

До Председателя на Научното жури,  
назначено със Заповед No 426/29.11.2017г.  
на Директора на НЦЗПБ-София

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Мариана Атанасова Мурджева, дм, мзм,  
Катедра Микробиология и Имунология  
При Медицински Университет –Пловдив

**относно** дисертационен труд за ОНС „доктор”  
**на тема:** *„Проучвания върху възможностите за диагностика и типизиране на Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis и Mycoplasma genitalium с молекулярно-генетични методи“*  
**автор:** д-р Ива Огнянова Филипова,  
**докторант:** на самостоятелна подготовка в НЦЗПБ-София  
**област на ВО:** 4.Природни науки, математика и информатика  
**професионално направление** 4.3. Биологически науки  
**научна специалност:** Микробиология  
**Научен ръководител:** проф. д-р Тодор Кантарджиев, дмн, НЦЗПБ-София  
**Научен консултант:** проф. Магнус Унемо, Швеция

### Биографични данни и кариерно развитие

Д-р Филипова е завършила висшето си образование (магистър по медицина) в Медицински университет –София през 2010 г., след което започва да работи като лекар-ординатор в Лабораторията по микробиология и вирусология на УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“, София.

От 2013 г. е на работа в Националната референтна лаборатория по Микози и СПИ в НЦЗПБ-София. От същата година е зачислена като докторант на самостоятелна подготовка. Отчислена е с право на защита през 2017 г. Придобива специалност по микробиология през 2016 г.

Д-р Филипова е осъществила две следдипломни специализации в Швеция в Националната референтна лаборатория по патогенни найсерии и Европейския колабориращ център на СЗО за гонорея и други полово-предавани инфекции, както и специализирани курсове, организирани от ECDC, PHE и IUST по темата на докторантската ѝ програма. Участието ѝ в

следдипломен курс на тема “*Методология на научното изследване – обект на дисертационна теза и медицинска статистика*“ във ФОЗ, МУ-София подчертава насочеността ѝ към статистически анализи, необходими за обработване на получените резултати. Владее три чужди езика – свободно немски, английски и основно ниво на шведски.

Представените биографични данни показват, че за краткото време на професионалния си път дотук, д-р Филипова е отбелязала възходящо и убедително кариерно развитие – само за 7 години след завършването на висшето си образование е защитила специалност по микробиология, разработила е докторска програма и е участвала в няколко специализирани форми на следдипломно обучение, вкл. и в чужбина, в подкрепа на дисертационния ѝ труд.

### **Актуалност и значимост на дисертационния труд**

Актуалността на разработения от д-р Филипова дисертационен труд се обуславя от няколко тенденции:

1. *Полово-предаваните инфекции – трихомониази, сифилис, гонорея, хламидиази, микоплазматози, се увеличават в световен мащаб.* Те заемат сериозно място сред най-значимите причини за репродуктивни неуспехи в зрялата полово-активна възраст, водят до загуба на работоспособност, както и до високи разходи за диагностика и лечение. В допълнение на това липсват систематизирани данни за тяхното разпространение в нашата страна, особено на различните хламидийни и гонококови геногрупи. Всичко това обуславя и интереса на докторантката към избраната тема. Следва да се отбележи обаче, че диагностичните методи за доказване на урогениталните инфекции от хламидии и микоплазми са стояли във фокуса на научните проучвания на няколко български колектива - от МУ-София (Я. Хараламбиева, Катедра по микробиология), МУ-Пловдив (Катедра Микробиология и имунология, Катедра Дерматология и венерология, Секция Нефрология), МЦ-КИРМ - Плевен (*Dimitrakov J., et al. Folia Medica 1998, XXXX, 4: 45-47; Димитраков Й. Proceedings of the Ninth Congress of the Bulgarian Microbiologists, 1998, vol.1: 180-186; Мурджева М. Инфектология. 2005,1/2:31-36; Ayvazova N et al. American Journal of Reproductive Immunology, 2012:(67), s1; Rilcheva M et al. American Journal of Reproductive Immunology, 2015:(73),23-49*).
2. *Класическите микробиологични подходи (рутинно култивиране и идентификация) за доказване на полово-предавани инфекции са ненадеждни и несъвършени.* Причинителите на гонорея, полово-предавани хламидиази и микоплазматози се отличават с трудоемко и

време-емко култивиране - те са взискателни, капризни и изискват високо-компетентен персонал, а и оборудване за тази цел. Прилагането на бързи, точни и достъпни микробиологични тестове за определяне на най-честите полово-предавани патогени (хламидии, гонококи и микоплазми) е несъмнена необходимост за страната ни и в този смисъл разработеният дисертационен труд е актуален и навременен.

