

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Велизар Костадинов Гочев, ръководител на катедра „Биохимия и микробиология”, Биологически факултет, ПУ „П. Хилендарски”

на дисертационен труд за присъждане на 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*

Автор: *Маринела Красиминова Цанкова*

Тема: *Генетични детерминанти и екологични фактори на вирулентността при патогенни изолати, асоциирани с урогенитални инфекции*

Научни ръководители: *доц. д-р Соня Костадинова Трифонова и гл.ас. д-р Мариана Иванова Мърхова - Косева*

1. Общо описание на представените материали *Микробиология*

Със заповед № Р33-6904 от 13.12.2019 г. на Ректора на Пловдивския университет „Павел Хилендарски” (ПУ) съм определен за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема *Генетични детерминанти и екологични фактори на вирулентността при патогенни изолати, асоциирани с урогенитални инфекции* за придобиване на образователната и научна степен 'доктор' в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4. Природни науки, математика и информатика, докторска програма *Микробиология*. Автор на дисертационния труд е *Маринела Красиминова Цанкова* – докторантка в редовна форма на обучение към катедра „Биохимия и микробиология” с научни ръководители *доц. д-р Соня Костадинова Трифонова и гл.ас. д-р Мариана Иванова Мърхова - Косева* от ПУ „П. Хилендарски”.

Представеният от *Маринела Цанкова* комплект материали на хартиен носител е в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ, включва следните документи:

- молба до Ректора на ПУ за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд;
- автобиография в европейски формат;

- протоколи от катедрени съвети, свързани с докладване на готовност за откриване на процедурата и с предварително обсъждане на дисертационния труд;
- дисертационен труд;
- автореферат;
- списък на научните публикации по темата на дисертацията;
- копия на научните публикации;
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;
- справка за спазване на специфичните изисквания на съответния факултет;

Всичко това ми дава основание да определя настоящата процедура като законна.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Докторантаката Маринела Цанкова е бакалвър по „Молекулярна биология” и магистър по „Биотехнологична микробиология” от Биологическия факултет на ПУ. От 2014 г. работи като биолог в катедра „Биохимия и микробиология” и е ангажирана с подготовка, организация и провеждане на лабораторни упражнения по Микробиология, Имунология, Микробни биотехнологии и редица други дисциплини, по които се провежда обучение в секцията по Микробиология. Докторантката участва активно в научноизследователската и административната дейност на катедрата.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Един от основните проблеми на съвременното общество безспорно е появата на все по-голям брой патогенни микроорганизми, които са резистентни спрямо широк спектър от използваните в клиничната практика антибиотични препарати. По данни на СЗО само за последните 10 години броят им е нараснал повече от 2 пъти. От друга страна инфекциите на урогениталния тракт (УГИ) са сред най-разпространените, като една от всеки две жени и един от всеки десет мъже е страдал от подобна инфекция поне веднъж в живота си, което ги прави особено социално значими. Намирането на решение на проблема свързан с лечение на инфекции на урогениталния тракт, причинени от резистентни микроорганизми се основава на изясняване на степента на разпространение на такива щамове, коректната им идентификация, изясняването на генетичните детерминанти на вирулентността и резистентността им. Считам, че темата на настоящия дисертационен труд е особено актуална, защото резултатите от подобни изследвания ще послужат като основа за разработване на нови и ефективни стратегии за лечение на УГИ.

4. Познаване на проблема

Литературният обзор е изчерпателен и се основава на използването на 345 литературни източника, от които 57 % са от последните 10 години. Обзорът започва с описание на нормалната микрофлора на урогениталния тракт и класификация на различните типове УГИ. Разгледани са основните характеристики на различните етиологични агенти при УГИ и етапите на развитие на инфекциозния процес. Подчертана е доминиращата роля на бактериите от семейство *Enterobacteriaceae*. Подробно са описани различните вирулентни фактори на причинителите на УГИ. Особено внимание е отделено на формирането и структурата на бактериалните биофилми и лекарствената устойчивост, което е естествено предвид на това, че експерименталната работа в основната си част е фокусирана именно върху тези два въпроса. В този смисъл обзорът е целенасочен, а представената в него информация е пряко свързана с разработвания проблем. Обзорът завършва с кратко обобщение, което мотивира необходимостта от разработване на дисертационния труд и дефинира неговата основна цел. Обемът на използваната литература и начинът на оформяне на обзора недвусмислено показва, че докторантката е запозната с разработвания проблем в дълбочина. Обзорът би спечелил, ако информацията в него бе представена по-аналитично, а не толкова детайлно описателно.

