



ДО

ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НАУЧНОТО ЖУРИ
ОПРЕДЕЛЕНО СЪС ЗАПОВЕД №506/16.12.2019
НА ДИРЕКТОРА НА НЦЗПБ

РЕЦЕНЗИЯ

ОТ: доц. д-р Елизабета Василева Бачийска, дм, НЦЗПБ

ОТНОСНО: дисертационния труд на Мария Руменова Малчева на тема: „Молекулярни методи за проучване на серотиповата принадлежност на *Streptococcus pneumoniae*, колонизиращи назофаринкса при деца” – за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”,

Област на висшето образование: 4. Природни науки, математика и информатика, Професионално направление: 4.3. Биологически науки,

Научна специалност: Микробиология.

Научен ръководител: доц. Виктория Стефанова Левтерова, дм.

Представените ми от докторантката Мария Малчева документи по процедурата за изготвяне на рецензия са коректно подготвени и съответстват на ЗРАСРБ и на Правилника за приложението му в НЦЗПБ.

Кратки биографични данни.

Мария Руменова Малчева е родена в гр. София. Дипломира се с образователна степен бакалавър по молекулярна биология в Софийски университет „Св. Климент

Охридски”, 2005г. През 2011г. придобива магистърска степен по микробиология и микробиологичен контрол в Софийски университет „Св. Климент Охридски”, като преди това преминава обучение по студентска програма Еразъм в гр. Нант, Франция, институт Ифремер. Работи в гр. Варна първоначално в „Нестле България” в отдел Осигуряване на качеството, 2012-2013г., а по-късно като асистент преподава по дисциплина „Биология на човека” в Медицински университет Варна „Проф. д-р Параскев Стоянов”, по специалностите: медицина, дентална медицина, фармация и помощник-фармация, 2013-2016г. През м. февруари 2017г. е зачислена за редовен докторант в Микробиологичен отдел на НЦЗПБ, с научен ръководител доц. Виктория Левтерова, дм.

Актуалност на разработвания проблем

Заболяванията с етиологичен агент *Streptococcus pneumoniae* варират от сравнително по-леко протичащи отити и пневмонии при децата до тежки и по-рядко срещащи се инвазивни заболявания като бактериемия и менингит. Резервоар на тези щамове е носителството, което осигурява разпространението им сред индивидите в обществото. През 2010г. в Българския имунизационен календар е включена пневмококовата конюгатна ваксина (PCV10), но до сега не са провеждани: мащабно проучване и задълбочен анализ на безсимптомното носителството, разпространението на серотиповете и резистентността на *S. pneumoniae* след въвеждането на тази ваксина. Изследванията на пневмококовото носителството при деца в цял свят потвърждават, че посещаването на детски градини и ясли е основен рисков фактор за колонизацията. Високият риск, в следствие на т. нар. „пренаселване“ в детските ясли и градини, недобрите хигиенни навици на децата в тази възрастови групи и честите вирусни инфекции са фактори способстващи за високите нива на колонизация със *S. pneumoniae*.

Считам, че дисертационен труд на докторантката Мария Малчева е много навременен и актуален, предвид извършеното мащабно проучване на серотиповата принадлежност и антиминокробна резистентност на *S. pneumoniae* сред здрави и т. нар. „неорганизирани“ (отглеждани само в дома си) и здрави и т. нар. „организирани“ (посещаващи детски градини и училища) деца през последните 3 години, приели поне една от задължителните дози PCV10 или преминали през пълния курс на ваксинацията с PCV10

(3+1), в зависимост от възрастта. Базирайки се на високочувствителни молекулярно генетични, успоредно с класическите културелни методи представени в настоящия дисертационен труд се създава предпоставка за натрупване на база данни за пневмококовите серотипове при носителство в България, чрез която да се следи за ваксинални ефекти и еволюцията на *S. pneumoniae* в нашата страна, както и връзките с международните клонове.

Структура на дисертационния труд.

Дисертационният труд е правилно структуриран и е написан на 123 стандартни страници. Съдържа 19 таблици и 27 фигури. Всички необходими раздели на дисертационния труд са добре оформени: увод - въведение, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, заключение, изводи, приноси и декларация за оригиналност, използвана литература, публикации свързани с дисертацията и участия в научни форуми.

Въведението представя в резюме актуалността на проблема по света и у нас, и необходимостта от разработване на темата от докторантката.

В **литературния обзор** на 41 страници са представени: исторически данни, класификацията на *S. pneumoniae*, характеристиката на носителството – трансмисията, колонизацията и взаимодействието им с назофарингиалната флора. Обстойно е представена клетъчната структурата на *S. pneumoniae*, като е акцентирано на основните фактори на вирулентност на пневмококите. Разгледана е в световен и национален мащаб резистентността към антибиотици и ефекта на пневмококовите конюгатни ваксини върху инфекциите, причинени от резистентни щамове *S. pneumoniae*. В заключение изтъквайки значимостта на проблема, докторантката логично достига до **целта** за изследване на серотиповото разпределение на *S. pneumoniae* чрез молекулярно-генетични методи, въвеждане и оптимизиране на методите за типизиране, и определяне на антибиотичната чувствителност на щамове, изолирани от назофаринкса на деца. Ясно са формулирани четирите **задачи**, във връзка с поставената цел.

