

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Пенка Ангелова Мончева, д-р, Софийски университет „Св. Кл. Охридски”,
Биологически факултет

на дисертационен труд, представен за защита пред научно жури, сформирано със заповед №
R33-6904/13.12.2019 г. на Ректора на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ за
получаване на образователната и научна степен „доктор”

Автор на дисертационния труд: Маринела Красимилова Цанкова

Тема на дисертационния труд: „Генетични детерминанти и екологични фактори на
вирулентността при патогенни изолати, асоциирани с урогенитални инфекции“

1. Кратки биографични данни и характеристика на научните интереси на кандидата

Маринела Цанкова е родена през 1989 г. През 2012 г завършва бакалавърска степен по „Молекулярна биология“ в ПУ „Паисий Хилендарски“, а през 2014 г и магистърска степен в магистърска програма „Биотехнологична микробиология“. От 2014 г и до момента тя работи като биолог в катедрата по Биохимия и микробиология на Биологически факултет на ПУ и едновременно осъществява редовна докторантура към същата катедра. Отчислена е с право на защита през март на 2019 г. Като биолог тя участва в подготовка на практически занятия в секция „Микробиология“ към катедрата, в която работи. Научните ѝ интереси са в областта на микрофлората на повърхностни води, седименти и почви и на микрофлора, асоциирана с урогенитални инфекции при амбулаторни пациенти.

2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Урогениталните инфекции са широко разпространени сред хората, независимо от пола и възрастта. Причинители на тези инфекции са микроорганизми с различен таксономичен статус – бактерии и гъби. С най-голямо значение и разпространение са Грам-отрицателните бактерии от разред *Enterobacteriales*. За успешно лечение на тези инфекции е необходимо да се разполага с информация за таксономичното разнообразие на техните причинители, със сведения за тяхното разпределение по пол и възраст, както и за наличието в тях на генетични детерминанти, обуславящи тяхната патогенност. От наличието на някои от тези детерминанти зависи тяхната резистентност към антибиотици, които най-често се използват за лечение на тези инфекции. Сравнително добра е базата от данни за видовото разнообразие на причинителите на урогенитални инфекции при хоспитализираните пациенти, но не така стои въпросът с амбулаторните. Особено голямо значение за изхода от тези инфекции е изследването на тяхната антибиотична резистентност. Проблемът с антибиотичната резистентност на патогените е изключително сериозен и актуален и е свързан не само с урогениталните инфекции, но и с причинителите на други сериозни инфекции. От тази гледна точка, считам, че темата на

настоящия дисертационен труд е много актуална. Нейното разработване е принос към установяване на разнообразието от микробни агенти, причинители на урогенитални инфекции сред амбулаторни пациенти от гр. Пловдив, което обхваща разпределение по пол, възраст, сезон, видово разнообразие, характеризирани на съвкупност от генетични детерминанти на патогенността, съобразно видовата принадлежност, изследване на антибиотичната резистентност и връзката ѝ с факторите на патогенност.

Дисертационният труд е построен по стандартния начин и е съставен от 9 раздела: Въведение (2 стр.), Литературен обзор (44 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (12 стр.), Резултати и дискусия (83 стр.), Заключение (2 стр.), Изводи (2 стр.), Научни приноси (1 стр.), Литература (19 стр., съдържаща 345 литературни източници), Приложения – три броя. Общият обем на труда, без приложенията е 166 страници А4 формат.

Литературният обзор е представен в оптимален обем спрямо този на целия дисертационен труд. Структуриран е много добре, съобразен е с темата на дисертационния труд и е целенасочен. В него дисертантът разглежда редица въпроси, пряко свързани с дисертационния труд. Представена е информация по следните по-важни въпроси: Характеристика на нормалната микрофлора на урогениталния тракт на човека; Епидемиология на инфекциите на урогениталния тракт, като поотделно е разгледан уринарният и гениталният тракт; Разгледани са основните етиологични агенти в инфекциите на урогениталния тракт; Фактори на вирулентност, осигуряващи успешна инвазия, колонизация и инфектиране на урогениталния тракт, като въпросът е разгледан поотделно за бактериалните и гъбните агенти; Лекарствената устойчивост при патогените и в частност при причинителите на урогенитални инфекции; Разгледани са механизмите на антибиотична резистентност. Много хубаво впечатление прави структурирането на литературния обзор и включването преобладаващо на съвременни литературни източници – около 57% от цитираната литература е от последните 10 години. Езикът и стилът са добри, ясни и точни. Литературният обзор завършва със заключение, което насочва читателя към необходимостта от изследването, предмет на дисертационния труд. Към тази част от дисертационния труд имам някои забележки, които са технически и езикови: Напр. на стр. 13, а също и след това на едно две места се използва терминът „нозокомиални“. Такава дума отсъства в българския език и би било правилно да се каже „вътреболнични“. Бих добавила още изрази като „биофилм формиране“, вместо „формиране на биофилм“ (стр. 28 и стр. 29); „нутриенти“ (стр. 29), вместо „хранителни вещества“. Фигурите, включени в Литературния обзор, макар и взаимствани от други, цитирани литературни източници, би трябвало да се преведат на български език; Латинските имена на микроорганизмите се изписват изцяло (родово и видово име) само при първото им споменаване. След това в текста трябва да се изписват със съкратено

