти и съответно на вида на причинителя. Най-висок леталитет е намерен при инфекциите на кръвта причинени от *E. coli* (23.6%), *S. aureus* (20.7%) и *K. pneumoniae* (19.2%). Намерен е високият 30-дневен леталитет (26%) в групата пациенти, причинени от повечето патогенни и/или резистентни към антибиотици причинители. Този показател достига до тревожните 53.6% при инфекции от *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex.

Установени са генетичните механизми на антибиотична резистентност към 3та генерация цефалоспорини и карбапенеми в карбапенем-резистентни изолати. Определено е клонално разпространение и персистенция на ST15 като фактор за разпространението на карбапенем-резистентни *K. pneumoniae*.

На базата на резултатите са предложени насоки за оптимизиране на диагностиката на инфекциите на кръвта, описани по-долу.

Оценка на научните и научно-приложните приноси

Ще се спра на приносите на дисертацията, които ми направиха най-силно впечатление:

- В нашата страна, това е първото дългосрочно и мащабно изследване на характеристиките и честотата на инфекциозните агенти в кръвта, свързаната с тях смъртност като цяло и в отделните рискови групи пациенти, както и бактериалната резистентност към антибиотици и еволюцията на гореспоменатите показатели във времето.
- Тревожно е увеличението 2.5 пъти на показателя „BCR - Blood Culture Rate” от 2011г. до 2020 г., което съответства на кумулативната заболяемост от инфекции на кръвта. Това показва необходимостта от по-ранно и по-често вземане на кръв за хемокултура при пациенти с риск от инфекция на кръвта, особено при имunosупресирани.
- Проучени са рисковите фактори за 30-дневния леталитет на пациентите според възрастта, клиниката, предишното хоспитализиране, терапията в интензивните или хирургичните отделения и вида на бактериите. Възрастта на пациентите е установеният сигнификантен рисков фактор за леталитета. Други рискови фактори за смъртен изход за отделни видове причинители са резистентността към цефалоспорини от трета генерация, предишна хоспитализация и лечение в хирургично или интензивно отделение лечение.
- С научно-практическо значение са изводите за антибиотиците подходящи за начална емпирична терапия на инфекциите на кръвта. Определени са антибиотиците с най-голяма активност към *E. coli*, *Enterobacter spp.* и *K. pneumoniae* (карбапенемите и amikacin), към карбапенем-резистентните *K. pneumoniae* (colistin и amikacin), към ентерококите (гликопептидите и linezolid), въпреки тенденцията на нарастване на vancomycin-резистентните изолати и към други причинители на бактериемия. Тези резултати са важни за избягване на забавеното или неподходящо антибиотично лечение и от друга страна за оптимизиране на употребата на антибиотици до изчакване на микробиологичния резултат.
- Между Грам-отрицателните бактерии, най-висока честота (68.4%) на карбапенем резистентност е установена при изолатите от *A. baumannii - calcoaceticus* complex, което се обяснява с разпространение и персистенция на ОХА-продуциращи клонове с множествена резистентност.
- Друг важен резултат е персистенцията на ST15 клон на *K. pneumoniae*, често свързан резистентност към карбапенем и наличие на *bla_{KPC-2}* в 12 болнични клиники в периода от 2014 до 2017 г. Изолирането на бактерии от този клон от ръцете на медицински персонал в една от клиниките, показва необходимостта засилен контрол на спазването на практиките за хигиена на ръцете, както и

санитарно микробиологичен контрол. Тук искам да напомня, че в проучването на Wetzker et al. [2016] в Германия, спазването на хигиената на ръцете е било субоптимално – вариращо от 67% до 84%- в зависимост от индикациите.

