

**ДО
ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА НАУЧНОТО ЖУРИ,
НАЗНАЧЕНО СЪС ЗАПОВЕД
№ Р-109-276/04.07.2022
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, София

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор” в
областта на висшето образование: 4. Природни науки, математика и информатика
по професионално направление: 4.3. Биологически науки и
научна специалност „Микробиология“

**на тема: “Проучване върху бактериемията и инвазивните микотични
инфекции при пациенти след автоложна и алогенна хематопоеична
стволовоклетъчна трансплантация”**

от д-р Денис Сунай Ниязи
докторант в редовна форма на обучение към Катедра „Микробиология и
вирусология” на Факултет по медицина в МУ - Варна

Научни ръководители:
Проф. д-р Теменуга Стоева, дм
Доц. д-р Илина Мичева, дм

Научен консултант:
Проф. д-р Игор Резник, дмн

Декларирам, че нямам общи научни трудове с докторанта.

Актуалност на дисертационния труд

Трансплантацията на хематопоетични стволови клетки е едно от революционните открития в медицината, което довежда до лечението на много нелечими до средата на миналия век заболявания – малигнени хематологични, както и немалигнени, които водят до костномозъчна недостатъчност. Заради многото рискови фактори и увреденото състояние на пациентите обаче, хематопоетична стволовоклетъчна трансплантация се съпътства от развитието на неинфекциозни и инфекциозни усложнения. Инфекциозните усложнения се причиняват от бактерии, гъбички, вируси и паразити, като бактериалните и микотичните инфекции са сред водещите причини за смъртност при тези пациенти.

Всичко това обуславя актуалността на дисертационния труд и необходимостта от проведените клинично-микробиологични и епидемиологични проучвания върху бактериемите и инвазивните микотични инфекции при пациенти след хематопоетична стволовоклетъчна трансплантация (ХСКТ).

Структура на дисертационния труд

Дисертацията е написана на 187 страници и е структурирана по общоприетата схема със съразмерно разпределение на текста в отделните раздели, както следва: въведение – 1 стр., литературен обзор – 47 стр., цел и задачи – 1 стр., материали и методи – 19 стр., резултати и обсъждане – 69 стр., изводи – 2 стр., приноси – 2 стр., и литература – 40 стр. Към дисертационния труд е приложен и списък с публикации и участия в научни форуми във връзка с дисертацията. Изложението е оптимално илюстрирано с 39 прецизно изработени нагледни материали (19 фигури и 20 таблици). В дисертацията са цитирани 430 литературни източници: 8 са на кирилица и 422 – на латиница, като 240 са от последните 10 години – доказателство за актуалността на разработвания дисертационен труд.

Въведението обосновава актуалността на проучвания проблем и подчертава значението на съвременната микробиологична диагностика на инфекциозните усложнения, които са сред водещите причини за смъртност при пациенти след хематопоетична стволовоклетъчна трансплантация.

Оценка на литературния обзор

Литературният обзор е построен логично и разглежда в пълнота рисковите фактори за възникване на инфекциозни усложнения при пациенти с ХСКТ и клиничната значимост на предтрансплантационното скриниране на донора и реципиента. В детайли са представени бактериалните инфекции, които са сред най-честите инфекциозни усложнения с фатален изход, тяхната профилактика и етиотропна терапия. Обстойно са разгледани инфекциозните усложнения, асоциирани с бактерии с множествена резистентност (MDR), и възможностите за терапия съобразно откритите механизми на резистентност. Подробно са описани микотичните усложнения след ХСКТ, които подобно на бактериалните инфекции са причина за висока смъртност (40% - 90%), тяхната профилактика и етиотропна терапия. Специално място в обзора заема колонизация с MDR микроорганизми – най-често бактерии и гъбички, в резултат на продължителната употреба на антимикробни препарати. Изрично се подчертава, че колонизацията с MDR микроорганизми не означава непременно развитие на инвазивна инфекция. Но при наличните рискови фактори и увреденото състояние на пациентите с ХСКТ е препоръчително откриване на това носителство с готовност за адекватна терапия при възникване на инфекциозни усложнения.

