

№ 1611
27. 05. 2013 г.
бул. „Янко Сакъзов“ № 26
София 1504, тел: 9446999

РЕЦЕНЗИЯ

От Доц. Д-р Магдалена Иванова Лесева, д.м.

На дисертационен труд на тема „МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ЕТИОЛОГИЯТА НА КОКЛЮША В БЪЛГАРИЯ“ за присъждане на образователната и научна степен „ДОКТОР“ по научната специалност „Микробиология“ – шифър 01.06.12

на

Надя Боянова Бранкова, докторант към Отдел Микробиология на Националния Център по Заразни и Паразитни Болести

Дисертационният труд на Надя Бранкова е посветен на актуален клинико-микробиологичен проблем, свързан с диагностиката на етиологичния агент на коклюша – *Bordetella pertussis*. Коклюшът е висококонтагиозна респираторна инфекция с тежко клинично протичане, засягаща всички възрастови групи, която може да завърши със смърт, особено при новородени. Тъй като заболявяне с подобни симптоми може да се причини и от други микроорганизми, своевременната и точна микробиологична диагностика е от изключително важно значение за правилното терапевтично поведение и изхода от болестта.

Рутинно използваните досега в нашата страна методи за диагностика на коклюш – културелни и серологични, освен че са бавни, се характеризират с относително ниска чувствителност и специфичност. Понастоящем най-точните и бързи диагностични методи в микробиологията са молекуларно-генетичните, поради което те намират все по-широко разпространение за диагностика на различни инфекции, включително в нашата страна.

Досега в България не са използвани генетични методи за диагностика на коклюш, поради което настоящият дисертационен труд запълва важна ниша в диагностиката и типизирането на причинителя на това заболяване.

Трудът е написан на 160 страници и съдържа литературна справка от 112 заглавия, большинството от които са след 2000 г., като най-голямата част е от последните 5 години.

ЛИТЕРАТУРНИЯТ ОБЗОР представя актуална информация за епидемиологията, клиничната картина на коклюша, микробиологичната характеристика на микробния причинител и подробно анализира методите за лабораторна диагностика на *Bordetella pertussis*. Фенотипните методи са разгледани критично и обстойно, с техните предимства и недостатъци, определящи необходимостта от подобряване на диагностиката на коклюша. Обстойно са описани молекулярно-генетичните методи, използвани по света. Данните са представени стегнато, с добър научен език. Много прецизно и ясно са представени PCR диагностичните тестове, базирани на инсерционния елемент IS481 и на промотора на маркерния ген за пертусис токсина, който се експресира само при този бактериален вид. Подробно са характеризирани молекулярно-генетичните методи за типизиране: MLVA, AFLP, PFGE на хромозомна ДНК, ДНК секвениране и анализ на единични нуклеотивни полиморфизми, които макар и сложни и скъпи за рутинно приложение, значително подобряват изясняването на епидемияния процес, в сравнение с фенотипните методи. Много компетентно са представени принципът на всеки от методите, техните предимства, недостатъци и място за приложение.

Заключението на направения обзор насочва към целта и задачите на дисертационния труд, свързани с разработката и въвеждането в лабораторната практика на нашата страна на молекулярно-генетични методи за диагностика и типизиране на *Bordetella pertussis*. Целта и задачите са точно и ясно формулирани.

В обширната глава МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ дисертантката прави детайлно описание на използваните от нея техники за изпълнение на поставените цели и задачи. Прави впечатление огромният труд, който е

вложен за разработката на тези методи и високата компетентност на авторката, показваща отличното им познаване и владеене. Техниките включват изолиране на геномна ДНК от назофарингеални секрети; проектиране на олигонуклеотидни праймери за диагностика на инсерционния елемент IS481; използването на праймери за амплификация на промотора на гена за пертусис токсина; разработка на вътрешна положителна контрола (съществен принос на дисертантката) за повишаване надежността на PCR анализа за диагностика на *B.pertussis*. За типизирането са разработени MLVA и AFLP методи, като са използвани щамове и ДНК от колекциите на Академията на Медицинските Науки в Москва и Instituto Superiore di Sanita в Рим, както и от пациенти.

