

Уж. № 205/160
05.11.2018г

СТАНОВИЩЕ

От проф. д-р Лена Петрова Сечанова, дм.
МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ

Катедра Медицинска Микробиология, Медицински Факултет, МУ - София

Относно дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен "доктор"

Тема: "МИКРОБИОЛОГИЧНИ И ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ
ВЪРХУ КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ *STREPTOCOCCUS PYOGENES*"

Докторска програма: **МИКРОБИОЛОГИЯ**
Професионално направление 4.3. Биологически науки от област висше образование
4. Природни науки, математика и информатика.

Форма на докторантурата: **редовен докторант** в Катедра по Медицинска Микробиология,
Медицински Факултет, МУ-София.

Автор на дисертацията: **Адиле Акифова Мухтарова**
Научен ръководител: **доц. д-р Райна Цветанова Гергова, дм**

Рецензирането на материалите по дисертацията в настоящото становище се основава на заповед № РК36 - 2397/08.10.2018 г. на Ректора на Медицински Университет - София и изискванията на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински Университет-София (приет с Решение на Академичния съвет от 18.09.2018 г.), както и на Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ).

Общо представяне на докторанта. Адиле Акифова Мухтарова е магистър по специалността Биология на развитието от 2014 г. и бакалавър по Молекулярна биология (2008-2012), като и двете степени на обучение е получила в Софийски Университет „Климент Охридски“. Адиле е **редовен докторант** в Катедрата по Медицинска Микробиология, МФ, на МУ-София от месец ноември 2015 г. От 2018 г., докторантката работи в Катедра по Мед. Микробиология на МФ-София като биолог-специализант и хоноруван асистент.

Дисертационният труд на Адиле Мухтарова е посветен на един важен и актуален от клинично-микробиологична и епидемиологична гледна точка проблем, а именно: оптимизиране на диагностиката и идентификацията на *S. pyogenes* в клинични материали; проучване на генетичните детерминанти, кодиращи разнообразието от фактори на вирулентност, проучване за честотата на антимикробната резистентност и молекулярно-генетичните механизми отговорни за възникването и, както и молекулярно типизиране на клинични щамове с цел определяне на клонален произход сред тях.

Структура на дисертационния труд

Дисертационния труд е в обем 188 стр., структуриран съгласно изискванията, а именно: заглавие -1 стр.; съдържание - 4 стр.; легенда на използваните съкращения - 1 стр.; литературен обзор - 49 стр.; цел и задачи - 1 стр.; материали и методи - 23 стр.; резултати и обсъждане - 68 стр.; изводи - 3 стр.; приноси - 4 стр.; реферирана литература - 31 стр.; списък на научните прояви и участия на дисертанта - 4 стр. Дисертацията е онагледена с 28 таблици и 38 фигури. Библиографията включва 287 литературни източника, от които 12 на кирилица и 275 на латиница.

Въведението синтезира научния обхват на дисертацията, който включва клиничното значение на този важен причинител, оптимизиране на диагностиката и идентификацията му, проучване на генетичните механизми, кодиращи факторите на вирулентност, резистентност към важни антимикробни средства, серотиповото разпределение на GAS стрептококите, както и клоналния произход на българските щамове изолирани през последните пет години.

Литературният обзор представя научните постижения по темата на дисертационния труд до момента, много информативен, базиран на 287 литературни източника, от които преобладават референциите от последното десетилетие (2008-2017 г.). Обзорът е добре илюстриран с 12 фигури и 6 таблици. Обхваща данни за таксономията, морфологията, факторите на вирулентност, клиничния спектър на инфекциите, причинени от *S. pyogenes*, диагностиката с молекулярно-генетични методи, механизмите на резистентност към основни антимикробни средства и молекулярно-биологичните методи, които се прилагат понастоящем за епидемиологично типизиране на клинично значими щамове. В края на обзора се обосновава необходимостта от детайлно разработване на

проблема в България поради голямото му медицинско значение за населението на страната ни.

