

изд. № 159
05.11.2018 г.

ДО ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА НАУЧНОТО
ЖУРИ ПРОФ. Л. СЕЧАНОВА, ДМ,
НАЗНАЧЕНО СЪС ЗАПОВЕД
№ РК36-2397/08.10.2018 г.
на Ректора на МУ-София

СТ А Н О В И Щ Е

относно процедура за придобиване на ОНС „Доктор“ с кандидат Адиле Акифова Мухтарова , редовен докторант в Катедра Микробиология на Медицинския факултет към МУ-София, в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, по научната специалност „Микробиология”

Тема на дисертационния труд: „МИКРОБИОЛОГИЧНИ И ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ *STREPTOCOCCUS PYOGENES*“

Научен ръководител: доц. д-р Райна Цветанова Гергова, дм

Изготвил становището: Доц. Иван Николаев Иванов, дм завеждащ Национална референтна лаборатория по контрол и мониториране на антимикробната резистентност, отд. Микробиология, Национален център по заразни и паразитни болести

Представените ми документи са изготвени коректно и в съответствие със Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ).

Декларирам, че 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.

Актуалност на темата. Дисертационният труд на Адиле Мухтарова третира един изключително важен проблем, а именно инфекциите причинени от пиогенните стрептоки от група А *S. pyogenes*. Благодарение на разнообразния си арсенал от фактори на вирулентност и продукцията на токсини, *S. pyogenes* се явява етиологичен причинител на необикновено широк диапазон от клинични изяви и инфекции (най-малко 20) с разнообразна локализация и тежест на протичане- от леки самоограничаващи се

тонсилофарингити до тежки инвазивни и често фатални състояния като токсичен шок синдром, менингит и некротизиращ фасциит.

Последното мащабно проучване за тежестта, включително икономическите загуби, в следствие на инфекциите от *S. pyogenes* датира от 2005г. Данните сочат, че най-малко 18,1 млн. хора са страдали от инвазивни инфекции, а новооткрите случаи възлизат на 1,78 млн. на година. Не малък е и броя на случаите на ревматична болест на сърцето при деца от 5 до 14 годишна възраст – при бл. 2млн. случаи само в Азия (Carapetis 2008). Все още не са ясни последиците от асимптомното носителство, понастоящем обект на редица проучвания. Въпреки усилията на множество колективи за разработване на ваксина, все още няма кандидат достигнал фаза III на клинични изпитвания. Едни от най-обещаващите кандидат ваксини са базирани на М-протеина, който освен своята имуногенност представлява и отличен обект за типизиране на изолати *S. pyogenes* чрез ДНК секвениране на гена *emm*, което е и една от задачите на настоящата работа.

Независимо от запазената си чувствителност към беталактами, честата неправилна емпирична терапия с макролиди в амбулаторната практика доведе до докладване на обезпокояващи нива на резистентност през последните години, включително и в България. В допълнение, някои автори откриват корелация между резистентността към еритромицин и способността за инвазия на епителните клетки чрез повишена продукция на вирулентния фактор *prtF* (Facinelli 2001).

В България проучванията по темата като цяло са недостатъчни, а генотипното разнообразие на циркулиращите изолати на практика е неизвестно.

От всичко изброено до тук е видно, че темата е избрана много умело от научния ръководител и е безспорно актуална и значима.

Структура на дисертационния труд и библиография. Дисертацията е с обем от 188 страници и е структурирана стандартно както следва: Въведение - 2 стр.; Литературен обзор - 45 стр.; Цел и задачи – 1 стр.; Материали и методи 22 стр.; Резултати и обсъждане - 67 стр., Изводи -3стр., Справка за приносите - 4 стр. Включва 38 фигури и 28 таблици както и 287 литературни източника, 12 от които на кирилица. Библиографската справка

сочи, че 164 от цитираните статии са публикувани през последните 10 години, а 72 от последните 5 години, което подчертава още веднъж актуалността на работата.