5. Методика на изследването

Приложената експериментална схема е логична и правилно структурирана. В изследването са обхванати 546 амбулаторни пациенти. Обемът на извадката е достатъчен за получаване на достоверни резултати. Приложени са референтни микробиологични методи за изолиране, физиолого-биохимична идентификация, определяне на антибиотична чувствителност, серумна устойчивост и биофилм-формиращ капацитет. В съчетание с класическите са използвани и съвременни молекулярно-биологични методи за идентификация, като мултиплекс PCR и секвенционен анализ. Всички приложени методи отговарят на целите на изследването и позволяват получаването на достоверни и възпроизводими резултати.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е оформен по възприетия у нас начин и е структуриран в разделите: Въведение (2 стр.) ; Литературен обзор (44 стр.), Цел и задачи (1 стр.); Материали и методи (12 стр.); Резултати и дискусия (85 стр., от които 2 стр. Заключение); Изводи (2 стр.); Приноси (1 стр.), Използвана литература (18 стр.) и 22 стр. Приложения. Считаю, че съотношенията между отделните раздели на дисертационния труд са оптимални, като естествено разделът Резултати и дискусия заема доминиращо място с малко над 50 % от обема на работата.

Целта на дисертационния труд е ясно формулирана, като за постигането ѝ са поставени 5 конкретни задачи.

Следвайки определената експериментална схема работата по дисертационния труд започва с оценка на честотата на разпространение на УГИ сред 546 амбулаторни пациенти от гр. Пловдив, като е направен анализ на честота на срещане по пол и възраст. Установени са сезонни флукутации в разпространението на уринарните инфекции с пик през летните месеци и липса на сезонни колебания в честотата на срещане на генитални инфекции. Като най-рискови за развитие на уринарни инфекции са определени деца на възраст под 5 години, възрастни над 50 години, а на генитални инфекции - жени в репродуктивна възраст. Оценявам положително факта, че в работата е отразена корекцията в таксономичния статус на семейство *Enterobacteriaceae*, която влиза в сила през последната година от работата на докторантката. Всички изолати от пациенти са подложени на биохимична идентификация чрез две различни системи BBL Enterotube II и Merlin Micronaut. Установено е доминиращо присъствие на представители от видовете *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Enterococcus faecalis*. Чрез приложените конвенционални системи е постигната видова идентификация на изолатите със степен на достоверност над 95 %. На следващия етап от работата по втора експериментална задача видовата принадлежност на щамовете е потвърдена и чрез секвениране на 16 S рДНК. Деветдесет и седемте гъбични изолата също са видово идентифицирани по посочената схема, като е установено, че 84 % от тях се отнасят към вида *Candida albicans*, а останалите 16 % от групата на Non-Albicans Candida (NAC) са разпределени между видовете *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.tropicalis* и *C.parapsilosis*.

В третата експериментална задача усилията са насочени към проучване на различни вирулентни фактори на видово идентифицираните щамове, започвайки с определяне на серумната устойчивост, като за целта е приложен бърз и евтин culture-and-spot тест. Установен е висок процент на резистентност (над 84 %) спрямо действието на комплемента. Сериозно внимание е отделено и на хидролитичните ензими, продуцирани от щамовете, като един от основните вирулентни фактори. Доказано е, че 31 % от щамовете *Enterococcus faecalis* продуцират желатиназа и 76 % хидролизират казеин. При щамовете от вида *C.albicans* е установено, че едва 7% продуцират желатиназа, 7% хидролизират казеин, 10 % продуцират фосфолипази и едва 6 % - естерази.

В рамките на третата експериментална задача всички 546 щама са тествани за образуване на биофилм. Представителите на разред *Entrobacteriales* са изследвани на три различни вида хранителни среди – соево-казеинова, M63 и RPMI. Като най-подходяща за образуване на

биофилми е определена среда M63. Двадесет и един % от щамове *Enterobacteriales* образуват биофилм, 58 % от *Klebsiella*, 10 % от *Escherichia*, 25 % от *Enterococcus* и едва 7 % от *Candida*. Най-висок биофилм-формиращ капацитет проявява щам *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* G-180. Проведени са тестове за определяне на морфотипа на висчки щамове, за които е доказано образуването на биофилм. Осемдесет и осем процента от щамове от род *Klebsiella* са отнесени към saw-тип и 55 % от щамове от род *Escherichia* – към pdar-тип. Вирулентните детерминанти при биофилм-формиращите щамове от разред *Enterobacteriales* са изследвани чрез мултиплекс колония PCR, като за *Klebsiella* са конструирани 4 системи, а за *Escherichia* – 5 системи. Получените резултати показват щамова специфика в разпределението на изследваните вирулентни детерминанти сред биофилм-формиращите щамове.