В **материали и методи** на 28 страници са представени обстойно: дизайна на проучването, обхващаш периода от февруари 2017г. до март 2019г.; критериите за подбор

на проучените 834 деца във възрастовия диапазон от 6 месеца до 8 години: здрави и „неорганизиран“ (отглеждани само в дома си) и здрави „организиран“ (посещаващи детски градини и училища) деца. С 8 фигури и 5 таблици са представени подробно и точно в последователност: от онагледената техника на вземане на назо-фарингиалния секрет, първично и вторично култивиране и фенотипно определяне на антимикуробната чувствителност на изолатите до използваните в дисертационния труд молекулярно-генетични методи, необходими за решаването на поставените задачи.

Резултатите и обсъжданията са представени в съответствие с изпълнението на набелязаните задачи за постигане на поставената цел. Спазен е представеният дизайн на проучването. Прави впечатление задълбочения анализ на получените резултати и съпоставянето им с публикуваното по проблематиката от други автори, като докторантката убедително защитава тезите си.

Резултатите са много добре онагледени на 28 страници с 9 таблици и 12 фигури. От 174 от взетите материали, т.е. в 21% от проучваните материали са изолирани шамове, идентифицирани като *S. pneumoniae*. Подобни резултати са наблюдавани при проучвания в съседни държави Турция (21,9%) и Румъния (25,25%) и Гърция (33,1%). Установено е, че 85% от тези положителни култури са били от проби на „организиран деца“. При определяне на фенотипното отнасяне на изолираните култури *S. pneumoniae* към различните антимикуробни препарати, докторантката е доказала следната чувствителност, съответно към: ванкомицин, тейкопланин и линезолид – 100%; норфлоксацин – 96,5%; триметоприм/сулфаметоксазол – 93%; оксацилин (при скрининга) – 85,6%; тетрациклин – 58%; клиндамицин – 50% и еритромицин – 48,9%, като е доказана корелация между резистентността към еритромицин и клиндамицин при 97,8% (n=87). Прави впечатление и високият дял на MDR шамовете, които съставляват общо 44% от изолираните шамове, както и това, че те основно принадлежат към широко разпространения сред децата у нас серотип 6С. За първи път в България докторантката доказва наличието на неваксиналния серотип 35В, характеризиращ се с резистентност към бета-лактамни антибиотици, макролиди и линкозамиди и респ. с висок риск от смъртност – факт с голямо значение при терапията на пневмококовите инфекции у нас. Подробно са представени и резултатите от молекулярно генетичните изследвания, осъществени в настоящия дисертационен труд.

Типизирането на културите е извършено след изолиране на ДНК чрез конвенционален PCR до конкретен серотип или серогрупа, като за прецизиране на някои серотипове, напр. 10F/10C/33C, 18A/B/C/F, 24A/B/F, 33F/33A/37 и 35F/47F в откритите серогрупи е използван търговския кит S. PneumoStrip. С най-голям относителен дял е доказаният серотип 6С (20%, n=36), следван от серогрупа 24 В/F (11.5 %, n=20) и серотип 3 (8.6 %, n=15). Направено е сравнение на използваните в дисертационния труд културелни и молекулярно-генетични методи при култури с добре обосновани предимства и недостатъци.

При използването на молекулярни методи от ДНК директно от секрети докторантката доказва, че неваксиналните серотипове представляват преобладаващата част от извадката с 64,2% (203, n=316), като резултатите са показали поне два пъти по-висока чувствителност отколкото при култивиране.

Направените 7 извода отразяват пълно получените резултати и тяхното обсъждане.

Оценка на научните приноси. Приемам добре формулираните от докторантката приноси с научен и научно-приложен характер.

Библиография. В дисертационния труд са цитирани 242 литературни източника: 4 на кирилица и 238 на латиница, като над 70% от литературните източници са от последните 10 години.

Публикации и други научни активности свързани с дисертацията. Мария Малчева представя общо 5 публикации в реномирани научни списания, като тя е първи автор в 3 от публикациите. Взела е участие в 6 научни форума: 3 международни и 3 национални конгреса.

Авторефератът на докторантката е оформен, съгласно изискванията.

Познавам Мария Малчева от 2017г. като амбициозен, съвестен и прецизен млад изследовател – с усет към новостите и тяхното приложение в областта в която работи.

Заключение.

Считам, че дисертационният труд на докторантката Мария Малчева разглежда един много актуален проблем в съвременната микробиологична диагностика на *S. pneumoniae*, като постигнатите научни резултати, освен теоретично имат и реално практическо приложение.

Дисертацията отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и на правилника на НЦЗПБ за неговото приложение.

С оглед на казаното по-горе, убедено давам положителната си оценка на представения ми за рецензия дисертационен труд и предлагам на членове на Научното жури, да присъдят образователната и научна степен „Доктор” по микробиология на Мария Малчева.

Изготвил рецензията:



Доц. д-р Елизабета Бачийска, дм

09.01.2020г.