

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” – ВАРНА
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ



PROSPERITAS VESTRA FINIS NOSTRA!

Д-Р ДЕНИС СУНАЙ НИЯЗИ

**Проучване върху бактериемииите и инвазивните микотични
инфекции при пациенти след автоложна и алогенна
хематопоеична стволово-клетъчна трансплантация**

Автореферат

На дисертационен труд за присъждане на образователна и
научна степен «Доктор»

Научна специалност:

«Микробиология»

Научни ръководители:

Проф. д-р Теменуга Стоева, д.м.

Доц. д-р Илина Мичева, д.м.

Научен консултант:

Проф. д-р Игор Резник, д.м.н.

Варна, 2022

Дисертационният труд съдържа 187 страници и е онагледен с 19 фигури и 20 таблици. Цитирани са 430 литературни източника, от които 8 на кирилица и 422 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедрен съвет на Катедра по микробиология и вирусология на МУ – Варна и е насочен за публична защита пред Научно жури в състав:

Проф. д-р Мария Средкова, дм

Проф. д-р Стефана Събчева, дм

Доц. д-р Калинка Божкова, дм

Проф. д-р Валерия Калева, дм

Доц. д-р Милена Божкова, дм

Дисертантът работи като асистент в Катедра по микробиология и вирусология на МУ – Варна и като лекар в Лабораторията по клинична микробиология на УМБАЛ „Света Марина“ – Варна.

Експерименталната работа е извършена в Катедрата по микробиология и вирусология при МУ – Варна, УМБАЛ „Света Марина“ – Варна и Катедрата по медицинска микробиология при МУ – София.

Защитата на дисертационният труд ще се състои на 13.09.2022 г. от 13:00 часа в

Материалите по защитата са на разположение на интересувашите се в библиотеката на МУ – Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

1. ВЪВЕДЕНИЕ 5
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ 6
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ 7
4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ 10
 - 4.1. ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА ИНФЕКЦИИТЕ НА КРЪВТА (БАКТЕРИЕМИИ И ФУНГЕМИИ) В ПАЦИЕНТИ, ПРЕМИНАЛИ ХСКТ 10
 - 4.2. ЕТИОЛОГИЧЕН СПЕКТЪР НА ИНФЕКЦИИТЕ НА КРЪВТА 20
 - 4.3. ПРОУЧВАНЕ МЕХАНИЗМИТЕ НА РЕЗИСТЕНТНОСТ ЧРЕЗ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ МЕТОДИ КЪМ ЦЕФАЛОСПОРИНИ ОТ ТРЕТА ГЕНЕРАЦИЯ И КАРБАПЕНЕМИ ПРИ ГРАМ-ОТРИЦАТЕЛНИ БАКТЕРИИ И МЕХАНИЗМИТЕ НА МЕТИЦИЛИНОВА РЕЗИСТЕНТНОСТ ПРИ *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ОТ КРЪВ 33
 - 4.4. СЛАЙМ ПРОДУКЦИЯ В ИЗОЛАТИ *STAPHYLOCOCCUS* SPP. 39
 - 4.5. ЕТИОЛОГИЧЕН СПЕКТЪР НА ИНВАЗИВНИТЕ МИКОТИЧНИ ИНФЕКЦИИ 45
 - 4.6. ФЕКАЛНО НОСИТЕЛСТВО НА ГЪБИЧКИ И ПРОБЛЕМНИ ЗА ЛЕЧЕНИЕ БАКТЕРИИ: ВИДОВО РАЗНООБРАЗИЕ И ЧУВСТВИТЕЛНОСТ КЪМ АНТИМИКРОБНИ ЛЕКАРСТВЕНИ СРЕДСТВА 53
 - 4.7. ПРОУЧВАНЕ НА ЕПИДЕМИОЛОГИЧНАТА ВРЪЗКА МЕЖДУ ФЕКАЛНИТЕ ИЗОЛАТИ И ИЗОЛАТИТЕ ОТ КРЪВ, ДЕМОНИСТРАЩИ РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ ЦЕФАЛОСПОРИНИ ОТ 3-ТА ГЕНЕРАЦИЯ, КАРБАПЕНЕМИ И ГЛИКОПЕПТИДНИ АНТИБИОТИЦИ 69
5. ИЗВОДИ 77
6. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД 79
7. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД 81

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

БАЛ – бронхо-алвеоларен лаваж

ГМ - галактоманан

ИПА – инвазивна пулмонална аспергилоза

МПК – минимална потискаща концентрация

НФГБ – Неферментиращи глюкоза Грам – отрицателни бактерии

ХМЗ – хематологично малигнено заболяване

ХСК – хематопоеични стволови клетки

ХСКТ – хематопоеична стволово-клетъчна трансплантация

CoNS – Coagulase-negative staphylococci (коагулаза-негативни стафилококи)

CPR – carbapenem-resistant

CRA – Congo red agar

CVC – central venous catheter (централен венозен катетър)

ESBL – extended-spectrum beta-lactamase (широкоспектърна бета-лактамаза)

GVHD – graft versus host diseases (болест на присадката срещу реципиента)

MDR – multidrug resistant (множествено резистентни)

MRCoNS – methicillin-resistant Coagulase-negative staphylococci (methicillin-резистентни коагулаза-негативни стафилококи)

MRSA – methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

PCR – Polymerase chain reaction

TT – Tube test (тест на Christensen)

VRE – vancomycin-resistant enterococcus (vancomycin-резистентен ентерокок)

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Трансплантацията на хематопоетични стволови клетки (ХСК) се явява едно от революционните открития в сферата на медицината, което довежда до лечението на много нелечими до средата на миналия век заболявания (*Thomas ED, 1970; Hatzmichael E, 2010*). Медицинските състояния, при които се използва хематопоетична стволово-клетъчна трансплантация (ХСКТ) се разделят в две групи. В първата група се включват немалигнени състояния, които водят до костно-мозъчна недостатъчност като апластична анемия, имунодефицитни синдроми, хемоглобинопатии и др. Към втората група се отнасят малигнени, основно хематологични заболявания като остри и хронични левкемии, миелодиспластичен синдром, лимфоми, мултиплен миелом.

ХСК, които ще бъдат трансплантирани, могат да бъдат екстрахиран от костния мозък, от периферната кръв или от пъпната връв на донора и прехвърлени чрез инфузия в тялото на реципиента (*Wingard JR, 2010*). Трансплантираните ХСК служат за заместване на увредената хематопоетична тъкан или за унищожаване на туморните клетки на реципиента (*Negrin RS, 2019*).

Съществуват два основни типа ХСКТ - автоложна и алогенна. При автоложната трансплантация се използват собствените клетки на пациента, които чрез инфузия се връщат отново в тялото на реципиента, след унищожаване на туморните клетки. При алогенната трансплантация се използват чужди ХСК, взети от родствени или неродствени на пациента индивиди (*Antin JH, 2013*).

Заради редица свои специфични особености, ХСКТ се съпътства от развитието на неинфекциозни и инфекциозни усложнения. Инфекциозните усложнения, които са сред водещите причини за смъртност при тези пациенти, се асоциират с различни видове бактерии, гъбички, вируси и паразити (*Wingard JR, 2019*), докато неинфекциозните усложнения се дължат на използваните препарати по време на периода на кондициониране и се демонстрират най-често като серозити, мукозити, вено-оклузивна болест на черния и белия дроб и хеморагичен цистит (*Al-Anazi KA, 2010; Weisdorf D, 2019*). *Styczynski* съобщава честота на бактериалните, микотични и вирусни усложнения, съответно 33.9%, 22.8% и 38.3%, като делът на тези усложнения е вариращ и зависи от типа на трансплантацията, условията в трансплантационния център, географския регион,

използване или не на антимикробни препарати с цел профилактика и др. (Styczynski J, 2016).

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се извърши клинично-микробиологично прочуване върху бактериемииите и инвазивните микотични инфекции при пациенти след автоложна и алогенна хематопоеична стволоро-клетъчна трансплантация, извършени в периода 01.01.2019 – 31.12.2021г. в Отделението по трансплантации към Клиника по клинична хематология на УМБАЛ „Света Марина“, гр. Варна.

Във връзка с това си поставихме следните задачи:

1. Да се проучат честотата и рисковите фактори за бактериемии и фунгемии при пациенти след автоложна и алогенна хематопоеична стволоро-клетъчна трансплантация, както и 4-месечната преживяемостта в цялата изследвана група пациенти, като се анализират факторите, които влияят върху нея.
2. Да се проучи етиологичния спектър на бактериемииите и фунгемииите и да се определи чувствителността на микробните изолати, асоцииращи се с инфекции на кръвта към набор от антимикробни лекарствени средства.
3. Да се проучат чрез молекулярно – генетични методи механизмите на метицилинова резистентност при изолати *Staphylococcus* spp. и резистентност към цефалоспорини от 3-та генерация и карбапенемии в Грам-отрицателни изолати от кръв.
4. Да се проучи чрез фенотипни и молекулярно-генетични методи способността за слайм продукция в клинично значими изолати *Staphylococcus* spp. от кръв, като техен важен фактор на вирулентност.
5. Да се проучи етиологичния спектър на инвазивните микотични инфекции.
6. Да се проучи нивото на фекално носителство на изолати от разред *Enterobacteriales*, резистентни на 3-та генерация цефалоспорини и карбапенемии, карбапенем-резистентни *Pseudomonas* spp., vancomycin-резистентни ентерококи, *Stenotrophomonas maltophilia*, и гъбички в проучваната група трансплантирани пациенти, както и да се проучат чрез молекулярно – генетични методи механизмите на

резистентност към тези антибиотици.

7. Да се проучи епидемиологичната връзка между фекалните изолати и изолатите от кръв, демонстриращи резистентност към цефалоспорици от 3-та генерация, карбапенеми и гликопептидни антибиотици.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. ДИЗАЙН НА ПРОУЧВАНЕТО

Настоящото проучване е проспективно клинично-микробиологично и епидемиологично проучване върху общо 74 пациенти, постъпили в Трансплантационното отделение на клиниката по Клинична хематология на УМБАЛ „Света Марина“ гр. Варна в периода Януари 2019 – Декември 2021г. и преминали хематопетична стволото – клетъчна трансплантация. Проучването е одобрено от Комисията по Етика на Научните Изследвания с протокол No 92/02.04.2020.

Проучени пациенти

Проспективно за периода Януари 2019 – Декември 2021г., са проучени 74 пациенти, постъпили в Трансплантационното отделение на клиниката по Клинична хематология на УМБАЛ „Света Марина“ гр. Варна и преминали ХСКТ. От проучваната група пациенти, 42 (56.8%) са мъже, а 32 (43.2%) – жени, като възрастта е в границите 14 – 68 години. При 71 пациента (96%) ХСКТ е предхождана от развитие на онкологично или хематологично малигнено заболяване (ХМЗ), а при трима - причината за провеждане на ХСКТ е множествена склероза.

3.2. МИКРОБНИ ИЗОЛАТИ

Проучени са общо 107 неповтарящи се микробни изолата (89 бактериални и 18 микотични), получени от различни клинични материали на 74 пациенти преминали ХСКТ (42 от кръв и 65 от фецес) (Таблица 1).

Таблица 1. Разпределение на микробните изолати според вида на клиничния материал и бактериалния и микотичен вид (в брой).

Вид клиничен материал	Микробен вид	Брой изолати (n)
Кръв	<i>Escherichia coli</i>	11
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
	<i>Enterobacter cloacae</i>	2

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
	<i>Burkholderia cepacia</i>	1
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3
	<i>Staphylococcus hominis</i>	2
	<i>Streptococcus bovis</i>	1
	<i>Candida krusei</i>	1
	Общо изолати от кръв	42
Фецес	<i>Escherichia coli</i>	10
	<i>Enterobacter cloacae</i>	7
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4
	<i>Pseudomonas putida</i>	4
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
	<i>Pseudomonas composti</i>	1
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	1
	<i>Serratia marcescens</i>	1
	<i>Enterococcus faecium</i>	15
	<i>Candida glabrata</i>	7
	<i>Candida albicans</i>	3
	<i>Candida krusei</i>	2
	<i>Candida tropicalis</i>	2
	<i>Candida dubliniensis</i>	1
	<i>Candida kefyr</i>	1
	<i>Candida parapsilosis</i>	1
	Общо изолати от фецес	65
	Общ брой клинични материали (n=95)	

3.3. МЕТОДИ ЗА МИКРОБНА ИДЕНТИФИКАЦИЯ

3.3.1. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЧРЕЗ:

- Phoenix 100 (BD, USA)
- MALDI Biotyper® Sirius (Bruker, Germany)
- Полимеразна верижна реакция (PCR)

3.3.2. ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА ГЪБИЧКИ ЧРЕЗ АСИМИЛАЦИОНЕН МЕТОД

- AUXACOLOR™ 2 (Bio-Rad, France)

3.4. МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ КЪМ АНТИМИКРОБНИ ЛЕКАРСТВЕНИ СРЕДСТВА

3.4.1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ КЪМ АНТИМИКРОБНИ ЛЕКАРСТВЕНИ СРЕДСТВА ЧРЕЗ АВТОМАТИЗИРАНА СИСТЕМА

3.4.2. МИКРОДИЛУЦИОНЕН МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА МИНИМАЛНАТА ПОТИСКАЩА КОНЦЕНТРАЦИЯ НА АНТИМИКРОБНИЯ ПРЕПАРАТ:

- MIKROLATEST (Erba Lachema, Czech Republic)
- Sensititre™ YeastOne™ YO3IVD AST Plate (Thermo Fisher, USA)

3.4.3. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ КЪМ АНТИМИКРОБНИ ЛЕКАРСТВЕНИ СРЕДСТВА ЧРЕЗ Е-ТЕСТ

- Е-тест (Liofilchem, Italy)

3.5. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ДЕТЕКЦИЯ НА БЕТА-ЛАКТАМНА, МЕТИЦИЛИНОВА И ГЛИКОПЕПТИДНА РЕЗИСТЕНТНОСТ

3.5.1. ПОЛИМЕРАЗО-ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ (PCR)

3.5.2. ДНК СЕКВЕНИРАНЕ

3.6. МЕТОДИ ЗА ДОКАЗВАНЕ НА СЛАЙМ ПРОДУКЦИЯ В ИЗОЛАТИ *STARHYLOCOCCUS* SPP.

3.6.1 ФЕНОТИПНИ МЕТОДИ

- Посявка на Congo red агар (*Freeman DJ, 1989*)
- Метода на Christensen в епруветка (*Christensen GD, 1982*)

3.6.2 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ МЕТОДИ

- *icaA, icaD* (Petrelli D, 2006)

3.7. ДЕТЕКЦИЯ НА ASPERGILLUS GALАСТОМАННАН АНТИГЕН В СЕРУМ И БРОНХО-АЛВЕОЛАРЕН ЛАВАЖ (БАЛ)

- Platelia™ *Aspergillus* Ag (Bio-Rad, France)

3.8. ЕПИДЕМИОЛОГИЧЕН АНАЛИЗ

- ERIC PCR
- RAPD PCR

3.9. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ

- Дескриптивни
- Проверка на хипотези

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА ИНФЕКЦИИТЕ НА КРЪВТА (БАКТЕРИЕМИИ И ФУНГЕМИИ) В ПАЦИЕНТИ, ПРЕМИНАЛИ ХСКТ.

Характеристика на проучените пациенти

Демографските и други характеристики на пациентите, свързани с ХСКТ са показани на таблица 2.

Таблица 2. Характеристика на пациентите с ХСКТ.

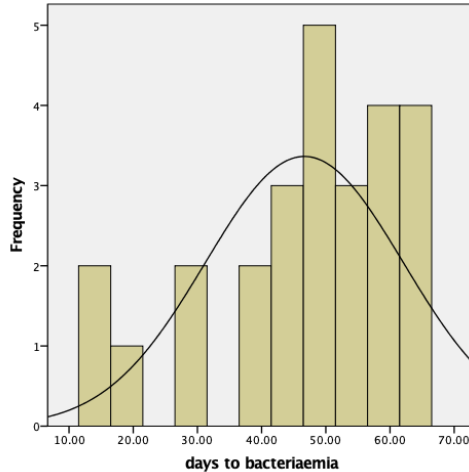
Характеристики	Пациенти, n (%)	
	Автоложна ХСКТ (n=49)	Алогенна ХСКТ (n=25)
Възраст год. (95% ИД)	51 (18 – 68)	39 (14 – 65)
Пациенти < 18 г. n (%)	-	3 (12.0)
Мъжки пол	27 (55.1)	15 (60.0)
Подлежащо заболяване		
Множествен миелом	26 (52.0)	-
Остра миелобластна левкемия	-	11 (44.0)
Остра лимфобластна левкемия	-	5 (20.0)
Неходжкинов лимфом	13 (26.5)	2 (8.0)
Ходжкинов лимфом	6 (12.2)	4 (16.0)
Апластична анемия	-	2 (8.0)

Множествена склероза	3 (6.1)	-
Миелодиспластичен синдром	-	1 (4.0)
Пролиферативно заболяване	1 (2.0)	-
Предишна ХСКТ		
Автоложна	5 (10.2)	5 (20.0)
Алогенна	-	-
Тип на донора		
HLA MUD	NA	14 (56.0)
HLA MRD	NA	5 (20.0)
Haplo	NA	6 (24.0)
Източник на стволови клетки		
Костен мозък	-	2 (8.0)
Периферна кръв	49 (100.0)	23 (92.0)

NA – неприложимо; **MUD** – съвместим неродствен донор; **MRD** – съвместим родствен донор; **Haplo** – хаplo-идентичен донор; **ID** – интерквартилен диапазон;

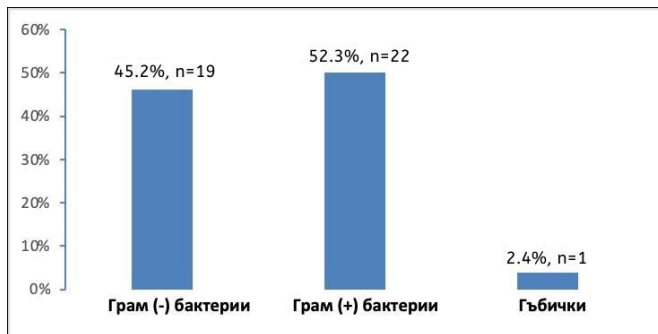
Инфекции на кръвта (бактериемии и фунгемии)

За периода на проучването, инфекции на кръвта са документирани при 26 от 74 пациенти, преминали ХСКТ (35.1%). Петнадесет от тях (58%) имат един епизод на инфекция на кръвта, при 7 се документират два епизода, при 2 – три епизода и един пациент е имал 4 различни епизода. При 25 (96.2%) пациенти инфекцията на кръвта настъпва преди 30 ден след ХСКТ, а при един (3.8%) след 30 ден. При 24 (92.3%) пациенти епизодите на инфекция на кръвта се развиват преди настъпване на неутрофилен енграфтмънт, като включват 29 епизода. При един пациент на 61 г., от мъжки пол, с основно заболяване миелодиспластичен синдром и последваща алогенна ХСКТ, с източник на ХСК съвместим неродствен донор, се документира епизод на фунгемия на 6ти ден след ХСКТ. Средният период на поява на инфекция на кръвта е 46.7 (SD ± 15.42) дни (фиг. 1)



Фигура 1. Среден период до възникване на инфекция на кръвта след ХСКТ.

В етиологичния спектър на документираните инфекции на кръвта се установява превес на Грам - положителните видове ($p > 0.05$), асоцииращи се с бактериемии в проучваната група трансплантирани пациенти. На фигура 2 са представени обобщени данни за причинителите и честотата на тези инфекции.



Фигура 2. Спектър на причинители на инфекции на кръвта, документирани при 26 трансплантирани пациенти за целия проучван период (2019 - 2021г.) в брой и %.

Рискови фактори за инфекции на кръвта (бактериемии и фунгемии) при пациенти след ХСКТ

Кумулативната честота на инфекциите на кръвта след автоложна и алогенна ХСКТ е 32.0% (95% ИД 26.3%-37.7%) и съответно 38.5% (95% ИД 14.6% - 62.3%).

Рисковите фактори с потенциално отношение към възникване на инфекции на кръвта в изследваната група от 74 пациента, свързани с демографските характеристики, подлежащото заболяване и показатели, свързани с трансплантацията са представени на таблица 3.

Таблица 3. Рискови фактори за възникване на инфекции на кръвта (бактериемии и фунгемии) при пациенти след ХСКТ.

	Пациенти общо		Пациенти с кръвни инфекции		Пациенти без кръвни инфекции (%)		p
	n	%	n	%	n	%	
Общ брой	74	100.0	26	35.1	48	64.9	
Пол							
мъже	42	56.8	17	69.2	25	52.1	0.15
жени	32	43.2	9	30.8	23	47.9	
Вид ХСКТ							
автоложна	49	66.2	15	57.7	34	70.1	0.25
алогенна	25	33.8	11	42.3	14	29.2	
Източник на клетки							
костен мозък	2	2.7	2	3.8	0	0.0	0.17
периферна кръв	72	97.3	24	96.2	48	100.0	
Време до НЕ							
0-10 дни	16	21.6	6	23.1	10	20.8	0.86
11-20 дни	51	68.9	17	65.4	34	70.8	
21-30 дни	7	9.5	3	11.5	4	8.3	
Време до ТЕ							
0-10 дни	11	14.9	2	7.7	9	18.8	0.43
11-20 дни	56	75.7	21	80.8	35	72.9	
21-30 дни	7	9.5	3	11.5	4	8.3	
Преишна ХСКТ							
Не	64	86.3	23	88.5	41	85.4	0.88
Да	10	13.7	3	11.5	7	14.6	
Фекална колонизация							
Да	4	5.4	4	15.4	0	0.0	0.005
Не	70	94.6	2	84.6	48	100.0	
Кръвна инфекция преди ХСКТ							
Да	2	2.7	2	7.7	0	0	0.05
Не	72	97.3	24	92.3	48	100	

ХСКТ - хематопоетична стоволово-клетъчна трансплантация; **НЕ**, неутрофилен енграфтмънт; **ТЕ** - тромбоцитен енграфтмънт;

Предшествваща трансплантацията колонизация на храносмилателната система с представители на семейство *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. и *Enterococcus faecium*, демонстриращи редуцирана чувствителност към β -лактами и гликопептидни антибиотици, както и епизод на инфекция на кръвта преди настоящата ХСКТ се доказаха като статистически значими рискови фактори, свързани с възникване на инфекции на кръвта при изследваната група пациенти ($p \leq 0.05$). Пре-трансплантационни инфекции на кръвта, причинени от *E. coli* ($n=1$) и methicillin – резистентен *Staphylococcus hominis* ($n=1$) се доказаха в 2 пациенти (7.8%). Инфекция на кръвта със същия бактериален вид (*Enterobacter cloacae*), доказан при фекалния скрининг и с идентичен профил на чувствителност се доказа при 1 пациент (1.4%) след трансплантацията.