В заключението на обзора е разгледана ситуацията в България в светлината на факта, че през последните години броят на ХСКТ е нараснал от единични в рамките на една календарна година до няколко в рамките на един месец. И тъй като в България не са провеждани комплексни проучвания, включващи рискови фактори, етиологичен спектър и терапевтични възможности на бактериалните и микотичните инфекции при ХСКТ, предвид високата смъртност логично се извежда необходимостта от извършване на проучване върху бактериемите и инвазивните микотични инфекции при пациенти след хематопоеична стволовоклетъчна трансплантация.

Систематично и задълбочено авторът подхожда към набелязаните задачи в съответствие с **целта на дисертационния труд**: да се извърши клинично-микробиологично проучване върху бактериемите и инвазивните микотични инфекции при пациенти след автоложна и алогенна хематопоеична стволово-

клетъчна трансплантация, извършени в периода 2019 – 2021 г. в Отделението по трансплантации към Клиника по клинична хематология на УМБАЛ „Света Марина“.

За осъществяване целта на проучването са поставени **7 задачи**, които следват последователността на планираните изследвания, а именно: (1) да се проучат честотата и рисковите фактори за бактериемии и фунгемии при пациенти след автоложна и алогенна хематопоеична стволовоклетъчна трансплантация, както и 4-месечната преживяемост в цялата изследвана група пациенти, като се анализират факторите, които влияят върху нея; (2) да се проучи етиологичният спектър на бактериемии и фунгемии и да се определи чувствителността на микробните изолати към антимикробни лекарствени средства; (3) да се проучат чрез молекулярно-генетични методи механизмите на метицилинова резистентност при изолираните стафилококи и резистентността към цефалоспорини и карбапенеми в Грам-отрицателни изолати от кръв; (4) да се проучи чрез фенотипни и молекулярно-генетични методи способността за слайм продукция в изолираните стафилококи като техен важен фактор на вирулентност; (5) да се проучи етиологичният спектър на инвазивните микотични инфекции; (6) да се проучи нивото на фекално носителство на изолати от разред *Enterobacterales*, резистентни на 3-та генерация цефалоспорини и карбапенеми, на карбапенем-резистентни *Pseudomonas* spp., на vancomycin-резистентни ентерококи, *Stenotrophomonas maltophilia* и гъбички в проучваната група трансплантирани пациенти и се установят генетичните механизми на резистентност към тези антибиотици; (7) да се проучи епидемиологичната връзка между фекалните изолати и изолатите от кръв, демонстриращи резистентност към цефалоспорини от 3-та генерация, карбапенеми и гликопептидни антибиотици.

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 характеризирание на 107 неповтарящи се микробни изолата (89 бактериални и 18 микотични), получени от кръв (42) при септични епизоди и от фецес (65) при рутинен фекален скрининг на 74 пациенти, преминали

хематопоеитична стволовоклетъчна трансплантация от януари 2019 до декември 2021 г. 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 проспективното клинично-микробиологично и епидемиологично проучване са представени и анализирани резултатите от изследваните пациенти и техните микробни изолати за тригодишен период. Получените резултати и тяхното обсъждане следват стриктно поставените задачи, както следва:

1) Установена е висока кумулативна честота на инфекциите на кръвта в проучваната група трансплантирани пациенти (32% - 38,5%), със среден период на възникване на инфекциозното усложнение от 47 дни след процедурата. Фекалната колонизация и инфекция на кръвта, предхождащи ХСКТ, са независими рискови фактори за възникване на инфекция на кръвта при пациенти след ХСКТ. Установена е висока 4-месечна преживяемост сред цялата група проследявани пациенти (86,5%). Статистически значима е установената зависимост между 4-месечната преживяемост и показателите - вид на трансплантацията, основно заболяване, липса или наличие на предходна трансплантация, като пациентите с алогенна ХСКТ, предишна ХСКТ и с основно заболяване левкемия или лимфом имат по-малки шансове за преживяване първите 4 месеца след трансплантацията.

