

РЕЦЕНЗИЯ

От проф. д-р Ива Стефанова Христова, д.м.н.

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

Тема на дисертационния труд: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ЕТИОЛОГИЯТА НА КОКЛЮША В БЪЛГАРИЯ

Автор на дисертационния труд: Надя Боянова Бранкова, докторант към Отдел Микробиология на Националния Център по Заразни и Паразитни Болести с
научен ръководител: Проф. Д-р Тодор Кантарджиев, дмн

Дисертационният труд на Надя Бранкова се отличава със задълбоченост, методическа подготвеност и оригинален подход, насочени към профилактиката на едно тежко протичащо, с възможност дори за фатален изход заболяване, а именно за коклюша.

Първо, проблемът е изключително важен и много актуален. В последните години нараства броят на регистрираните случаи на коклюш дори в страни с високо ваксинационно покритие, в това число и България. Наблюдава се цикличност в епидемиите от коклюш. По-доброто разбиране на причините за повтарящите се епидемии е особено важно за актуализиране на съществуващите стратегии за контрол на това коклюша в световен мащаб.

Второ, разработената дисертация има изследователска и методична насоченост. Разработени, апробирани, въведени и приложени са генетични методи за диагностика на коклюша в България. До момента в нашата страна липсваше молекуларна диагностика на това заболяване. При недостатъчно

ефективните културелни методи и често фалшиво-положителните серологични методи, надеждната лабораторна диагностика на коклюша определено беше проблем в нашата страна.

Трето, още по-съществено, разработени, апробирани, въведени и приложени са генетични методи за типизиране на причинителя на коклюша в България. С тези методи е установена генетична хомоложност между циркулиращите в страната щамове от една страна, и от друга – техните генетични различия от ваксиналния щам, използван доскоро за производство на целоклетъчната ваксина против коклюш. Направен е изводът, че е необходимо да се разработват нови наксинални щамове, които да са генетично и имуногенно максимално близки до актуално циркулиращите в момента щамове в обществото.

Дисертационният труд е написан на 160 страници. На базата на 112 литературни източника докторантката прави задълбочен литературен обзор на 38 страници. Обзорът е стегнат, много информативен и представя състоянието на проблема у нас и в света. Разгледани са епидемиологията на коклюша в света, Европа и България; общата характеристика и клиничните симптоми на заболяването; микробиологичните характеристики на род *Bordetella* и микробиологичната диагностика на коклюша. Разгледани са подробно, систематизирано и аналитично както фенотипните, така и генетичните методи за диагностика и типизиране на *Bordetella pertussis*. От фенотипните методи са разгледани култивирането, микроскопирането след оцветяване по Грам и с директна имунофлуоресценция, биохимичната идентификация и серологичните методи за диагностика. Всички тези методи са представени с различните им модификации, с анализиране на тяхната специфичност и чувствителност, предимства, недостатъци и приложение в практиката. По същия начин са описани молекулярно-генетичните методи за диагностика и за типизиране на *B. pertussis*, а именно диагностичните PCR тестове, базирани на доказване на инсерционния елемент IS481 и промотора на маркерния ген на пертусис-токсина *ptxA*; а от генетичните методи за типизиране – мултилокусен анализ на tandemно повторени вариабилни участъци (MLVA), специфична амплификация

на полиморфни ДНК рестриктазни фрагменти (AFLP), пулсова гел-електрофореза на хромозомна ДНК (PFGE), ДНК секвениране и анализ на единичните нуклеотидни полиморфизми. Изяснен е принципът на всеки метод, възможностите му за типизиране и приложението му. Прави впечатление огромната осведоменост на докторантката.

Обзорът завършва с извод за необходимостта от молекулярно-генетична диагностика на коклюша, типизиране на неговия причинител в България и сравняването му с аналогични щамове в Европа и света. По този начин обзорът логично извежда до целта на дисертационния труд.