Преживяемост

Общата 4 месечна преживяемост сред изследваната група трансплантирани пациенти е 86.5%. Установена беше статистически значима разлика по отношение на тази преживяемост между групата на пациентите с автоложна и съответно алогенна трансплантация ($p < 0.001$) (Таблица 4), както и статистически значима разлика между тези две групи по отношение на средната преживяемост след трансплантация, като пациентите с автоложна трансплантация имат много по-дълга преживяемост спрямо алогенно трансплантираните ($p = 0.002$).

Статистически значима връзка беше установена също и между вида на диагнозата и 4-месечната преживяемост ($p = 0.043$) (Таблица 4), като в случаите с диагнози множествен миелом, апластична анемия, множествена склероза и идиопатично пролиферативно заболяване се доказа 100% преживяемост към четвъртия месец след трансплантацията.

Статистически значима връзка беше установена и между 4 месечната преживяемост в цялата група трансплантирани пациенти (авто- и алогенни трансплантации) и променливата „предходна трансплантация“, като по - голяма вероятност за преживяване до 4 месец имат тези пациенти, които не са имали предходен опит за трансплантация ($p = 0.001$) (Таблица 4).

За следните променливи: пол, възраст на трансплантирания пациент, вид на донора, източник на клетките за трансплантация, продължителна неутропения, мукозит, болест на присадката срещу

реципиента (GVHD), не беше доказана връзка и влияние върху 4 месечната преживяемост ($p > 0.05$) (Таблица 4).

Таблица 4. Рискови фактори, влияещи на преживяемостта при пациенти след ХСКТ.

	Преживяемост на 4-ти месец			
	Преживял	Починал	Общо	<i>p</i>
Алогенна ХСКТ				
Средна възраст год. (SD)	37.9 (17.86)	37.7 (18.23)	37.8 (17.62)	0.971
Брой (%)	16 (64.0)	9 (36.0)	25 (100.0)	
Автоложна ХСКТ				
Средна възраст год. (SD)	53.8 (10.47)	43.0 (0.00)	53.6 (10.47)	0.312
Брой (%)	48 (98)	1 (2.0)	49 (100.0)	
Източник на стволови клетки				
Костен мозък	1 (100.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	0.691
Периферна кръв	63 (86.3)	10 (13.7)	73 (100.0)	
Продължителна неутропения				
Налична	4 (57.1)	3 (42.9)	7 (100.0)	0.146
Липсва	16 (84.2)	3 (15.8)	19 (100.0)	
Мукозит				
Доказан	4 (100.0)	0 (0.0)	4 (100.0)	0.234
Липсва	16 (72.7)	6 (27.3)	22 (100.0)	
Болест на присадката срещу реципиента (GVHD)				
Налична	1 (100.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	0.664
Липсва	21 (84.0)	4 (16.0)	25 (100.0)	
Основно заболяване				
<i>MM</i>	26 (100)	0 (0.0)	26 (100.0)	0.043
ОМЛ	8 (72.7)	3 (27.3)	11 (100.0)	
ОЛЛ	4 (80.0)	1 (20.0)	5 (100.0)	
ХЛ	7 (70.0)	3 (30.0)	10 (100.0)	
НХЛ	13 (86.7)	2 (13.3)	15 (100.0)	
<i>AA</i>	2 (100.0)	0 (0.0)	2 (100.0)	
<i>MC</i>	3 (100.0)	0 (0.0)	3 (100.0)	

МДС	0 (0.0)	1 (100.0)	1 (100.0)	
<i>ИПЗ</i>	1 (100.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	
Вид донор				
Haplo	3 (50.0)	3 (50.0)	6 (100.0)	0.587
MRD	4 (80.0)	1 (20.0)	5 (100.0)	
MUD	9 (64.3)	5 (35.7)	14 (100.0)	
Предходна трансплантация				
Да	4 (50.0)	4 (50.0)	8 (100.0)	0.001
Не	60 (90.9)	6 (9.1)	66 (100.0)	
Пол				
Мъж	38 (88.4)	5 (11.6)	43 (100.0)	0.576
Жена	26 (83.9)	5 (16.1)	31 (100.0)	
Вид трансплантация				
Автоложна	48 (98.0)	1 (2.0)	49 (100.0)	< 0.001
Алогенна	16 (64.0)	9 (36.0)	25 (100.0)	

SD – стандартно отклонение; **MM** – множествен миелом; **ОМЛ** – остра миелобластна левкемия; **ОМЛ** – остра лимфобластна левкемия; **ХЛ** – Ходжкинов лимфом; **НХЛ** – неходжкинов лимфом; **АА** – апластична анемия; **МС** – множествена клероза; **МДС** – миелодиспластичен синдром; **ИПЗ** – идиопатично пролиферативно заболяване; **Haplo** – хаplo-идентичен донор; **MRD** – съвместим родствен донор; **MUD** – съвместим неродствен донор;

Тридесет дневната смъртност след диагностициране на инфекцията на кръвта (бактериемия/фунгемия) беше 23% (6 от 26 пациенти), като в 50 % от пациентите (3 от 6) инфекцията беше приета като основна причина за смъртен изход.

Обсъждане

Трансплантацията на ХСК е ефективен терапевтичен метод за справяне с много злокачествени заболявания, синдроми с костномозъчна недостатъчност, както и имунодефицитни състояния при деца, подрастващи и възрастни индивиди. В световен мащаб се извършват повече от 50 000 ХСКТ годишно. Развитието на трансплантационните стратегии и напредването на поддържащите грижи, водят до подобряване на изхода от трансплантацията (*Dandoy CE, 2020*). Въпреки това, инфекциозните усложнения непрекъснато съпътстват ХСКТ, като инфекциите на кръвта са една от най – честите

причини за заболяемост и смъртност при пациенти, преминали ХСКТ (*Ge J, 2018*).

Инфекциите на кръвта са тежка форма на системна инфекция, причинена от навлизането на патогенни микроорганизми в кръвната циркулация. Срещат се като най – често усложнение предимно през ранните етапи на трансплантацията и варират между 13.6% и 38.9%. Според голям брой литературни източници, развитието на такъв тип усложнение е съществен рисков фактор за ранен смъртен изход след ХСКТ (*Cao W, 2021*). Основни фактори, идентифицирани като рискови, за развитие на инфекция на кръвта след ХСКТ са абсолютна неутропения, мукозит и наличие на централен венозен катетър (CVC). За допълнителни рискови фактори, допринасящи за поява на това усложнение, се смятат вида на основното заболяване, тежка форма на GVHD и употребата на кортикостероиди (*Youssef A, 2019*).

В настоящото проучване чрез проспективно проследяване на пациенти преминали ХСКТ в периода 2019 – 2021г., събиране на информация и нейната статистическа обработка, определихме рисковите фактори, допринасящи за развитието на инфекция на кръвта в изследваната група пациенти и оценихме факторите, оказващи влияние върху изхода от ХСКТ.

За проследявания тригодишен период 35.1% от изследваните пациенти развиха поне един епизод на инфекция на кръвта, като средният период на възникване на инфекция на кръвта е приблизително 47 дни след ХСКТ. Тези данни значително се различават от получените от други изследователи. *Ferreira et al.* съобщават за среден период от 8 дни след ХСКТ на възникване на инфекция на кръвта сред 232 пациенти (*Ferreira AM, 2018*). Подобни са и данните, съобщени от *Akinboyo, Youssef* и *Ge* – 15, 5 и 4.5 дни, съответно (*Ge J, 2018; Akinboyo IC, 2020; Youssef A, 2020*). Резултати, по – близки до нашите се съобщават в мащабно кохортно ретроспективно проучване, обхващащо общо 16 875 алогенни трансплантации от различни центрове, проведени в периода 2009 – 2016г. – 29 дни (*Dandoy CE, 2020*).

В настоящото проучване кумулативната честота на инфекциите на кръвта след авто- и ало-ХСКТ е 32% и 38.5%, съответно. Близки до нашите стойности се съобщават в проучване на *Ferreira et al.* – 25.4% (*Ferreira AM, 2018*). Значителни различия се наблюдават в съобщенията на *Girmenia et al.* и *Dandoy et al.* В мащабно италианско проучване, включващо данни от 54 трансплантационни центъра за повече от 2500 ХСКТ се документира кумулативна честота на инфекциите на кръвта от 9% за авто и 17.3% за ало-ХСКТ (*Girmenia*

C, 2017). Честотата в проучването на Dandoy et al. е 21% (Dandoy CE, 2020).

За определяне ролята на потенциалните рискови фактори за развитие на инфекция на кръвта след ХСКТ използвахме еднофакторен и множествен регресионен анализ. След анализиране на получените данни, се откриха два фактора, при които се откри статистическа зависимост ($p < 0.05$). Фекалната колонизация на пациентите с микроорганизми, демонстриращи множествена резистентност и *Candida spp.*, както и епизод на инфекция на кръвта преди ХСКТ се доказаха като независими рискови фактори за възникване на инвазивна инфекция на кръвта след ХСКТ. Подобни резултати се докладват и в други проучвания. Youssef et al. в проучване, проведено в Египет сред педиатрични пациенти, преминали ХСКТ в периода 2013 – 2017г. откриват статистически значима връзка между възникването на инфекция на кръвта след ХСКТ и епизод преди самата трансплантация (Youssef A, 2020). Girmenia et al. откриват статистическа значимост между колонизация с полирезистентни бактерии и възникването на инфекция на кръвта, както при пациенти с автоложна, така и при такива с алогенна трансплантация (Girmenia C, 2017). Тези данни се подкрепят и от проучване, проведено в Бразилия, в което се документира чревната колонизация с бактерии, демонстриращи множествена резистентност, като рисков фактор за възникване на инфекция на кръвта (Ferreira AM, 2018).

В допълнение към определянето на потенциалните рискови фактори, повлияващи възникването на инфекция на кръвта, проучихме и факторите, които могат да въздействат върху преживяемостта след ХСКТ. От изследваните пациенти над 80% преживяха първите 4 месеца след ХСКТ. Пациентите, преминали авто-ХСКТ и тези с основно заболяване: множествен миелом, апластична анемия, множествена склероза и идиопатично пролиферативно заболяване се оказаха с по-висок шанс за преживяване в сравнение с алогенно трансплантираните и пациентите с предходна трансплантация. Близки резултати се съобщават от Girmenia et al. Авторите докладват за 4 месечна преживяемост при приблизително 90% от пациентите, по – високи шансове за преживяемост се отчитат при пациентите с авто-ХСКТ. Фактори, повлияващо негативно преживяемостта, са остра левкемия, предишна трансплантация, продължителна неутроения и др. (Girmenia C, 2017).

В нашето проучване 30-дневната смъртност след ХСКТ и инфекция на кръвта е 23%, като непосредствената причина за смъртта

е инфекция на кръвта в половината от случаите. В проучване на Girmenia et al. 30-дневната смъртност след ало-ХСКТ е 17.9%, като в 96% от тях инфекцията се доказва като първопричина. Сред авто трансплантираните, тази честота е доста по – ниска (4.1%), като всички пациенти са починали в следствие на инфекция на кръвта (*Girmenia C, 2017*).

Заклучение

В настоящото проучване фекалната колонизация и предишна инфекция на кръвта се доказаха като независими рискови фактори за възникването на инфекция на кръвта при пациенти след ХСКТ. Кумулативната честота на тези инфекции е 32% за авто- и 38.5% за алогенно трансплантираните, със среден период на възникване на инфекциозното усложнение от 47 дни след процедурата. Тридесет дневната смъртност след диагностициране на инфекция на кръвта е 23%. Установи се висока 4-месечна преживяемост сред цялата група проследявани пациенти (над 86%), като статистически значима зависимост се установи между 4-месечната преживяемост и показателите вид на трансплантацията, основното заболяване и липса или наличие на предходна трансплантация, като пациентите с автоложна ХСКТ и диагноза, различна от левкемия и лимфом са с по – добри шансове за преживяване, отколкото пациентите с алогенна ХСКТ и предхождаща трансплантация.

4.2. ЕТИОЛОГИЧЕН СПЕКТЪР НА ИНФЕКЦИИТЕ НА КРЪВТА

4.2.1. Етиологичен спектър

През проучвания период от време са изследвани общо 968 хемокултури на 74 пациенти с ХСКТ със съмнение за инфекциозно усложнение (втрисане, главоболие, повишена телесна температура, отпадналост). Изолирани и идентифицирани са общо 42 клинично значими, неповтарящи се изолата от хемокултури на 26 пациенти, асоцииращи се с отделни епизоди на инфекция. Детайлният етиологичен спектър е представена на таблица 5.

Таблица 5. Етиологична структура на инфекциите на кръвта при пациенти с ХСКТ в периода 2019-2021г.

Етиологичен причинител на инфекциите на кръвта	n (%)
Грам - положителни бактерии	22 (52.3)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12 (54.5)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4 (18.1)
<i>Staphylococcus hominis</i>	2 (9.1)
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 (13.6)
<i>Streptococcus bovis</i>	1 (4.5)
Грам - отрицателни бактерии	19 (45.2)
<i>E. coli</i>	11 (57.9)
<i>Enterobacter cloacae</i>	2 (10.5)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2 (10.5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 (10.5)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1 (5.3)
<i>Burkholderia cepacia complex</i>	1 (5.3)
Гъбички	1 (2.4)
<i>Candida krusei</i>	1 (100.0)
Общо клинично значими микроорганизми, изолирани от хемокултури	42 (100.0)

Обсъждане

В етиологичната структура на инфекциите на кръвта, доказани при 26 пациенти, преминали ХСКТ в периода 2019 – 2021г. се установява превалиране на изолатите, отнасящи се към Грам – положителни бактериални видове (52.3%). Сред тях водещи патогени са коагулаза-негативни стафилококи (CoNS), като най - голям относителен дял се пада на *S. epidermidis* (54.5%). Значително по-рядко се доказват видове с по-изразен патогенен потенциал, какъвто е *S. aureus* (13.6%). Подобни на нашите резултати се докладват и в проучвания, проведени в хематологични центрове в САЩ, Турция и Египет, включващи педиатрични и възрастни пациенти след ХСКТ и с малигнени заболявания (*Yemisen M, 2016; Balian C, 2018; Youssef A, 2019; Akinboyo I, 2020*).

Получените от нас резултати показват много ниска честота на каталаза - отрицателните Грам - положителни коки, като причинители

на инфекции на кръвта (единичен изолат *S. bovis*), което е в унисон с данните, съобщени от *Youssef* и *Yemisen* (*Yemisen M, 2016; Youssef A, 2019*). Нашите данни значително се различават от получените от *Akinboyo*, при изследване на инфекциите на кръвта за периода 1997 – 2016г., в което се установява доминиране на представителите на родовете *Enterococcus* и *Streptococcus*, като се асоциират с 57.9% от всички инфекции на кръвта, причинени от Грам - положителни бактерии (*Akinboyo I, 2020*).

В настоящото проучване представителите на Грам - отрицателните бактериални видове се нареждат на второ място като причинители на инфекции на кръвта в проучваната група пациенти. Доминират представителите на семейство *Enterobacteriaceae*, като *E. coli* е най – честият изолат (57.9%). С много по-нисък относителен дял са представени неферментиращи глюкоза Грам – отрицателни бактерии (НФГБ) като *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *B. cepacia* (21.1%). Получените от нас данни са подобни на тези, докладвани от *Balian* и *Youssef* (*Balian C, 2018; Youssef A, 2019*). Други автори също идентифицират *E. coli* като най-чест причинител на бактериемии (*Ge J, 2018; Youssef A, 2019; Akinboyo I, 2020*). В контраст на получените от нас данни, *Yemisen* отчита доминиране на НФГБ (*A. baumannii*, *S. maltophilia*, *P. aeruginosa*) над представителите на разред *Enterobacteriales* в проучване обхващащо 11 годишен период (2000 – 2011г.) (*Yemisen M, 2016*). Същият автор за по-ранен период (2000 – 2005г.) установява Грам – отрицателните бактерии като водещи причинители на инфекции на кръвта, но след 2005г. съобщава за рязка промяна и нарастване броя на Грам – положителните бактериални изолати, като промяната в етиологичния спектър се обяснява с използването на различни кондициониращи режими преди трансплантациите, антибиотичната профилактика, както и промяната в глобалната антибиотична резистентност (*Yemisen M, 2016*).

Етиологичната структура на инфекциите на кръвта при пациенти след ХСКТ и ХМЗ е била обект на множество задълбочени проучвания в продължение на години, като през последните 30 години тя показва тенденция да се променя. През миналия век, Грам – положителните бактерии са смятани за най – честите инфекциозни агенти, водещи до бактериемия в неутропенични пациенти. Около 2000г. започва промяна в тази структура, като се отчита доминиране на Грам – отрицателните бактерии. Например за периода 2013 – 2014г. *Youssef et al.* установяват увеличаване честотата на Грам – отрицателните бактериемии. Предприетата промяна в терапевтичния и профилактичния режим, изразяваща се в замяна на

piperacillin/tazobactam с карбапенем повлиява благоприятно и през следващия документиран период (2015 – 2017г.) се отчита намаляване на Грам – отрицателните причинители от 72% на 29%, но това се съпътства с многократно нараснала честотата на Грам – положителните бактериемии - от 28% до 70% (*Youssef A, 2019*).

Някои автори смятат, че видът на етиологичния причинител на инфекциите на кръвта при пациенти с ХСКТ зависи от ресурсите, с които разполагат различните държави и икономическата им развитост. Например Китай и някои развиващи се страни, съобщават за по - висока честота на Грам - отрицателните бактерии в сравнение с Грам - положителните. От друга страна, в развитите страни се документира доминиране на Грам – положителните агенти (*Ge J, 2018*).

Други автори смятат, че по – високата честотата на Грам – положителните бактериемии, докладвана в редица проучвания, се дължи на контаминацията на пробите с кожна микрофлора. Предполага се, че продължителната кожна травма, рядката смяна на SVCs и трудността при поддържането им стерилни, особено при педиатрични пациенти, оказват своя ефект върху вида на изолираните бактерии (*Akinboyo I, 2020*).

В България в проучване, проведено от *Стоева* и кол., върху етиологичната структура на инфекциите на кръвта при пациенти с ХМЗ, хоспитализирани в УМБАЛ „Света Марина“ – Варна в периода 2010 – 2014г. се установява превалиране на Грам – отрицателните микроорганизми (54.7%), като най – голям е дялът на чревните бактерии (*E. coli*, *K. pneumoniae* и *Enterobacter spp.*). Грам – положителните бактерии се изолират в 38%, като доминират *S. aureus* и *Enterococcus spp.* Представителите на род *Candida* се изолират в 6.9% (*Стоева Т, 2016*). Тези данни се различават от резултатите докладвани в настоящото проучване и вероятно са свързани с промяната на терапевтичните и профилактичните режими, режимите на химиотерапия, както и навлизането в широка употреба на SVC през последните години.

Сравнителното проучване на *Калева* и кол. върху етиологичния спектър на инфекциозните усложнения при деца с ХМЗ, обхващащо два периода - 1990 - 1994г. и 1995 - 2003г., установява доминиране на Грам - положителните бактерии (53.2%) като причинители на инфекции на кръвта над Грам - отрицателните (40.3%), а микотичните агенти се докладват в 6.5% от случаите. Най-често се изолират CoNS, следвани от *Klebsiella spp.*, *Enterococcus spp.*, *E. coli* и *P. aeruginosa*. През двата периода не се наблюдава промяна в съотношението между Грам – положителни и Грам – отрицателни

причинители, но през втория период се установява значително повишаване относителния дял на *E. coli* - асоциираните бактериемии (Калева В, 2006).

В настоящото проучване се изолира само един микотичен агент, причинител на инфекция на кръвта, принадлежащ към род *Candida* – *C. krusei* (2.4%). Подобни са и резултатите, съобщени от различни автори, изучаващи етиологията на инфекциите на кръвта. *Yemisen et al.* докладват 6 епизода на фунгемия, причинени от *Candida* spp. (3.1%), като всички гъбички попадат в *nonalbicans* групата (*Yemisen M, 2016*). В проучване на *Youssef et al.* са изолирани 141 инфекциозни агента, но едва 1.4% (*C. albicans*, n=2) са гъбички (*Youssef A, 2019*). В друго 4-годишно проучване, проведено от *Mikulska et al.* се докладват 5 изолата *Candida* spp. (*C. glabrata*, n=1; *C. krusei*, n=1; *C. parapsilosis*, n=2) с честота 3.4% (*Mikulska M, 2012*). От проучените данни става ясно, че причинителите на микотични инфекции на кръвта са основно от *nonalbicans* групата и честотата им варира между 1.4% - 3.4%, данни, които подкрепят напълно нашите резултати. Редица учени смятат, че този феномен на изместване на чувствителните *C. albicans* от по – резистентните *nonalbicans* видове се дължи основно на използваната антимикотична профилактика с fluconazole (*Akinboyo I, 2020*).

В проучване, проведено в УМБАЛ „Света Марина“ – Варна от *Стоева* и кол., включващо данни за период от 4 години (2007 – 2011г.) за фунгемии при пациенти от интензивни и неинтензивни звена (включително пациенти с ХМЗ и фебрилна неутропения) се отчита нарастване честотата на фунгемииите, както и изместване на спектъра от *C. albicans* към *C. nonalbicans* видовете (*Стоева Т, 2013*).

Заклучение

Нашето проучване установява превалиране на Грам – положителните (52.3%) над Грам - отрицателните бактериални видове (45.2%) като причинители на инфекции на кръвта при пациенти след ХСКТ, като най-честите причинители са представителите на нормалната кожна микрофлора (CoNS), факт, който свързваме с влиянието на профилактичния режим в неутропеничния период и използването на SVC. Видът *E. coli* превалира сред Грам - отрицателните микроорганизми. Установяваме нисък относителен дял на фунгемииите, който се асоциира с *Candida nonalbicans* вид (*C. krusei*, 2.4%).

4.2.2. Чувствителност на микробните изолати от кръв към антимикробни лекарствени средства

Чувствителността към набор от антимикробни лекарствени средства на 19 Грам - отрицателни и 22 Грам - положителни бактериални изолата е проучена чрез автоматизираната система Phoenix 100 и микродилуционен метод за определяне на минимална потискаща концентрация (МПК) на colistin.

