

До: Членовете на научното жури

Назначено със заповед № Р – 109 – 276 / 07.07.2022г.

На Ректора на Медицински Университет –
Варна

РЕЦЕНЗИЯ

От Доц, д-р Милена Красиминова Божкова , д.м.

Вътрешен член на НЖ

Медицински университет - Варна

Относно: Дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ по докторска програма „Микробиология“ в професионално направление 4.3. Биологически науки и научна специалност „Микробиология“

Тема на дисертационния труд:

„ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ БАКТЕРИЕМИИТЕ И ИНВАЗИВНИТЕ МИКОТИЧНИ ИНФЕКЦИИ ПРИ ПАЦИЕНТИ СЛЕД АВТОЛОЖНА И АЛОГЕННА ХЕМАТОПОЕТИЧНА СТВОЛОВО-КЛЕТЪЧНА ТРАНСПЛАНТАЦИЯ“

Научни ръководители:

проф. д-р Теменуга Стоева д.м.

доц. д-р Илина Мичева , д.м.

Автор на дисертационния труд:

д-р Денис Сунай Ниязи

Декларирам, че нямам конфликт на интереси от научно или друго естество.

Предоставеният ми дисертационен труд е изготвен в съответствие със Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и правилника за прилагането му в МУ-Варна.

Дисертантът д-р Денис Сунай Ниязи работи от 2018г. като асистент към Катедра по микробиология и вирусология при МУ-Варна и като лекар в Лаборатория по микробиология към УМБАЛ „Света Марина“ Варна.

Актуалност на дисертационния труд:

Хематопоеитичната стволово – клетъчна трансплантация (ХСКТ) представлява едно от най-революционните достижения на съвременната медицинска практика. Още от началните етапи на въвеждането ѝ, а и до днес е ясно, че сред основните рискове за неблагоприятен изход сред пациентите са инфекциозните усложнения от всякакъв характер – бактериални, вирусни и микотични. Ранното идентифициране на потенциалните рискови фактори за развитие на инвазивни бактериални и микотични инфекции при пациентите след автоложна и алогенна ХСКТ и въвеждането в клиничната практика на скринингови тестове с цел своевременна превенция и бърза и акуратна детекция на този тип усложнения съществено подобряват дългосрочната прогноза и днес се очертават като едно от най-важните направления в комплексния подход при лечението на пациентите с костно-мозъчна недостатъчност.

Представеният ми дисертационен труд разглежда важни и актуални проблеми на локално ниво, съществена част от глобалния проблем с успеваемостта на ХСКТ. Опознаването на етиологичния спектър на инвазивните бактериални и микотични инфекции, идентифицирането на основните рискови фактори за възникването им, разкриването на механизмите на антибиотична резистентност и епидемиологичното

типизиране на изолатите от пациенти след ХСКТ дават ценни насоки за лечението на тези потенциално животозастрашаващи усложнения. В този смисъл считам актуалността на настоящия дисертационен труд за неоспорима.

Раздели на дисертационния труд:

Дисертационният труд на д-р Ниязи е правилно структуриран, с всички необходими раздели и се състои от 187 страници. За онагледяване дисертантът е използвал 19 фигури и 20 таблици. Цитираните литературни източници са общо 430, от които 8 са на български език и 422 са на английски език.

Литературният обзор е написан компетентно и изчерпателно. В него обстойно се представят основните рискови фактори за възникване на инфекциозни усложнения при пациенти след ХСКТ. Специално внимание е отделено на предтрансплантационните скринингови тестове на донор и реципиент като важно условие за успешност на процедурата. Следвайки основната линия на дисертационния си труд, д-р Ниязи представя задълбочено базовите характеристики на бактериалните и микотични инфекции в таргетната група пациенти. Представени са множество актуални данни за честотата и етиологичния спектър на инвазивните инфекции и основните източници на инфектиране. Детайлно са охарактеризирани водещите подходи за етиотропно лечение на бактериалните инфекции, асоциирани с най-честите причинители – стафилококи, стрептококи, ентерококи, чревни бактерии и НФГБ. Докторантът логично поставя акцент върху възможностите за лечение на инфекции, причинявани от множество-резистентни бактерии (MDR) – едно от най-сериозните предизвикателства в съвременната медицинска практика в ерата на глобална антибиотична резистентност. Гъбичките като причинители на инвазивни инфекции при пациенти след ХСКТ също са разгледани подробно и