3. *Увеличаващата се резистентност на полово-предаваните бактерии към използваните антибиотици.* Въпреки безспорната роля на цефалоспорините от 3-то поколение като едни от най-ефективните антибиотици за лечение на гонорея, нараства резистентността на гонококите към тях, което ги представя като рискови бактерии за компрометиране на терапията и увеличаване на шанса от развитие на пост-гонококови усложнения. Заплаха за антимикуробната терапия представлява и *C. trachomatis*. Макар тя да е с рядка резистентност към препоръчваните антимикуробни средства като тетрациклини, макролиди и флуорохинолони, изследванията за антибиотичната ѝ чувствителност не са стандартизирани и се извършват в малък брой високо-специализирани лаборатории. Проблемите с резистентността на описаните бактерии мотивират д-р Филипова към *in vitro* изследване на чувствителността с различни методи на гонококови щамове към гентамицин – бъдещ кандидат в лечението на гонорея.

Тези факти определят насочването на докторантката към разработване на информативни и чувствителни методи за диагностика на тези ППИ като обосновано и необходимо.

### **Обща характеристика на дисертационния труд**

Написан е на 134 страници и е структуриран в следните раздели:

- 1/ Въведение и актуалност на проблема – 40 стр;
- 2/ Цели и задачи – 1 стр.,
- 3/ Материали и методи – 32 стр.,
- 4/ Резултати и обсъждане – 19 стр.,
- 5/ Изводи – 1 стр.,
- 6/ Справка за приносите и списъци на публикации и участия – 8 стр.,
- 7/ Библиография – 15 стр.

Съотношението между отделните раздели е приемливо – тъй като темата се фокусира върху разработване на методични проблеми (съвременна бактериологична диагностика на ППИ), логично е в раздела „*Материали и методи*“ да присъства повече информация относно използваните подходи. С удоволствие подчертавам доброто онагледяване на текста с информативни фигури (18 бр.) и таблици (8 бр.).

Научният труд е написан на точен медицински език. Изложението се чете лесно, а данните се възприемат ясно.

### **Познаване на проблема**

Литературният обзор умело очертава историческите данни, микробиологичните характеристики, клиничната картина, водещите тенденции по отношение на разпространението и епидемиологията на трите най-чести полово-предавани патогени – *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*. Подробно и точно са описани различните подходи за лабораторната им диагностика - микроскопия, култивиране, клетъчни култури, имунологични и серологични методи, амплификация на нуклеинови киселини, генотипизиране, детекция на антибиотична резистентност,

Литературната справка съдържа 203 източника (2 се повтарят), от които 1 на кирилица. В нея присъстват и български автори, които са работили по проблема за диагностиката и лечението на ППИ в България, но считам, че тя не е пълна и са пропуснати някои български групи с фокус върху ППИ през последните две декади. Близко половината от цитираните източници са през последните 10 години, а около 20% от тях – през последните 5. Изборът им подкрепя впечатлението за сравнително добрата осведоменост на авторката и възможностите ѝ да анализира адекватно известните до момента данни по проблема.

На базата на аналитичния литературен преглед и необходимостта от въвеждане на модерни генетични методи за диагнозата на ППИ авторката извежда ясно поставена цел (*“апробиране и въвеждане на молекулярно-биологични методи за диагностика, типизиране и охарактеризиране на причинителите на бактериалните сексуално предавани инфекции: Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis и Mycoplasma genitalium”*), за чието изпълнение си поставя 4 стегнати задачи.