2) В установения етиологичен спектър на инфекциите на кръвта при пациенти след ХСКТ водещи са Грам-положителните бактерии, като най-чести причинители са коагулаза-негативните стафилококи (CoNS). *E. coli* преваляра сред Грам-отрицателните микроорганизми. Доказан е нисък относителен дял на фунгемиите. CoNS, асоциирани с инфекции на кръвта в настоящото проучване, демонстрират много високи нива на метицилинова резистентност, поради което в случаите на поставен CVC и съмнение за катетър-асоцирана инфекция е препоръчителна терапия с гликопептид. Ampicillin, ciprofloxacin и trimethoprim/sulfamethoxazole са със значително редуцирана активност спрямо грам-отрицателните бактерии, изолирани от кръв.

3) Установен е основният механизъм на резистентност към цефалоспорини от 3-та генерация в кръвни изолати от семейство *Enterobacteriaceae* – продукция на CTX-M-15 ESBL. Карбапенемната резистентност в *A. baumannii* се асоциира с четири *bla* гена, кодиращи карбапенемази от два различни класа - клас В (*bla_{VIM}*) и клас D (*bla_{OXA-48}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24/40}*). Метицилиновата резистентност, доказана във всички CoNS, се свързва изцяло с *mecA* гена. Делът на ESBL продуцентите сред чревните бактерии от семейство *Enterobacteriaceae* е 20%. Imipenem/meropenem, piperacillin/tazobactam и amikacin са препаратите с най-добра активност, което ги прави подходящи за начално емпирично лечение в случаите на фебрилна неутропения и септично състояние.

4) Установено е, че високият относителен дял на слайм-продуциращи CoNS от кръв, сред които най-чест е видът *Staphylococcus epidermidis*, се асоциира с наличие на *ica* гени. Статистически значима е връзката между носителството на *ica* гени и метицилиновата резистентност.

5) В изследваната група пациенти е установена ниска честота на инвазивна пулмонална аспергилоза, но висока смъртност сред доказаните случаи.

6) Проучваната група трансплантирани пациенти се характеризира с висока честота на чревна колонизация с гъбички и полирезистентни бактерии (49%), като 33,8% е относителният дял на ESBL продуцентите (главно CTX-M-15 ESBL); 13,8% – на карбапенем-резистентните бактерии (*Pseudomonas* spp. с VIM-2 и *E. cloacae* с VIM-1 метало-карбапенемази) и 23% – на VRE, всички носители на *vanA* гена. Сред микотичните изолати доминират представителите на *Candida nonalbicans* видовете, като се доказват видове с едновременна резистентност към ехинокандини и азолната група антимиотици.

7) Установените чрез епидемиологичното типизиране клъстери от идентични и/или близкородствени изолати от видовете *E. cloacae* и *E. faecium*, както и генетичната идентичност между фекален и кръвен изолат *E. cloacae*, получени от един пациент, потвърждават гастроинтестиналния тракт като важен резервоар за инфекциозни усложнения при пациенти след ХСКТ, инвазивния потенциал и способността на тези микроорганизми за клонална дисеминация в болнични условия.

Оценка на научните приноси

В дисертационния труд д-р Ниязи е постигнал значителни оригинални и потвърдителни приноси с научен и научно-приложен характер.