Съществена по обем експериментална работа е посветена на определяне на лекарствена устойчивост на щамове. Отчетена е повишена 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 MDR, а 6% - XDR фенотип. Изолиран е изключително устойчив щам *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* U-230, чувствителен единствено към карбапенеми. Установено е, че гъбичните изолати се отличават с изразена лекарствена чувствителност въпреки честотата си на срещане сред амбулаторните пациенти. Получените резултати показват сериозно стеснение на спектъра на възможните перорални препарати и повишен риск за хоспитализация за лечение с парентерални антибиотични средства.

Експерименталната работа по дисертацията е обхватна и изчерпателна. Получените резултати са коректно интерпретирани и съпоставени с тези на други автори. Този раздел на дисертационния труд определено превъзхожда по аналитичност литературния обзор.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

На база на получените резултати са формулирани 12 извода, 5 научни приноса с оригинален характер и с научни приноса с потвърдителен характер. Високо оценявам факта, че това е първото по рода си систематизирано проучване и характеризиране на основните причинители на УГИ при амбулаторни пациенти на територията на град Пловдив. Особено важни за клиничната практиката са приносите, които доказват, че резултатите от диск-дифузионния тест за антибиотична чувствителност при биофилм-формиращи щамове, могат да доведат до

компрометиран терапевтичен избор, както и липсата на корелация между изследваните вирулентни детерминанти и лекарствената устойчивост.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Във връзка с дисертацията са публикувани 2 статии в реферирано списание, в които докторантката е първи автор. Маринела Цанкова е участвала с постери в 2 национални и 2 международни научни форума. Представените публикации отразяват съществени резултати, които са получени в рамките на настоящото дисертационно изследване.

9. Лично участие на докторантката

В качеството си на ръководител на катедрата по „Биохимия и микробиология” съм бил пряк свидетел на интензивната експериментална работа провеждана от Маринела Цанкова, в рамките на докторантурата, активното ѝ участие при планиране, обсъждане на получените резултати, оформяне на дисертационния труд и публикациите по темата. Разбира се не мога да пренебрегна и оценявам високо голямата ангажираност от страна на научните ръководители и колегите от секция Микробиология с работата на докторантката.

10. Автореферат

Авторефератът е оформен според изискванията на ПРАСПУ и отразява основните резултати, постигнати в дисертацията, изводите и приносите.

11. Критични забележки и препоръки

Към работата нямам критични забележки и със задоволство ще отбележа, че всички препоръки за корекции, които предложих на предварителното обсъждане на дисертационния труд и при преценката на готовността му за защита, са взети предвид от докторантката и научните ѝ ръководители.

Към докторантката имам следните въпроси:

Направете съпоставка между системите за определяне на лекарствена устойчивост EUCAST и CLSI. Възможно ли е при прилагане само на една от двете системи да се получат резултати, които да доведат до компрометиран терапевтичен избор?

Каква е вероятната причина за високата честота на откриване на гените *iss* и *traT*, сред патогенни щамове от човешки изолати, които по принцип са типични за щамове от птичи изолати, и какви допълнителни изследвания са необходими за доказване на хипотезата?

12. Лични впечатления

Познавам Маринела Цанкова от 2010 г. и мисля, че този 10-годишен период, като неин преподавател, а от 2014 г. и като ръководител на катедрата, в която работи съм успял да формирам обективно мнение за личните и професионалните ѝ качества. Считаю, че тя целенасочено върви по професионалния път, който си е избрала и притежава старание, желание, любознателност, знания, умения за общуване и уважение към авторитети, които са качества абсолютно необходими за успешна академична кариера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Маринела Цанкова съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“. Представените материали и дисертационни резултати напълно съответстват на специфичните изисквания на Биологическия факултет, приети във връзка с Правилника на ПУ за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че докторантката Маринела Красиминова Цанкова притежава нужните теоретични знания и професионални умения по научна специалност Микробиология като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен ‘доктор’** на Маринела Красиминова Цанкова в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4. Природни науки, математика и информатика, докторска програма *Микробиология*.

27.01.2020 г.

Рецензент:

(проф. д-р Велизар Гочев)