Грам - отрицателни бактерии

Установената резистентност сред Грам - отрицателни изолати, представители на семейство *Enterobacteriaceae* (n=15) в низходящ ред е както следва: 80% ampicillin (n=12) > 53.3% trimethoprim/sulfamethoxazole (n=8) > 46.7% ciprofloxacin (n=7) > 40% amoxicillin/clavulanate (n=6) > 33.3% levofloxacin (n=5) > 26.6% gentamicin (n=4), cefuroxime (n=4) и cefotaxime/ceftazidime (n=4) > 20% piperacillin/tazobactam (n=3) и cefepime (n=3). Не се доказаха изолати резистентни на imipenem, meropenem, ceftazidime/avibactam, amikacin и colistin.

Изолатът *A. baumannii* демонстрира множествена резистентност към β -лактами (включително карбапенеми), хинолони и аминогликозиди. Чувствителността към colistin е запазена.

При изолатите *P. aeruginosa* и *B. cepacia* complex се установи характерната за тези бактериални видове вродена резистентност към ampicillin, amoxicillin/clavulanate, cefuroxime и cefotaxime и съхранена антибиотична чувствителност към останалите тествани препарати.

Грам - положителни бактерии

Резистентността на 21 Грам - положителни бактериални изолата, представители на род *Staphylococcus* (CoNS, n=18; *S. aureus*, n=3) към основни групи антимикробни средства в намаляващ ред е както следва: 90.5% penicillin (n=19) > 85.7% ceftazidime (n=18) > 71.4% erythromycin (n=15) > 62% ciprofloxacin (n=13) > 52.4% gentamicin (n=12) > 47.6% doxycycline (n=10) > 42.9% trimethoprim/sulfamethoxazole (n=9) > 38.1% clindamycin (n=8). Не се доказаха изолати резистентни на гликопептиди (vancomycin, teicoplanin) и linezolid.

Чувствителността сред изолатите *S. aureus* към всички антибиотици с изключение на penicillin е напълно съхранена. Напълно запазена чувствителност към изпитваните антимикробни агенти

(penicillin, cefoxitin, clindamycin, ciprofloxacin, vancomycin, teicoplanin и linezolid) демонстрира и единствения изолат *Streptococcus bovis* от кръв.

Изолати от род *Candida*

Чувствителността към набор от антимикотични средства (fluconazole, voriconazole, itraconazole, isavuconazole, caspofungin, micafungin, anidulafungin и flucytosine) е проучена чрез микродилуционен метод за определяне на МПК (Sensititre YO3IVD).

За проследявания период от време е изолиран от кръв и идентифициран само един микотичен изолат, който е представител на род *Candida* - *C. krusei* и представлява 2.4% от всички инфекции на кръвта.

Освен характерната вродена резистентност на този вид към fluconazole (МПК > 64 µg/ml), се отчетоха следните стойности на МПК на останалите антимикотици както следва: voriconazole, 1 µg/ml; itraconazole, 0.5 µg/ml; isavuconazole, 0.06 µg/ml; anidulafungin, 0.06 µg/ml; caspofungin, 0.5 µg/ml; micafungin, 0.12 µg/ml и flucytosine, 32 µg/ml. Съгласно използваните европейски и американски стандарти за отчитане на чувствителност към антимикотици, изолатът демонстрира запазена чувствителност към voriconazole, itraconazole, micafungin и anidulafungin. Поради липсата на общоприети стандарти за caspofungin, isavuconazole и flucytosine, установените МПК на тези препарати не бяха интерпретирани като чувствителност, интермедиерна чувствителност или резистентност.

Обсъждане

В настоящото проучване чувствителността към антимикробни лекарствени средства на 42 неповтарящи се клинично значими микробни изолата от хемокултури на 26 пациенти след ХСКТ и поставен SVC е проучена чрез автоматизирани и микродилуционни МПК методи.

CoNS са най-често изолираните бактерии от хемокултури в проучваната група пациенти, както и най-често изолираните Грам - положителни бактерии (81.8%), значително надвишаващи дела на изолатите *S. aureus* (13.6%). В проучваната колекция от стафилококови изолати (n=21) установихме като най-високо, нивото на метицилинова резистентност (85.7%) в сравнение с нивата на резистентност към другите тествани групи антибиотици. Всички CoNS бяха идентифицирани като метицилин-резистентни, но не бяха доказани

MRSA. Метицилин - резистентните стафилококи са сред проблемните за лечение патогени, тъй като са резистентни към всички β -лактами (включително карбапенеми) и много често демонстрират профил на множествена лекарствена резистентност. Наред с β -лактамата резистентност, тези изолати показваха значително редуцирана чувствителност и към други антимикробни групи агенти, варираща от 44.4% за сулфонамиди и линкозамиди до над 80% за макролиди. Добре известен факт е, че резистентността към methicillin е документирана по-често при CoNS, отколкото при *S. aureus*. Нашите резултати са в съответствие с данните, докладвани от други автори и подкрепят това твърдение (Busca A, 2012).

Тревожен резултат е установеният висок процент стафилококови изолати с резистентност към макролиди, хинолони и аминогликозиди (над 50%), агенти, обикновено предпочитани при инфекции, причинени от Грам-положителни бактерии и явяващи се алтернатива на β -лактамите. Редица ръководства за пациенти, преминали ХСКТ и в ранен следтрансплантационен етап или в случаите на епизод на фебрилна неутропения, препоръчват профилактика или терапия с хинолони (Verlinden A, 2020). Наблюдаваната значително редуцирана чувствителност към тези антимикробни средства (62%) е с потенциал да компрометира превантивните и лечебни стратегии при тези пациенти.

Разумен избор за емпирична терапия на бактериемия, свързана с CoNS, са гликопептидните антимикробни средства vancomycin и teicoplanin, които обичайно са със запазена активност и срещу метицилин-резистентни *S. aureus* (MRSA)/ метицилин-резистентни коагулаза-негативни стафилококи (MRCoNS). В случай на колонизация на SVC от тези микроорганизми се препоръчва неговата подмяна, поради способността на бактериите да образуват биофилм, през който антибиотиците трудно дифундират (Balletto E, 2015). В нашето проучване не се доказва резистентност към стратегическите гликопептиди и оксазолидинони (linezolid) при всички 21 изолата. Трябва да се има предвид обаче, че вече има описани случаи на резистентни към гликопептиди стафилококи (Ghahremani M, 2018).

Положителен резултат от това проучване е, че за разлика от CoNS, *S. aureus* изолатите демонстрират запазена чувствителност към всички антимикробни средства с изключение на penicillin.

Сред Грам - отрицателните бактерии, асоцииращи се с бактериемии в настоящото проучване, най-голям относителен дял се пада на представителите на семейство *Enterobacteriaceae* (78.9%). Групата на β -лактамните антибиотици са едни от най - често

използваните антимикробни агенти в клиничната практика, особено в случаите на емпирична терапия. В нашето проучване най – висока честота на резистентност към тези препарати сред чревните бактерии се отчете към представителите на аминопеницилините (ampicillin, 80%; amoxicillin/clavulanic acid, 40%). По-ниска е резистентността към по-широкоспектърните цефалоспорини от 2 (cefuroxime) и 3 генерация (cefotaxime/ceftazidime) (26.6%), следвани от piperacillin/tazobactam и cefepime (20%). Получените от нас резултати значително се различават от други подобни проучвания. *Barman et al.* провеждат двугодишно проучване, изучавайки етиологичния спектър на причинителите на инфекции на кръвта при пациенти, преминали ХСКТ и техния профил на резистентност (*Barman P, 2020*). Те докладват за пълна липса на чувствителност към ampicillin сред чревните бактерии, както и редуцирана чувствителност към останалите β -лактами: amoxicillin/clavulanic acid (93.6%), piperacillin/tazobactam (85.5%), трета и четвърта генерация цефалоспорини – 97.6% и 89.4%, съответно (*Barman P, 2020*). Подобно на *Barman, Lubwama et al.* съобщават за многократно завишена резистентност сред изолати *E. coli*, *K. pneumoniae* и *Enterobacter spp.*, причинители на инфекции на кръвта при пациенти с фебрилна неутропения и онкологични заболявания, към широко използвани β -лактамни антибиотици: над 90% за ampicillin и amoxicillin/clavulanic acid, 85% за втора и трета генерация цефалоспорини и 65% за piperacillin/tazobactam (*Lubwama M, 2019*). Тези данни се подкрепят и от *Ge et al.*, които в продължение на пет години (2012 – 2017) изследват 336 пациенти с ХМЗ, преминали ХСКТ. Авторите съобщават за пълна липса на чувствителност към ampicillin сред изолати *E. coli* и значително редуцирана към останалите β -лактами (76.9% - 100%) (*Ge J, 2018*).

Бета - лактамните антибиотици са препарати с добра поносимост, широк спектър на действие и бактерициден ефект. Тези им качества ги превръщат в едни от най – често предпочитаните антибиотици, както при хоспитализирани пациенти, така и в амбулаторни условия. Честото им използване, обаче, обуславя възникването на бактериална резистентност към тях. Най - честият и добре проучен механизъм, обуславящ възникване на β - лактамна резистентност се асоциира с продукцията на ензими, хидролизиращи тези антимикробни препарати. Сред най - проблемните изолати са тези, проявяващи устойчивост към широкоспектърните цефалоспорини от трета и четвърта генерации, която най-често е медирана от продукцията на широкоспектърни бета-лактамази (ESBLs). В настоящото проучване делът на ESBL продуцентите сред

коллекцията от изолати от кръв, отнасящи се към семейство *Enterobacteriaceae* е 20%, което беше доказано чрез използваните молекулярно-генетични методи (виж т. 4.3). При един изолат *E. coli* се документира резистентност към трета генерация цефалоспорини, но запазена чувствителност към четвърта генерация (сефериме). Вероятно е този феномен да се дължи на хиперпродукция на придобита AmpC бета-лактамаза от клас C. Подобен резултат се съобщава и от *Yemisen et al.* (20.6%) (*Yemisen M, 2016*). За разлика от нашите данни, други трансплантационни центрове съобщават за много по – висока честотата на ESBL продуценти, асоцииращи се с бактериемии. *Lubawa et al.* съобщават, че 41% от тестваните ентеробактерии в тяхното проучване са ESBL продуценти (*Lubawa M, 2019*). Според *Gustinetti et al.* най – честите ESBL продуценти сред ентеробактериите са *E. coli* и *K. pneumoniae*. В тяхно систематично проучване се съобщава за повишаване на честотата на тези изолати, като в някои страни този процент варира от 11% до 69%. В проучване проведено в Южна Корея, включващо неутропенични пациенти, ESBL продуциращите *E. coli* и *K. pneumoniae* са били отговорни за 26% от инфекциите, асоциирани с резистентни бактерии, а в италианско кохортно проучване честотата на тези изолати е значително по-висока – около 40% (*Gustinetti G, 2016*).

Карбапенемните антибиотици (meropenem, imipenem) са сред препоръчаните препарати на първи избор при доказване на ESBL продуцент като причинител на инфекции на кръвта. Следвайки тези препоръки, в миналото е отчетено понижаване на броя на ESBL – асоциираните инвазивни инфекции, но само няколко години след въвеждането на тази практика, започват да нарастват съобщенията за чревни бактерии, проявяващи резистентност и към тези стратегически антибиотици (*Logan LK, 2012; Labaste F, 2019*). Наред с ESBL продуцентите, бактериите, носещи гени за устойчивост към карбапенемите са едни от най – проблемите за лечение микробни агенти. В международен план в последните години се докладват данни за непрекъснато увеличаваща се честота на карбапенем-резистентни (CPR) бактерии, поради което през 2017г. СЗО обявява бактериалните видове, резистентни към карбапенемии (*A. baumannii, P. aeruginosa*, представители на семейство *Enterobacteriaceae*) за глобална заплаха и ги включва в първа група агенти с висок приоритет за създаване на нови антимикробни средства с активност към тях (*WHO, 2017*). Сред групата на представителите на семейство *Enterobacteriaceae* в настоящото проучване не бяха доказани CPR изолати, причинители на бактериемии. Множество автори съобщават различни от нашите

результати. Например *Cao et al.* анализират в продължение на 4 години епизодите на инфекции на кръвта в пре-енграфтмънт периода при пациенти след ХСКТ и докладват честота от 17.9% на бактериемите, причинени от CPR ентеробактерии (*Cao W, 2021*). В други хематологични центрове, честотата на този тип инфекции е много по – висока. По данни на *Lubawa et al.* 45% от причинителите на инфекции на кръвта в тяхното проучване са CPR *Enterobacteriaceae*, подобни са и резултатите докладвани от *Barman et al.* (22.9% - 44.8%) (*Lubawa M, 2019; Barman P, 2020*).

Поради широкия си антимикробен спектър, флуорохинолоните са сред препаратите на първи избор за профилактика при неутропенични пациенти с онкологични заболявания. Още повече, в голям брой проучвания се съобщава, че флуорохинолоните са по-ефективни от trimethoprim/sulfamethoxazole за редуциране на инфекциозните усложнения. През 2007г. Европейската конференция по инфекции одобрява антибактериалната профилактика с флуорохинолони и ги включва в препоръките за превенция и лечение на пациенти с левкемия, като профилактиката се препоръчва за високорискови пациенти с неутропения с очаквана продължителност на неутропенията повече от седем дни (*Servidio AG, 2021*). Нашите резултати показват високи нива на хинолонова резистентност – над 40% за ciprofloxacin и над 30% за levofloxacin. Други автори съобщават за много по-високи нива, вариращи между 70% - 95.2% (*Ge J, 2018; Lubwama M, 2019; Barman P, 2020*). Подобни са и данните, докладвани от *Mikulska et al.* – 73% резистентност към хинолони сред Грам – отрицателните бактерии, причинители на инфекции на кръвта при пациенти с ХСКТ (*Mikulska M, 2012*). В контраст с тези резултати, в изследване на *Yemisen et al.* се докладва за едва 10% Грам – отрицателни бактерии с липса на чувствителност към ciprofloxacin/levofloxacin (*Yemisen M, 2016*).

Наред с хинолоните, аминогликозидите са алтернатива на β -лактамните антибиотици, а в много случаи се използват и в комбинация с тях с цел постигане на синергистичен ефект и подобряване изхода от инфекцията при септични пациенти. В нашето проучване резистентността към gentamicin е над 20%. Положителен резултат обаче е установената напълно съхранена активност на amikacin сред чревните изолати от кръв. Други автори съобщават за значително по-високи нива на резистентност към gentamicin (67.3% - 75%) и amikacin (28.6% - 50%) (*Ge J, 2018; Lubwama M, 2019; Barman P, 2020*).

В настоящото проучване сред препаратите с най-висока активност срещу изолати, представители на семейство *Enterobacteriaceae* са цефалоспориновия антибиотик от 3-та генерация ceftazidime, потенциран с новия бета-лактамазен инхибитор avibactam, както и colistin, смятани за стратегически антимикробни средства и такива на последен избор в случаи на инфекции, причинени от множествово резистентни (MDR) бактерии и CPR ентеробактерии. Въпреки това, вече има съобщения за резистентни и към тези антибиотици бактерии (Gogry FA, 2021; Xu T, 2021).

Групата на НФГБ в това проучване, представена от *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *B. cepacia*, се явява трета по честота като причинител на бактериемии в пациенти преминали ХСКТ след стафилококите и представителите на семейство *Enterobacteriaceae* за проучвания период от време. При три от тези изолати, отнасящи се към видовете *P. aeruginosa* и *B. cepacia*, се установи единствено характерната за тях вродена резистентност (аминопеницилини, първа и втора генерация цефалоспорини), без данни за придобита резистентност към други антибиотици. Не бива да се забравя, че инфекциите, причинени от тези микроорганизми, са сред най-проблемните за лечение именно заради вродената им и често придобита антибиотична резистентност, като се асоциират и с висока смъртност (Ku NS, 2011; Montero MM, 2020). Вродената резистентност на тези бактериални видове не трябва да бъде пренебрегвана и при необходимост от емпирично използване на антимикробни лекарствени средства, трябва да се подбират такива, които имат и антипсевдомонадна активност.

Единственият кръвен изолат *A. baumannii* в това проучване демонстрира фенотип на множествена резистентност: пълна липса на чувствителност към всички тествани препарати (β -лактами, хинолони, аминогликозиди и сулфонамиди), с изключение на colistin. Подобно на CPR ентеробактерии, CPR *A. baumannii* и *P. aeruginosa* се смятат за сериозна заплаха за общественото здраве именно поради липсата на активни препарати срещу тях и съответно адекватно терапевтично поведение, което за пациенти след ХСКТ е от критична важност. За MDR *A. baumannii*, причинители на инфекции на кръвта в пациенти след ХСКТ съобщава и Barman, като установява 84% дял на тези изолати (Barman P, 2020). Други автори като Mikulska, Wang и Youssef съобщават за значително по-ниски проценти - 35%, 16% и 21%, съответно (Mikulska M, 2009; Wang L, 2015; Youssef A, 2019).

В нашето проучване се документира един епизод на фунгемия, причинен от *C. krusei*. Наскоро публикуваните препоръки за първична

профилактика при пациенти след ХСКТ са за използването на антимикотици от групата на азолите в зависимост от рисковите фактори (вид на трансплантацията, подлежащо заболяване, очаквана продължителност на неутропенията и др.) (Teh BW, 2021). При пациентите с висок риск, препарат на избор е posaconazole или неговата алтернатива voriconazole, докато при пациенти с нисък риск, fluconazole е медикаментът на първи избор (Teh BW, 2021). При доказване или съмнение за инвазивна инфекция, причинена от *Candida* spp. ехинокандините са препаратите на избор, с алтернатива липозомален amphotericin B (Rahi MS, 2021). Редица автори докладват, че голяма част от причинителите на фунгемии от род *Candida* са чувствителни към voriconazole и ехинокандини, но резистентни към fluconazole (Mikulska M, 2012; Barman P, 2020). Нашият изолат демонстрира типичната за този вид вредна резистентност към fluconazole, но запазва чувствителност към препоръчваните за терапия и профилактика антимикотици (триазоли и ехинокандини). За съжаление, в научната литература вече има съобщения за резистентност и към voriconazole и ехинокандини в инвазивни изолати *Candida* (Phu TT, 2019; Posteraro B, 2020).

Заключение

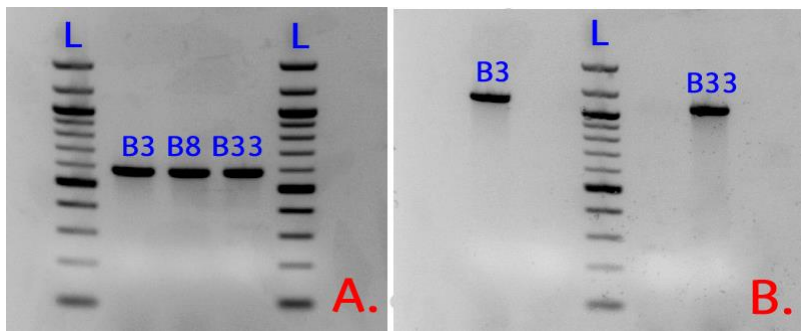
Изпитването на чувствителността към антимикробни лекарствени средства установи висок относителен дял на methicillin – резистентни стафилококи сред причинителите на инфекции на кръвта (44%), както и високи нива на резистентност към ampicillin, ciprofloxacin и trimethoprim/sulfamethoxazole сред чревните бактерии. Делът на резистентните към цефалоспорини от трета генерация представители на семейство *Enterobacteriaceae* е 26.7%, като делът на ESBL продуцентите е 20%. С най-добра активност са imipenem/meropenem, piperacillin/tazobactam, amikacin и vancomycin, което ги прави подходящи препарати за начално емпирично лечение в случаите на фебрилна неутропения и септично състояние. Препаратите ceftazidime/avibactam и colistin запазват ефективността си и могат да бъдат използвани при възникване на инфекции, дължащи се на микроорганизми с множествена резистентност. В случаите на поставен SVC и съмнение за катетър – асоциирана инфекция е препоръчително стартиране на терапия с гликопептид с оглед високия относителен дял на MRCoNS в етиологичната структура на инфекциите на кръвта при пациенти след ХСКТ.

4.3. ПРОУЧВАНЕ МЕХАНИЗМИТЕ НА РЕЗИСТЕНТНОСТ ЧРЕЗ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ МЕТОДИ КЪМ ЦЕФАЛОСПОРИНИ ОТ ТРЕТА ГЕНЕРАЦИЯ И КАРБАПЕНЕМИ ПРИ ГРАМ-ОТРИЦАТЕЛНИ БАКТЕРИИ И МЕХАНИЗМИТЕ НА МЕТИЦИЛИНОВА РЕЗИСТЕНТНОСТ ПРИ *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ОТ КРЪВ

В проучваната колекция от 42 изолата от кръв, 4 Грам - отрицателни изолата (*E. coli*, n=2; *E. cloacae*, n=1; *A. baumannii*, n=1) демонстрираха резистентност към трета и четвърта генерация цефалоспорини, а един от тях и към карбапенеми (*A. baumannii*). Осемнадесет CoNS се идентифицираха фенотипно като метицилин – резистентни. Тези общо 22 изолата бяха подложени на молекулярно – генетично изследване чрез PCR с цел доказване носителство на гени, медиращи съответния тип резистентност (най-често срещаните в представителите на семейство *Enterobacteriaceae* гени, кодиращи широкоспектърни β -лактамази (ESBLs) – CTX-M, SHV, TEM и карбапенемази (VIM, IMP, KPC, NDM, OXA-48, OXA-23, OXA-58, OXA-24), както и *mecA* и *mecC* гените, асоцииращи се с метицилинова резистентност). При 3 изолата (*E. coli*, n=2 и *E. cloacae*, n=1) бе извършено нуклеотидно секвениране с цел доказване конкретния тип бета-лактамаза.