Сред приносите с оригинален характер се открояват следните: (1) проучени и анализирани са честотата и рисковите фактори за бактериемии и инвазивни микотични инфекции при пациенти след хематопоеична стволовоклетъчна трансплантация, както и 4-месечната преживяемост в цялата изследвана група пациенти, като са анализирани факторите, които влияят върху нея; (2) анализиран е етиологичният спектър и чувствителността към антимикробни лекарствени средства на микробните причинители на инфекциите на кръвта при изследваните пациенти; (3) проучен е колонизационният статус на гастроинтестиналния тракт с полирезистентни бактерии (ESBL и карбапенемаза-продуциращи Грам-отрицателни бактерии, vancomycin-резистентни ентерококи, *S. maltophilia*) и гъбички при пациенти след ХСКТ; (4) идентифицирани са от фекални проби карбапенем-резистентен изолат *E. cloacae* с *bla*_{VIM-1}, карбапенем-резистентни изолати *Pseudomonas composti* и *Pseudomonas mendocina* с *bla*_{VIM-2}; (5) идентифициран е от хемокултура карбапенем-резистентен изолат *A. baumannii*, носител на *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24/40-like} и *bla*_{VIM-like} гени; (6) доказани са *Candida nonalbicans* изолати (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*) с множествена резистентност от фекален скрининг.

Приносите с потвърдителен характер се отличават с ясно изразена концентрация върху проблемите на клиничната микробиология в следните основни направления: (1) гастроинтестиналният тракт се потвърждава като важен източник за инфекциозни усложнения при пациенти след ХСКТ, а чревната колонизация с полирезистентни бактерии се доказва като значим рисков фактор за развитие на бактериемии в тази група имунокомпрометирани пациенти; (2) потвърждава се водещата етиологична роля на коагулаза-негативните стафилококи при бактериемии на пациенти след ХСКТ и поставен СВС, широкото разпространение на метицилинова резистентност медирана от *tesA* гена при тези изолати, връзката между носителството на *ica* оперона и слайм продукцията при тях, както и асоциацията между носителството на *ica* гени и метицилиновата

резистентност; (3) потвърждава се широкото разпространение на СТХ-М-15 като основен механизъм на резистентността към цефалоспорици от трета генерация в изолати от семейство *Enterobacteriaceae*, получени от кръв и фецес на пациенти след ХСКТ; (4) потвърждава се, че резистентността към гликопептиди във vancomycin-резистентни изолати *E. faecium* се медира от *vanA* гена; (5) потвърждава се инвазивния потенциал на *E. cloacae* и способността за клонална дисеминация на изолати от видовете *E. faecium* и *E. cloacae*; (6) потвърждава се, че инвазивната пулмонална аспергилоза при пациенти, преминали ХСКТ, се асоциира с висока смъртност.

Сред приносите с научноприложен характер с голяма клинична значимост е въвеждането в рутинната микробиологична диагностика на: (1) CRA теста и теста на Кристенсен като фенотипни методи за детекция на слайм продукция от изолати *Staphylococcus* spp.; (2) имуоензимния метод Platelia *Aspergillus* Ag test (Bio-Rad, France) за диагностициране на инвазивна пулмонална аспергилоза при пациенти след ХСКТ.

Публикации, свързани с дисертационния труд

Резултатите от обемната изследователска работа на д-р Денис Ниязи са отразени в 3 публикации, в които той е първи автор. Публикациите са в наши списания с SJR от 0.101 до 0.203, като 2 от тях са на английски език. Дисертантът е представил своите постижения на 4 научни форума, като един от докладите му е отличен с награда за I място. Тези наукометрични показатели представят дисертанта като изграден изследовател със съществен принос в развитието на клиничната микробиология и познанията за микробиологичната диагностика на бактериемите и инвазивните микотични инфекции при пациенти след хематопоеична стволовоклетъчна трансплантация.

Заклучение

Представеният десертационен труд е върху изключително актуален за медицинската наука и практика проблем със значими научни и научноприложни приноси, свързани с всички клинично-микробиологични аспекти на бактериемите и инвазивните микотични инфекции при пациенти след автоложна и алогенна

хематопоеична стволовоклетъчна трансплантация в България. 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 образователната и научна степен “Доктор” по научната специалност “Микробиология” на д-р Денис Сунай Ниязи.

24.08.2022 г.

Рецензент:



/Проф. д-р Стефана Събчева, дм/