задълбочено, като докторантът очертава основните алгоритми за профилактика и съвременните стратегии за терапия с вече утвърдени в клиничната практика антимикотични препарати като amphotericin B и fluconazole и по-нови представители от групата на ехинокандините и азолите (voriconazole, isavuconazole, posaconazole, anidulafungin, caspofungin). На базата на литературния обзор е изведена основната цел на дисертационния труд, като във връзка с това са ясно формулирани и поставени седем конкретни задачи.

Материали и методи: Дисертационният труд на д-р Ниязи е клинично – микробиологично проспективно проучване върху 74 пациенти, преминали през автоложна и алогенна ХСКТ в Клиниката по Клинична хематология на УМБАЛ „Св. Марина“ в периода 2019-2021г. Проучването на 107-те микробни изолати от обхванатите пациенти е извършено с разнообразни класически и съвременни методи, подробно описани и съответно даващи възможност протоколите да бъдат използвани и в следващи проучвания. За идентификация на бактериалните изолати са използвани най-съвременни автоматизирани системи като Phoenix 100 (BD, USA) и MALDI Biotyper Sirius (Bruker, Germany). Определянето на чувствителността към антимикробни лекарствени средства е извършено чрез автоматизирана система Phoenix 100 (BD, USA), микродилуционния метод за определяне на МПК и Е-тест. Приложени са и съвременни молекулярно-генетични методи за детекция на гени, кодиращи резистентност към бета-лактамни антибиотици и гликопептиди на базата на полимеразно-верижната реакция (PCR), както и ДНК секвениране на получените гени. Освен класическите тестове за доказване на слайм – продукция в стафилококи като посевка на Congo red agar и метода на Christensen, са използвани и методи, основани на PCR – детекция на гени *icaA* и *icaD*. Като основен метод за доказване на инвазивна аспергилоза е

използван Galactomannan Ag теста - Platella™ *Aspergillus* Ag (Bio-Rad, France) в серум и/или БАЛ. Епидемиологичният анализ е извършен чрез два алтернативни метода, базирани на PCR – RAPD и ERIC.

Резултати и обсъждане: Получените резултати са обсъдени и представени в седем подраздела. Докторантът детайлно излага получените данни за рисковите фактори за развитие на инфекции на кръвта след ХСКТ, кумулативната им честота (31.5%), средният период за развитието им (приблизително 47 дни след трансплантацията) и преживяемостта на пациентите, използвайки за сравнителен анализ данни от съвременни мащабни проучвания. Особен интерес представлява установената от д-р Ниязи статистически достоверна корелация между колонизацията на ГИТ с множество резистентни бактерии и гъбички и възникването на инвазивни инфекции след ХСКТ. Проучването доказва известен превес на Грам-положителните бактерии (основно CoNS) като причинители на бактериемии, което авторът свързва с използване на CVC и антибиотичната профилактика в неутропеничния период. На фона относително ниския дял на фунгемиите (едва 2.4%), специално внимание се обръща на факта, че причинителя – *Candida krusei* принадлежи към по-резистентните представители на рода – т.нар. nonalbicans група.

Анализът на данните от антибиотичната чувствителност на изолатите от хемокултури очаквано демонстрира висока честота на метицилинова резистентност сред CoNS (85.7%), както и тревожно високи нива на резистентност към макролиди, аминогликозиди и хинолонови препарати (респективно 71.4%, 62.0% и 52.4%). При представителите на сем. *Enterobacteriaceae* с най-висока активност са карбапенемите.