PCR метод за доказване на гени, кодиращи CTX-M, SHV и TEM ESBLs

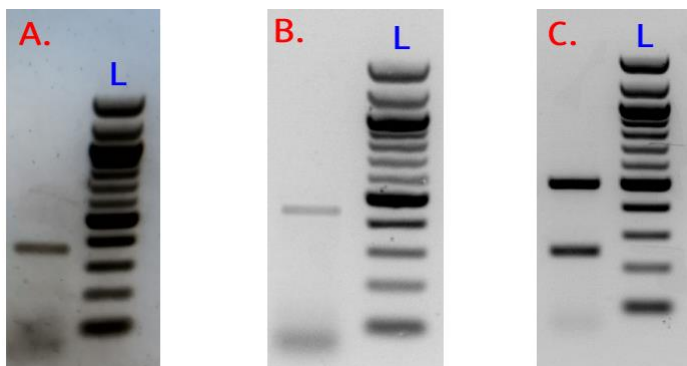
При 3 бактериални изолата от хемокултури (*E. coli*, n=2; *E. cloacae*, n=1) се приложи PCR за доказване на *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} и *bla*_{TEM} гените. И при трите изолата се получи амплифициран продукт с големина 585 bp, съответстващ на *bla*_{CTX-M-like}, а при два от тях - *E. coli*, n=1 и *E. cloacae*, n=1, се доказва и наличие на *bla*_{TEM-like} (1075 bp) (Фигура 3А). Не се доказаха носители на *bla*_{SHV-like}.



Фигура 3А. PCR детекция на *bla* гени, асоцииращи се с бета-лактамна резистентност. А. Детекция на *bla*_{CTX-M} (585 bp); В. Детекция на *bla*_{TEM} (1075 bp); L, 100 bp ДНК маркер, B3 и B8 (*E. coli*); B33, *E. cloacae*.

PCR метод за доказване на гени, кодиращи VIM, IMP, KPC, NDM, OXA-48, OXA-23, OXA-58, OXA-24 карбапенемази

При един бактериален изолат от хемокултура (*A. baumannii*) се приложи PCR за доказване на *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24/40}, *bla*_{OXA-58} гените. Получиха се амплификационни продукти с големина 390 bp, 438 bp, 246 bp, 501 bp съответстващи на *bla*_{VIM-like}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{OXA-24/40-like} и *bla*_{OXA-23-like} (Фигура 3В).



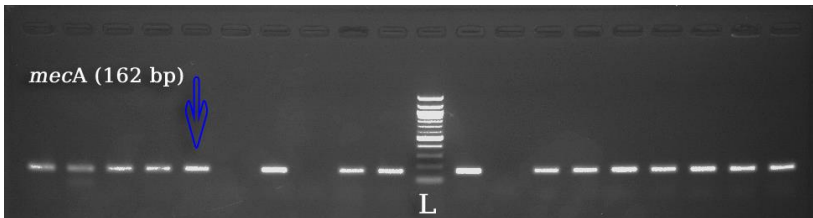
Фигура 3В. PCR детекция на *bla* гени в кръвен изолат *A. baumannii*. А. *bla*_{VIM} (390 bp); В. *bla*_{OXA-48} (438 bp); С. *bla*_{OXA-23} (501 bp), *bla*_{OXA-24/40} (246 bp). L, 100 bp ДНК маркер

Секвениране на гени, кодиращи ESBLs

Всички CTX-M и TEM положителни изолати бяха тествани със CTX-M-P1/P2 и TEM A/B праймери и дадоха положителна реакция, което потвърди наличието на CTX-M 1-ва група и гени *bla*_{TEM-like}. Чрез нуклеотидно секвениране се идентифицира наличието на CTX-M-15 и TEM-1 в съответните изолати.

PCR метод за доказване на метицилинова резистентност

Всички изолати *Staphylococcus* spp. (n=21) бяха подложени на PCR за доказване на гените *mecA* и *mecC*, кодиращи метицилинова резистентност. При 18 изолата (85.7%), всички фенотипно определени като метицилин – резистентни, се визуализира PCR продукт с големина 162 bp (фигура 3С), отговарящ на *mecA* гена. *MecA* положителни бяха всички CoNS. Сред изолатите *S. aureus* (n=3), всички фенотипно определени като метицилин чувствителни, не се доказаха *mec* гени. Всички тествани изолати бяха отрицателни за *mecC* гена.



Фигура 3С. PCR детекция на *mecA* и *mecC* гени, асоцииращи се с метицилинова резистентност. L, 100 bp ДНК маркер.

Обсъждане

През последните години в световен мащаб сме свидетели на непрекъснато нарастване броя на бактериите, проявяващи множествена резистентност, като с особена сила този феномен се забелязва сред Грам – отрицателните микроорганизми – представителите на семейство *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*, които са и сред най-важните в медицинско отношение бактериални видове. Поради възникване на устойчивост към препарати, често влизащи в състава на емпиричните режими, инфекциите, причинени от MDR бактериите често се асоциират със закъснение в стартирането на адекватна терапия, което от своя страна води до неблагоприятен изход от инфекциозното

усложнение, особено в случаите на имунокомпрометирани пациенти, каквито са пациентите след ХСКТ.

Основният механизъм на резистентност сред представителите на разред *Enterobacterales* към β -лактамни антибиотици се свързва с продукцията на β -лактамази от различни молекулярни класове (А, В, С, D), някои от които с потенциал да хидролизират цефалоспорини от трета генерация, известни като ESBLs. Тези ензими са непрекъснато нарастваща и еволюираща група, като до момента има описани над 200 варианта, отнасящи се към три основни групи – TEM, SHV и CTX-M (*Rawat D, 2010*). След TEM и SHV ESBLs, CTX-M са третата най – голяма група широкоспектърни ензими, представени от CTX-M-15 и CTX-M-3, като най – често се доказват в бактериални видове от семейство *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *K. pneumoniae*) (*Markovska R, 2012*; *Bevan ER, 2017*; *Markovska R, 2017*). Според някои автори тази група ензими са най – широко разпространените ESBLs (*Марковска Р, 2012*; *Markovska R, 2014*; *Mirkalantari S, 2020*). *Bla* гените, отговорни за синтеза на ESBLs, обичайно са локализирани в големи плазмиди, които често носят и други гени, кодиращи резистентност към различни групи антибактериални препарати (аминогликозиди, сулфонамиди, тетрациклини, хинолони) (*Patterson DL, 2000*; *Wang M, 2004*; *Mammeri H, 2005*). Поради тази причина, множествената антибиотична резистентност е често срещана характеристика на ESBL – продуциращите ентеробактерии, превръщайки ги в сериозен терапевтичен проблем за клиничната практика (*Rawat D, 2010*). В настоящото проучване сред общо 15 изолата от кръв, представители на семейство *Enterobacteriaceae*, при три бе установена резистентност към трета и четвърта генерация цефалоспорини (*E. coli*, n=2; *E. cloacae*, n=1). Молекулярно-генетичните експерименти потвърдиха, че и при трите изолата резистентността към широкоспектърните цефалоспорини се медира от наличието на CTX-M-15 ESBL. Доказаната TEM-1 бета-лактамаза в два от изолатите (*E. coli*, *E. cloacae*) е ензим с тясноспектърна активност, хидролизиращ пеницилини и цефалоспорини от първа генерация без активност към широкоспектърните цефалоспорини (*Salverda M, 2010*). В проучване на *Димитрова* и кол. в периода 2014 – 2017г. сред пациенти с ХМЗ са документирани поредица от бактериемии с причинител *E. cloacae*, като авторите доказват *bla*_{CTX-M-15} гена в 93% от изолатите, медиращ резистентността към цефалоспорини от трета и четвърта генерация (*Dimitrova D, 2019b*). В друго проучване, *Ge* съобщава за изолати *K. pneumoniae* от кръв на пациенти след ХСКТ, демонстриращи резистентност, както към трета генерация цефалоспорини, така и към

карбапенеми, като тя се асоциира с продукцията на СТХ-M-15 и модификации, засягащи порнините на външната мембрана (Ge J, 2018).

В последната декада CPR *A. baumannii* се оценяват като едни от най-важните, проблемни за лечение и асоцииращи се с висока смъртност причинители на вътреболнични инфекции - най-често пневмония, свързана с изкуствена вентилация и инфекции на кръвта (Strateva T, 2019). Трудността при лечението на тези инфекции е в резултат на впечатляващия профил на резистентност на тези бактерии (множествена или пан-резистентност) и респективно наличието на изключително ограничен брой антибактериални препарати с несигурен ефект, каквито са colistin и tigecycline (Piperaki ET, 2019). Резистентността на *A. baumannii* към β -лактами (вкл. карбапенеми) се медира най-често от ензимния механизъм, свързан с продукция на β -лактамази, някои, от които с карбапенемазна активност, от класовете В (метало-бета-лактамази) и D (оксацилинази). Метало-карбапенемазите от клас В са най-проблемните, поради своя много широк хидролитичен спектър: хидролизират всички β -лактамни антибиотици с изключение на aztreonam. Оксацилиназите от клас D са голяма група ензими с вариабилна активност срещу различните β -лактами (вкл. карбапенеми), като някои от тях са документирани почти единствено в *A. baumannii* – OXA-23, OXA-58, OXA-24/40 (Diene SM, 2014). Други ензими от клас D, като OXA-48, имат слаба хидролизираща активност срещу карбапенемите и са по – често срещани в представителите на чревните бактерии (особено *K. pneumoniae*) (Evans BA, 2014). Терапията на инфекциите, причинени от CPR *A. baumannii*, които обикновено демонстрират профил на множествена или пан-резистентност е силно затруднена. Към момента се препоръчва използването на colistin, tigecycline, sulbactam, minocycline и някои нови агенти, сред които cefiderocol и eravacycline (Piperaki ET, 2019).

В настоящото проучване единственият изолат *A. baumannii* (с характеристика на множествено резистентен), причинител на бактериемия в пациент след алогенна ХСКТ беше доказан като носител едновременно на четири *bla* гена, кодиращи карбапенемази от два молекулярни класа ензими - *bla*_{VIM-like} (клас В) и *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24/40-like} (клас D), факт който потвърждава генетичната пластичност на този бактериален вид, даваща му възможност да се възползва от многообразието на механизмите на резистентност в условията на висок селективен антибиотичен натиск. Скорошно проучване на Стратева и колектив върху CPR *A. baumannii* в 4 Университетски болници в България доказва дисеминация на *bla*_{OXA-58},

*bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24/40}, вкл. в изолати от кръв (Strateva T, 2019). Първите съобщения за *bla*_{OXA-23} и *bla*_{OXA-58} в *A. baumannii* в България са направени от Стоева и кол. (Stoeva T, 2008; Stoeva T, 2009; Stoeva T, 2014). По-късно Петрова и кол. в продължение на четири години проследяват CPR *A. baumannii*, причинители на инфекции в университетска болница и докладват *bla*_{OXA-23} като най – често асоцииран ензим с устойчивост към карбапенеми (Petrova AP, 2017). Много автори от различни географски региони докладват *bla*_{OXA-23} като най-чест в CPR *A. baumannii*, но също съобщават и за увеличаване броя на изолатите, носители на *bla*_{OXA24/40} и *bla*_{OXA-58} гените, медиращи резистентността към карбапенемни антибиотици (Ji S, 2014; Ayibieke A, 2020). За разлика от споменатите OXA ензими, бета-лактамазата OXA-48 с характеристика на карбапенемаза, се доказва сравнително рядко в *A. baumannii*. Първият такъв изolat е доказан през 2013г. в Португалия (Goncalves D, 2013). В допълнение, в световен мащаб нарастват и съобщенията за *A. baumannii*, продуценти на ензими от клас В (предимно VIM и IMP), като честотата им е различна в различните географски райони (Nikibakhsh M, 2021).

Механизмът на метицилинова резистентност в представителите на род *Staphylococcus* се детерминира най-често от *mecA* гена, разположен на мобилен генетичен елемент наречен Staphylococcal Chromosome Cassette *mec* (SCC*mec*). Изолатите, носители на този ген продуцират алтернативни пеницилин – свързващи протеини (PBP2a), които са с нисък афинитет към β-лактамни антибиотици (Cikman A, 2019). През 2005г. е идентифициран друг ген, също свързан с метицилинова резистентност - *mecA*_{LGA251}, хомолог на класическия *mecA* и наречен през 2012г. *mecC* (Cikman A, 2019). В настоящото проучване при всички MRCoNS механизъм на метицилинова резистентност се медира от *mecA* гена. В проучване на Гергова и кол., включващо изолати *Staphylococcus* spp. от кръв и пунктати, се докладва за висока честота на MRCoNS (93.9%) и MRSA (39.3%), като резистентността към β-лактамни антибиотици при всички изолати е обусловена от *mecA* гена (Gergova R, 2019).

Заклучение

Основният механизъм на резистентност към цефалоспоринони от 3-та генерация в изолати от кръв от семейство *Enterobacteriaceae* в настоящото проучване се асоциира с продукцията на CTX-M-15 ESBL, резултат, който потвърждава широкото географско разпространение на този тип ESBLs. В карбапенем – резистентния изolat *A. baumannii* се доказва носителството на четири *bla* гена, кодиращи карбапенемази от клас В (*bla*_{VIM-like}) и клас D (*bla*_{OXA-48-like},

*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24/40-like}). Метицилиновата резистентност, доказана във всички CoNS, се свързва с *mecA* гена.

4.4. СЛАЙМ ПРОДУКЦИЯ В ИЗОЛАТИ *STAPHYLOCOCCUS* SPP.

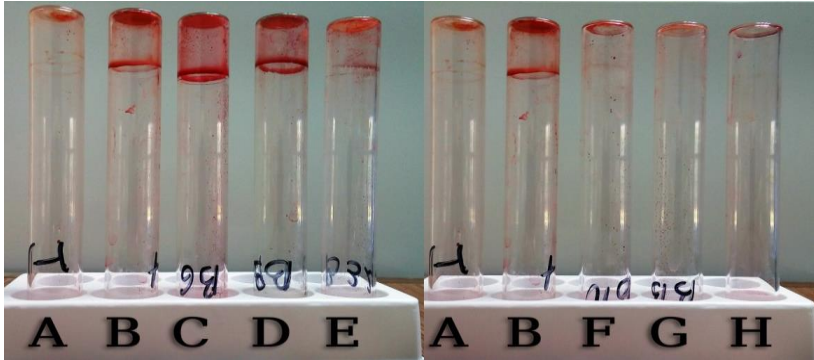
Всички двадесет и един клинично значими изолата *Staphylococcus* spp. (n=18, CoNS; n=3, *S. aureus*), изолирани от кръв и асоцииращи с инфекции на кръвта при 17 пациента с ХСКТ и поставен SVC, бяха подложени на фенотипни и молекулярно – генетични тестове за доказване на слайм продукция. Двата използвани фенотипни метода (посявка на Congo red агар, CRA и тестът на Christensen в епруветка, ТТ) позитивираха при 13 изолата (61.9%) (включително силни и слаби слайм продуценти) (Фигура 4 и 5, таблица 6).

При 10 (47.6%) от изследваните изолати (*S. epidermidis*, n=9, *S. haemolyticus*, n=1) чрез PCR се доказва наличието на *ica* гени (Фигура 6). В *S. aureus* и *S. hominis* не се документираха *icaA* или *icaD* гени.

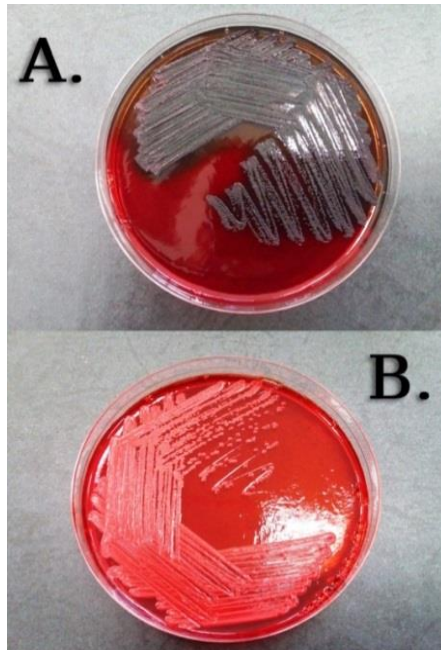
Трите използвани метода (CRA, ТТ, PCR) са позитивни при 5 (23.8%) от тестваните изолати. Пет *ica* носители, демонстрират различни комбинации от резултати, получени с фенотипните методи (Таблица 6). Три *ica* – отрицателни изолата (*S. aureus*, *S. hominis* и *S. haemolyticus*) са положителни само с ТТ теста. Други два *ica* – отрицателни изолата, демонстрират слайм продукция само със CRA фенотипния тест (Фигура 5). Общо 15 изолата (71.4%) бяха доказани като слайм продуценти при използване на фенотипните и/или PCR метода.

В цялата изследвана колекция, 6 изолата (28.6%) са отрицателни за слайм продукция и по трите метода.

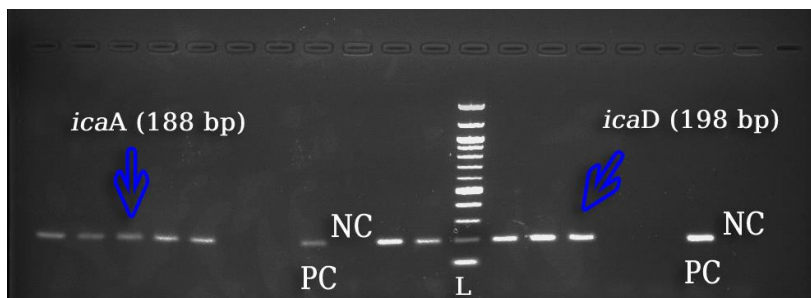
Всички *ica* – положителни изолати са и *mecA* носители. Установена бе статистическа значима зависимост между носителството на *ica* и *mecA* гените ($p=0.002$).



Фигура 4. Тест на Christensen. А, отрицателна контрола; В, положителна контрола; С и D: силни слайм продуценти; Е, слаб слайм продуцент; F, G и H: HE-продуценти



Фигура 5. Congo red agar тест. А. Положителен резултат; В. Отрицателен резултат.



Фигура 6. PCR детекция на *icaA* и *icaD* гените. PC, позитивна контрола (*S. epidermidis* ATCC 35984); NC, отрицателна контрола (*S. epidermidis* ATCC 12228); L, 100 bp ДНК маркер

Таблица 6. Резултати от фенотипните и PCR тестовете за доказване на слайм продукция в 21 клинично значими изолата *Staphylococcus* spp. от кръв на пациенти с ХСКТ.

Бактериални изолати	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	CRA	TT	<i>mecA</i>	Чувствителност към FOX*
<i>S. epidermidis</i> , n=4	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	R
<i>S. haemolyticus</i> , n=1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	R
<i>S. epidermidis</i> , n=1	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	R
<i>S. epidermidis</i> , n=2	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	R
<i>S. epidermidis</i> , n=2	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	R
<i>S. haemolyticus</i> , n=1	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	R
<i>S. hominis</i> , n=1	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	R
<i>S. aureus</i> , n=1	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	S
<i>S. aureus</i> , n=1	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	S
<i>S. aureus</i> , n=1	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	S
<i>S. epidermidis</i> , n=3	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	R
<i>S. haemolyticus</i> , n=2	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	R
<i>S. hominis</i> , n=1	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	R

CRA - Congo red агар тест; TT - тест на Christensen в епруветка; FOX - cefoxitin (*индикатор за метицилинова резистентност).

Обсъждане

Бактериалните инфекции на кръвта при пациенти след ХСКТ са често свързани с наличието на SVC или увреждане на лигавиците/кожата. Използването на SVC води до нарушаване на целостта на кожата, с последващата колонизация на чуждото тяло най-често с резидентна кожна микрофлора, каквито са CoNS, бактерии със слаб вирулентен потенциал (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* и др.). Колонизацията на SVC е важен рисков фактор за катетър-свързани инфекции и бактериемия. CoNS и особено *S. epidermidis* са сред най-често изолираните бактерии, като са отговорни за приблизително 25% от всички описани епизоди на бактериемия при пациенти с ХСКТ, докато по-вирулентните видове (*Staphylococcus aureus*) са изолирани в много по-нисък процент (5%) (*Mikulska M, 2014*). В настоящото проучване бактериемията, асоциираща се с различни видове стафилококи се доказват в 46.7%, доминирайки леко над Грам - отрицателните бактериемии.

Смята се, че увеличеният брой на този вид инфекции се свързва с навлизането на биополимери в медицинската практика (поливинилхлорид, полиетилен, полиуретан и др.) и честото им приложение при високорискови пациенти (неутропенични, трансплантирани и др.) (*Petrelli D, 2006*). Способността на CoNS да прилепват към повърхността на изкуствените медицински изделия в резултат на производството на слайм е техният най-значим фактор на вирулентност, който медира развитието на тези инфекции (*Fey PD, 2011*). В допълнение, слаймът повишава бактериалната резистентност към антимикуробни агенти и имунната система на пациента, причинявайки трудни за елиминиране инфекции (*Klingenberg C, 2005; Pourmand MR, 2011*). Редица проучвания показват, че в началната фаза на микробно прикрепване към изкуствената повърхност, полизахаридният междуклетъчен адхезин (PIA), медиран от оперона *ica*, който се състои от четири основни гена (*icaA, icaB, icaC, icaD*), взема директно участие (*Fitzpatrick F, 2005; Fey PD, 2011*). В лабораторната практика са въведени различни фенотипни и молекулярно-генетични методи за доказване на слайм продукция като Конго рот агар (CRA), тест на Кристенсен в епруветка (ТТ), PCR и др. (*Christensen GD, 1982; Freeman DJ, 1989*).

В допълнение, голяма част от продуциращите слайм *S. epidermidis* изолати, свързани с катетър – асоциирани инфекции, са идентифицирани като носители на гени, медиращи метицилинова резистентност (*Kozitskaya S, 2005*). Много автори съобщават за висок процент на methicillin – резистентни CoNS, причиняващи

бактериемии, отколкото за такива, причинени от MRSA (*Hong J, 2013; Mikulska M, 2014; Weissner M, 2017*).

Поради високия относителен дял на бактериемииите, причинени от представители на род *Staphylococcus* в проучваната група пациенти, си поставихме задача да проучим чрез различни методи способността за слайм продукция сред тези изолати като техен основен фактор на патогенност и вирулентност. Сред колекцията от двадесет и един клинично значим изолати *Staphylococcus spp.*, получени от хемокултури на 17 пациенти, всички с поставен CVC и фебрилна неутропения, като слайм продуценти чрез използваните 2 фенотипни и 1 молекулярно-генетичен методи, бяха идентифицирани общо 15 изолати (71.4%). Тринадесет изолати (61.9%, 9 CoNS и 3 *S. aureus*) бяха доказани като продуценти на слайм чрез фенотипните CRA и/или ТТ. Близки до нашите резултати са докладвани от Prasad и Hussein, които чрез CRA идентифицират между 65% - 69% слайм-продуциращи *S. epidermidis* от голям брой тествани изолати (*Prasad S, 2012; Hussein RM, 2018*).