Целта на дисертационния труд е точно и конкретно формулирана, а тя е да се оптимизира диагностичния алгоритъм за бърза етиологична диагноза на инфекциите причинени от *S. pyogenes*, да се проучат факторите на вирулентност присъстващи в клиничните изолати *S. pyogenes*, резистентността към важни групи антимикробни средства, и да се извърши епидемиологично типизиране на циркулиращите щамове. Задачите са ясно и точно формулирани и произтичат от поставената цел. Етапите на изследване са представени като отделни задачи.

В раздела **Материали и Методи**, дисертантката представя клинични и епидемиологични данни за многобройна колекция (**n=445**) от клинични щамове *S. pyogenes*, изолирани от микробиологични лаборатории, локализирани в София и част от страната през последните 5 години (2013-2017). Подробно са описани използваните методи за реализиране на поставените задачи, а именно:

1. Най-съвременни методи за идентификация и определяне на антимикробна чувствителност на бактериалния вид, включително и директна молекулярно-генетична идентификация в пациентски проби.
2. Съвременни молекулярно-генетични методи, като PCR и секвениране, за изследване на широк набор от фактори на вирулентност и доказване механизмите на резистентност към антимикробни средства.
3. Епидемиологично охарактеризиране на изолатите *S. pyogenes* чрез метода нуклеотидно секвениране на *emm*-гените (*emm*-типизиране) и MLST типизиране за установяване на секвенционния тип (ST).
4. Съвременни методи за статистическа обработка и анализ на получените данни.

Анализ и обсъждане на резултатите

В раздела **“Резултати и обсъждане“** са представени данни за разпространението на инфекциите, причинени от *S. pyogenes*, клиничния спектър на заболяванията, анализирана е демографската и епидемиологична характеристика на изследваните пациенти. Установено е участието на *S. pyogenes* в етиологията на различни мукозни, кожни и инвазивни инфекции в България за последните 5 години. Сравнена е етиологичната диагностика на изследваните клинични материали постигната с няколко

метода. За идентификация са използвани класически (културелен), имунохроматографски тест и молекулярно-генетичен ДНК базиран метод, като за последния е разработена и въведена нова методология за откриване на GAS бактериите (Мултиплекс PCR и Real time-PCR). Нововъведените генетичните методи са доказали 100% специфичност и по-висока чувствителност за доказване на стрептококовата етиология в сравнение с използваните рутинни методи. Централно място в раздела и дискусията заемат молекулярно-биологичните проучвания, основани на полимеразно-верижната реакция (PCR) за изследване на много голям набор от гени (21), определящи фактори на вирулентност сред щамовете *S. pyogenes*, изследван е механизмът на макролидна и тетрациклинова резистентност. Получените резултати са сравнени с тези публикувани в международната литература, като е анализирана разликата между българските щамове и тези от други географски региони на света. Практическа насоченост имат предложените схеми и препоръки за терапия на стрептококовите GAS заболявания. Друг значим етап от дисертацията е епидемиологичното охарактеризиране на щамовете *S. pyogenes* чрез използване на генетичния метод за определяне на *emm*-типа и въвеждане на новата *emm*-кълъстерна система за типизиране на *S. pyogenes*. Внедрен е MLST метод за молекулярно типизиране на най-честите *emm*-типове.

Предложените **11 извода** са логично и правилно формулирани, следват данните от получените резултати и отговарят на поставената цел и задачи в дисертационния труд.

Оценка на приносите на дисертационния труд

В дисертацията са посочени приносите на труда, разделени в три категории: приноси с оригинален, потвърдителен и приложен характер с които съм съгласна. Считам, че по-важните от тях могат да бъдат формулирани по следния начин:

1. За първи път в България са извършени комплексни микробиологични, епидемиологични и генетични проучвания върху голям брой **клинично значими (445) изолати *S. pyogenes***.
2. Разработени са **2 нови, молекулярно-генетични метода за бърза етиологична диагностика на *S. pyogenes*** директно от клиничните материали на пациенти - Мултиплекс PCR и Real time-PCR.
3. Проучена е честотата на **21 фактора на вирулентност** (токсини, ензими и суперантигени) и е установено, че гените *speB*, *spyCep*, *sdaB* и *slo* се срещат в 100% от

изследваните щамове *S. pyogenes*, а гени *speA*, *speF*, *speL* и *speM* са по-чести сред инвазивните изолати.

