

Узр. №. 158
05.11.2018г.

До Председателя на Научното жури

Проф. Д-р Лена П. Сечанова, дм

Назначено със заповед 36-2397/08.10.2018 на
Ректора на МУ-София

Рецензия

на дисертационен труд на Адиле Акифова Мухтарова, докторант на самостоятелна подготовка за присъждане на научна и образователна степен „доктор“ 4. Природни науки, математика и информатика, Професионално направление 4.3. Биологически науки, Докторска програма: МИКРОБИОЛОГИЯ с Научен ръководител: доц. Д-р Райна Цветанова Гергова, дм от Катедра Микробиология на МУ- София на тема: „Микробиологични и генетични проучвания върху клинични изолати *Streptococcus pyogenes*“

от проф. Д-р Тодор Веселов Кантарджиев, дм, дмн от НЦЗПБ

Нямам общи публикации или конфликт на интереси от друг характер по смисъла на ал. 1, т. 3 и 5 от ДР на ЗРАСРБ с докторанта

Темата на дисертацията е подбрана много професионално от ръководството на катедрата и научния ръководител. До въвеждането на пеницилина в терапевтичната практика *Streptococcus pyogenes* е най-честия причинител на вътреболнични инфекции и един от най-силно влияещия на инфекциозната заболяемост и леталитет, като причинител на скарлатината, родилната треска, тонзилофарингита, еризипела и инвалидизиращите болести като ревматизма и гломерулонефрита. Въвеждането на антибиотиците в терапевтичната практика промениха честотата и тежестта на причинените от него

инфекции. С годините антибиотичния натиск и неправилната употреба на тези лекарства доведоха до промени в екологията и факторите на вирулентност на този микроорганизъм. Не са убягнали от погледа на експертите от Катедрата промените в клиничните изяви на този бактерий у нас. Още в средата на деветдесетте години на миналия век наблюдавахме взривове от вътреболнични инфекции от некротизиращ фасциит от шамове с повишена вирулентност. Сега във второто десетилетие на двадесет и първи век имаме безпрецедентна епидемия от скарлатина в нашите училища и детски заведения – за 2015г от 4985 случая, 2016г от 4735, 2017г.-3706 случая. Пропуски в спазването на правилата за употреба на антибиотици в извънболничната помощ - неправилна структура на употреба на антибиотици, недостатъчна продължителност и дозов режим на терапевтичните курсове доведоха до селектиране изменения във факторите на вирулентност на този микроорганизъм. Направените в дисертацията проучвания са навременни и попълват една празнина, което е с голяма значение за общественото здравеопазване у нас. Това прави работата значима и приносна!

Дисертацията е от 188 стр страници и е структурирана стандартноспоред изискванията на NEJM, както следва: Въведението е 2 стр.; Литературният обзор е 45 стр.; Цел и задачи са представени на 1 стр.; Материали и методи са 22 стр.; Резултати и обсъждане на 67 стр., Изводите и приносите са 7 стр. Дисертацията включва показателни 38 фигури и 28 прегледни таблици, които илюстрират добре обсъжданото. Използвани са 287 литературни източника, 12 от които са с български букви. 164 от цитираните статии са публикувани през последните 10 години, а 72 са от последните 5 години, което подчертава още веднъж актуалността на разработката и способността на дисертантката да работи с научните публикации.

Литературният обзор представя по най-добрия начин представеното в световната литература и позволява да се дефинират точно целите и задачите.

Използваните за анализ шамове са достатъчно на брой за направените научни изводи. Дисертантката използва класически и молекулярно-генитични методи, които правят дисертацията актуална и приносна.