В настоящото проучване десет CoNS (47.6%) носят както *icaA*, така и *icaD* гени. В съответствие с нашите резултати, Pinheiro et al. откриват *icaA/icaD* в 43.9% (*Pinheiro L, 2014*). Образуването на биофилм е свързано с производството на PIA, полизахарид, който медира началните етапи на слайм продукция. PIA е продукт на оперон *icaADBC*, състоящ се от четири гена. Сред тях *icaA* и *icaD* са най-важните. Последните проучвания показват силна връзка между наличието на тези гени и образуване на голямо количество слайм (*El-Mahallawy HA, 2009*). Други автори също намират *icaC* гена за важен, тъй като ко – експресията му с *icaA* и *icaD* води до синтез на по - дълъг олигомер, който действа като начална точка за прикрепване на полизахаридни остатъци. Ролята на *icaB* все още не е ясна, но най-вероятно е свързана със синтеза на секреторен протеин, който не е пряко свързан с PIA (*Oliveira A, 2010; Gowrishankar S, 2016*).

В нашето проучване три PCR положителни *S. epidermidis* изолати демонстрираха липса на производство на слайм по CRA метода. В допълнение четири *ica* положителни *S. epidermidis* бяха с отрицателен ТТ. Подобни резултати са докладвани и в други проучвания (*Liberto MC, 2009*). Смята се, че въпреки липсата на производство на слайм, наличието на *ica* гени определя микроорганизмите като потенциални производители. Ruzicka et al. съобщават, че 20% от техните *ica* оперон носители не произвеждат слайм фенотипно (*Ruzicka F, 2004*). Liberto et al. предприемат проучване, за да демонстрират наличието на иРНК като продукт на

експресията на *ica* оперон. Те откриват пет *icaA/icaD* положителни изолата, при които липсва фенотипна експресия. В четири от тях не са открити *icaA* иРНК и/или *icaD* иРНК, което може да обясни липсата на производство на слайм (Liberto MC, 2009). Други автори предполагат, че липсата на *icaC* в някои *icaA* положителни стафилококи може да доведе до липса на производство на слайм (Ziebuhr W, 1999).

Доказано е, че производството на слайм може да бъде свързано и с други фактори. Zmantar et al. демонстрират, че условията на околната среда, в които се инкубират бактериите, могат да повлияят слайм продукцията в *ica* положителни стафилококи (анаеробни условия, повишено количество NaCl и др.) (Zmantar T, 2008). В нашето проучване гените *icaA* и *icaD* не бяха открити в 5 изолата, които имаха положителни фенотипни тестове (CRA и/или TT). Предполагаме, че други механизми са свързани с производство на слайм при тези стафилококи. Някои автори препоръчват търсенето на *aap*, *atlE* и *bhp* гени, свързани с алтернативен път за производство на слайм (Petrelli D, 2006; Oliveira A, 2010).

В настоящата работа 10 стафилококови изолата са носители едновременно на *mecA* гена и на *icaA/icaD*. Подобни резултати са докладвани от други автори, като се смята, че съвместната експресия на *ica* и *mecA* гени е признак за повишена вирулентност и резистентност в *Staphylococcus* spp. (Petrelli D, 2006; Zhou S, 2013). Свързаната с *mec* метицилинова резистентност сред стафилококите е основен здравен проблем, тъй като голяма част от изолатите, носещи тези гени, се откриват в болничната среда и колонизират пациентите, както и че не се повлияват от най-често използваната в практиката β-лактамна група антибиотици (Mathur T, 2006; Rocchetti TT, 2018). В този смисъл при започване на емпирична терапия в случаите на бактериемии, асоциирани с CoNS, трябва да се вземе под внимание факта за широката разпространеност на метицилиновата резистентност сред тези стафилококови видове и да се стартира лечение с антибиотици, които по-лесно проникват през слайма (ciprofloxacin, rifampicin).

Преобладаващият бактериален вид в настоящото изследване е *S. epidermidis*, както и повечето *icaA/icaD* положителните изолати, принадлежат към вида *S. epidermidis* (n = 9, 42.9%). Тези резултати потвърждават *S. epidermidis* като най-често асоцииращ се с катетър-свързани инфекции поради способността му да произвежда слайм и придобива резистентност към β-лактами (Zhou S, 2013).

В настоящото проучване доказахме статистически значима корелация между носителството на *icaA/icaD* и на *mecA* гена. Подобно

на нашите данни, Zhou et al. наблюдават статистически значима връзка между носителство на *ica* и *mecA* гена ($p < 0.05$) (Zhou S, 2013). В друго проучване, Cafiso et al. установяват, че *ica* положителните стафилококи са по-склонни да демонстрират резистентност към различни антимикробни средства (оxacillin, аминокликозиди, флуорохинолони, макролиди и сулфонамиди), отколкото *ica* отрицателните. Те съобщават за силна връзка между наличието на *mecA* и *ica* оперон ($p < 0.05$) (Cafiso V, 2004; Shrestha LB, 2018). Тези данни са в унисон с нашите резултати, че носителите на *ica* гени са потенциално по-устойчиви на действието на антимикробни препарати.

Заклучение

Нашето проучване доказва висок относителен дял на слайм-продуциращи или потенциално слайм-продуциращи CoNS (71.4%), свързани с *ica* гени, сред които най-чест е вида *Staphylococcus epidermidis*. С оглед откриване на алтернативни пътища за продукция на слайм, препоръчително е комбинираното използване на фенотипните и генетични методи за изследване. Всички *ica*-положителни изолати са и methicillin резистентни (*mecA* положителни), което се асоциира с трудни за лечение и ерадикация изолати.

4.5. ЕТИОЛОГИЧЕН СПЕКТЪР НА ИНВАЗИВНИТЕ МИКОТИЧНИ ИНФЕКЦИИ

За периода 2019 – 2021г. сред проучените 74 пациента, при 26 бяха диагностицирани инвазивни бактериални и микотични инфекции (35.1%). Инвазивна микотична инфекция се документира при 15.3% ($n=4$) от тези пациенти, като инфекция на кръвта се отчете при един (3.8%) (виж т. 4.2) и инвазивна пулмонална аспергилоза (ИПА) - при трима пациенти (11.5%). Не се документираха инвазивни микотични инфекции, причинени от други микотични агенти (*Mucorales* sp., *P. jirovecii*, *Cryptococcus* sp. и др.).

Следвайки критериите за включване (посочени в раздел „Материали и методи“), в периода 2019 - 2021г. за ИПА чрез доказване наличието на *Aspergillus* галактоманан антиген (ГМ) в серум и/или БАЛ са изследвани общо 33 пациенти след ХСКТ (44.6%) (Таблица 7). Възрастта на пациентите варира между 14 г. - 63 г., като дванадесет (36.4%) от тях са жени, а 21 (63.6%) - мъже. Шест (18.2%) от изследваните пациенти са с автоложна, а 27 (81.8%) - с алогенна

ХСКТ. Терапия с piperacillin/tazobactam е започната при 4 пациента преди тестването за ГМ, а 29 получават хинолонов препарат или trimethoprim/sulphamethoxazole.

Таблица 7. Разпределение на изследваните пациентите в зависимост от основаната им диагноза.

Подлежащо заболяване	n (%)
Остра миелоидна левкемия	8 (24.2)
Нехочкинов лимфом	7 (21.2)
Хочкинов лимфом	6 (18.2)
Остра лимфоидна левкемия	5 (15.2)
Множествена склероза	3 (9.1)
Апластична анемия	2 (6.1)
Множествен миелом	1 (3.0)
Миелодиспластичен синдром	1 (3.0)
Общо	33 (100.0)

От всички 33 изследвани пациенти са получени 74 клинични материала: 70 серумни и 4 проби от БАЛ. В зависимост от получените резултати от изследването за ГМ, пациентите се подразделят в 3 групи (Таблица 8).

Позитивен ГМ резултат е отчетен при 3 пациенти (9.1%) (група I), като оптичната плътност (OD), измерена в серумните проби, варира между 1.6 – 3.37. При един от тези пациенти е изследван и БАЛ, който е интерпретиран като положителен.

Пациентите, при които бе отчетен отрицателен ГМ резултат (16 серумни и 1 БАЛ проби), но с данни от образното изследване, суспектни за ИПА (n=5) (гр. II), са интерпретирани като възможни случаи на ИПА. Пациентите с отрицателен ГМ тест и липса на клинични данни (вкл. образна находка), са категоризирани като „липса на ИПА“ (n=25) (гр. III). Нито един от изследваните случаи не бе категоризиран като доказан. Плесени от род *Aspergillus* не се изолираха при култивирането на БАЛ проби.

Таблица 8. Резултати от *Aspergillus* галактоманан антиген теста.

Пациенти, брой (n)	Тествани серумни проби (n)	Тествани проби БАЛ (n)	Образна находка	Категория (възможен, вероятен, доказан, липса на ИПА)
Група I n=3 (положителни) (пациенти с ID 21, 13, 33 - за детайли виж таблица 9)	n=5* положителни (от 15 проби) (OD=1.02 – 3.37)	n=1 положителен (OD=2.09)	+	Вероятен случай на ИПА
Група II n=5 (отрицателни)	n=16* (отрицателни)	n=1 (отрицателен)	+	Възможен случай на ИПА
Група III n=25 (отрицателни)	n=39* (отрицателни)	n=2 (отрицателни)	-	липса на ИПА

ID - идентификационен номер на пациента, *Изследвани са повече от една серумна проба на пациент; **OD** - оптична плътност; „+“, наличие на находка; „-“, липса на находка.

При пациентите, категоризирани като възможен случай на ИПА (група II) не бе иницирана антимикотична терапия. При проследяване на тези пациенти, ГМ тестът остана отрицателен.

Етиотропна терапия с voriconazole с начална доза 6mg/kg и поддържаща - 4mg/kg през 12 ч., бе започната при 3 пациенти с положителен резултат за ГМ в серумна проба и/или БАЛ (ID 13, 21, 33), определени като вероятни случаи на ИПА (група I) (Таблица 9).

При пациент с ID 21 са документирани два епизода на завишен серумен ГМ (изследвани общо 8 серумни проби) (Таблицы 8 и 9). По време на първия епизод (01.07.2020 г.), не бяха открити образни данни, характерни за ИПА. Според новите препоръки на Европейската организация за изследване и лечение на рак и Консорциумът за обучение и изследване на изследователската група по микози, този случай се категоризира като „липса на ИПА“, но въпреки това бе започнато лечение с voriconazole. При проследяване на резултатите, тестът негативира и терапията бе преустановена, тъй като бе прието, че серумният ГМ е фалшиво положителен, повлиян от мукозита на храносмилателната система, използваните β – лактамни антибиотици, вливанията на биологични продукти и електролитни разтвори. Вторият епизод настъпва 4 месеца (09.11.2020 г.) след първия, като е потвърден

с образни изследвания и съпроводен с клинична симптоматика. Класифициран е като вероятен случай и веднага е започнато лечение с voriconazole в съответната дозировка.

Таблица 9. Характеристика на пациентите с положителен резултат за *Aspergillus* галактоманан.

Пациент					Данни			
ID	Пол	Възраст	Основна диагноза	Тип ХСКТ	Серум	БАЛ	Брой БКК	Ден на ЕЛ
21	жена	14 г.	ОЛЛ	АСКТ	01.07.20 г (+, 2.31 ODI)	-	0.14 x 10⁹	19.11.20
					09.11.20 г (+, 1.6 ODI)			
13	жена	39 г.	ХЛ	АСКТ	31.08.20 г (+, 2.73 ODI)	-	0.87 x 10⁹	01.09.20
33	мъж	47 г.	ОМЛ	АСКТ	11.10.21 г (+, 3.37 ODI)	04.11.21 г (+, 2.9 ODI)	0.01 x 10⁹ 16.17 x10 ⁹	01.12.21
					19.10.21 г (+, 1.02 ODI)			

ID - идентификационен номер; **ХСКТ** - хематопоеична стволово-клетъчна трансплантация; **БАЛ** - бронхоалвеоларен лаваж; **БКК** - бели кръвни клетки; **ЕЛ** - смъртен изход; **ODI** - индекс на оптична плътност; **ОЛЛ** - остра лимфобластна левкемия; **ХЛ** - Ходжкинов лимфом; **ОМЛ** - остра миелобластна левкемия; **АСКТ** - алогенна стволово-клетъчна трансплантация.

Смъртен изход беше документиран и при тримата пациенти, като при двама от тях, ИПА беше определена като основна причина за смърт.

Обсъждане

Аспергилозата е екзогенна микотична инфекция, причинявана от широко разпространените плесенни гъбички, принадлежащи към род *Aspergillus*, като *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* и *A. terreus* са най-

важните клинично значими видове (*Denning DW, 1998*). Инфекциите, свързани с *Aspergillus* spp. може да варират от локални кожни форми до тежки инфекции с висока смъртност като ИПА (*Kousha M, 2011; Bozhkova M, 2018*). Много рядко тези плесени могат да причинят инвазивни заболявания при имунокомпетентни индивиди (*Denning DW, 1998; Gabrovska N, 2019*).

Основните рискови фактори за ИПА са продължителната неутропения (< 500 клетки/ μ l за повече от 10 дни), ХМЗ, химиотерапия, ХСКТ, продължителна (> 3 седмици) и високодозова кортикостероидна терапия и прогресиращ СПИН (*Kousha M, 2011*).

Откриването на ГМ антиген на *Aspergillus* и бета-D-глюкан чрез имуноензимни и молекулярно-генетични методи като PCR, понастоящем се използват за диагностициране на ИПА (*White P, 2015*). Тези методи притежават висока специфичност и чувствителност. Тестът за ГМ антиген, сравнително евтин и бърз, е специално пригоден за диагностициране на ИПА при пациенти с неутропения (*Viscoli C, 2004*).

Инвазивната инфекция, причинена от плесени *Aspergillus*, е едно от най-тежките усложнения при пациенти с неутропения, ХМЗ и тези с ХСКТ. Ранното откриване и навременното стартиране на етиологична терапия са от съществено значение за изхода на заболяването и терапевтичния успех (*Shannon VR, 2015*).

Честотата на ИПА при пациенти с ХМЗ и ХСКТ варира, като средните стойности достигат 12% - 15% (*Wald A, 1997; Marr KA, 2002; Fukuda T, 2003; Morgan J, 2005; Van de Peppel R, 2018*). В нашето проучване честотата на ИПА при изследваните пациенти е 11.5% (n=3).

В широкомащабно ретроспективно многоцентрово проучване, проведено за по-добро характеризиране на инвазивни микотични инфекции при пациенти с хематологични злокачествени заболявания без ХСКТ, е отчетено, че най-висок процент (94% от случаите) на ИПА се наблюдава при пациенти с остра левкемия (миелобластна и лимфобластна) (*Pagano L, 2006*). Същото проучване съобщава, че пациентите с остра левкемия имат по-висок риск от развитие на ИПА и неговите усложнения. Подобно на тези резултати, ние открихме, че 66.7% (n=2) от нашите пациенти с положителен тест за ГМ са пациенти с остра левкемия.

В настоящото проучване всички пациенти (n=3) с положителен ГМ тест са преминали алогенна ХСКТ. Според литературата, честотата на ИПА при индивиди с ХСКТ е променлива. В зависимост от трансплантационния център, честотата на ИПА сред

пациентите, подложени на алогенна ХСКТ, варира от 4 до 24%, като повечето проучвания отчитат 8-15%. За разлика от алогенна ХСКТ, честотата на ИПА след автоложна ХСКТ е значително по-ниска, варираща от 1 до 2% (*Wirk B, 2009*). Смъртността, свързана с ИПА при реципиенти на ХСКТ, може да достигне драматичните 50-80% (*Lin SJ, 2001*).

В настоящото проучване е открит един фалшиво положителен резултат. Този пациент е проследен, повторно тестван и по-късно е отчетен отрицателен резултат. Едно от възможните обяснения за това явление е фактът, че към момента на микробиологичното изследване пациентът е лекуван с piperacillin/tazobactam, доказан е мукозит на храносмилателната система и има множество вливания на биологични продукти и водно-солеви разтвори. Подобно на нашите наблюдения, други автори съобщават за фалшиво положителни резултати, свързани с парентерално приложение на piperacillin/tazobactam или amoxicillin/clavulanic acid (*Mennink-Kersten MA, 2004; Walsh TJ, 2004; Mattei D, 2004*). Описани са и други причини за фалшиво положителни резултати. Освен *Aspergillus* spp. други клинично значими гъбички (*Fusarium* spp, *Penicillium* spp, *Histoplasma capsulatum*) също притежават ГМ в клетъчната си обвивка. В случаи на инфекция, причинена от тези организми, поради кръстосана реактивност, серумният ГМ тест може да бъде фалшиво положителен (*Huang YT, 2007; Wheat LJ, 2007; Tortorano AM, 2012*). Alban Aubry et al. препоръчват наблюдение два пъти седмично на пациенти с положителен ГМ тест, но без клинични симптоми на ИПА, за да се потвърди или отхвърли диагнозата. Тези автори препоръчват 5-дневен интервал между прекратяването на антимиотичната терапия (ако е започната) и следващото изследване на ГМ. Същата изследователска група създава кинетичен модел и установява, че полуживотът на ГМ от контаминирани β -лактамни антибиотици в серума е 2.4 дни, докато средното време до отрицателен серумен ГМ тест е 5.5 дни (*Aubry A, 2006*).

Само един от изследваните пациенти има положителен резултат едновременно в серумна проба и БАЛ. Проведени са множество проучвания върху клиничната значимост на ГМ теста в БАЛ (*Bergeron A, 2010; Fisher C, 2014; Boch T, 2016; Marchesi F, 2019*). Тъй като белият дроб е мястото на първичната инфекция, се смята, че появата на ГМ в БАЛ предхожда появата му в кръвообращението (*Steinbach W, 2012*). Bergeron et al. провеждат проучване за откриване на ГМ в проби от БАЛ, получени от високорискови пациенти с хематологични заболявания и отчитат

средна чувствителност (57.6%) и висока специфичност (95.6%) на ELISA теста (Bergeron A, 2010). В сравнително проучване, Boch et al. съобщават за много по-висока чувствителност за ГМ теста в БАЛ (85%) в сравнение със серумния тест (23%) и специфичност от 88% за двата теста (Boch T, 2016). Съгласно насоките на ESCMID-ECMM-ERS от 2017 г., откриването на ГМ в проби от БАЛ има отлична достоверност, достигайки чувствителност и специфичност съответно от 100% и 90.4%, когато се използват подходящи индекси на оптична плътност (Ullman A, 2018). Други автори демонстрират в експериментални условия, че стойностите на ГМ в БАЛ се повишават по-рано след появата на ИПА, отколкото в серума (Hope W, 2010). Предимството на ГМ теста в БАЛ е, че антимикотичната терапия, започната преди микробиологичното изследване, не повлиява теста и не води до фалшиво-отрицателни резултати (Fisher C, 2014). Недостатъците се свързват най-вече с фалшиво положителни резултати в случаите, когато се използват β -лактамни антибиотици или в случаи на колонизация на дихателните пътища, но без развитие на клинично заболяване (Husain S, 2008). Fisher et al. съобщават, че изследването едновременно на серумни и БАЛ проби за ГМ и интерпретирането им в едно с клиничните данни, може значително да подобри диагностиката на ИПА (Fisher C, 2014).

Трябва да се отбележи обаче, че извършването на бронхоскопия с цел изследване на БАЛ при критично болни пациенти или пациенти с ХМЗ е свързано с висок риск от усложнения като кървене, дихателна недостатъчност или пневмоторакс (Svensson T, 2017).

В допълнение на имунно-ензимния метод за доказване на *Aspergillus* ГМ, откриването на бета-D-глюкан чрез същия метод (специфичност 89.4% и чувствителност 76.9%), както и PCR реакцията също се използват за диагностициране на инвазивни микотични инфекции (White P, 2015). Много проучвания демонстрират предимството на комбинираното използване на тези методи (Reinwald M, 2012; White PL, 2013; Hoenigl M, 2014). Hoenigl et al. съобщават за 100% чувствителност и специфичност от 95% – 98%, когато ГМ тестът се използва в комбинация с PCR (Hoenigl M, 2014).

Няколко насоки за превенция и лечение на инвазивните микотични усложнения (вкл. ИПА) при пациенти с ХСКТ са публикувани и се използват в клиничната практика: Международните насоки за предотвратяване на инфекциозни усложнения при реципиенти на ХСКТ (Tomblin M, 2009), насоки за употреба на антимикробни средства при неутропенични пациенти с рак на

Обществото за инфекциозни заболявания на Америка (IDSA) (*Freifeld AG, 2011*) и насоки на IDSA за диагностика и лечение на аспергилоза (*Patterson TF, 2016*). Приети са две основни стратегии за поведение в случаи на ИПА: 1) започване на първична профилактика и 2) липса на профилактика, но пациентите се наблюдават поне два пъти седмично с помощта на лабораторни биомаркери. Опитът на центъра обикновено определя коя от двете стратегии ще бъде използвана. Изборът на противогъбични средства за първична профилактика зависи от това дали индивидът е неутропеничен или е с възстановен неутрофилен брой, наличието на GVHD или дали е започната имunosупресивна терапия. При лица с неутропения и алогенна ХСКТ се препоръчва posaconazole (200 mg три пъти дневно) или voriconazole (200 mg два пъти дневно), докато при пациенти с тежка GVHD и имunosупресивна терапия, posaconazole, voriconazole или itraconazole (400 mg/ден) са препаратите на избор.

При всеки високорисков пациент появата на симптоми, съмнителни за ИПА, трябва да бъде индикация за бързо започване на адекватна антимикотична терапия. При пациенти с алогенна ХСКТ и неутропения се препоръчва начална терапия с voriconazole (2x6 mg/kg IV на ден 1 и 2-4 mg/kg IV от ден втори). Ако не може да се започне лечение с voriconazole, се препоръчва липозомален amphotericin B като алтернативен антимикотичен агент. Също така липозомалния amphotericin B се предписва като част от схемите за профилактика (*Ullman A, 2018*). В нашето проучване пациентите с риск от инфекциозни усложнения са рутинно изследвани за ИПА без започване на профилактика. Противогъбична терапия с voriconazole е започната при 3 пациенти, определени като случаи на вероятна ИПА.

Въпреки въвеждането на някои нови агенти с антиплесенна активност, смъртността, свързана с ИПА по литературни данни остава висока, варираща от 50% до 90% (*Kousha M, 2011*). В настоящото проучване ИПА е приета като основна причина за смъртност при двама от тримата пациенти, при които беше доказан положителен ГМ тест. В проспективно проучване от 2004 до 2009 г. Nicolle et al. установяват, че смъртността на първия и третия месец при пациенти с ХМЗ с ИПА е съответно 13% и 43% (*Nicolle MC, 2011*). В допълнение, друго проспективно италианско проучване, което включва пациенти с алогенна ХСКТ, съобщава за смъртност от 46.3% след ИПА (*Girmania C, 2014*).