Разделът *“Материали и методи”* прави впечатление с изследваните многобройни щамове за тригодишен период (над 5000 – 1124 от България и 3884 от Швеция), както и с внимателно подбраните високо-информативни генетични методи - real-time PCR, ДНК секвениране и анализ с висока резолюция на кривите на топене (HRMA). Те са предпоставка за логични и последователни резултати. Добросъвестното и подробно описание на използваните методи насочва и към добро усвояване на техниките.

Резултатите и обсъждането са обединени в общ раздел. Той включва 7 части със собствените проучвания на д-р Филипова върху генетичната

характеристика на събраните от България и Швеция България полово-предавани изследвани патогени.

Безспорно достойнство на труда е въвеждането на молекулно-биологични (генетични) методи за модерна, чувствителна и бърза микробиологична диагностика на гонококи, урогенитални хламидии и микоплазми. Интересни са резултатите, доказващи чрез ДНК секвениране на *ompA* гена най-разпространения генотип *C. trachomatis* при ППИ в страната – генотип E, което съвпада с данните на други автори за региона и България. Чрез внедрения HRMA метод (анализ с висока резолюция на кривите на топене) е извършено ефективно типизиране на *C. trachomatis* и диференциране на различните групи на хламидията (генотип D-K). В следващите раздели са представени убедителни данни за разпространението на *Mycoplasma genitalium* и *Neisseria gonorrhoeae*. При анализа на разпространението на *M. genitalium* в страната, докторантката нагледно доказва значителното увеличение на тези инфекции от 2011 г. (0.29%) към настоящия момент (2.45%), въпреки, че делът им остава по-малък в сравнение с хламидийните ППИ.

През призмата на модерните разработени диагностични методи е потвърдена антибиотичната чувствителност на гонококовите изолати. Високо оценявам резултатите, доказващи значителното увеличение на резистентността на гонококите към азитромицин и появата на такива с намалена чувствителност и резистентност към цефалоспорини трета генерация. Логично обяснение за това авторката намира в разпространението на NG-MAST ST1407 и еволюционно свързаните секвенционни типове с мозаичен *penA* алел XXXIV, които повишават минималните инхибиращи концентрации на антибиотиците. MAST методът дава възможност за молекулярно епидемиологично типизиране на *N. gonorrhoeae* и разкриване на разпространението на различните геногрупи на гонококите. Искам да подчертая, че авторката идентифицира 85 различни NG-MAST секвенционни типа, които съответстват на 77 различни алела *porB* и 19 различни *tbpB* алела. Определен приносен характер има фактът, че от 85 секвенционни типове 29 не са били описвани досега в световната литература.

**Изводите** са правилно и синтезирано формулирани, кореспондират на поставените задачи и получените резултати. Те са 7 броя, обобщават основните резултати и представят насоки за бъдещи проучвания, напр. доколко HRMA методът може да диференцира генотипове на *C. trachomatis*, свързани с LGV.

## **Критични бележки, препоръки и въпроси**

### **1. Бележки**

1/ Би било добре в литературния преглед да беше отразена работата на поне още три български колектива в диагностиката на хламидийните, гонококовите и микоплазмените ППИ. Макар и с използването на други методи (директен имунофлуоресцентен тест и клетъчно култивиране на хламидии), но и PCR, те бележат еволюцията на прилаганите в страната методи.

2/ Желателно беше да се представи материалът, изпратен за публикуване в AMPIS относно антимикробната резистентност на шведските гонококови изолати към широко-спектърни цефалоспорини и тяхната генетична характеристика. Липсват и представени доказателства за приемането на статията за публикуване и за изнесените на научни конференции форуми.

3/ В Литературната справка има повтарящи се източници (73 и 167, 141 и 205), а в много от цитираните статии авторите са представени само с първия – би било добре да се изписват поне до 3-я автор.

4/ Някои правописни грешки, които не са съществени, и заедно с горе-посочените бележки не намаляват достойнствата на дисертационния труд.