Дисертантката разработва оригинален метод с две стъпки (мултиплена хибридизация и мултиплена амплификация) за изпълнение на MLVA анализа с небелязани праймери, като едната праймерна двойка е въведена от нея и до сега не е използвана по света. AFLP е също една от най-съвременните и използвани по света техники в молекулярната диагностика на *B.pertussis*. За неговото провеждане авторката също разработва метод. Описанието на използваните методики е детайлно и говори за изключително добра информираност, подготовка и лично вложен труд по изпълнението им.

Главата РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ е илюстрирана с 9 таблици, 13 фигури и 4 графики и е структурирана съобразно изпълнението на поставените четири задачи.

В първия раздел, посветен на методите за PCR диагностика на коклюша на базата на инсерционния елемент IS481 и промотора на гена на пертусис токсина, авторката подчертава важността на избора на подходящи праймери за качествена диагностика. Тя установява висока чувствителност на метода при използване както на конструираните, така и на избраните от публикации праймери за успешна диагностика на

заболяването в най-ранните му етапи. С помощта на ДНК от микроорганизми, причиняващи респираторни инфекции с подобни на коклюша симптоми, авторката доказва и високата (100%) специфичност на праймерите и на подбора на PCR условията за анализ. В хода на разработване и включване на вътрешна положителна контрола (ВПК) за избягване на фалшиво-позитивни резултати тя установява, че концентрацията на ВПК не бива да надвишава определени стойности, за да не се инхибира амплификацията на таргетната ДНК. Н. Бранкова доказва, че са достатъчни 2000 копия за една проба за качествено протичане на процесите.

Вторият раздел представя резултатите от проучването на тенденциите във възрастовите особености на заболяването и разпространението на коклюша на територията на България, извършено за периода 2007-2012 г. Дисертантката установява значително понижение на случаите до 2010 г., последвано от повишение през периода 2010-2012 г., което съответства на ситуацията в другите европейски страни. Най-засегнатите групи от населението: кърмачетата (35,17% положителни резултати) и децата до 4-годишна възраст (23,66%) също съответстват на тенденциите в другите европейски страни. Авторката констатира, че честотата на положителните резултати при възрастните над 30 г. е по-голяма, в сравнение с публикуваните данни, което насочва към ролята им като най-чести носители, резервоари и разпространители на коклюш сред бебета и малки деца у нас и необходимостта от въвеждане на допълнителна бустер доза ваксина за тази група. Тя анализира подробно резултатите и направените изводи за всяка от възрастовите групи. Относно регионите на разпространение на коклюш в България, Н. Бранкова установява повсеместното му разпространение, като в някои населени места са регистрирани и епидемии.

Третият раздел на главата представя резултатите от разработването на оригинален авторски метод MLVA за типизиране на щамове *B.pertussis*. За разлика от световните публикации, при които методът се провежда с флуоресцентно-белязани праймери, авторката разработва с помощта на програмата Tandem Repeats Finder модификация на метода с небелязани праймери. От използваните 6 праймерни двойки, едната (BP VNTR 11 FR) е е въведена от Н. Бранкова и до момента няма данни за използването ѝ в световните публикации. Този метод анализира вариабилните тандемни повтори в генома на *B.pertussis* - важен генетичен маркер за щамовото генетично разнообразие, което се счита за отговорно за наблюдаваните циклични епидемии от коклюш по света. Поради това, въвеждането му в лабораторната практика в нашата страна е важен принос на дисертантката. Резултатите от проучването ѝ показват, че най-дискриминативен анализ дават праймерите за вариабилни повтори VNTR 11 (идентифициран от нея) и VNTR 6. Анализът на резултатите от типизирането на ДНКи на щамове от пациенти показва, че те се групират главно в два клъстера. Първият обхваща пациенти от 2009г. до 2011 г., а вторият - между 2011 г. и 2012 г, като съпоставката на данните показва над 80% до 100% VNTR сходство в изследваните пробы от четирите години. Това дава основание на Н. Бранкова да допусне циркулирането през този период в нашето общество на почти еднакви VNTR клинични щамове. От друга страна използванияят MLVA метод показва значителни VNTR различия между тези щамове и ваксиналния щам, използван доскоро в нашата страна, което се наблюдава и в други страни. В резултат Н. Бранкова основателно стига до важното заключение, че е наложително да се разработят нови ваксинални щамове, генетично и имуногенно максимално близки до актуално циркулиращите клинични щамове.