Заклучение

ИПА е инфекциозно заболяване с тежко протичане и висока смъртност, което винаги трябва да се подозира при пациенти с неутропения, продължителен фебрилитет, типични образни находки и липса на отговор към антибактериална терапия. Бързата диагноза и незабавното започване на адекватна антимикотична терапия са от решаващо значение за хода и изхода от заболяването. Настоящото проучване върху инвазивните микотични инфекции в пациенти след ХСКТ за периода 2019 – 2021г. доказва честота на ИПА 11.5% (n=3) и смъртност 66.7% (n=2). Нашите резултати демонстрират, че *Aspergillus* ГМ ELISA е надежден метод, който може да се използва, както за диагностика, така и за мониториране отговора на пациента към етиотропната терапия. При липса на противопоказания, едновременно изследване на серум и БАЛ за откриване на *Aspergillus* ГМ е препоръчително.

4.6. ФЕКАЛНО НОСИТЕЛСТВО НА ГЪБИЧКИ И ПРОБЛЕМНИ ЗА ЛЕЧЕНИЕ БАКТЕРИИ: ВИДОВО РАЗНООБРАЗИЕ И ЧУВСТВИТЕЛНОСТ КЪМ АНТИМИКРОБНИ ЛЕКАРСТВЕНИ СРЕДСТВА

С цел проследяване на фекалния колонизационен статус на пациентите с гъбички и проблемни за лечение бактерии като един от важните рискови фактори за потенциални и проблемни за лечение инфекциозни усложнения през проучвания период, са изследвани общо 242 фекални проби от 74 пациенти с ХСКТ. Като проблемни за лечение микроорганизми приехме бактериални изолати, демонстриращи резистентност към трета и четвърта генерация цефалоспорици, карбапенеми и гликопептиди (обикновено с фенотип на множество резистентни) и *Stenotrophomonas maltophilia*.

Извършването на микробиологичния фекален скрининг е част от въведения в клиниката протокол за мониториране на претрансплантационния колонизационен статус на лигавиците на пациентите и при необходимост в следтрансплантационния период. Изолирани и идентифицирани са общо 65 микробни изолата от проби на 36 от 74 изследвани пациенти (49%): 17 микотични и 48 бактериални изолата, отговарящи на определението „проблемни“. При 20 (55.6%) пациенти се изолираха единствено бактерии, при 8 (22.2%) – само гъбички, а при 9 (25%) се доказаха едновременно гъбички и

бактерии. Видовото разнообразие на колонизиращите агенти е представено на таблица 10.

Таблица 10. Видово разнообразие на проблемни микробните агенти, колонизиращи гастро-интестиналния тракт при 36 пациенти след ХСКТ в периода 2019-2021г.

Микроорганизми, изолирани от фекални проби	n (%)
<i>Грам - отрицателни бактерии</i>	33 (50.8)
<i>E. coli</i>	10 (30.3)
<i>Enterobacter cloacae</i>	7 (21.2)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4 (12.1)
<i>Pseudomonas putida</i>	4 (12.1)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3 (9.0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 (6.0)
<i>Pseudomonas mendocina</i>	1 (3.0)
<i>Pseudomonas composti</i>	1 (3.0)
<i>Serratia marcescens</i>	1 (3.0)
<i>Грам - положителни бактерии</i>	15 (23.0)
<i>Enterococcus faecium</i>	15 (23.0)
<i>Гъбички</i>	17 (26.1)
<i>Candida glabrata</i>	7 (41.2)
<i>Candida albicans</i>	3 (17.6)
<i>Candida tropicalis</i>	2 (11.8)
<i>Candida. krusei</i>	2 (11.8)
<i>Candida kefyr</i>	1 (5.8)
<i>Candida dubliniensis</i>	1 (5.8)
<i>Candida parapsilosis</i>	1 (5.8)
Общо	65 (100.0)

4.6.1 Чувствителност на фекалните микробни изолати към антимикробни лекарствени средства

Чувствителността към набор от антимикробни лекарствени средства на 33 Грам – отрицателни и 15 Грам - положителни бактериални изолата е проучена чрез автоматизираната система Phoenix 100, микродилуционен МПК метод за colistin, vancomycin, teicoplanin, а тази на 17 микотични изолати чрез микродилуционен метод и E-test.

Грам - отрицателни бактерии

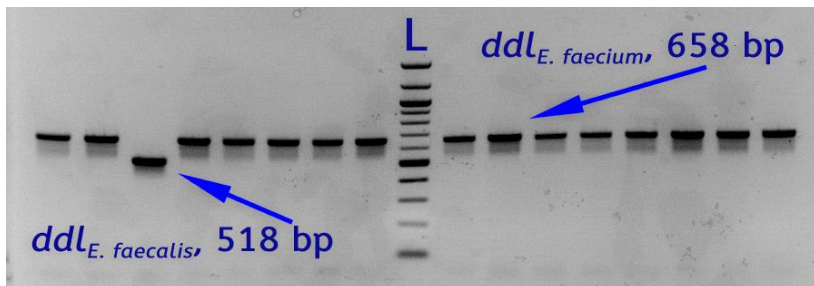
Документираната резистентност сред Грам - отрицателни изолати, представители на разред *Enterobacteriales* (n=22) в низходящ ред е както следва: 100% за cefotaxime/ceftazidime (n=22) и ceftipime (n=22) > 68.1% gentamicin (n=15) > 54.5% ciprofloxacin (n=12) > 45.5% piperacillin/tazobactam (n=10) > 41% за levofloxacin (n=9) и trimethoprim/sulfamethoxazole (n=9) > 4.5% за amikacin (n=1), ceftazidime/avibactam (n=1) и meropenem/imipenem (n=1).

Сред изолатите *Pseudomonas* spp. (*P. putida*, n=4; *P. aeruginosa*, n=2; *P. mendocina*, n=1; *P. composti*, n=1) се установи пълна липса на чувствителност към всички β -лактамни антибиотици (вкл. карбапенеми). Повишена резистентност се документира към хинолони, аминогликозиди и ceftazidime/avibactam. И при трите изолата *S. maltophilia* се установи липса на чувствителност към trimethoprim/sulfamethoxazole.

В цялата група Грам отрицателни изолати (n=32) не се доказва резистентност към colistin.

Грам – положителни бактерии

Всички 15 изолата, първоначално идентифицирани и определени като vancomycin-резистентни *E. faecium* чрез Phoenix BD, демонстрираха липса на чувствителност към всички β -лактамни антибиотици, аминогликозиди и хинолони. Чувствителността към linezolid беше напълно запазена. При тези изолати като потвърдителен беше използван микродилуционния метод за определяне на МПК на vancomycin и teicoplanin (Erba Lachema, Czech Republic). Всички изолати демонстрираха липса на чувствителност и към двата препарата (МПК > 16 $\mu\text{g/ml}$). С цел потвърждаване на видовата принадлежност на изолатите се приложи PCR метод за детекция на *ddl* гените, кодиращи специфични D-alanine-D-alanine лигази в *E. faecium* и *E. faecalis*. При всички 15 изолата се амплифицира продукт с големина 658 bp, отговарящ на *ddl*_{*E. faecium*} (Фигура 7).



Фигура 7. Multiplex PCR за видова идентификация на *Enterococcus* spp. L, маркер 100 bp.

Гъбички

Седемнадесет микотични изолата, изолирани от фекални проби на 17 пациенти (Таблица 11) са подложени на тестове за определяне на тяхната чувствителност към антимикотични препарати чрез микродилуционен МПК метод и Е-тест.

Сред изолатите, за които има общоприети стойности за МПК, най – висока резистентност се отчете към fluconazole (70.6%, n=12), последван от voriconazole (37.5%, n=6), itraconazole (31.3%, n=5) и anidulafungin (26.7%, n=4).

Към два от използваните антимикотици (casprofungin и micafungin) не се демонстрира липса на чувствителност. За други два антимикотични агента (isavuconazole и flucytosine), за които няма приет стандарт, се демонстрираха МПК, вариращи от 0.01 – 32 µg/ml.

Candida albicans изолатите (n=3) демонстрираха напълно запазена чувствителност към всички изследвани антимикотици.

В четири изолата (*C. glabrata*, n=2; *C. tropicalis*, n=1; *C. krusei*, n=1) (23.5%) се доказва резистентност едновременно към антимикотици от групата на азолите (fluconazole, voriconazole, itraconazole) и ехинокандините (anidulafungin). Антимикотичната чувствителност на изолатите е представена на таблици 11 и 12.

Таблица 11. Чувствителност към антимикотични лекарствени средства на по – често изолирани представители на род *Candida*.

Антимикотици		<i>C. glabrata</i> (n=7)	<i>C. albicans</i> (n=3)	<i>C. krusei</i> (n=2)	<i>C. tropicalis</i> (n=2)
Fluconazole	MIC µg/ml	32 - > 256	0.12 – 0.50	NA	256
	AC MIC µg/ml	0.001 - 16	2 - 4		2 - 4
	S (n, %)	0.0	n=3, 100%		0.0
	R (n, %)	n=7, 100%	0.0		n=2, 100%
Voriconazole	MIC µg/ml	0.25 - 2	0.03 – 0.04	0.25 - 2	32
	AC MIC µg/ml	1*	0.06 – 0.25	1*	0.12 – 0.25
	S (n, %)	n=5, 71.4%	n=3, 100%	n=1, 50%	0.0
	R (n, %)	n=2, 28.6%	0.0	n=1, 50%	n=2, 100%
Itraconazole	MIC µg/ml	0.5 - > 16	0.01 – 0.06	0.25 – 0.5	> 16
	AC MIC µg/ml	2*	0.06	1*	0.125
	S (n, %)	n=5, 71.4%	n=3, 100%	n=2, 100%	0.0
	R (n, %)	n=2, 28.6%	0.0	0.0	n=2, 100%
Isavuconazole	MIC µg/ml	0.03 – 0.75	0.01 – 0.03	0.19 – 0.25	0.38 - > 32
	AC MIC µg/ml	ND	ND	ND	ND
	S (n, %)	NA	NA	NA	NA
	R (n, %)	NA	NA	NA	NA
Flucytosine	MIC µg/ml	0.03 – 0.12	0.01 – 0.06	0.12 - 32	0.06 – 0.12
	AC MIC µg/ml	ND	ND	ND	ND
	S (n, %)	NA	NA	NA	NA
	R (n, %)	NA	NA	NA	NA
Caspofungin	MIC µg/ml	0.03 – 0.06	0.01 – 0.03	0.03 - 1	0.06 – 0.25
	AC MIC µg/ml	0.12 – 0.5**	0.25 – 1**	0.25 – 1**	0.25 – 1**
	S (n, %)	n=7, 100%	n=3, 100%	n=2, 100%	n=2, 100%
	R (n, %)	0.0	0.0	0.0	0.0
Micafungin	MIC	0.008 – 0.01	0.008 – 0.01	0.01 –	0.01

	$\mu\text{g/ml}$			0.12	
	AC MIC $\mu\text{g/ml}$	0.03	0.016	0.25*	0.06*
	S (n, %)	n=7, 100%	n=3, 100%	n=2, 100%	n=2, 100%
	R (n, %)	0.0	0.0	0.0	0.0
Anidulafungin	MIC $\mu\text{g/ml}$	0.02 – 0.09	0.01	0.04 – 0.12	0.04 – 0.12
	AC MIC $\mu\text{g/ml}$	0.06	0.03	0.06	0.06
	S (n, %)	n=5, 71.4%	n=3, 100%	n=1, 50%	n=1, 50%
	R (n, %)	n=2, 28.6%	0.0	n=1, 50%	n=1, 50%

AC – гранични стойности на МПК по стандарт; ND – няма определена МПК; *стойности според ECOFF; **стойности според CLSI; NA, неприложимо; S – чувствителен; R – резистентен; MIC – минимална потискаща концентрация;

Таблица 12. Чувствителност към антимикотични лекарствени средства на по – редки представители на род *Candida*.

Антимикотици		<i>C. kefyr</i> (n=1)	<i>C. parapsilosis</i> (n=1)	<i>C. dubliniensis</i> (n=1)
Fluconazole	MIC $\mu\text{g/ml}$	0.5	1	> 256
	AC MIC $\mu\text{g/ml}$	1*	2 - 4	2 – 4*
	S (n, %)	n=1	n=1	0.0
	R (n, %)	0.0	0.0	n=1
Voriconazole	MIC $\mu\text{g/ml}$	0.01	0.01	32
	AC MIC $\mu\text{g/ml}$	ND	0.12 – 0.25	0.12 – 0.25*
	S (n, %)	NA	n=1	0.0
	R (n, %)	NA	0.0	n=1
Itraconazole	MIC $\mu\text{g/ml}$	0.12	0.03	> 16
	AC MIC $\mu\text{g/ml}$	ND	0.125	0.06*
	S (n, %)	NA	n=1	0.0
	R (n, %)	NA	0.0	n=1
Isavuconazole	MIC $\mu\text{g/ml}$	0.003	0.04	0.02
	AC MIC $\mu\text{g/ml}$	ND	ND	ND
	S (n, %)	NA	NA	NA
	R (n, %)	NA	NA	NA

Flucytosine	MIC µg/ml	8	0.06	0.12
	AC MIC µg/ml	ND	ND	ND
	S (n, %)	NA	NA	NA
	R (n, %)	NA	NA	NA
Caspofungin	MIC µg/ml	0.03	0.03	0.03
	AC MIC µg/ml	ND	2 – 8**	ND
	S (n, %)	NA	n=1	NA
	R (n, %)	NA	0.0	NA
Micafungin	MIC µg/ml	0.06	0.06	< 0.008
	AC MIC µg/ml	ND	2	ND
	S (n, %)	NA	n=1	NA
	R (n, %)	NA	0.0	NA
Anidulafungin	MIC µg/ml	0.09	0.19	0.02
	AC MIC µg/ml	ND	4	ND
	S (n, %)	NA	n=1	NA
	R (n, %)	NA	0.0	NA

AC – гранични стойности на МПК по стандарт; ND – няма определена МПК; *стойности според ECOFF; **стойности според CLSI; NA, неприложимо; S – чувствителен; R – резистентен; MIC – минимална потискаща концентрация;

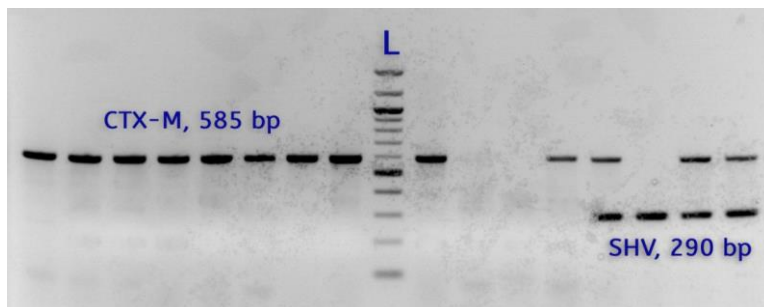
4.6.2 Проучване механизмите на резистентност към стратегически антимикробни лекарствени средства (цефалоспорици от трета генерация, карбапенеми, гликопептиди) чрез молекулярно-генетични методи.

В проучваната колекция от 48 бактериални изолата, получени от фекални проби, 30 изолата - *E. coli*, n=10; *E. cloacae*, n=7; *K. pneumoniae*, n=4; *S. marcescens*, n=1; *P. putida*, n=4; *P. aeruginosa*, n=2; *P. mendocina*, n=1; *P. composti*, n=1, демонстрираха резистентност към трета и четвърта генерация цефалоспорици, а 9 бяха определени като CPR - *P. putida*, n=4; *P. aeruginosa*, n=2; *P. mendocina*, n=1; *P. composti*, n=1; *E. cloacae*, n=1. Всички 15 изолата *E. faecium* се идентифицираха като vancomycin-резистентни ентерококи (VRE). С всички 48 проблемни по отношение антибиотичната си резистентност изолати от фекален скрининг бяха извършени PCR експерименти с цел доказване носителство на гени, медиращи съответния тип резистентност: най-

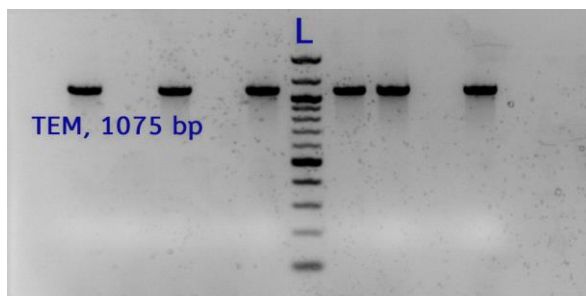
често срещаните в Грам - отрицателни бактерии, гени, кодиращи широкоспектърни β -лактамази (CTX-M, SHV, TEM тип) и карбапенемази (VIM, IMP, KPC, NDM, OXA-48), както и *vanA*, *vanB* и *vanD* гените, асоцииращи се с гликопептидна резистентност в изолати *Enterococcus* spp.

- **PCR експерименти за доказване на гени, кодиращи CTX-M, SHV и TEM ESBLs в изолати от разред *Enterobacteriales***

При 22 (33.8%) бактериални изолата, демонстриращи резистентност към цефалоспоринови от трета генерация (*E. coli*, n=10; *E. cloacae*, n=7; *K. pneumoniae*, n=4; *S. marcescens*, n=1) бяха доказани следните гени: *bla*_{SHV-like} (n=4, *K. pneumoniae*), *bla*_{CTX-M-like} (n=20; *E. coli*, n=9; *K. pneumoniae*, n=3; *E. cloacae* complex, n=7; *S. marcescens*, n=1), *bla*_{TEM-like} (n=14; *E. coli*, n=5; *K. pneumoniae*, n=2; *E. cloacae*, n=6; *S. marcescens*, n=1). В 13 (46.7%) от изолатите се идентифицираха повече от един ген, както следва: *bla*_{CTX-M-like} + *bla*_{TEM-like} (n=13; *E. coli*, n=4; *K. pneumoniae*, n=2; *E. cloacae*, n=6; *S. marcescens*, n=1); *bla*_{CTX-M-like} + *bla*_{SHV-like} (*K. pneumoniae*, n=3); *bla*_{CTX-M-like} + *bla*_{TEM-like} + *bla*_{SHV-like} (n=2, *K. pneumoniae*) (Фигури 8 и 9).



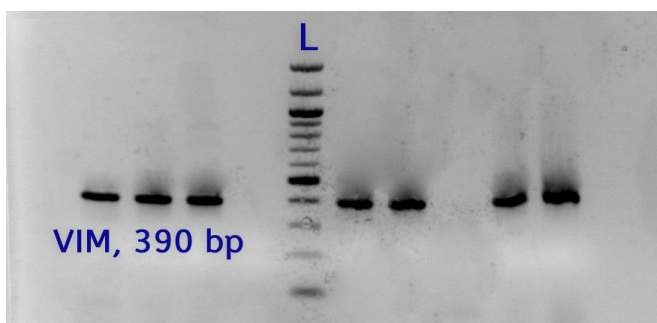
Фигура 8. Multiplex PCR за доказване на CTX-M и SHV в изолати *E. coli* и *K. pneumoniae*. L, маркер 100 bp



Фигура 9. PCR за доказване на TEM в изолати *E. coli*. L, маркер 100 bp

- PCR експерименти за доказване на гени, кодиращи KPC, VIM, IMP, NDM и OXA-48 карбапенемази в изолати от род *Pseudomonas* и *Enterobacter cloacae*

От общо 9 CPR изолата от фекален скрининг (*P. putida*, n=4; *P. aeruginosa*, n=2; *P. mendocina*, n=1; *P. composti*, n=1; *E. cloacae*, n=1), при 7 се получи амплификационни продукти с големина 390 bp, съответстващи на *bla*_{VIM-like}, а при два от изолатите (*P. aeruginosa* и *P. putida*) не се получи амплификационен продукт с нито един от използваните праймери, поради което се предположиха други механизми, медиращи резистентност към карбапенеми (Фигура 10).



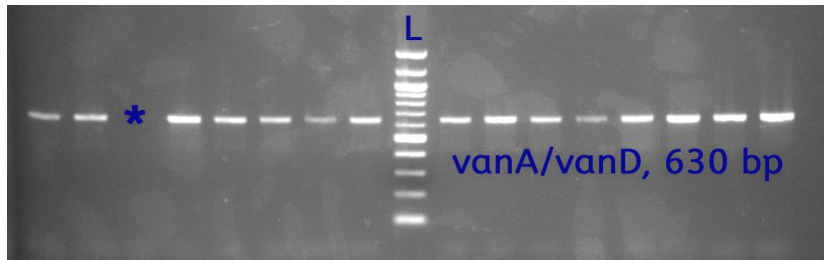
Фигура 10. PCR за доказване на VIM ген в *Pseudomonas* spp. L, маркер 100 bp

- **Секвениране на гени, кодиращи ESBLs и карбапенемази**

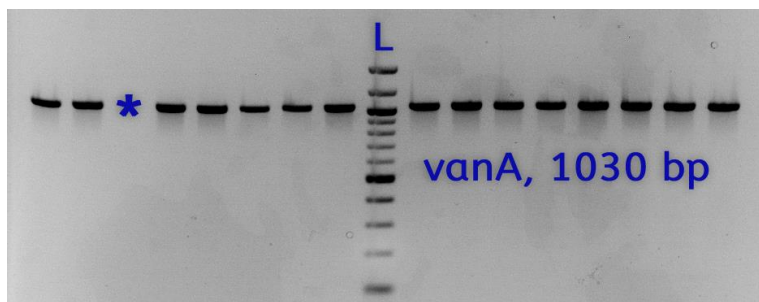
Шестнадесет репрезентативни изолата според фенотипа на антибиотична резистентност и резултатите от епидемиологичното типизиране (*E. coli*, n=4; *K. pneumoniae*, n=2; *E. cloacae*, n=2; *S. marcescens*, n=1; *Pseudomonas* spp., n=7) бяха тествани със СТХ-М-Р1/Р2 и TEM A/B, SHV и VIM праймери и дадоха положителна реакция, което потвърди наличието на СТХ-М 1-ва група, SHV-like, TEM-like и VIM-like гени. Чрез нуклеотидно секвениране се идентифицира наличието на *bla*_{СТХ-М-15} (n=5), *bla*_{СТХ-М-3} (n=3), *bla*_{TEM-1} (n=1), *bla*_{SHV-1} (n=1), *bla*_{SHV-12} (n=1), *bla*_{VIM-1} (n=1) и *bla*_{VIM-2} (n=6) в съответните изолати.