**2. Препоръка** - да се напише монография по проблема.

**3. Въпрос** – как оценявате мястото на по-старите методи за микробиологична диагностика на хламидийните и гонорейните инфекции в съвременните условия на нарастващата честота на последните и необходимостта от бърза и прецизна диагностика? Бихте ли препоръчали алгоритъм в бактериологичното изследване на тези инфекции или диагностицирането им да започва с генетични методи? Дали мястото на директния имунофлуоресцентен метод и клетъчната култура в диагностиката на хламидийните инфекции се измества от новия златен стандарт (PCR) и тези два подхода остават в историята на хламидиологията?

### **Оценка на научните приноси**

Приемам формулираните **НАУЧНИ ПРИНОСИ** на дисертационния труд, които могат да се обобщят както следва:

#### **1. Научно-теоретични оригинални**

1/ направен е задълбочен анализ на разпространението на урогениталните хламидиази в София по възраст и пол

2/ представени са данни за циркулиращите хламидийни генотипове, свързани с ППИ и за гонококовите щамове с резистентност към трето-генерационни цефалоспорини

3/ доказано е, че разпространението на най-честите причинители на ППИ в България (хламидии, гонококи и микоплазми) е съпоставимо с това в страните от региона.

2. **Научно-приложни**, свързани с поставянето на основи за генетична идентификация и типизиране на най-честите причинители на ППИ.

1/ въвеждане за първи път в страната на молекулно-генетични методи чрез real-time PCR за съвременна и бърза диагностика на три от най-значимите полово-предавани бактерии - гонококи, хламидии и микоплазми

2/ внедряване, оптимизиране и валидиране за първи път в страната в рутинната практика на генетичния метод HRMA за типизиране на *C. trachomatis* и на генетичен метод чрез ДНК секвениране на гена *OmpA* за генотипизиране на *C. trachomatis*

Извършените проучвания имат определена практическа стойност и могат да се прилагат в диагностичната микробиологична дейност.

#### **Публикации и съобщения във връзка с дисертационния труд**

Резултатите от проучванията в дисертацията са представени в списък от 6 публикации (5 от тях с приложени копия) и участия в 4 научни форуми (за тях няма доказателствен материал). Докторантката е първи автор в 4 от публикуваните статии, всички от които са в сп. *Problems of Infectious and Parasitic Diseases* (реферирано в Scopus). Една статия е в сп. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (IF= 5.071), а друга според представения списък е приета за публикуване в AMPIS (IF=1.933). Едно от съобщенията е изнесено на научен форум в чужбина – престижният 26-ти конгрес ECCMID в Амстердам през 2016 г., а други две - на национални конгрес по клинична микробиология и инфекции в София. Всички публикации и съобщения са по темата на докторантската програма и обхващат резултати върху патогените, обект на дисертацията – микоплазми, хламидии и гонококи. Водещото участие на авторката недвусмислено говори за активната ѝ роля в разработвания проблем, а броят на публикациите и представените участия на научни форуми подкрепя впечатлението, че по-голяма част от резултатите на дисертационния ѝ труд са станали достояние на научната общност у нас и в чужбина.

**В заключение**, считам, че представената дисертация на д-р Ива Филипова е актуален, задълбочен и завършен научен труд, подготвян систематизирано и компетентно под вещото ръководство и консултации на водещи експерти, със съществен приложен принос в областта на съвременната микробиологичната

диагностика на полово-предаваните инфекции от хламидии, микоплазми и гонококи. Темата е пионерска за страната не само заради комплексното въвеждане на генетични диагностични методи в тази област, но и по отношение на разкриване на основните типове на хламидиите в България и определяне на лекарствената чувствителност на гонококите. Тя е разработена в отговор на нарастващата потребност от прецизно определяне на тези най-чести бактерии в етиологията на СПИ и необходимостта от адекватна антимикробна терапия. Дисертационният труд напълно отговаря на научните критерии в ЗРАСРБ и Правилника на НЦЗПБ за ОНС “доктор”. Това ми дава основание да гласувам категорично за придобиване на същата степен от д-р Филипова в научна специалност “микробиология“.



2.03.2018 год.

Изготвил рецензията:  
Проф. д-р Мариана Мурджева, дм