

изд. № 156
05.11.2018 г.

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Румяна Донкова Марковска-Давидкова, дм
Катедра по Медицинска Микробиология
Медицински факултет, Медицински Университет –София
Член на научна жури със заповед №РК-36-2397/08.10.2018

относно дисертационен труд
на Адиле Акифова Мухтарова
за придобиване на образователна и научна степен „доктор”
научна специалност “Микробиология”
в професионално направление 4.3. Биологически науки
на тема: „ **Микробиологични и генетични проучвания върху
клинични изолати *Streptococcus pyogenes* “**
с научен ръководител: доц. д-р Райна Гергова, дм

Биографични данни и кариерно развитие

Адиле Мухтарова е завършила висшето си образование през 2014г (Бакалавър - Молекулярна биология ; Магистър - Биология на развитието) в СУ „Св. Климент Охридски“.

Редовен докторант е към Катедрата по Медицинска микробиология, МУ София от 2015 г, а от юли 2018г биолог-специализант. Дисертантката има два докторантски проекта и участие в три грантови проекта към СМН-МУ-София, което показва активното ѝ участие в хода на изработката на дисертационния труд.

Актуалност на научния проблем

Streptococcus pyogenes, бета-хемолитични стрептококи, принадлежащи на серогрупа А по Лансфилд, са причинители на голямо разнообразие на заболявания, от локализирани инфекции на горните дихателни пътища до инвазивни животозастрашаващи инфекции като сепсис, некротизиращ фасциит, стрептококов токсичен шок синдром и др. *S. pyogenes* инфекциите крият потенциален риск от развитието на сериозни усложнения, като ревматизъм, остър гломерулонефрит и др. *S. pyogenes*, притежават голямо разнообразие на фактори на вирулентост, които обуславят изброените типове заболявания. През последните години значимостта на този микробен вид нараства. Увеличението на честотата особено на инвазивните *S. pyogenes* инфекции се свързва с разпространението на специфични, вирулентни клонове. Независимо от продължителната употреба антибиотиците от пеницилиновата група продължават да са първо средство на избор. През последните години, в световен мащаб, нараства разпространението на резистентни клонове – особено по отношение на макролидите, които са важна част на терапията при деца и при алергия към пеницилиновата група. До сега в България няма мащабно, систематизирано проучване върху *S. pyogenes*. **Тези факти отразяват актуалността на темата на дисертационния труд.**

Структура на дисертационния труд

Представеният материал е написан на 183 страници и е структуриран в следните раздели:

1/ Въведение - 2 стр; Литературен обзор – 49 стр; Цели и задачи – 1 стр; Материали и методи – 22 стр.; Резултати и обсъждане – 68 стр.; Изводи – 3 стр.; Справка за приносите и списъци на публикации и участия в научни прояви – 4 стр.; Библиография – 33 стр.

Съотношението между отделните раздели е добро. Дисертационния труд е богато онагледен с 38 фигури и 28 таблици и е написан на точен медицински език. Изложението се чете лесно, а данните са представени ясно.

Литературният обзор е написан подробно и на високо научно ниво. Историческите данни, микробиологичните характеристики, спектъра на инфекциите, причинени от този микроорганизъм, както и водещите тенденции по отношение на

разпространението му са умело представени. Систематизирано и детайлно са описани различните фактори на вирулентност и тяхната връзка с патогенезата на заболяванията. Разгледани са основните антимикробни средства, използвани при *S. pyogenes* инфекциите, механизмите на макролидна и тетрациклинова резистентност и тяхното разпространение. Подробно и точно са разгледани методите за идентификация, както и за типизиране на изолатите. Предимство на обзора е систематизирането на данните за разпространението на emm типове *S. pyogenes*.

Книгописът съдържа 291 източника (56% от последните 10 години), от които 12 на кирилица. В него са включени и български автори, които са работили по проблема – проф. Сечанова, д-р Дечева и д-р Стоянова.

Литературната справка достатъчно задълбочено представя проблема и известните до момента данни, както и очертава необходимостта от допълнителни проучвания.

В резултат на направеният обзор е изведена ясна цел, като поставените седем задачи ѝ съответстват. Целта е много добре формулирана от научния ръководител на дисертантката.

Разделът “Материали и методи” прави впечатление с големия брой изследвани изолати – 445, колекционирани за петгодишен период 2013-2017г. Използвани са както стандартните микробиологични методи за идентификация и определяне на чувствителността, така и съвременни молекулярно-генетични методи за доказване на микроорганизмите директно в клинични материали, за определяне на факторите на вирулентност. Тежест на дисертационният труд дава по-задълбочените методи за молекулярно типизиране – emm типизиране и MLST. Подробното описание на използваните методи дава възможност те да бъдат възпроизведени.