- **PCR експерименти за доказване на гликопептидна резистентност в изолати *Enterococcus faecium***

Всички 15 изолата *E. faecium* се подложиха на скриниращ PCR, доказващ *vanA/vanD* гените (Фигура 11). Всички изолати амплифицираха продукт с големина 610 bp, отговарящ на *vanA/vanD*, а допълнително използвания мултиплексен PCR за *vanA* и *vanB* гените потвърди наличието на *vanA* (Фигура 12).



Фигура 11. Screening PCR за детекция на *vanA/vanD* гените. L, маркер 100 bp; * Негативна контрола (*E. faecalis*).



Фигура 12. Multiplex PCR за детекция на *vanA* и *vanB* гените. L, маркер 100 bp; * Негативна контрола (*E. faecalis*).

Обсъждане

С цел проследяване колонизационният статус на пациентите, включени в настоящия дисертационен труд се проведе фекален скрининг за гъбички и за бактерии, демонстриращи профил на множествена резистентност. Получените резултати доказват висок дял на пациентите с чревна колонизация с този тип мониториранни микроорганизми (49%). Подобни резултати се съобщават и от Scheich et al., които откриват, че 53.8% от техните пациенти след алогенна ХСКТ са с чревно носителство на микроорганизми, проявяващи множествена резистентност (Scheich S, 2018). Други автори, проследяващи колонизационния статус на пациенти след ХСКТ, установяват много по – ниска честота на фекална колонизация – 31% (Bilinski J, 2016).

Сред всички получени бактериални изолати се установи доминиране на Грам – отрицателните бактерии, като представителите на разред *Enterobacterales* са най – многобройни (66.7%), с водещ вид *E. coli*. Грам – положителните бактерии са представени изключително от *E. faecium* (23%). Получените от нас резултати значително се различават от тези на Scheich и Bilinski, които съобщават за по – висока честотата на интестинална колонизация с Грам – положителни бактерии, представени основно от *E. faecium* - 85.9% и 55% съответно (Bilinski J, 2016; Scheich S, 2018).

Освен бактериални изолати, от изследваните фекални проби, се изолират и гъбички, като всички са представители на род *Candida*. Най – голям брой са представители на *nonalbicans* видовете (82.4%), като превалира *C. glabrata* (50%). В проучване, обхващащо 77 пациенти след автоложна и алогенна ХСКТ и проследяващо

микотичното чревно носителство, се установява колонизация при 66% от изследваните пациенти, като най – често се изолира *C. albicans* (Zollner-Schwetz I, 2008). Честотата на *nonalbicans* видовете в същото проучване е значително по – ниска (24%), като се съобщава за доминиране на *C. glabrata* (Zollner-Schwetz I, 2008). Hamzavi et al. провеждат двугодишно проучване сред педиатрични пациенти с ХМЗ и документират 15.4% чревно микотично носителство. С най – голяма честотата се изолира *C. albicans* (72%), която се следва от *C. krusei* и *C. kefyr* (Hamzavi SS, 2019). Посочените данни значително се различават от резултатите, получени в нашето проучване.

От всички изолирани бактерии двадесет и два Грам - отрицателни изолата (46%) се определиха като ESBL продуценти. В проучване за тригодишен период, проследяващо 107 пациенти след алогенна ХСКТ, се доказва 20% чревна колонизация с ESBL продуценти (Bilinski J, 2016). Друго проучване за периода 2006 – 2016г. в Германия сред пациенти с остра миелоидна левкемия и последваща алогенна ХСКТ се открива 20.4% чревно носителство на ESBL – продуциращи *Enterobacteriaceae* (Scheich S, 2018). Сред ESBL продуцентите в нашето проучване се документира редуцирана чувствителност и към други антибактериални агенти, като аминогликозиди, сулфонамиди и хинолони. Тревожна е колонизацията с бактерии, демонстриращи липса на чувствителност към trimethoprim/sulfamethoxazole (41%), ciprofloxacin/levofloxacin (54.5% - 41%) и piperacillin/tazobactam (45.4%), тъй като тези антибактериални препарати са често използвани за профилактика и емпирична терапия при пациенти с фебрилна неутропения. Сред аминогликозидите се забелязва запазена активност на amikacin (4.5%) за разлика от тази на gentamicin (68.1%). В проучване на Scheich et al. се съобщава за пълна липса на чувствителност към хинолони сред всички ESBL продуценти, феномен, който най – вероятно се дължи на комбинирането на гени, отговорни за хинолонова и β -лактамна резистентност в един общ плазмид (Scheich S, 2018).

От всички изолирани бактерии, девет (18.8%) демонстрират резистентност към карбапенеми (*Pseudomonas* spp., n=8; *E. cloacae*, n=1). За ниска честота на CPR бактерии съобщават Scheich et al. (8.5%), като се наблюдава доминиране на *P. aeruginosa* (Scheich S, 2018). Близка честота съобщават Bilinski et al. (6%) (Bilinski J, 2016). В продължение на 8 години Giannella et al. скринират пациенти след трансплантация на солиден орган и документират честота от 26.6% чревна колонизация с CPR ентеробактерии (Giannella M, 2019). Сред

CPR изолати в нашето проучване 8 демонстрират резистентност към ceftazidime/avibactam и всички са чувствителни към colistin.

Три изолата са идентифицирани като *S. maltophilia*, попадащи в групата на полирезистентните бактерии, поради липсата си на чувствителност към всички групи антибиотици (вкл. thrimethoprim/sulfamethoxazole) с изключение на colistin.

Всички изолирани Грам – положителни бактерии са определени като *E. faecium*, проявяващи гликопептидна резистентност. След тестване с микродилуционен метод и определяне на МПК на vancomycin и teicoplanin, се потвърди като VRE. Честотата на VRE в нашето проучване като колонизиращи агенти при пациенти след ХСКТ е 23%. Близки резултати се съобщават и в проучване, проведено в Полша в периода 2010 – 2013г. сред ХСКТ реципиенти – 21% VRE (*Bilinski J, 2016*). Значително по – висок дял на VRE се съобщава в немско проучване за десетгодишен период сред трансплантирани пациенти – 85.9%. Различията в честотата на VRE колонизацията може да се обясни с вида на подлежащото заболяване, терапевтичния план преди трансплантацията, както и с прилагането на антибиотици с цел профилактика като хинолони, за които е известно, че са рисков фактор за колонизация с VRE (*Scheich S, 2018*). При всички 15 VRE изолата linezolid демонстрира запазена активност.

Пациентите с ХМЗ са в риск за възникване на инфекциозни усложнения заради имunosупресията в следствие на основното заболяване и химиотерапията. Инфекциите, причинени от полирезистентни щамове водят до по – висока смъртност, сравнена с тези, причинени от бактерии със запазена чувствителност. През последните години, инфекциозните усложнения, асоциирани с полирезистентни микроорганизми нарастват. Смята се, че това се дължи на широкото използване на антибиотици при хора и животни. Един от основните рискови фактори за възникване на инфекция, причинена от MDR бактерии е предхождаща колонизация с такива бактерии. Поради това, че при голяма част от пациентите с ХМЗ се използва продължителна антимикробна терапия, тези, които преминават през ХСКТ са с по – висок риск да бъдат колонизирани от MDR бактерии преди трансплантацията (*Scheich S, 2018*).

Редица проучвания доказват ролята на чревната микрофлора при ХСКТ за възникване на инвазивни инфекции на кръвта (*Bilinski J, 2016; Ford CD, 2017b; Scheich S, 2017; Giannella M, 2019*). Трансплантацията силно влияе върху интестиналната микробиота. Човешката чревна микрофлора взаимодейства с имунната система на гостоприемника и по – малкото разнообразие води до неадекватен

имунен отговор. При пациенти, които все още са с потисната имунна система след ХСКТ и след експозиция на антибиотици, променената чревна флора може да засегне имунното възстановяване и да обясни високите нива на смъртни случаи, асоциирани с инфекциозна причина при колонизирани пациенти (Scheich S, 2018).

При пациенти с предишна колонизация, селективният натиск може да доведе до селекция на VRE, които да доминират над останалите представители на чревната флора. Знае се, че чревното носителство на VRE е свързано със загуба на микробно разнообразие. Този феномен се асоциира с по – висока честота на GVHD и по – тежкото му протичане (Scheich S, 2018). Освен VRE, колонизацията с *Candida* spp. се асоциира с повишен риск от възникване на остра GVHD (Malard F, 2021).

Седемнадесет колонизиращи микотични изолата, от които 82.5% представители на *C. nonalbicans* видове, бяха подложени на микродилуционни и Е-тест МПК методи за изследване на тяхната чувствителност към набор от антимиотични препарати. Сред *Candida nonalbicans* видовете, отчетената чувствителност е варираща – от напълно запазена до напълно липсваща. Най – висока резистентност сред тестваните изолати се документира към азолните антимиотични и по – специално – fluconazole (70.6%). В нашият трансплантационен център, fluconazole е най – често използваният и е препаратът на първи избор при започване на емпирична антимиотична терапия при пациенти суспектни за микотична инфекция. Получените от нас резултати, подкрепят теорията за селективния натиск и появата на резистентни изолати. Алтернатива на този препарат в нашия трансплантационен център, е по – новият агент от групата на триазолите – voriconazole, проявяващ активност, както срещу fluconazole-резистентни дрожди, така и срещу някои плесени. Към този антимиотик, също са доказани резистентни изолати (*C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*) сред проучената колекция (37.5%).

Инвазивните микотични инфекции са сериозно усложнение при пациенти след ХСКТ. *Candida* spp. се смятат за най – честите причинители на тези усложнения. Предполага се, че инвазивната инфекция се предхожда от колонизация на макроорганизма и е с ендегенен произход, като голям брой проучвания сочат, храносмилателната система за най – честия източник (Nucci A, 2001; Zollner-Schwetz I, 2008). При възникване на инвазивна инфекция, дължаща се на *Candida* spp. (кандидемия), ехинокандините се препоръчат като препарати на първи избор според ECIL 6 (Tissot F,

2017). В нашето проучване не се откриват изолати, резистентни към caspofungin и micafungin, но 4 *Candida nonalbicans* изолата демонстрират резистентност към anidulafungin. В проучване на Zollner-Schwetz сред изолати *C. glabrata*, колонизиращи пациенти след ХСКТ, се съобщава за силно редуцирана чувствителност към азолните препарати fluconazole ($MIC_{90} \geq 64$ mg/l) и voriconazole ($MIC_{90} = 4$ mg/l), данни подобни на нашите (Zollner-Schwetz I, 2008).

В настоящото проучване беше изследвана чувствителността и към един от най – новите азолни антимикотици isavuconazole, за който все още няма общоприет стандарт за отчитане на чувствителност. Тестваните изолати демонстрираха МПК стойности от 0.003 до ≥ 32 μ g/ml. Най – ниски стойности на МПК се отчетоха при *C. kefyr*, а най – високи – *C. tropicalis*. За подобни резултати се съобщава и в двугодишно проучване на чувствителността на 29 различни микотични агента към isavuconazole (Desnos-Ollivier M, 2019).

Тестваните *C. albicans* изолати демонстрираха запазена чувствителност към всички изследвани антимикотици. Близки до нашите резултати съобщават Zollner-Schwetz et al. след изследване на 177 *C. albicans* от фекални проби на пациенти след ХСКТ (Zollner-Schwetz I, 2008).

Сред изследваната колекция от фекални изолати *Candida* spp. се откриоха 4 *nonalbicans* вида, които могат да бъдат определени като полирезистентни, поради документираната липса на чувствителност едновременно към азоли и ехинокандини. Смята се, че този феномен се дължи на селективен натиск. Поради тежката неутропения, последваща ХСКТ, често при пациентите се използва антимикотична профилактика в дози, които се различават от терапевтичните с цел предотвратяване на инвазивна инфекция. Този подход може да доведе до недостигане на нужната концентрация в храносмилателния тракт и адаптиране на гъбичките към съответната концентрация и дори възникване на мутанти, неповлияващи се от високи (терапевтични) дози (Healey KR, 2017).

Една от задачите на настоящият дисертационен труд беше да се идентифицират мехнизмите, свързани с появата на резистентност към широкопектърните цефалоспорини чрез молекулярно-генетични методи. Получените бактериални изолати, демонстриращи резистентност към трета и четвърта генерация цефалоспорини бяха подложени на молекулярно-генетично изследване с цел детекция на гените, кодиращи тази резистентност. Най-широко разпространение беше доказано за *bla*_{CTX-M-like} (91%), като *bla*_{CTX-M-15} е доминиращия вариант, следван от *bla*_{TEM-like} (63.6%) и *bla*_{SHV-like} (18.2%). В миналото

SHV и TEM бета – лактамазите са били доминиращият тип ензими, като SHV са доказвани в много центрове (*Markovska R, 2008*). През 2001 г. в България са доказани първите CTX-M ензими, като разпространението им бързо нараства – от 16.7% (2001г.) до 97% от всички ESBL ензими, като основно се доминират от CTX-M-15, данни съобщавани и в много други географски региони (*R. Markovska, 2018*). В голям брой от тестваните изолати, се доказва носителство на повече от един *bla* ген, което потвърждава мобилността и пластичността на тези гени, както и способността на бактериите за акумулиране на гени, отговорни за продукцията на различни ензими.

Карбапенемната резистентност, доказана в 9 изолата в нашето проучване се асоциира основно с продукцията на VIM-2 (66.7%) в 4 вида *Pseudomonas* spp. и по-рядко с VIM-1 метало - карбапенемазата, доказана в единичен изолат *E. cloacae*. В България има описани единични случаи на *P. aeruginosa*, носители на VIM карбапенемази, като първият случай е съобщен през 2006г. Доказан е генът *bla*_{VIM-15}, който представлява вариант на *bla*_{VIM-2} (*Schneider I, 2008*). Наскоро Strateva et al. съобщава за появата на VIM-2 продуциращ *P. aeruginosa*, принадлежащ към високорисковата група тип 111 (*Strateva T, 2021*). Изолати *E. cloacae*, носителите на *bla*_{VIM-1}, са описани в различни части на света, като се свързват основно с клонално разпространение в болнична среда (*Falcone M, 2009; Heller I, 2012*). Няма предишни данни за документиране на подобен изолат в България.

В настоящото проучване спектърът на Грам - положителни множествоно резистентни изолати, асоцииращи се с фекална колонизация се доминира изключително от vancomycin - резистентни *E. faecium*, всички носители на *vanA* гена. В периода 2017 – 2018г. Hitkova et al. изследват хоспитализирани пациенти за фекално носителство на гликопептид – резистентни ентерококи и съобщават за честота от 29.4% с доминиране на *vanC* гена. Авторите доказват *vanA* едва в 5.5% от изолатите (*Hitkova H, 2019*). В унисон с нашите резултати, в проучване на Strateva et al. включващо изолати *E. faecium* от три големи болница в България, се доказват 51 VRE, като всички са носители на *vanA* гена (*Strateva T, 2018*).

В периода 2017 – 2018г. Станкова и кол. провеждат проучване върху фекални изолати на пациенти, хоспитализирани в 6 големи болници от цялата страна, като ги съпоставят с резултати получени от здрави индивиди. Авторите съобщават за по – висока честота на MDR бактерии, особено ESBL и карбапенемаза продуциращи сред групата на хоспитализираните пациенти в сравнение с тази в групата на здравите. Авторите обясняват разликата с вътреболничното клонално

разпространение на резистентни бактерии, както и с антибиотичния селективен натиск (Станкова П, 2020).

Пациентите с ХСКТ имат чести хоспитализации с цел лечение или проследяване, като този момент се явява важен рисков фактор за колонизация с полирезистентни шамове. В допълнение, голяма част от тези пациенти приемат антибактериални агенти с цел профилактика или терапия, което допълнително води до поява на резистентност сред микроорганизмите. По литературни данни колонизацията с MDR бактерии има различна продължителност, като може да персистира дълго време, което крие риск от дисеминиране на тези микроорганизми и в обществото (Станкова П, 2020).

Заклучение

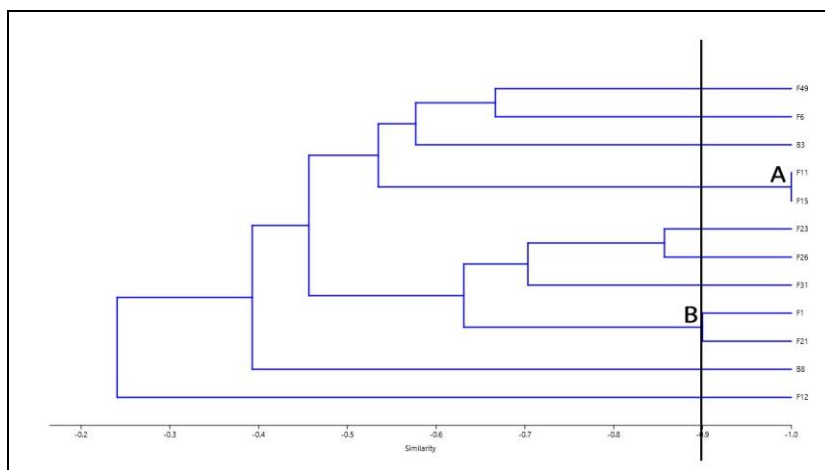
В настоящия дисертационен труд се доказва висока честота на чревна колонизация с гъбички и полирезистентни бактериални изолати (49%). ESBL продукцията при резистентните към трета генерация цефалоспоринови Грам отрицателни изолати се асоциира с CTX-M тип ензима, като най – разпространеният вариант е CTX-M-15. Честотата на карбапенем-резистентните бактерии (*Pseudomonas* spp., *E. cloacae*) е над 18%, като се медира от VIM-1 и VIM-2 метало-карбапенемазите. Делът на VRE е 23%, като резистентността се асоциира изцяло с *vanA* гена. Сред микотичните изолати доминират представителите на *Candida nonalbicans* видовете, като се доказват видове с полирезистентност.

4.7. ПРОУЧВАНЕ НА ЕПИДЕМИОЛОГИЧНАТА ВРЪЗКА МЕЖДУ ФЕКАЛНИТЕ ИЗОЛАТИ И ИЗОЛАТИТЕ ОТ КРЪВ, ДЕМОНСТРИРАЩИ РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ ЦЕФАЛОСПОРИНИ ОТ 3-ТА ГЕНЕРАЦИЯ, КАРБАПЕНЕМИ И ГЛИКОПЕПТИДНИ АНТИБИОТИЦИ

За целите на епидемиологичното типизиране бяха проучени всички изолати, представители на семейство *Enterobacteriaceae*, демонстриращи резистентност към трета генерация цефалоспоринови и карбапенеми (n=21) и всички *vancomycin* – резистентни *Enterococcus faecium* (n=15). Тридесет и шест са типизираните изолати, асоциирани с проведения фекален скрининг (*E. faecium*, n=15; *E. coli*, n=10; *E. cloacae*, n=7; *K. pneumoniae*, n=4) и 3 са изолати от кръв (*E. coli*, n=2; *E. cloacae*, n=1).

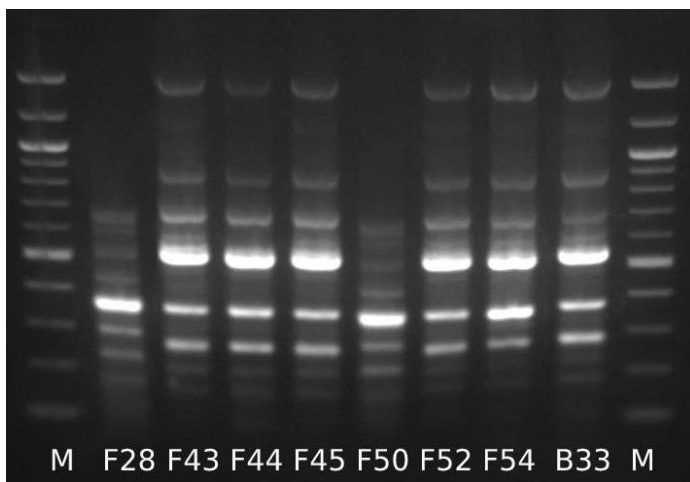
Изолатите от семейство *Enterobacteriaceae* бяха типизирани чрез ERIC – PCR, а RAPD – PCR беше използван при *E. faecium*. За всеки изолат бяха генерирани разпознаваеми ERIC или RAPD профили, съставени от 6 до 12 или 4 до 6 бенда, съответно. За клонална група се приеха изолати с индекс на подобност ≥ 0.9 (ERIC – PCR) или ≥ 0.8 (RAPD – PCR).

Сред *E. coli* изолатите (n=12) са идентифицирани 10 ERIC типа, 8 от които уникални. Типове А и В са представени от по 2 изолата всеки. Не се установява родствена близост между изолатите от кръв и фецес (Фигура 13).

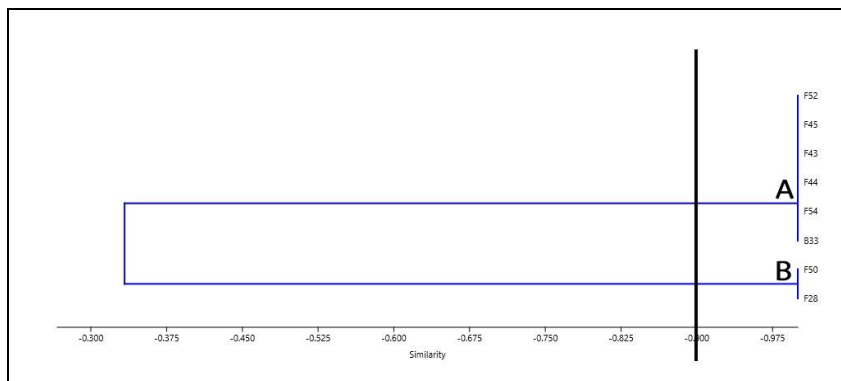


Фигура 13. Дендрограма, отразяваща степента на сходство между отделните ERIC типове, установени при изолатите *E. coli*. Типове А (F11, F15) и В (F1, F21).

При *E. cloacae* изолатите (n=8) са установени два ERIC типа (А, В), от които тип А доминиращ, представен от един изолат от кръв и 5 от фекален скрининг (Фигури 14 и 15). Установи се епидемиологично родство между кръвният и фекалните изолати, като В33 и F52 изолати са получени от кръвната и съответно фекалната проби на един и същи пациент.