4. Проучванията върху антимикробната резистентност показват, че българските изолати *S. pyogenes* остават чувствителни на пенцилини, но се наблюдава **тенденция за нарастване на резистентостта към MLS група антибиотици**. Изследванията за генетичните механизми кодиращи макролидна резистентност за **първи път у нас доказат *ermB* ген**, самостоятелно или в комбинация с *mefA* ген при 31.4% от еритромицин-резистентните GAS щамове.

5. За първи път в България е извършено мащабно епидемиологично проучване, с помощта на най-съвременни **генетични методи за типизиране на *S. pyogenes***, а именно: секвениране на *emm*-гена, който определя типа на M протеина; и MLST типизиране, което се базира на мултилокусно секвениране. Установени са най-разпространените *emm*-типове в страната (*emm*1,3,4,12,28,89), преобладаващите клъстери (A-C3, E4, A-C5, A-C4, E1, E6, M6, E3, cladeY) и са открити два нови *emm* субтипа - *emm*3.132 и *emm*3.133, депозирани в GenBankNCBI.

6. Посочена е връзката между честотата на факторите на вирулентност, *emm*-типизирането и новия *emm* клъстерен анализ според типа на инфекцията, доказана е статистически значима зависимост за част от факторите на вирулентност и установените *emm* клъстери, намерена е асоциация между *emm*-типа и генотипа на макролид-R GAS щамове.

7. На базата на резултата от *emm*-типизирането на българските щамове е направен анализ за **теоритичното, потенциално покритие на експерименталните 26- и 30-валентни ваксини**, които съдържат M-антигени и бяха разработени за профилактика на инфекции причинени от *S. pyogenes*.

Наукометрични показатели на дисертацията.

Дисертационният труд на Адиле Мухтарова отговаря на изискванията на МУ-София относно качествените и количествени критерии за докторантура в медико-биологичната област и участие в конкурс за придобиване на научна степен "доктор". Списъкът с публикации във връзка с дисертацията е оформен според изискванията на Медицински факултет, МУ-София. Резултатите от труда са публикувани в **5 национални и международни списания**, като във всички статии дисертантът е първи автор, което е доказателство за неговата роля и активност при разработването на настоящия труд. Една

от публикациите е в списания с ISI импакт фактор ($IF_{2017} = 2.022$). Втората статия е публикувана в чуждестранно списание без ISI импакт фактор, а останалите 3 броя са публикувани в национални списания. Дисертантката е представила 10 научни участия, от които 3 в международни научни форуми, а останалите 7 са участия в национални научни форуми. В периода на разработването на докторантурата, дисертантката е участвала в 6 научни проекта от конкурси финансирани от СМН, МУ-София.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд е планиран, подготвен и изпълнен на високо научно-методично и диагностично ниво, като е много добре оформен и онагледен. Техническите грешки на отделни места в текста не намаляват стойността на дисертацията.

Представеният труд съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за прилагането му в МУ-София.

Изследванията са изпълнени на високо методично ниво, приложени са съвременни молекулярно-генетични методи за доказване на голям набор от гени на вирулентност и патогенност, предложени са нови методи за идентификация на вида и за доказване гени на антимикробна резистентност, разработени са най-съвременни методи за епидемиологично, молекулярно-генетично типизиране и охарактеризиране на клинични щамове *S. pyogenes*.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователна и научна степен "Доктор" на Адиле Мухтарова в докторска програма по микробиология.

30.10. 2018 г.

Изготвил становището:

Проф. д-р Лена П. Сечанова, дм