Резултатите и обсъждането са обединени логично в общ раздел. Той включва 10 подраздела със собствените проучвания.

Първата част представя разпределението на изолираните *S. pyogenes* изолати, съобразно пола на пациентите, възрастта им и вида на заболяването. Предимство на работата е анализа на спектъра на инфекциите.

Втората част - Представя резултатите от апробираните молекулярно-генетичните методи за бърза идентификация, директно от клиничен материал, чрез доказване на стрептококовите гени *speB* и *SpyCEP*. Те биха улеснили и ускорили идентификацията на *S. pyogenes*, особено във варианта на real time PCR реакция. И двата теста доказват 100% от културелно изолираните микроорганизми, като не позитивират при нито един от използваните контролни щамове от 28 различни вида, което показва високата специфичност на тези молекулярно-генетични методи.

Дисертационният труд представя мащабно проучване на вирулентния потенциал на колекционирани изолати. Много добро впечатление прави големия брой изследвани фактори на вирулентност - над 20, включващи гени, кодиращи стрептококови суперантигени, протеази, стрептолизин, ДНК-ази и други токсини. Дисертантката установява видово специфични фактори на вирулентност – стрептококов пирогенен токсин В, ДНК-аза В, стрептолизин О, протеаза. Предимство на дисертационния труд е анализа на вирулентния потенциал при инвазивни и неинвазивни изолати. Така данните показват, че суперантигените *speA*, *speF*, *speL*, *speM* се асоциират с инвазивност на щамове. Това е сериозен принос за изясняване патогенезата на стрептококовите инфекции.

Особен интерес представлява раздела представящ определянето на механизмите на резистентност. Дисертационният труд разглежда чувствителността на изолатите към пеницилини, макролиди, линкозамиди и тетрациклини, като дисертантката открива сравнително висок процент на макролид- резистентни изолати – 31%. При изследваните 140 макролид-резистентни щамове се установява наличието на предимно *mefA* гени (79%) – самостоятелно в 57.1% или в комбинация с *ermA* или *ermB* – в 22,1%, както и *ermA* и/или *ermB* – в 20.7. За първи път в България се доказват изолати с *ermB* метилаза. Трябва да се отбележи, че са отразени предишни проучвания в тази област в България. По правило *ermB* положителните изолати показват значимо по-високи нива на резистентност към макролиди, включвайки и линкозамидите.

Дисертантката установява, че чувствителността към тетрациклини е сравнително ниска – 10%, като основен механизъм на резистентност е продукцията на рибозомния протективен протеин *tetM*.

В резултат на изследване на чувствителността и охарактеризиране на механизмите на резистентност са направени обосновани препоръки за лечение на заболяванията, причинени от *S. pyogenes*.

Безспорно достойнство на труда е прилагането на молекулярно - генетични методи за епидемиологично типизиране. Чрез ДНК секвениране дисертантката определя спектъра на основните *emm* типове при българските изолати *S. pyogenes*, което е първо такава проучване за България, както и тяхното разпространение и асоциираност с различни заболявания и механизми на макролидна резистентност. В България се установяват предимно *emm1*, *emm3*, *emm4*, *emm12*, *emm28* и *emm2* – в 78%. За първи път в света са установени два нови субтипа - *emm3.132* и *emm3.133*. От голямо значение е факта, че около половината от разпространените при нас изолати са от *emm* типове, които са ревматогенни и/или се асоциират с гломерулонефрит. Дисертантката установява, че доминиращият *emm1* тип се

асоциира сигнификантно с пирогенните токсини *speA*, *speG*, *speJ*. Преобладаващата част от проучените щамове *S. pyogenes*, принадлежат към *emm1* и *emm3*, което алармира за потенциалният риск от увеличаване на стрептококовите заболявания в страната ни, причинени от тези инвазивни клонове. Дисертантката установява, че 87.5% от *ermB*⁺ щамове принадлежат към един единствен клон - *emm28*. Това би могло да бъде причина за разпространение на щамове с високи нива на резистентност към макролиди. Направен е извод за евентуалното покриване на съществуващите серотипове при евентуално прилагане на експерименталните 26 и 30-валентни ваксини. 26-валентната ваксина срещу *S. pyogenes* включва 84.4% от М-типовете, установени от дисертантката (фиг. 31). Следователно тя би имала добро, но не пълно покритие в страната. Проучваната 30-валентна ваксина би имала 100% покритие. В дисертационния труд са представени и установените 8 MLST типа на изследваните щамове (ST28, ST15, ST39, ST36, ST52, ST63, ST382).