Фигура 14. ERIC профили на изолати *E. cloacae*. M, маркер 100 bp; Фекални изолати: F28, F43, F44, F45, F50, F52, F54; Кръвен изолат: B33.

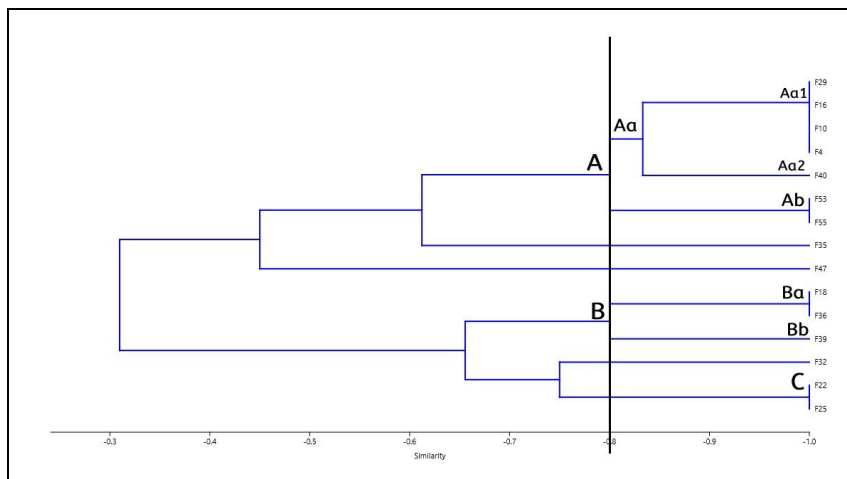


Фигура 15. Дендрограма, отразяваща степента на сходство между отделните ERIC типове, установени при изолатите *E. cloacae*. Тип А (F52, F45, F43, F44, F54, B33); тип В (F50, F28).

Четирите типизирани изолатата *K. pneumoniae*, всички от фекален скрининг, демонстрират различни ERIC профили.

Чрез RAPD PCR сред 15 изолатата *E. faecium*, всички от фекален скрининг, са идентифицирани 6 RAPD типа. Тип А е доминиращ,

идентифициран в 7 изолата и представен от 2 подтипа (Aa, Ab). RAPD тип В и С включват 3 и 2 изолата съответно. Три изолата *E. faecium* се демонстрират с уникални RAPD профили (Фигура 16).



Фигура 16. Дендрограма, отразяваща степента на сходство между отделните RAPD типове, установени при изолатите *E. faecium*. RAPD тип А с подтипове Аа (F29, F16, F10, F4, F40) и Ab (F53, F55); RAPD типове В с подтипове Ва (F18, F36) и Вb (F39); тип С (F22, F25).

Обсъждане

През последните години полирезистентните бактерии се превърнаха в основен проблем в здравеопазването в световен мащаб, а болничните заведения все по – често се сблъскват с локални взривове, причинени от тези патогени (*Mullière C, 2022*). По данни на EARS-NET за 2020г. честотата на инвазивните инфекции с причинители резистентни микроорганизми непрекъснато нараства (*EARS-NET, 2022*). Освен придобиването на резистентност към голям брой антимикробни препарати, ESBL и карбапенемаза продуциращите чревни бактерии, НФГБ, VRE, добавят още един фактор на патогенност към своя арсенал – а именно, способността им да се дисеминират клонално и да причиняват вътреболнични взривове.

В настоящият дисертационен труд беше проучена чрез молекулярно – генетични методи епидемиологичната връзка между 39 бактериални изолата, получени от фекални проби и хемокултури.

Сред тестваните 12 *E. coli* изолати, родствена връзка беше доказана само между изолати, сформиращи малки групи от по 2 с ERIC профили съответно А и В, всички носители на *bla*_{CTX-M-like} гена. Не се установи съответствие между кръвните и фекалните изолати. Близки до нашите резултати се съобщават в проучване на Kharrat et al., обхващащо 10 годишен период. Авторите изучават антибактериалната резистентност и епидемиологичната връзка между бактериални изолати, получени от пациенти след ХСКТ. Съобщават за висок процент *E. coli* изолати (43%), чиято резистентност основно се дължи на наличието на *bla*_{CTX-M-like} гени. След типизиране, авторите откриват голямо генетично разнообразие, като се открояват 5 пулсотипа, включващи по два изолата всеки (Kharrat M, 2018). Подобни са резултатите и на Uemura et al., които изучават *E. coli* изолати, получени от пациенти, пролежаващи в отделение по онкохематология. Съобщава се за неклонално разпространение на изолатите, асоциирани с *bla*_{CTX-M-like}, *bla*_{SHV-like} и *bla*_{TEM-like} гени (Uemura M, 2017).

Enterobacter cloacae все повече се приема като опортюнистичен патоген, отговорен за широк спектър от нозокомиални инфекции (вкл. вътреболнични взривове) като бактериемии, пневмонии, раневи и уроинфекции, засягащи пациенти в интензивните отделения и такива със супресирана имунна система. Увеличената продължителност на болничния престой, емпиричното приложение на антибиотици (особено 3та генерация цефалоспорини), използването на централни венозни и артериални катетри, интубация и други инвазивни манипулации, свързани с нарушаване на естествените механични бариери, подлежащо заболяване или рисково състояние (диабет, онкохематологични заболявания, солидни тумори, трансплантация, неутропения) са документираните рискови фактори за развитие на инфекции, причинени от *E. cloacae*, особено инфекции на кръвта (Sanders WE Jr, 1997; Lee, 2010).

В нашето проучване, сред типизираните *E. cloacae* изолати, получени от 7 пациенти, бе идентифициран един доминиращ ERIC тип (А), представен от 6 щама, демонстриращи 100% степен на сходство. Инвазивният (кръвен) изолат (В33) и един от фекалните изолати (F52) в този клъстер са получени от един пациент. Този факт доказва гастроинтестиналният тракт като важен източник на микроорганизми, причиняващи инфекциозни усложнения (вкл. инфекции на кръвта) при пациенти след ХСКТ. При всички изолати от клъстер А, резистентността към трета и четвърта генерация цефалоспорини се медира от *bla*_{CTX-M} гена, а демонстрираната резистентност към карбапенеми в един от фекалните изолати се асоциира с носителството

на *bla*_{VM-1} ген. Получените от нас резултати потвърждават потенциала на *E. cloacae* да причинява инвазивни инфекции при определени условия, да придобива различни гени, кодиращи резистентност към антибактериални агенти, както и да се разпространява клонално. Данните, получени от Dimitrova et al. напълно подкрепят тези резултати, като демонстрират клонално разпространение на *E. cloacae* изолати, носители на *bla*_{CTX-M-15} гена сред пациенти, хоспитализирани в Клиниката по хематология на УМБАЛ „Света Марина“ – Варна в периода 2014 – 2017г. (Dimitrova D, 2019). Близки до нашите резултати се съобщават и от Mullié et al. В хода на COVID-19 пандемията, авторите проследяват вътреболничен взрив, възникнал в периода март – октомври 2020г. в клиника за интензивно лечение на университетска болница във Франция с причинител *E. cloacae* complex. Всички проучени изолати - от пациенти (от фекални проби и други клинични материали) и от околна среда са идентифицирани като клонално свързани и носители на *bla*_{VM-4} гена (Mullié C, 2022).

Сред представителите на разред *Enterobacterales*, *Klebsiella pneumoniae* е един от най - честите причинители на трудно лечими инфекции. Наличието на различни фактори на вирулентност и способността да придобива множествена резистентност, превръщат този микроорганизъм в супер-бактерия. Наличието на тези характеристики, усилват потенциала на *K. pneumoniae* за колонизиране на пациенти, пролежаващи дълго време в лечебни заведения (Fatima S, 2021). В нашето проучване се изолират малък брой изолати *K. pneumoniae*, резистентни на 3та генерация цефалоспорини, като всички те са носители на различни варианти на *bla* гените и нямат генетична близост. В проучване на Kharrat et al. се откриват близки до нашите данни. В продължение на 10 години, авторите изучават ESBL – продуцентите, колонизиращи и причиняващи инфекции при пациенти след ХСКТ. След извършване на епидемиологично типизиране чрез PFGE, сред всички 19 изолата *K. pneumoniae* се идентифицират 17 уникални пулсотипа (Kharrat M, 2018). Други изследователи от Япония, съобщават напълно различни данни, които подкрепят твърденията за способността за клонално разпространение на *K. pneumoniae* в болнични условия. Uemura et al. изучават *K. pneumoniae* изолати, получени от пациенти, хоспитализирани в различни отделения на университетска болница. Чрез PFGE и PCR методи, авторите доказват клъстер от щамове, причиняващи вътреболничен взрив от инфекции, засягащи пациенти в няколко различни клиники (Uemura M, 2017).

В унисон с нарастващото глобално разпространение на бактерии с множествена резистентност, честотата на нечувствителните към vancomycin ентерококи също бележи ръст (Weterings V, 2021). Ентерококите, демонстриращи този тип резистентност, се асоциират с проблемни за лечение инфекции и с трудно контролируеми вътреболнични взривове, превръщайки се в много болнични центрове в сериозно медицинско предизвикателство (Rangerberg A, 2019). В настоящото проучване беше изследвана епидемиологичната връзка между 15 фекални изолата vancomycin – резистентни *E. faecium*. Идентифициран бе един доминиращ RAPD тип (A), представен от 7 щамове, изолирани от 7 пациенти, резултат демонстриращ потенциала на тези бактерии за клонално разпространение. Резистентността към vancomycin при всички тествани изолати е *vanA* асоциирана. В периода 2012 – 2013г. в Норвегия, в хода на вътреболничен взрив в хирургично отделение, са изследвани 9454 фекални проби за носителство на VRE, като са доказани две клъстърни групи, представени от щамове *E. faecium* всички *vanA* носители (Rangerberg A, 2019). В продължение на три години, Weterings et al. проследяват вътреболничен взрив, причинен от VRE. Авторите установяват чревна колонизация при 140 пациенти, като при някои от тях по – късно се наблюдава и бактериемия. Епидемиологичното проучване чрез AFLP доказва дисеминиране на един клон VRE, носители на *vanA* гена (Weterings V, 2021). През 2015г. в Испания de Artola et al. провеждат активно скриниране на фекални проби, получени от 117 пациенти в клиника по хематология и доказват чревна колонизация с *E. faecium* в 18.9%. В 9% от колонизираните е документирана и инвазивна инфекция, причинена от същия щам. В допълнение, проведеното типизиране чрез PFGE открива 3 близки клъстъра, причиняващи вътреболничния взрив, като всички изолати са носители на *vanA* гена (de Artola DGM, 2017). VRE, носители на *vanA* гена, освен носителство на множество фактори на вирулентност и потенциал за клонална дисеминация, притежават и способност да изместват други ентерококи, като причинители на инфекции, както съобщават Hughes et al. В периода 2015 – 2016г. авторите документират нововъзникнал взрив в болница в Австралия, в която се наблюдава ендемично разпространение на *vanB* гена сред *E. faecium* изолатите в продължение на години. Новият взрив е причинен от *E. faecium*, носители на *vanA*. След провеждане на допълнителни изследвания, откриват, че голям брой от изолатите попадат в 5 клъстърни групи, а представителите на едната са носители едновременно на *vanA* и *vanB* гените (Hughes A, 2019).

Освен клонална дисеминация на MDR бактериални изолати сред пациенти с ХСКТ, настоящото проучване установи и не-клонално разпространение. Смята се, че не-клоналното или ограниченото разпространение на тези микроорганизми се дължи на ефективните хигиенни мерки, които се прилагат от приемането на пациента в клиниката до неговото изписване, водещи до минимизиране на трансмисията на бактерии между различни пациенти (Kharrat M, 2018).

Заклучение

Епидемиологичното проучване установи наличие на клъстери от изолати от видовете *E. cloacae* и *E. faecium*, както и такива с уникални ERIC или RAPD профили (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. faecium*). Доказан бе изолат *E. cloacae* от фекален скрининг, генетично идентичен с кръвен изолат *E. cloacae*, получени от един и същи пациент. Тези резултати потвърждават инвазивния потенциал и способността на тези микроорганизми за клонална дисеминация в болнични условия сред пациенти след ХСКТ. Провеждането на епидемиологично типизиране чрез ERIC и RAPD PCR се потвърди като полезен и надежден метод за откриване на генетична близост между представители на различни бактериални видове.

5. ИЗВОДИ

След анализ на получените резултати, можем да направим следните изводи:

1. Установява се 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.
2. Фекалната колонизация и инфекция на кръвта, предхождаща ХСКТ, са независими рискови фактори за възникване на инфекция на кръвта при пациенти след ХСКТ.
3. Установява се висока 4-месечна преживяемост сред цялата група проследявани пациенти (86.5%).
4. Статистически значима зависимост се установи между 4-месечната преживяемост и показателите вид на трансплантацията, основното заболяване и липса или наличие на предходна трансплантация, като пациентите с алогенна ХСКТ, предишна ХСКТ и с основно заболяване левкемия или лимфом имат по – ниски шансове за преживяване първите 4 месеца след трансплантацията.
5. Грам – положителните бактерии доминират в етиологичния спектър на инфекциите на кръвта при пациенти след ХСКТ, като най-честите причинители са коагулаза-негативните стафилококи. Видът *E. coli* превалява сред Грам - отрицателните микроорганизми. Доказа се нисък относителен дял на фунгемиите.
6. Коагулаза негативните стафилококи, асоциирани с инфекции на кръвта в настоящото проучване, демонстрират много високи нива на метицилинова резистентност, поради което в случаите на поставен SVC и съмнение за катетър – асоциирана инфекция е препоръчително стартиране на терапия с гликопептид. Ampicillin, ciprofloxacin и trimethoprim/sulfamethoxazole са със значително редуцирана активност спрямо Грам отрицателните бактерии, изолирани от кръв. Делът на ESBL продуцентите сред чревните бактерии, представители на 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.
7. Основният механизъм на резистентност към цефалоспорици от 3-та генерация в изолати от кръв от семейство *Enterobacteriaceae* е продукцията на CTX-M-15 ESBL. Карбапенемната резистентност в *A. baumannii* се асоциира с носителството на 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.
 8. Високият относителен дял на слайм-продуциращи коагулаза негативни стафилококи от кръв, сред които най-чест е видът *Staphylococcus epidermidis*, се асоциира с наличие на *ica* гени. Установява се статистически значима връзка между носителството на *ica* гените и метицилиновата резистентност.
 9. В изследваната група пациенти се установи ниска честота на инвазивна пулмонална аспергилоза, но висока смъртност сред доказаните случаи.
 10. Проучваната група трансплантирани пациенти се характеризира с висока честота на чревна колонизация с гъбички и полирезистентни бактерии (49%): 33.8% дял на ESBL продуценти, като CTX-M-15 е най – разпространената ESBL; 13.8% дял на карбапенем-резистентните бактерии (*Pseudomonas* spp., *E. cloacae*), асоцииращи се с продукцията на VIM-1 и VIM-2 метало-карбапенемази и 23% дял 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.
 11. 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 изолати *E. cloacae*, получени от един пациент, потвърждават гастро-интестиналния тракт като важен резервоар за инфекциозни усложнения при пациенти след ХСКТ, инвазивния потенциал и способността на тези микроорганизми за клонална дисеминация в болнични условия.

6. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинален характер

1. Проучени и анализирани са честотата и рисковите фактори за бактериемии и инвазивни микотични инфекции при пациенти, преминали автоложна и алогенна ХСКТ, както и 4-месечната преживяемостта в цялата изследвана група пациенти, като са анализирани факторите, които влияят върху нея.
2. Анализирани са етиологичният спектър и чувствителността към антимикробни лекарствени средства на микробните причинители на инфекциите на кръвта при пациенти след автоложна и алогенна ХСКТ.
3. Проучен е колонизиционният статус на гастро-интестиналния тракт с MDR бактерии (ESBL и карбапенемаза – продуциращи Грам – отрицателни бактерии, vancomycin – резистентни ентерококи и *S. maltophilia*) и гъбички при пациенти след ХСКТ.
4. Идентифициран е карбапенем-резистентен изолат *E. cloacae* complex от фекална проба, носител на *bla*_{VIM-1}.
5. Идентифицирани са карбапенем-резистентни изолати *Pseudomonas composti* и *Pseudomonas mendocina* от фекална проба като носители на *bla*_{VIM-2}.
6. Идентифициран е карбапенем-резистентен изолат *A. baumannii* от хемокултура, носител на *bla*_{OXA-48-like} гена. Същият изолат е носител на още 3 гена (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24/40-like}, *bla*_{VIM-like}), кодиращи карбапенемази.
7. Доказани са *Candida nonalbicans* изолати (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*) от фекален скрининг, демонстриращи множествена резистентност: едновременна резистентност към fluconazole, voriconazole, itraconazole и anidulafungin.

Приноси с потвърдителен характер

1. Гастро-интестиналният тракт се потвърди като важен източник за инфекциозни усложнения при пациенти след ХСКТ, а чревната колонизация с MDR бактерии се доказва като значим рисков фактор за развитие на бактериемии в тази група имунокомпрометирани пациенти.
2. Грам – положителните бактерии, доминиращо предствени от коагулаза-негативни стафилококи и по-рядко от *S. aureus*, са

водещи причинители на бактериемии при пациенти след ХСКТ и поставен СВС.

3. Потвърди се широкото разпространение на метицилиновата резистентност, медирана основно от *mecA* гена, сред изолати CoNS, включително такива асоциирани с инфекции на кръвта.
4. Потвърди се връзката между носителството на *ica* оперона и слайм – продукцията в коагулаза-негативни стафилококи, изолирани от кръв, както и асоциацията между носителството на *ica* гени в тези изолати и метицилиновата резистентност.
5. Потвърждава се широкото географско разпространение на СТХ-М типа широкоспектърни бета-лактамази и в частност СТХ-М-15, които се явяват и основен механизъм на резистентността към цефалоспорини от трета генерация в изолати от семейство *Enterobacteriaceae*, получени от кръв и фецес на пациенти след ХСКТ.
6. Резистентността към гликопептиди (vancomycin, teicoplanin) във vancomycin – резистентни изолати *E. faecium* най-често се медира от носителството на *vanA* ген.
7. Потвърди се инвазивния потенциал на *E. cloacae* и способността за клонална дисеминация на изолати от видовете *E. faecium* и *E. cloacae*.
8. Инвазивната пулмонална аспергилоза при пациенти преминали ХСКТ се асоциира с висока смъртност.

Приноси с научно – приложен характер

1. CRA тестът и тестът на Кристенсен са оценени като фенотипни методи за детекция на слайм продукцията от изолати *Staphylococcus* spp. от кръв.
2. Проучени са възможностите на имуноензимния метод Platelia *Aspergillus* Ag test (Bio-Rad, France) за диагностициране на инвазивна пулмонална аспергилоза при пациенти след ХСКТ.

7. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации в научни списания

1. **Ниязи Д**, Мичева И, Стоева Т. Бактериални и микотични усложнения при пациенти след хематопоетична стволово-клетъчна трансплантация. Хематология. 2020;56(1):27-31. (SJR₂₀₂₀ 0.101, Q4)
2. **Niyazi D**, Stoeva T, Atanasova S, Markovska R, Micheva I. Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients with Haematological Malignancies and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: a Single-Center Study. Folia Medica. 2021;63(6):941-947. (SJR₂₀₂₁ 0.203, Q4)
3. **Niyazi D**, Micheva I, Markovska R, Stoeva T. Phenotypic and molecular detection of slime producing *Staphylococcus* spp. obtained from blood samples of patients undergoing hematopoietic stem-cell transplantation. Acta Medica Bulgarica. 2022 (SJR₂₀₂₁ 0.120, Q4) (*in press*)

Съобщения, изнесени на научни форуми

1. **Ниязи Д**, Стоева Т, Атанасова С, Резник И, Мичева И. Клинично значение на теста за галактоманан в диагностиката на инвазивната аспергилоза при пациенти с хематологични малигнени заболявания. XI национален конгрес по хематология и XIII хематологичен ден, 10 - 13 октомври 2019 г., Правец, България (орална презентация).
2. **Ниязи Д**, Мичева И, Калева В, Стоева Т. Видово разнообразие и профил на резистентност към антимиотични лекарствени средства на изолати *Candida* spp., получени от клинични материали на пациенти след хематопоетична стволово-клетъчна трансплантация. Национална конференция по хематология, 16 – 19 септември 2021 г., Правец, България (постер)
3. **Ниязи Д**, Савова Д, Божкова М, Каменова В, Бижева С, Стоева Т. Доказване на слайм продукция чрез фенотипни и молекулярно-генетични методи в кръвни изолати *Staphylococcus* spp., получени от пациенти след хематопоетична стволово-клетъчна трансплантация. XIX национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, 14 – 16 септември 2021г., София, България (постер)

4. **Niyazi D**, Marinska B, Kaleva V, Stoeva T. A clinical case of invasive pulmonary aspergillosis in a paediatric patient with acute lymphoblastic leukemia after hematopoietic stem-cell transplantation. 11th South-east European conference of chemotherapy, infections, and cancer and 31st annual assembly of international medical association Bulgaria (IMAB), 28 – 31 October 2021, Plovdiv, Bulgaria (oral presentation) – **I^{vo} място**

Проекти и финансиране

1. Инвазивни бактериални инфекции при пациенти след автоложна и алогенна костно-мозъчна трансплантация: етиологичен спектър и резистентност към стратегически бета-лактами и гликопептидни антибиотици. Фонд Наука, Медицински университет – Варна, № 19019, 2019 – 2022 г.

БЛАГОДАРНОСТИ

Сърдечно благодаря за подкрепата и помощта на:

- Моите научни ръководители – **проф. д-р Теменуга Стоева**, дм и **доц. д-р Илина Мичева**, дм и научния ми консултант **проф. д-р Игор Резник**, дмн
- Екипите на лабораториите по Клинична микробиология и Клинична вирусология към УМБАЛ „Света Марина“ – Варна
- Състава на Катедрата по микробиология и вирусология към Медицински университет – Варна
- **Проф. д-р Румяна Марковска**, дм и **проф. д-р Таня Стратева**, дм от Катедра медицинска микробиология към Медицински университет – София
- **Доц. д-р Клара Докова**, дм от Катедра социална медицина и организация на здравеопазването към Медицински университет – Варна
- **Проф. д-р Валерия Калева**, дм от Катедра педиатрия и Клиника по детска онкохематология към УМБАЛ „Света Марина“ – Варна
- **Инж. Свилен Първанов** и „ЕЛТА – 90“