Проучването на механизмите на резистентност към стратегически антибиотици сред инвазивните бактериални патогени е базирано върху PCR и обхваща общо 22 изолата – 18 фенотипно MRCoNS и 4 Грам-негативни

изолата, демонстриращи *in vitro* устойчивост към високо-генерационни цефалоспорини и карбапенеми. Д-р Ниязи установява, че метицилиновата резистентност сред изследваните стафилококи се асоциира единствено с *mecA* гени. Проведените експерименти с кръвните изолати от сем. *Enterobacteriaceae* разкриват като водещ механизъм на резистентност към бета-лактами продукцията на широкоспектърни бета-лактамази от групата CTX и по-специално CTX-M-15, потвърждавайки широкото им географско разпространение. Единственият документиран инвазивен изолат *A.baumannii* демонстрира множествена резистентност и е доказан като носител на гени *bla*_{VIM-like}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{OXA-24/40-like}, и *bla*_{OXA-23-like}

Продукцията на слайм е отдавна известна като важен фактор на вирулентност, с водеща роля в патогенезата на стафилококовите инфекции. В настоящия дисертационен труд всички изолирани от хемокултури стафилококи са подложени на фенотипни и молекулярно-генетични тестове – PCR за детекция на *icaA* или *icaD* гени. Анализът на поучените резултати сочи висок относителен дял на потвърдени и потенциални слайм-продуциращи стафилококи - 71,4%. В допълнение, д-р Ниязи доказва статистически достоверна зависимост между носителството на *mecA* и *ica* гените, което допълнително усложнява коректния избор на подходяща антимикробна терапия.

Като особено важна част от дисертационния труд оценявам анализа на получените резултати от детекцията на *Aspergillus* галактоманан антиген чрез ELISA в серум и/или БАЛ с цел доказване на потенциално фатални инфекциозни усложнения след ХСКТ като ИПА. Документирана е честотата на заболяването (11.5%) и смъртността (66.7%) на пациентите с ИПА. Много задълбочено и изчерпателно са представени основните клинично-микробиологични критерии и алгоритми при диагностициране на заболяването, спецификите при отчитане на галактоманановия тест и възможните източници на грешки. В детайли е описан терапевтичния

подход и изхода на заболяването при тримата пациенти, категоризирани като такива с възможен случай на ИПА. Настоящото проучване демонстрира по безспорен начин надеждността на *Aspergillus* галактоманан Ag - ELISA теста за диагностика на ИПА и мониторинг на терапевтичния отговор.

Анализирани са данните от фекалния скрининг за множествено-резистентни бактерии и гъбички, като в около половината изследвани пациенти (49%) са доказани един или повече „проблемни“ изолати. Обстойно са анализирани профилите на резистентност на изолираните бактерии и гъбички и са установени водещите генетични механизми на резистентност към третогенерационни цефалоспорини и карбапенеми сред Грам-отрицателните бактерии и към гликопептиди в ентерококите.

В настоящият дисертационен труд е проучена чрез молекулярно-генетични методи (ERIC и RAPD) епидемиологичната връзка между 39 бактериални изолати, получени от фекални проби и хемокултури. Установено е наличие на малки клъстърни групи при *E. cloacae* и *E. faecium*, предполагаща способността им за клонална дисеминация в болнични условия. При един от изследваните пациенти се доказва пълна идентичност на изолати *E. cloacae* от фецес и хемокултура като потвърждение на инвазивния потенциал на чревната микрофлора при пациентите след ХСКТ.

Д-р Ниязи представя задълбочено обзорно проучване и голям обем от ценни собствени експериментални данни, въз основа на които логично извежда 11 извода, с които съм напълно съгласна. Високо оценявам приносите на дисертанта, които са ясни и правилно формулирани. Те са общо 17, от които 7 са с оригинален характер, 8 – с потвърдителен и 2 – с научно-приложен характер.

Във връзка с дисертационния труд са представени три публикации и четири съобщения, изнесени на научни форуми, чиито първи автор е д-р

Ниязи, което ясно свидетелства за това, че дисертационния труд е негово лично дело.

В заключение, представеният ми за рецензия дисертационен труд представлява задълбочено и изчерпателно клинично-микробиологично проучване на актуален медицински проблем, извършено с класически и съвременни молекулярно-генетични методи. Това ми дава основание да дам личната си положителната си оценка и да предложа на членовете на научното жури да гласуват за присъждането на образователна и научна степен „доктор“ по научна специалност „Микробиология“ на д-р Денис Сунай Ниязи.



Доц. д-р Милена Божкова, дм