родово име, според възприетия начин за съкращение. Последното се отнася и за другите раздели на дисертационния труд.

Целта на дисертацията е формулирана ясно. За нейното реализиране е предвидено изпълнението на 5 основни задачи, също формулирани точно и в пълно съответствие с поставената цел. В действителност зад краткото формулиране на някои от задачите (задача 2 и 3) стоят по няколко подзадачи. Считаю, че задачи 1 и 2 би трябвало да разменят своите места. За да бъде направен анализ на етиологичната структура, трябва да е известен родовият/видовият състав на клиничните изолати.

Разделът „Материали и методи“ е написан в стегнат стил и е структуриран в няколко точки, с които се описват използваните като обект микроорганизми, представляващи 546 клинични изолати от амбулаторни пациенти с различни инфекции на урогениталния тракт (приблизително по-равно от уринарния и гениталния тракт). Описани са всички хранителни среди, използвани в изследването – 26 на брой. Представен е списък на използваните реактиви и буфери. Описани са приложените в изследването методи. Една част от тях са рутинни, класически методи и подробното им описание, което разбира се не е грешка, не е било необходимо. Описани са условията на провеждане на PCR амплификациите при различните анализи, като е представена подробна характеристика на използваните праймери в добре изработени таблици. Много хубаво впечатление прави използването на различни статистически методи за обработка на получените резултати. Считаю, че от методична гледна точка дисертационният труд е богат, тъй като са използвани разнообразни, както класически, така и съвременни молекулярни методи, с което методичните умения на докторанта са надградени. Прави впечатление огромният брой изолати, които са анализирани. Към този раздел имам следните забележки: Много често се използва терминът „замътване“ с определен брой клетки. Правилно е да се използва „приготвя се суспензия“ или „суспендират се...“; На стр. 54, т.4.14, не е ясно посочено от вас ли са направени модификациите на теста за серумна резистентност и ако е така би трябвало да посочите кое точно е модифицирано, като подчертаете само тях, тъй като е посочен авторът на метода. Отсъства като метод използването на полуавтоматизираната система Merlin MICRONAUT (MERLIN Diagnostika GmbH, Germany), която се споменава за първи път в раздела Резултати и дискусия.

В раздела „Резултати и дискусия“ докторантът представя резултатите от проведените изследвания и същевременно ги дискутира в светлината на известното в литературата по съответния въпрос. Разделът е обособен сполучливо в три глави. Резултатите са представени в 39 добре оформени фигури и 13 таблици. Първата глава обединява резултатите от първите две задачи. Във връзка с първата задача са представени резултатите за етиологичната структура на инфекциите на урогениталния тракт при изследваните амбулаторни пациенти. Представени са данни за честотата на изолиране на патогенни микроорганизми в изследването проведено в