В дисертацията се анализира епидемиологията на инфекциите, с доказан етиологичен причинител *S. pyogenes* у нас, за период от пет години, представени са агрегирани данни, разпределени по пол и възраст. Направен е научен извод, при което се установява, че най-често от инфекцията е засегната групата в предучилищна, детска възраст, от 3 до 7 г. и повече момичета, което е характерно и за част от проучените европейски държави. Авторката изучава голям брой важни фактори на вирулентността (за първи път в български изолати) в голям брой щамове *S. pyogenes* със съвременни молекулярно-генетични методи. В 100% от изолатите дисертантката установява *speB*, *spyCep*, *sdaB*, *slo*, кодиращи: две протеази, ДНК-аза В и стрептолизин О. В над 80% от изследваните щамове тя доказва *mac* и *smeZ*. Много важен извод, който прави е, че гени за суперантигените *speA*, *speF*, *speL*, *speM* ($p < 0.001$) по-често се установяват в инвазивните изолати *S. pyogenes*. Дисертантката разработва два нови за България молекулярно-генетични метода (мултиплекс PCR и RT - PCR), като те демонстрират висока специфичност и чувствителност и могат да се приложат за бърза етиологична диагноза на инфекции причинени от *S. pyogenes*. Сравнителните експерименти са задоволителни, както при изследване на директно проби от пациенти, така и при сравнителното проучване едновременно с бърз имунохроматографски тест. Сравними са и с класическото култивиране, което ги прави особено полезни, като бърз тест за доказване на стрептококовата етиология при инвазивни инфекции. Проучено е и нивото на резистентност сред проучваната колекция от изолати *S. pyogenes* към макролиди и се установява, че е в над 30% от изолатите има тенденция за нарастване във времето и то през последните пет години. В някои европейски държави се наблюдава обратната тенденция. Преобладаващият генетичен механизъм на резистентност при макролид-резистентните щамове *S. pyogenes* в 79.2% е *mefA* – самостоятелно (57.1%) или в комбинация с други два гена (22.1%): *ermA* и/или *ermB*. Втори по честота е *ermB* при 31.4 % от изолатите (самостоятелно в 11,4% и в комбинация с *ermA* – в 20%). Резистентността към тетрациклини се установява в 10,3% от изследваните щамове, без тенденция към нарастване и в 85% се доказва като вероятна причина *tet(M)*. В 15% се установява в *tet(O)* и наличието му показва корелация с макролидната резистентност. При епидемиологичното типизиране на 182 клинични изолати *S. pyogenes* се установяват 15 различни *emm*-типа с преобладаване на типовете *emm1,3,4,12,28,89*, разпределени в 8

различни *emm*-кльстера: А-С3, Е4, А-С5, А-С4, Е1, Е6, М6, Е3, cladeY. Съществен научен принос с оригинален характер е откриването, за първи път в света, на два нови субтипа - *emm3.132* и *emm3.133*, депозирани в GenBankNCBI с номера, съответно: MG869722 и MG869723. Много интересен е и факта, че 49.9% от установените генотипове (*emm1,3,6*) са ревматогенни, 46.7% са нефритогенни и/или ревматогенни, *emm3* се асоциира често с инвазивни инфекции, докато *emm12* се открива по-често при кожни и мукозни етиологични причинители. Дисертантката прави обосновани изводи, че подходящи за емпирична терапия на инфекции, причинени от *S. pyogenes* остават пеницилините, аминопеницилините, а при тежки инфекции е препоръчителна комбинацията на пеницилинов препарат с клиндамицин, защото последният инхибира отделянето на токсини от пиогенните стрептококои и има по-добра проникваемост, както в тъканите, така и вътреклетъчно, освен това действа във всички фази на жизнения цикъл на бактериите. Препоръчва използването на макролиди да става само след *in vitro* изпитване на чувствителността. Експерименталните 26 - и 30 - валентни ваксини срещу *S. pyogenes* (които подхранват свръхнадежди главно в производителите им!), могат да имат покритие в момента у нас над 84% и респ. 100% от *emm*-типозете. Най-разпространения клъстер в нашата страна А-С3, който включва и доминиращият *emm1* тип сред българските изолати *S. pyogenes*, има статистически значима положителна връзка със суперантигените *SpeA*, *speG*, *speJ*, докато клъстер Е4, който е вторият по-честота у нас, се асоциира сигнификантно със суперантигенът *speC*. Авторката установява, че 87.5% от *ermB* положителните щамове, принадлежат към новия клон за България *emm28*. Извършения от нея MLST анализ установи 8 секвенционни типа (ST) в изследваните щамове *S. pyogenes* (ST28, ST15, ST39, ST36, ST52, ST63, ST382, ST847), което се доказва за първи път при български изолати.

Приемам приносите изтъкнати от дисертантката, като по съществени считам следните с оригинален за науката характер:

1 За първи път в света са установени два нови субтипа *S. pyogenes* - *emm3.132* и *emm3.133*, депозирани в GenBankNCBI с номерата MG869722 и MG869723.

2 С оригинален характер е откритото, че сред преобладаващите българските стрептококови изолати са нефритогенните и/или ревматогенните типове , както и описаната в дисертацията асоциация на *emm3* – клъстер А-С5 с инвазивни инфекции и клъстер А-С4 (*emm12*) с кожни и мукозни изолати на микроба.

3 Пионерно за България е, че със съвременни молекулярно-генетични методи е охарактеризиран вирулентния потенциал на колекция от 445 клинично значими изолати *S. pyogenes*.