Литературен обзор. Г-ца Мухтарова представя компетентно написан, съвременен и информативен обзор. Изчерпателно са разгледани всички аспекти на проблема. Историческата справка представя сбито всички важни моменти от откриването на *S.pyogenes* през 1884г. до наши дни, а таксономията е представена в съответствие със съвременната генотипна класификация базирана на ДНК секвениране на гена 16S rRNA. Тук в съответствие с последната номенклатура базирана на целогеномно секвениране, може да се направи уточнение, че броя на официално възприетите видове в рода през последните пет години нарасна драстично и вече е 123, а не 79. По-нататък специално внимание е обърнато на морфологията, физиологията, културелните особености, антигенната структура, факторите на вирулентност, патогенезата, имунитета и имунния отговор. Детайлно са описани всички етапи от лабораторния диагностичен процес, включвайки както традиционните микробиологични методи, така и съвременните молекулярно-генетични. Основната част в обзора е фокусирана върху патогенният потенциал, диагностичните подходи, антимикробната резистентност, и най-съвременните молекулярни методи за типизиране базирани на ДНК – секвениране (emt-типизиране и MLST), което е в унисон с целта на дисертационния труд. В заключението на обзора дисертантката извежда и систематизира най-важните проблеми свързани със зачестяващите инфекции от *S. pyogenes* в България, като набляга на необходимостта от нови проучвания върху патогенезата, въвеждането на съвременни микробиологични, серологични и молекулярно-генетични методи за диагностика и типизиране и скрининг за носителство, заключения които логично водят към целта на дисертацията.

Цел и задачи. Целта и шестте задачи са прецизно формулирани, отразявайки основните аспекти и същността на дисертационния труд.

Материалите и методите са детайлно и коректно описани, от което личи високото ниво на компетентност на кандидатката. Изследвани са проби от общо 445 пациента, с разнообразна симптоматика като 122 от тях са били лежащо болни. Материалите са събирани за период от 5 години от почти всички региони на страната, което обуславя

репрезентативния характер на извадката. Много добро впечатление прави уелото използване на значителен набор от традиционни микробиологични, серологични, молекулярно-генетични и статистически методи, които докторантката е усвоила. Всички микробиологични и биохимични техники както и изпитването на антимикробната чувствителност са извършени според най-съвременните препоръки и стандарти. Огромният набор от PCR методики е адекватно описан и са описани задължителните положителни контролни щамове и отрицателни контроли. Към този раздел имам някои дребни забележки : 1) на места в текста, методите RT-PCR и Real-time PCR се употребяват еднозначно, което въпреки че е упоменато, създава известно двусмислие; 2) при използване на неоригинални праймери е редно освен секвенцията им да се цитира и съответния литературния източник.

Много умело е подбрана стратегията за типизиране на изолатите като първо е секвениран единичен локус (emm-типизиране), след което подбрани представителни emm-генотипове са допълнително субтипизирани чрез MLST. И двата метода предоставят резултати, съвместими с общовъзприетите онлайн бази данни и дават възможност за глобален сравнителен анализ на българските изолати.

Резултатите и обсъждане. Направеният епидемиологичен анализ на инфекциите причинени от *S. pyogenes* за период от пет години показва няколко важни находки, а именно че най-често биват засягани децата от женски пол на възраст между 3 и 7 г., което се наблюдава и в някои скандинавски държави. Значителен е процента на пациентите със скарлатина (6%) и считам, че направения анализ на заболяемостта от 1927г насам е уместен, предвид оскъдните данни след 2012г. и зачестилите напоследък случаи.