рамките на приблизително една година, при което са изолирани 546 щамове – 279 от урина и 267 от генитален тракт. Всички щамове са подложени на анализ с оглед на определяне на тяхната видова принадлежност, при което е създадена внушителна колекция от идентифицирани до вид щамове, инфектиращи урогениталния тракт при хора. Установено е, че най-много положителни проби от уринарния тракт са установени през м. юли (2016 г.), неправилно отбелязано в текста, че пикът е през м. юни (стр. 62), докато тези от гениталния тракт бележат пик през м. август (2016 г.). Що се отнася до разпределението на инфекциите сред пациентите по пол и възраст се установява, че най-засегнати от уринарни инфекции са жените, от които са изолирани 227 изолата. Установени са най-рисковите групи – деца до 5 години и възрастни над 60 години. Най-често етиологичните агенти на уринарните инфекции са представители на разред *Enterobacteriales* (80%), следвани от представители на родовете *Enterococcus* (15%), *Staphylococcus*, *Streptococcus* (под 3%). Инфекциите на половите пътища отново са най-разпространение при жените, а най-засегната е групата между 21 и 40-годишна възраст. Основен етиологичен агент са представители на род *Candida* (при 35% от пробите), следвани от представители на разред *Enterobacteriales*, *Enterococcus*, *Streptococcus* и *Staphylococcus*. По втората задача са представени резултатите от идентификацията на изолираните щамове предварително идентифицирани до род на базата на рутинни методи и групирани като представители на разред *Enterobacteriales*, други Грам-отрицателни щамове, Грам-положителни каталаза-отрицателни и каталаза-положителни щамове и гъбните представители. За идентификацията е използвана системата Enterotube II (BD, BBL), рутинни тестове и системата Merlin MICRONAUT, съответно плаки MICRONAUT-GNE, MICRONAUT-NF, MICRONAUT-PRO, MICRONAUT-IDS, MICRONAUT-*Candida*. Сред представителите на разред *Enterobacteriales*, доминиращ е видът *Escherichia coli*. Сред другите Грам-отрицателни бактерии са установени единични щамове на *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cepacia*. Сред Грам-положителните каталаза-отрицателни щамове са идентифицирани видовете *Enterococcus faecalis* и *Streptococcus agalactiae*; сред Грам-положителните каталаза-положителни щамове – *Staphylococcus saprophyticus* и *Staphylococcus aureus*. Гъбичните инфекции се причиняват най-често от вида *Candida albicans*. Видовата принадлежност на изолатите, установена с фенотипни методи е потвърдена чрез секвениране на гените за 16S рРНК, като за целта са избрани 15 щамове от групите на всеки идентифициран вид. Потвърдена е видовата принадлежност на всички изолати. Резултатите от биохимичната идентификация на представителите на разред *Enterobacteriales* е подробно представена в Приложение 2. Бих искала да отбележа огромния труд, извършен от докторанта, при който са анализирани 546 щамове по също така огромен брой показатели. Потвърждаването на идентификацията на щамовете чрез молекулните методи е доказателство за прецизното изпълнение на работата по идентификацията с фенотипните

методи, което не винаги се оказва лесна изследователска задача. Това от своя страна е свидетелство за много добро ниво на методичните умения на изследователя. Втората глава представя резултатите от изпълнението на третата задача, която изследва вирулентните фактори при изолираните причинители на урогенитални инфекции. Показани са данни от изследванията на серумната чувствителност, хидролитичната активност, капацитета към формиране на биофилм при представители на разред *Enterobacteriales*, при *E. faecalis*, *Candida* spp., продукцията на фимбрии и целулоза, аглутинация на дрождеви клетки, наличие на вирулентни детерминанти чрез мултиплекс PCR при формиращи биофилм представители на разред *Enterobacteriales*. За вида *Klebsiella pneumoniae* последният от изброените анализи е направен с четири системи от праймери, даващи възможност за откриване на общо 18 гени, кодиращи вирулентни фактори, а за вида *E. coli* – пет системи от праймери за откриване на общо 23 гени за вирулентни фактори. В Глава 3 са показани резултатите за лекарствената устойчивост на представителите на разред *Enterobacteriales* (спрямо 16 антибиотика от 8 групи), *P. aeruginosa* и *B. cepacia* (спрямо 5 антибиотика), *Enterococcus faecalis* (спрямо 5 антибиотика), представители на род *Streptococcus* група В (спрямо 7 антибиотика), *Staphylococcus* spp. (спрямо 12 антибиотика), *Candida* spp. (спрямо 4 антигъбни препарата). Резултатите от тези анализи са представени подробно в Приложение 1. И тук искам да подчертая големия обем работа, извършена от докторанта. Огромният брой анализирани щамове дава възможност за добиване на по-пълна информация за разпространението на резистентност или чувствителност на изолираните щамове спрямо най-често използваните при лечението на тези инфекции лекарствени средства, което има голямо практическо значение. Към този раздел от дисертацията имам следните забележки: Струва ми се, че по-правилно би било разглеждането на етиологичната структура на причинителите на урогенитални инфекции да бъде направена след представянето на резултатите от идентификацията на изолатите, което е логично; На много места в този раздел представянето на собствените резултати се предшества от дълги участъци, в които се коментират въпроси, по-подходящи за литературния обзор, вместо първо да се представят собствените резултати, след което да се коментират; На места изказът е неясен и затруднява разграничаването на собствените резултати от тези, получени от други автори; При анализирането на факторите на вирулентност добре би било да се посочи броят на анализираните щамове за всеки един показател; При провеждането на електрофорезата за визуализиране на амплифицираните продукти е добре ДНК маркерът да се поставя от двата края на гела; Не е ясно какво представлява контролата на Фиг. от 31 до 35. За анализите, представени на Фиг. 29 и 30 пък отсъства контрола; Считам, че анализът на връзката между антибиотичната резистентност и генетичните детерминанти на вирулентност, макар и скромно, не трябва да предшества представянето на резултатите за лекарствената

чувствителност на щамовете, както това е направено; Не би било излишно в приложение да се представят данните от идентификацията със системата Merlin MICRONAUT.

