

Становище

От проф. Искра Витанова Иванова дбн

на дисертационен труд на тема:

“Генетични детерминанти и екологични фактори на вирулентността при патогенни изолати, асоциирани с урогенитални инфекции”

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”, в област 4: Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3: Биологически науки (научна специалност Микробиология)

на редовен докторант **Маринела Красиминова Цанкова**

Научен ръководители: доц. д-р **Соня Костадинова Трифонова;**

гл. ас. д-р **Мариана Иванова Мърхова-Косева**

Със Заповед № Р-33-6904 /13.12.2019 г. на Ректора на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ съм определена за член на научно жури за защита на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор” от докторант Маринела Красиминова Цанкова.

1. АКТУАЛНОСТ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТВАНИЯ ПРОБЛЕМ.

Инфекциите на урогениталния тракт, разглеждани в екологичен аспект, засягат в световен мащаб жени и мъже от всякаква възраст с различна интензивност. Широк спектър от етиологични агенти, които се асоциират с инфекции в урогениталния тракт са главно Грам-отрицателни бактерии, но могат да участват и Грам-положителни патогени, както и гъбички. Антибиотичните препарати са първи терапевтичен избор, но прекомерната и нерегламентирана употреба на лекарствени средства от тази група в обществото бързо доведе до нарастваща устойчивост и поява на множество резистентни щамове. Изследвания на вирулентния профил на микроорганизми, свързани с неусложнени инфекции на урогениталния тракт при амбулаторни пациенти в дадена област, успоредно с детайлен анализ на лекарствената им устойчивост са оправдани както с оглед актуализацията на лечебните практики, както и за откриване на нови терапевтични подходи при лечение на инфекции на урогениталния тракт. Всичко това ми дава основание да оценя като актуална

представената научна разработка, с потенциал за научни постижения, които да имат бърза практическа реализация.

2. ОБЕМ И СТРУКТУРА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Дисертацията е изложена на 166 стандартни страници текст. Спазена е общоприетата схема и препоръчителните съотношения между отделните части на труда, както следва:

- *Въведение* – 2 стр.;
- *Литературен обзор* - 46 стр.;
- *Цел и задачи* – 1 стр.;
- *Материали и методи* – 12 стр.;
- *Резултати и обсъждане* – 82 стр.;
- *Заклучение* -2 стр.;
- *Изводи* – 2 стр.;
- *Приноси* - 1 стр.;
- *Литература* – 18 стр.

Включено е *Приложение* - 4 стр., в което е представено допълнително направено графично обобщение на резултатите, получени в изпълнение на 4^{та} експериментална задача. Отлично впечатление прави стегнатият научен стил използван при написването и подредбата на дисертацията.

Получените резултати са илюстрирани с 47 фигури и 17 таблици. Отлично впечатление прави техническо оформление на дисертацията.

В литературния обзор са представени 7 фигури, в подкрепа на научната информация по разработвания проблем. Добавен е списък на всички фигури и таблици което допринася за по-лесното възприятие на тази обемна разработка.

3. ЛИТЕРАТУРНА ОСВЕДОМЕНОСТ И ПОСТАНОВКА НА ЦЕЛТА И ЗАДАЧИТЕ.

Настоящата дисертация е комплексна и предполага добро познаване на литературните източници и методите за решаването ѝ. Докторантката е направила обстоен преглед на постиженията на други изследователи, които е успяла да предаде и анализира върху 46 страници в литературния обзор. Обзорът представя детайлно състоянието на проблема и доказва необходимостта от разработването на дисертационната теза. Разгледани са редица въпроси, свързани с епидемиология на инфекциите на урогениталния тракт като етиологичните агенти в инфекциите на урогениталния тракт, факторите на вирулентност, осигуряващи успешна инвазия, колонизация и инфекция на микроорганизмите в

урогениталния тракт, патогенезата и вирулентни фактори на бактериални уропатогенни изолати, патогенезата и вирулентни фактори при гъбични изолати. Разгледани са аспектите за формиране на биофилми, лекарствена устойчивост и механизмите на антибиотична резистентност. На вниманието на читателя се предлагат и някои нерешени проблеми. Литературният обзор е конкретен, структуриран е правилно, следвайки логическата обвързаност на информацията.

Данните от справката са послужили за ясното и правилно определяне не само на целта, но и за формулировката на задачите. Поставени са за решаване пет добре обосновани 5 експериментални задачи.

Литературата (както в обзора, така и в целия труд) е тясно свързана с темата на дисертационния труд. Литературният списък включва внушителния, дори за голяма докторска дисертация брой от 343 заглавия на латиница и 2 на кирилица. Те са основно от последните 10 години. Това говори за отлична теоретична осведоменост на докторантката и с цел намиране на ново научно предизвикателство.

Високо оценявам идеята да се проучва разпространението на антибиотичната устойчивост в световен мащаб и реалната възможност за поява на щамове, едновременно силно вирулентни и резистентни, което определя значението на тези изследвания в посока, че има научно значение и с потенциал за последващо приложение.

4. ОЦЕНКА НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ МЕТОДИ И МАТЕРИАЛИ.

Разделът "Материали и методи" демонстрира внушителен набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експериментите. Те са съвременни и адекватни за реализацията на дисертационния труд. Описани са точно и подробно, като изцяло покриват многостранните области на работата: от класическите до модерните микробиологични изследвания, включващи изолиране и начално охарактеризиране на чисти микробни култури, изолиране на тотална ДНК от МКБ, съвременни гентични анализи и видова идентификация на новоизолирани щамове.