Дисертантката разработва и валидира два нови молекулярно-генетични метода (мултиплекс PCR и Real-time PCR) за детекция на *S. pyogenes* в клиничен материал. Установените специфичност и чувствителност >95% ги прави подходящи за бърза етиологична диагноза на тонзилофарингити и перитонзиларни абсцеси като получените резултати са солидна основа за бъдещо приложение на тези методи при диагностиката и на инвазивните инфекции. Чрез съвременни молекулярно-генетични методи е извършен

огромен брой изследвания за откриване на важни фактори на вирулентността за първи път в български изолати. В 100% от изолатите дисертантката установява *speB*, *spyCsp*, *sdaB*, *slo*, кодиращи съответно протеази, ДНК-аза В и стрептолизин О и се обсъжда тяхната роля в патогенезата. Направена е статистическа корелация между наличието на суперантигените *speA*, *speF*, *speL*, *speM* и инвазивността на изолатите *S. pyogenes* извършен сравнителен анализ на честотата на разпространение на вирулентните фактори в други държави като Португалия, Дания, Швеция, САЩ и др.

По-нататък е извършен мащабен анализ на нивото на резистентност към макролиди за последните 5 години като се установява рязко нарастване през 2015г и стабилизиране през последните три, тенденции, които потвърждават националните данни от надзора. Ефлуксът обуславян от *mefA* се явява основния механизъм на резистентност към макролиди, следван от метилазите *ermA* и/или *ermB*. Резистентност към тетрациклини се установява в 10%, без тенденция към нарастване. Преобладава наличието на гени протектиращи рибозомите *tet(M)* и *tet(O)*, като последния показва известна асоциация с макролидната резистентност.

Генотипизирането на 182 щама показва циркулацията на 15 различни *emm*-типа с множество подтипове, като преобладаващите 7 се групират в 8 клъстера. Съществен научен принос с оригинален характер е откриването, за първи път в света, на два нови субтипа - *emm3.132* и *emm3.133*, депозиран в GenBank. Анализът показва, че значителна част от установените генотипове са ревматогенни, нефритогенни или инвазивни. Изведени са важни изводи, а именно че на базата на генотипното разнообразие експерименталните 26 - и 30 - валентни ваксини срещу *S. pyogenes*, биха имали покритие у нас в над 84% и съответно 100%. Изолатите се групират най-често в клъстер А-С3, който включва и доминиращия *emm1* тип. като се наблюдава статистически значима асоциация със суперантигените *SpeA*, *speG*, *speJ*. Вторият по-честота клъстер Е4 се характеризира с наличие предимно на суперантигена *speC*. MLST анализът извършен за първи път при български изолати, установява 8 секвенционни типа, които обхващат и най-честите обособени *emm*-типове, което потвърждава дискриминативната способност и валидността на данните установени чрез едно-локусния метод. Бих препоръчал в бъдеще

резултатите получени от генотипизиране да се онагледяват чрез филогенетични дървета, както е възприето в молекулярната епидемиология.

Изводите единадесет на брой, са прецизно формулирани и отразяват адекватно изпълнението на целта и поставените задачи едновременно акцентирайки върху най-важните находки от дисертационния труд.

Работата представя значителни оригинални научни и практически приноси, които напълно приемам.

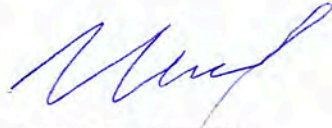
Адиле Мухтарова представя пет публикации свързани с дисертационния труд. Във всички от тях тя е първи автор, което свидетелства за нейния водещ и съществен принос в изследванията. Две от публикациите са на английски, в т.ч. една статия в престижно международно списание – Journal of Global Antimicrobial Resistance с IF-2,022. Представени са и 10 участия в научни форуми, като в 8 от тях тя е първи или втори автор. Считаю, че наукометричните показатели надхвърлят критериите за придобиване на ОНС „Доктор“ заложи в правилника на МУ-София.

Заклучение. Работата притежава безспорна научна стойност, изследванията са извършени акуратно чрез съвременни методи и подходи. Получените данни разширяват разбирането ни по проблема *S. pyogenes* и са представени по начин достоен за научна разработка от такъв характер.

На базата на изложеното, смятам че г-ца Мухтарова напълно изпълнява критериите за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“ според Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и правилника за прилагането му в МУ-София и убедено предлагам на уважаемите членове на журито и НС да одобрят кандидатурата ѝ.

Дата: 2/11/2018

Изготвил становището:.....


/Доц. Иван Иванов/