



До членовете на научно жури  
Определено със Заповед № 506/ 16.12.2019 г.  
на Директора на НЦЗПБ

## РЕЦЕНЗИЯ

От проф. д-р Магдалена Иванова Лесева, д.м., УМБАЛСМ „Н.И. ПИРОГОВ”,  
София,

член на научно жури съгласно заповед № 506/ 16.12.2019 г. на Директора на НЦЗПБ

На дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „ДОКТОР”  
по научна специалност „Микробиология” – шифър 01.06.12 в област на висше  
образование 4. „Природни науки, математика и информатика”, професионално  
направление 4.3. „Биологически науки”

На тема: Молекулярни методи за проучване на серотиповата принадлежност на  
*Streptococcus pneumoniae*, колонизиращи назофаринкса при деца

Автор на дисертационния труд: Мария Руменова Малчева, редовен  
докторант в отдел „Микробиология” на НЦЗПБ.

### Актуалност и значимост на дисертационния труд

*Streptococcus pneumoniae* е опортюнистичен патоген, нормално колонизиращ назофаринкса при хора, който може да причини широк спектър от заболявания: от умерено тежки, като отит, бронхит и пневмония, до тежки, макар и по – рядко срещани се инвазивни заболявания, като септицемия и менингит. В световен мащаб, пневмококовите инфекции са отговорни за 1-2 милиона смъртни случаи годишно при деца. Не случайно, Световната здравна организация приоритетно е включила *S.pneumoniae* като един от 12-те микроорганизма, представляващи най-голяма заплаха

за човешкото здраве. Колонизацията на назофаринкса е основен резервоар за разпространение на *S.pneumoniae* в организма и предшественик на пневмококовите инфекции. Капсулните полизахариди са главен вирулентен фактор на *S.pneumoniae*. Те определят серотиповата принадлежност на щамовете и служат за разработването на ваксините срещу пневмококовите инфекции. Въведената в България през 2010г пневмококова конюгатна ваксина PCV10 доведе до намаление на честотата на пневмококовите инфекции, но се наблюдава както поява на нови не-ваксинални серотипове, така и разпространение на нови резистентни клонове пневмококи. В светлината на казаното, извършеното от авторката на дисертационния труд с помощта на високочувствителни молекулярни методи мащабно проучване на серотиповата принадлежност на изолати *S.pneumoniae* при деца и антимикробната им резистентност е основа за създаване на база данни за пневмококовите серотипове при носителство в България, което е тясно свързано с насоките за успешната диагностика, ваксинална превенция и терапия на инфекциите, причинени от пневмококи.

#### **Структура на дисертационния труд**

Дисертационния труд обхваща 104 стандартни страници, онаяден е с 27 фигури и 18 таблици. Библиографията съдържа 239 заглавия, от които 4 на кирилица, но са цитирани на латиница и други трудове с водещи или участващи български автори. Работата започва с кратко Въведение към темата на дисертационния труд, последвано от Литературен обзор от 42 страници. Останалата част е структурирана по общоприетата схема: Използвани съкращения; Цел и задачи, Материали и методи, Резултати и обсъждане, Изводи; Публикации и участия в научни форуми, Библиография.

*Литературният обзор* започва с исторически данни, класификация и данни за структурата на клетките. Подробно е характеризирано носителството на пневмококи: начините за разпространението им, механизмите на колонизация, взаимодействията с другата назо-фарингеална флора, методите за саниране на колонизацията, имунизацията ефект на колонизацията. В раздела носителство и пневмококови заболявания детайлно са представени факторите на вирулантност на пневмококите, способностите им да преодоляват защитните механизми на гостоприемника; голямата им клинична значимост като причинители на инфекции в детска възраст и ролята на колонизацията за възникване на пневмококови заболявания, ролята на конкретни серотипове като причинители на определени заболявания. Следва анализ на методите

за превенция на пневмококовите заболявания с акцент на пневмококовата конюгатна ваксина и данни за резистентността на пневмококите към антибиотици, включително за България, както и за заплахата, представляваща мултирезистентния клон 19A. Въведението завършва с описание на методите за идентификация и типизиране на *S.pneumoniae*. Текстът е компетентно написан и обхваща всички по-важни аспекти на изследвания проблем.

**Цел и задачи.** Целта и четирите задачи за изпълнението ѝ са формулирани правилно и отразяват основните елементи на дисертационния труд.

**Материали и методи.** Разделът обхваща 30 стр. Материалите включват критериите, използвани при подбор на общо 834 деца на възраст от 1-8 г, обхванати през 3 годишния период на проучването и данни за тях. Счита се че обема и разнородността на материала за проучване е напълно достатъчен, за гарантиране на представителния му характер. Подразделът методи е значително по-обширен. По-кратко, но много точно и ясно са описани техниката за взимане на назо-фарингеален секрет, онагледено с фигура и методите за първично и вторично култивиране и определяне на антимикробната чувствителност на изолатите. В детайли са описани молекулярно-генетичните методи, тъй като те са в основата на дисертационния труд. Подробно са изложени и използваните статистически методи.