Изводите са правилно формулирани, те кореспондират точно на поставените задачи и получените резултати, но трябва да се съкратят максимално и по-възможност да се премахнат съществуващите подточки.

Оценка на научните приноси

Приемам формулираните научни приноси на дисертационния труд, които могат да се обобщят накратко както следва:

Приноси с оригинален характер:

- 1 За първи път в България е охарактеризиран вирулентния потенциал на голям брой клинични изолати *S. pyogenes*.
- 2 Проучени са механизмите на резистентност при макролид резистентни изолати *S. pyogenes*. За първи път в България е доказана *ermB* метилазата.
- 3 За първи път в България е извършено епидемиологично типизиране на клинични изолати *S. pyogenes*. Установени са 15 различни *emm*-типа с преобладаване на типовете *emm1* и *emm3*.
- 4 За първи път в света са установени два нови субтипа - *emm3.132* и *emm3.133*, депозиран в GenBankNCBI с номерата MG869722 и MG869723. Установява се, че повече от половината проучени изолати се асоциират с нефритогенност и/или ревматогенност, както и асоциация на *emm3* – клъстер А-С5 с инвазивните инфекции, докато клъстерите А-С4 и Е1, респ. включените в тях *emm12* и *emm4* са открити значително по-често в кожните и мукозните изолати.
- 5 Това е първото проучване, доказващо, че най-разпространеният клъстер в страната А-С3, който включва и доминиращият *emm1* тип, има статистически значима положителна връзка със суперантигените *SpeA*, *speG*, *speJ*, докато

- клъстер E4, който е вторият по-честота на разпространение в страната е свързан предимно с кожно-мукозни изолати, се асоциираше сигнификантно със суперантигенът *speC*.
- 6 За първи път в България е установен *ermB*+ макролид-резистентни щамове от *emm28* тип.
 - 7 За първи път в България беше извършено типизиране чрез MLST на *S. pyogenes* и са установени 8 секвенционни типа (ST) в изследваните щамове (ST28, ST15, ST39, ST36, ST52, ST63, ST382)..

Приноси с потвърдителен характер:

1. Анализирана е епидемиологията на инфекциите, с доказан причинител *S. pyogenes*, за пет годишен период по пол и възраст.
2. Определена е антибиотичната чувствителност на изолатите *S. pyogenes*, като нивото на резистентност към макролиди е над 30%, а това към тетрациклини е 10%.
3. Като преобладаващ генетичен детерминант при макролид резистентните щамове *S. pyogenese* е установен *mef(A)*.

Приноси с научно - приложен характер:

1. За първи път в България са разработени и внедрени в практиката две нови молекулярно-генетични техники за доказване на *S. pyogenes* директно в проби от пациенти - мултиплекс PCR и RT PCR .
2. Направени са препоръки за емпирична терапия на инфекции, причинени от *S. pyogenes*.
3. Направен е за първи път в нашата страна задълбочен анализ на молекулярната епидемиология на инфекциите, причинени от *S. pyogenes* в контекста на потенциалните възможности на експерименталните 26- и 30-валентни ваксини, съдържащи М-антигени от този микробен вид.

Направените препоръки в предварителната рецензия бяха съобразени и дисертационния труд беше коригиран.

Наукометрични показатели

Резултатите от проучванията в дисертацията са обобщени в 5 публикации и участия в 10 научни форуми. Докторантката е първи автор и в петте представени статии, което показва водещата ѝ роля. Една от статия е в сп. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* (IF= 1.27).

Съобщенията са изнесени на национални форуми. Всички публикации и съобщения са по темата на дисертационния труд. Броят на публикациите и представените участия на научни форуми надвишават изискванията на МУ-София.

В заключение, считам, че представеният дисертационен труд на Адиле Мухтарова е актуален и задълбочен научен труд, извършен с голямо разнообразие на микробиологични и молекулярно-геветични методи. Подготвен е компетентно под ръководството на нейният научен ръководител, със съществен приложен и теоретичен принос в областта на съвременната микробиологичната практика. Личните ми впечатления от докторантката са много добри. По структура, съдържание и обем дисертационният труд напълно отговаря на научните критерии в ЗРАСРБ и Правилника на МУ-София за ОНС „доктор”. Предлагам на членовете на Научното жури да гласуват за присъждане на **образователната и научна степен „доктор” по научна специалност “Микробиология” на Адиле Акифова Мухтарова.**

София, 03.11.2018

Изготвил рецензията:
/Доц д-р Румяна Марковска-Давидкова/