В последния четвърти раздел е представена разработената от авторката AFLP техника за генетична идентификация на представителите

от род *Bordetella*. Използваната от нея ензимна комбинация (BamHI/PstI) е уникална – няма литературни данни за приложението ѝ другаде по света. Чрез AFLP анализ Н. Бранкова доказва наличието на значителни генетични различия между *B.pertussis* от една страна и *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica* – от друга (поради което противококлюшната ваксина не може да се използва за тяхната профилактика) и значителен процент геномно сродство между последните два вида, което предполага, че или са един и същ вид, или са произлезли еволюционно един от друг. Тези авторски резултати потвърждават публикуваните данни за такава връзка. AFLP анализът потвърждава резултатите на MLVA метода за наличието на значителни генетични различия между ваксиналния щам и клиничните изолати *B.pertussis* у нас. В резултат от направените проучвания, дисертантката стига до заключението, че AFLP анализът е подходящ метод както за идентификация, така и за типизиране на представителите на род *Bordetella*; за проследяване на полиморфизмите и генетичните различия в рамките на няколко вида едновременно, както и на епидемиологията и географската връзка между изолати от различни епидемии от коклюш.

Дисертационният труд на Н. Бранкова има изследователска и методична насоченост и е реализирал следните по-важни приноси с научно-теоретичен и научно-приложен характер:

1. За пръв път в България разработва и въвежда в лабораторната практика бързи и точни молекулярно-генетични методи за диагностика и типизиране на *B.pertussis*;
2. Определя най-засегнатите от коклюш възрастови групи в България, групите на резервоарите-носители, отговорни за разпространението на *B.pertussis* сред малките деца и географското разпространение на заболяването;
3. Разработва и въвежда за пръв път в България модификация на MLVA метода с небелязяни праймери, чрез който доказва

- циркулацията на почти еднакви VNTR клинични щамове в нашата страна, генетично различни от ваксиналния щам и необходимостта от разработката на нови ваксинални щамове;
4. Разработва AFLP техника за генетична идентификация и типизиране на представителите от род *Bordetella*, използвайки уникални ензимни комбинации и доказва приложимостта му за количествени филогенетични изследвания.

Дисертантката е реализирала 11 научни публикации в медицински списания, 4 от които на английски език и на 5 от които е първи автор. Тя е участвала в 4 научни форума, два от които – Европейски Конгреси по Клинична Микробиология и Инфекциозни Заболявания и на два от които е първи автор. Считам, че това показва много добра научна активност и личен принос в осъществяване на публикациите и изявите.

В заключение, дисертационният труд на Надя Боянова Бранкова е важен принос за профилактиката и лечението на коклюша, който е животозастрашаваща респираторна инфекция с висока заболеваемост и смъртност, особено при бебета и малки деца. Въведената от нея молекуларно-генетична методика за диагностика и типизиране на *B.pertussis* се характеризира с висока чувствителност, специфичност и бързина на получените резултати. Този труд представя дисертантката като задълбочен изследовател, съчетаващ необходимите качества на учен и практик. Въз основа на всичко това давам положителна оценка и подкрепям присъждането на образователната и научна степен „Доктор“ по научната специалност 01.-6.12 – Микробиология на Надя Боянова Бранкова.

23.05.2013 г.

София

Рецензент:

(Доц. Д-р М. Лесева, дм)