Докторантката е подбрала селективни хранителни среди, условия и правилните методични подходи за изпълнението на различните задачи.

В отделните етапи на работата докторантката съчетава умело основните микробиологични подходи, със съвременни молекулярно-генетични методи и биохимични методи. Всички това ми позволява да дам висока оценка на научното ниво и на отличната подготовка на докторантката, която успява правилно да съчетае многообразие от класически със съвременни методи за целите на дисертацията, успешно решавайки поставените експериментални задачи.

5. ОЦЕНКА НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ.

Раздел „*Резултати и обсъждане*“ е добре структуриран, подкрепен с табличен и графичен материал, с подходяща интерпретация на получени резултати от чужди научни колективи. Авторката последователно представя доказателствен материал по своята научна теза, като по този начин логически финализира експериментална работа. Извършена е голяма по обем и разнообразна експериментална работа в рамките на комплексно микробиологично и молекулярно-генетично изследване на инфекциите на уринарния тракт. Докторантката установява, че при инфекции на уринарния тракт (ИУТ) най-рискови възрастови групи са децата под 5 години и възрастните над 50-годишна възраст. Най-засегнати от инфекции на гениталния тракт са предимно жените в репродуктивна възраст, като се наблюдава ясно изразена сезонна динамика се наблюдава при ИУТ. Най-чести етиологични агенти на ИУТ при амбулаторни пациенти са представители на разред *Enterobacteriales*, с доминиращ вид *E. coli*. Следващи по честота са *Enterococcus faecalis* и минорно представени *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cepacia*. Отчетената устойчивост спрямо действието на комплемента при 80% от Грам-отрицателните изолати определя изследването на този вирулентен фактор, като актуално направление за профилактични и терапевтични разработки. Големият процент от щамове *E. faecalis* имащи положителна хидролазна активност свидетелства за значението ѝ като вирулентен фактор при колонизацията на урогениталния тракт. Авторката доказва способността да образуват биофилм, като вирулентен фактор е най-често при щамове *Klebsiella* spp. (> 50%), независимо от относително по-ниската честота на изолиране при инфекции в урогениталния тракт. От друга страна, най-често при биофилм-формиращите щамове от разред *Enterobacteriales*, се установяват гени за вирулентни детерминанти, свързани със адхезията (фимбри и адхезини), сидерофори, както и гени, свързани със активното изпомпване на антибиотични препарати извън клетката. Особен интерес представлява присъствието на нетипичен за екстраинтестинални човешки изолати *E. coli* ген *iiss*, осигуряващ серумна устойчивост, при изследваните биофилм-формиращи щамове *E. coli*. Отчетена е увеличена антибиотична устойчивост към клас флуорохинолони при всички бактериални щамове и висока устойчивост към нитрофурантоин при тестваните щамове от разред *Enterobacteriales*. Най-често множествена резистентност е отчетена към пеницилини, тетрациклини и флуорохинолони или триметоприм/сулфаметоксазол. Сред изследваните изолати *Enterobacteriales* 29 % проявяват Множествена резистентност MDR, а 6% - са екстремно устойчивите щамове. Изолиран е изключително устойчив щам *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* U-230, чувствителен единствено към карбапенеми. В резултат

на проведените експерименти е установено е, че гъбичните изолати се отличават с изразена лекарствена чувствителност въпреки честотата си на срещане сред амбулаторните пациенти.

Всички резултати са представени и анализирани в отделните глави от раздела „Резултати и обсъждане“, които логично следват хода на решаването на поставените задачи. Те са обобщени и дискутирани в светлината на публикуваните данни от последните години. Висока оценка заслужават както идеята, така и обемът от изследвания проведен по изпълнението на тази задача и в целия труд. Направената дискусия по всеки експеримент, съпоставката на резултатите за отделните щамове и експерименти, и съпоставката с литературните данни, още веднъж подчертава качествата на докторантката и владееенето на експерименталната теория. С това тя доказва, че е овладяла напълно третата степен на обучението си и е завършен експериментатор.

6. ПРИНОСИ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТКАТА ЗА НАУКАТА И ПРАКТИКАТА, ЗАБЕЛЕЖКИ И ВЪПРОСИ.

Авторефератът отговаря напълно на целите, задачите и постигнатите резултати в дисертационния труд. Приемам направените приноси.

Маринела Красиминова Цанкова е водещ автор във всичките научни публикации, което показва творческата и изследователската ѝ активност при изработването и оформянето им. Резултатите от дисертацията са публикувани в 2 публикации в списанието *J. BioSci. Biotechnol* като и 4 участия в национални научни форуми като водещ изследовател.

Към докторатката имам следния въпрос?

Дали резистентните към антибиотици бактерии, които представляват сериозна заплаха за лечението на редица бактериални заболявания, може да бъде страничен ефект от първоначалните функции на определени генни продукти, като така наречените efflux помпи?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

В заключение искам да подчертая, че материалът е дисертабилен. Темата е актуална, докторантката е усвоила съвременни методи, експериментите са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки. Открояват се изключително оригинални научни и приложни приноси. Въз основа на гореизложеното уверено мога да заявя, че рецензираният дисертационен труд представлява оригинална научна разработка, с теоретично и приложно значение. Той отговаря на всички условия на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и на Правилника на ПУ “Паисий Хилендарски“. Поради гореизложеното, убедено даваме своята **положителна оценка** за

проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и *предлагаме на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен ‘доктор’* на **Маринела Красмирова Цанкова** в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност **Микробиология**.

03.02.2020г.

София

Рецензент:

Проф. Искра Иванова дбн