Дисертацията завършва със „Заклучение“, в което дисертантът прави опит да изведе най-важните резултати, получени в хода на изследването.

3. Характеристика и оценка на изводите и приносите в дисертационния труд

Въз основа на получените резултати докторантът прави 12 извода, които са добре формулирани и произтичат логично от получените резултати.

Разработената дисертация има приносен характер, като искам да открия като по-важни тези, които докторантът е определил като оригинални. Считам, че някои приноси са формулирани като изводи (напр. принос 4). Като принос, който не е отбелязан от автора на дисертацията, бих посочила създаването чрез това изследване на богата колекция от таксономирани щамове, изолирани от амбулаторни пациенти с инфекции на урогениталния тракт, допълнително характеризирани и по други признаци, които биха могли да се използват при следващи сравнителни изследвания.

4. Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд

Прегледът на изготвения автореферат показва, че по съдържание той съответства на представеното в дисертационния труд. В съкратен вид е представен разделът «Материали и методи», което е разбираемо от гледна точка на неговия общ обем. Всички резултати са представени коректно в идентичен с този в дисертацията вид.

5. Публикации на дисертанта, свързани с темата на дисертацията

Докторантът е представил списък с две публикации, едната от които под печат в списанието Journal of BioSciences and Biotechnology. И в двете статии дисертантът Маринела Цанкова е водещ автор. Освен това е представен списък с четири участия с постерни съобщения в национални научни форуми, един от които с международно участие. Дисертантът е водещ автор във всички съобщения. Както публикациите, така и постерните съобщения докладват резултати, свързани с дисертационния труд.

6. Критични бележки, коментари и въпроси

Критичните бележки към дисертационния труд, повечето от които са от технически или стилни характер са посочени в рецензията по-горе, при анализа на отделните раздели от дисертацията. Имам следните въпроси към докторанта:

1. Какъв е броят на анализирани проби, въз основа на които са изолирани щамовете, предмет на изследване в дисертацията?
2. Оригинални стрипове Enterotube II (BD, BBL) ли са използвани за биохимичната идентификация на бактериите, тъй като на стр. 52 не е посочена фирмата-производител?

3. Бихте ли могли малко по-подробно да обясните на какво се базира тестът за определяне на морфотиповете на бактериите и считате ли, че той е достатъчен за да кажете, че изследваните щамове образуват или не целулоза и фимбрии? Съществуват ли други методи за тяхното определяне?
4. Тъй като бактериите от вида *E. coli* са най-често изолирани във вашите изследвания бихте ли могли да кажете кои от всички механизми на устойчивост към различните антибиотици е най-разпространен сред бактериите от разред *Enterobacteriales*?

7. Лични впечатления за дисертанта

Не познавам лично дисертанта Маринела Цанкова и нямам преки впечатления от нея. Прочитът на нейния дисертационен труд обаче формира у мен мнение за един много добре подготвен както в теоретично, така и в методично отношение млад учен, който за периода на докторантурата е свършил огромна по обем работа, на много добро научно ниво, резултатите от която е успял да анализира, дискутира и обобщи в дисертационния труд. Това показва, че тя е придобила квалификацията, съответстваща на тази степен на обучение.

8. Заключение

Оценката ми за дисертационния труд на Маринела Цанкова, базираща се на направения анализ на всички негови раздели и на неговото оформяне е изцяло положителна. Всичко това ми дава основание да смятам, че в хода на докторантурата тя е усвоила теоретични знания и методични умения, напълно съответстващи на изискванията се за образователната и научна степен „доктор“ и е изграден млад учен. Извършено е задълбочено и значително по обем изследване чрез умелото съчетаване на разнообразни методи. Дисертационният труд има приносен характер в изучаването на причинителите на урогенитални инфекции при амбулаторни пациенти.

Въз основа на гореизложеното, както и предвид Правилника за приложение на закона за развитие на академичния състав в Република България и този на ПУ „Паисий Хилендарски“ считам, че настоящият труд напълно отговаря на изискванията за докторска дисертация, оценявам го положително и препоръчвам на Научното жури да присъди образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика“, професионално направление 4.3. Биологически науки, Докторска програма „Микробиология“ на Маринела Красимилова Цанкова.

05.02.2020 г.

София

Подпис:

(проф. д-р П. Мончева)