4 За първи път е извършено толкова мащабно епидемиологично типизиране у нас, на клинични изолати *S. pyogenes*, с помощта на молекулярно-генетични методи и определяне на *emm*-кльстери. Открити са 15 различни *emm*-типа с преобладаване на типовете *emm1,3,4,12,28,89* и 8 различни *emm*-кльстера: А-С3, Е4, А-С5, А-С4, Е1, Е6, М6, Е3, cladeY.

5 Проучени са механизмите на резистентност на 140 български щама *S. pyogenes* резистентни на макролиди. За първи път в изследваните изолати е доказан генът, кодиращ метилази – *ermB*, самостоятелно в 11.4% и в комбинация с *mefA* при 20% от резистентните щамове, обуславящ високи нива на резистентност, както към макролиди, така и към линкозамиди.

6 За първи път се установява *ermB*+ макролид-резистентни щамове от-*emm28* тип, което потвърждава разширение на ареала на разпространение засягащо и нашата страна.

7 Това е първото мащабно научно проучване, което доказва, че най-разпространеният клъстер в страната А-С3, който включва и доминиращият *emm1*, тип сред българските изолати *S. pyogenes*, има статистически значима положителна връзка със суперантигените *SpeA*, *speG*, *speJ*, докато клъстер Е4, който е вторият по-честота на разпространение в страната е сигнификантно свързан със суперантигенът *speC*.

8 Научна новост е извършеното у нас типизиране чрез MLST на *S. pyogenes*, като са установени 8 секвенционни типа (ST) в изследваните щамове (ST28, ST15, ST39, ST36, ST52, ST63, ST382, ST847).

Потвърдителен за науката характер имат следните приноси: Извършения анализ на епидемиологичното разпространение и протичане на инфекциите, с доказан причинител *S. pyogenes*, за период от пет години. Представени са агрегирани данни за пол и възраст като се установява, че най-често е засегната групата в предучилищна, детска възраст, от 3 до 7 г., по-често при момичета, което е характерно и за част от другите европейски държави. Определена е антибиотичната чувствителност при 445 български щамове *S. pyogenes*, с фенотипни лабораторни техники (EUCAST) към основните използвани за терапията у нас групи антимикробни средства – беталактами, макролиди, линкозамиди, тетрациклини. Нивото на резистентност към макролиди е над 30%, а това към тетрациклини е над 10%, което се доближава до това и в други европейски държави, при някои от които тенденциите са обратни. Динамиката в годините е различна. Като преобладаващ генетичен детерминант при малко повече от половината резистентни на макролиди щамове *S. pyogenes* е установен *mef(A)*.

Приносите с научно - приложен характер, които приемам са следните:

1. Направен е първият в нашата страна задълбочен и мащабен анализ чрез молекулярни методи на епидемиология на инфекциите, причинени от *S. pyogenes* с цел преценка потенциалните протективни възможности на описваните в литературата експериментални 26- и 30-валентни ваксини, съдържащи М-антигени от този микробен вид. Този анализ е полезен с цел прогнозиране на ефекта от специфичната имунопрофилактика срещу етиологичния агент в теоретичен план. Обсъжданите ваксини са част от бъдещето на проблема, за сега на дневен ред е правилната употреба на антибиотиците


2. Разработените от докторантката и внедрени в практиката две нови молекулярно-генетични техники: мултиплекс PCR и Real Time PCR, са с задоволителна чувствителност и специфичност. Това е доказано след сравнителното проучване едновременно с бърз имунохроматографски тест и класическото култивиране за доказване на *S. pyogenes* директно в проби от пациенти.

3. Въз основа на резултатите от изследванията на антимикробната чувствителност, от обзора на литературата, както и във връзка с установените механизми на резистентност, са направени препоръки за емпирична антибиотична терапия на инфекции, причинени от *S. pyogenes*. Аргументирано е, че използването на макролиди трябва да става само след *in vitro* изпитване на чувствителността при сегашното състояние на проблема.

Заклучение: Докторската работа е актуална, достатъчна по методичен и научен обем и изпълнява напълно изискванията на ЗРАСРБ, Правилника към него и Правилника на МУ- София. Изследванията са широкомащабни, проведени са методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни разработки. Приемам оригиналните научно-теоретични и научно-приложни приноси и представените публикации, свързани с дисертацията.

Всичко това ми дава основание за крайна висока оценка на дисертационния труд, въз основа на която подържам присъждането и предлагам на уважаваното научно жури да присъди образователната и научна степен ДОКТОР по микробиология на Адиле Акифова Мухтарова, по научната специалност „Микробиология“.

1.11.2018 г.


Проф.д-р Тодор Кантарджиев