**Резултати и обсъждане.** Счита се за уместно обединяването на резултатите и обсъждането в общ раздел, поради по-лесното проследяване на взаимовръзките и логиката на получените резултати и следствията от тях. Много добро впечатление прави стегнатият и ясен научен стил, с който са изложени и анализирани резултатите от проучването.

В подраздела с резултатите от идентификацията на изолираните щамове *S.pneumoniae* авторката установява 21% носителство при изследваната популация, подобна или по-ниска от тази в съседните страни, както и определянето на посещението на детска градина до 5 годишна възраст като основен рисков фактор за колонизация и инфекция със *S.pneumoniae*.

Интересни резултати са получени при определяне на антимикробната чувствителност на изолатите. Впечатляващ е факта, че България е на водещо място по резистентност към макролиди (51.1%) и линкозамиди (50%), при сравнително нисък

дял на нечувствителните към пеницилин (7.5%) и ампицилин (3.4%) изолати. Авторката установява висок относителен дял на множествено-резистентните (MDR) изолати - 44% от всичките, като определя и преобладаващите при тях резистентности. Друг важен факт, установен от нея, е наличието на ко-резистентност между еритромицин и клиндамицин при изследваните щамове. Едно от най-важните и клинично значими открития на проучването е, че MDR изолатите принадлежат основно към серотип 6С, който е широко разпространен сред децата в България. Авторката идентифицира за пръв път в България щамове от неваксиналния серотип 35В, характеризиращи се с нечувствителност към бета-лактемни антибиотици и висок риск от смъртност. Този резултат също е от много голямо значение за превенцията и терапията на пневмококовите инфекции у нас.

Най-големите приноси на дисертационния труд произлизат от резултатите от молекулярно-биологичните проучвания. В подраздела „Качество и количество на изолираната ДНК“ авторката обосновава избора си на методи: търговски кит на QIAGEN за култури и на оптималния според нея Cheelex100 за назофаринкс, като достига до извода, че препоръчаният от СЗО бърз метод за изолиране на ДНК от култура не дава достатъчно чиста от белтъци и РНК проба.

В подраздела с резултатите от генотипизирането на култури чрез конвенционален PCR и кит S. PneumoStrip авторката подробно описва използваните генетични методи, чрез които успешно се типизират всички изолирани щамове *S. pneumoniae*. Прави изводи за предимствата и недостатъците на базираните на културелно изследване методи, с което мотивира предимството на генотипизирането на ДНК, директно изолирана от секрети, резултатите от което обсъжда подробно в следващия подраздел. Тревожна находка е, че неваксиналните серотипове значително преобладават (82,7%) в извадката.

Авторката достига до важно заключение, че културелните и серологични методи за диагностика на пневмококовите инфекции имат ниска чувствителност и специфичност, което обосновава необходимостта от използването на молекулярно-биологични методи за целта. Резултатите от проучването показват високата чувствителност на метода за детекция и типизиране на пневмококите - поне два пъти по висока чувствителност на детекцията, отколкото при культивиране. Важен принос е

разработването на алгоритъм на работа за анализ на носителството и типизирането на изолатите ДНК.

Използваните статистически методи показват статистически значима зависимост между децата, посещаващи дневни центрове и носителството на *S.pneumoniae*.

В заключителната част на раздела „Резултати и обсъждане“, г-жа Малчева прави обобщение на резултатите за серотиповото разпределение на *S. pneumoniae* при всички изследвани деца. Високата ефективност на използваните молекулярни методи за типизиране се доказва и от ниския отпадък (7.6%) на нетипизируемите проби. От голямо значение е откриването за пръв път у нас от авторката на мулти-резистентния серотип 35В, заместил ваксиналните серотипове след въвеждането на PCV13 в нашата страна.

Заклучението на г-жа Малчева за откритието на висок процент носителство при изследваните деца, характеризиращо се основно с неваксинални серотипове, което е предполагаем ефект на PCV10 и за обстоятелството, че неваксиналните серотипове/серогрупи 6С/D, 3, 19А доминират при пневмококовите популации, колонизиращи назофаринкса на децата, е от много голямо значение за проследяване на ваксиналните ефекти и еволюцията на микроорганизма, както и за насочване към ефективна превенция на пневмококовите заболявания.

#### **Оценка на изводите и приносите на дисертационния труд**

Изведените 9 извода от извършената работа представляват синтез на получените резултати.

Приемам както научно-теоретичните с оригинален характер, така и научно-приложните приноси на дисертационния труд.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ:**

Предложеният за рецензия материал е актуален, достатъчен като обем и изпълнява напълно изискванията на ЗРАСРБ и Правилника към него. Темата е високо значима, материалът – богат и методично правилно обработен, получените резултати са с важна научна и практическа стойност. Дисертационният труд е написан добре. Приемам със задоволство приносите на разработката и представените публикации, свързани с нея. Всичко това ми дава основание да поставя положителна оценка на

дисертационния труд и убедено да подкрепя присъждането на образователната и научна степен „Доктор“ по научна специалност Микробиология на г-жа Мария Руменова Малчева.

18.12.2019 г.

Проф. Д-р Магдалена Иванова Лесева, дм