- Отделно са представени данните за етиологичния спектър и еволюцията на резистентността на причинителите при една от най-рисковите групи- болните с онкохематологични заболявания. Резултатите са полезни за определяне на насоките за емпирична терапия за пациенти с тежка имунна супресия.
- Резултатите и изводите от дисертацията показват необходимостта от по-широко въвеждане и използване на MALDI TOF MS и молекулярно-генетични методи за бързо идентифициране и определяне на чувствителността на причинителите на инфекциите на кръвта. Успоредно е необходимо оптимизиране на диагностиката вкл. времето на вземане и инкубиране на на кръвта, както и не на последно място постоянната и добра комуникация между клиницистите и микробиолозите. Още един фактор, който може да бъде оптимизиран е диагностичното работно време на лабораториите, напр. с дежурства, като се има предвид, че клинично значимите бактериемии са спешни състояния.

Публикации свързани с дисертацията

Проф. Стоева представя в дисертационния си труд 18 публикации и е първи автор на 7 от тях. От всички посочени публикации, 9 са в списания с импакт фактор.

Впечатляващо е, че две от публикациите от 2022 г. са в Lancet и Lancet Public Health имат импакт фактор над 202 и съотв. над 72. Има също така публикации и в други престижни международни медицински списания като Infection, Genetics and Evolution, Journal of Global Antimicrobial Resistance, Diagnostic Microbiology & Infectious Disease, APMIS и The Brazilian Journal of Infectious Diseases. Кандидатът има представени и съобщения, изнесени на научни форуми, вкл. в чужбина в Германия и Испания.

Публикациите на проф. Стоева са многократно цитирани в медицинската литература. Така напр. статията в Lancet е цитирана над 4000 пъти, тази в Journal of Global Antimicrobial Resistance 29 пъти, а публикацията в APMIS има 63 цитирания.

Тези данни говорят за значимостта на представените трудове, за широкия им международен им принос за разбирането и насоките за овладяване на антибиотичната резистентност и леталитета при бактериемии, както и за много високата оценка на трудовете в глобален мащаб.

Оценка на автореферата на дисертационния труд:

Представеният автореферат е написан на 77 страници и коректно отразява структурата, данните, анализа в дисертационния труд, както и приносите на дисертанта.

Критични бележки и препоръки

Имам някои дребни бележки, които не засягат стойността на дисертационния труд. В Материали и методи/ Дизайн на проучването може да се замени “*Propionibacterium*” с “*Cutibacterium*”, като се има предвид *Cutibacterium acnes*.

Съкращението „CoNSЧ не би следвало да бъде в италик. На някои страници фамиленото име на *Enterobacteriaceae* трябва да бъде заменено с името на разред *Enterobacterales*.

Заклучение

След рецензиране на дисертационния труд на проф. Стоева, считам, че той отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България, на правилника за приложението му и на правилника на Медицински университет - Варна за присъждане на образователна и научна степен „доктор на медицинските науки“.

Този труд е много актуален, диагностично и клинично важен, прецизно планиран и компетентно и старателно разработен. Това е първото за страната толкова мащабно и дълготрайно проучване на пациентите и причинителите на инфекции на кръвта. Обхващането на 10-годишния период на изследване и впечатляващият брой пациенти (над 15 600), както и броя и комплексността на използваните класически и най-съвременни изследователски методи, вкл. автоматизираните и молекулярно генетичните, очертават характеристиката, съвременното състояние, рисковите фактори и насоките за контрол на клинично значимите бактериемии в нашата страна.

Като автор на дисертационния труд, проф. Стоева се изявява като мотивиран, старателен и високо компетентен научен изследовател, който успешно провежда продължителни и мащабни научни проучвания. Нейните приноси, както теоретични, така и научно-приложни са ясно очертани и оценени и от международната научна общност, както се вижда от техните цитирания.

Въз основа на гореизложеното, настойчиво и убедено препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури, да присъдят образователна и научна степен „доктор на медицинските науки“ по научната специалност „Микробиология“ на проф. д-р Теменуга Жекова Стоева, дм за нейния дисертационен труд.



16.10. 2023 г.

Проф. д-р Людмила Боянова Георгиева, дм, дмн
Катедра медицинска микробиология
на Медицински университет-София