Задачите са четири и са ясно и точно формулирани. Те очертават конкретните стъпки за изпълнение на целта на разработката.

Раздел Цел и Задачи в обем 1 страница е последван от раздел Материали и методи в обем 42 страници, съдържащ подробна информация и представляващ изключително ценна част на дисертационния труд. Детайлно са описани изолирането на геномна ДНК от клинични материали (назофарингеални секрети), използваните праймери и условия на PCR амплификациите за доказване на *B. pertussis*. След тях по същия детайлен начин са описани методите за типизиране на *B. pertussis* – използваните щамове от колекциите на Академията на Медицинските Науки в Москва и Instituto Superiore di Sanita в Рим, проектирането на специфични праймери, техниката на изпълнение на мултилокусния анализ на tandemно повторени вариабилни участъци (MLVA) и специфичната амплификация на полиморфни ДНК рестриктазни фрагменти (AFLP). Начинът на представяне говори за методичната подготвеност на докторантката. Това са авангардните методи за молекулярно-генетично типизиране на *B. pertussis*.

Резултатите от собствените изследвания са представени и обсъдени на 51 страници. Илюстрирани са богато с 21 таблици и 15 фигури. Описането на резултатите е точно и ясно и е направено на добър научен език. Резултатите са

представени в 4 раздела, като точно следват логичната последователност на поставените задачи.

В първия раздел са представени резултатите от разработването и изпитването на **PCR методи за диагностика** на коклюша на базата на откриване на специфичен инсерционен елемент и промотора на гена за пертусис-токсина. Конструираните (BOR-1) и избраните от публикации (PTPX 1/2) праймери показват висока чувствителност и специфичност и позволяват надеждно откриване на *B. pertussis* дори и в ранните етапи на болестта, когато микроорганизмите са все още в ниска концентрация. Допълнително, с цел избягване на фалшиво-положителни резултати, Н. Бранкова въвежда вътрешна положителна контрола с големина на фрагмента 442 нб. С разработения диагностичен метод тя се включва в ежегодния външен контрол за детекция на *B. pertussis* в Европейските страни, организиран от EUVAC.NET, който доказва надеждността на използваните методи за диагностика.

Вторият раздел е посветен на проучванията на Надя Бранкова върху тенденциите във възрастовите особености на коклюша и разпространението му на територията на България, основани на данните, получени с помощта на разработените диагностични подходи. Установява, че най-засегнатата група от населението са кърмачетата и децата до 4-годишна възраст, което е в унисон с данните от света. Подчертава значителната роля на подрастващите и възрастните в поддържане циркулацията на *B. pertussis* в обществото и оттам в поддържането на епидемичния процес.

В следващия, трети, раздел е описано разработването на модифициран метод на Мултилокусен анализ на тандемно повторени вариабилни участъци (MLVA) за **типовизиране на *B. pertussis***, приложим за изолирана ДНК, както от чисти култури, така и от клинични материали. Въведен е нов MLVA маркер за типизиране, който е използван за първи път. До момента в световните публикации няма данни за използването на праймерната двойка VNTR 11 FR. Общо 6 праймерни двойки са използвани за този анализ. Разработената от докторантката методика използва небелязани праймери, за разлика от публикуваните методики с флуоресцентно белязани праймери. PCR продуктите

са нанасяни на капилярна електрофореза и са отчитани автоматично от софтуера й. Резултатите показват, че нашите щамове *B. pertussis* са еволюирали и се различават значително от ваксиналния щам, използван доскоро в целоклетъчната ваксина. Това може да доведе до увеличена вирулентност на патогенната популация и намаляване ефекта от ваксинациите.

В последния, четвърти, раздел е описано разработването и изпитването на собствена AFLP техника за амплифициране на полиморфни ДНК рестриктазни фрагменти за **генетична идентификация на представители на род *Bordetella***. Следва да се отбележи, че в литературата няма данни за използване на ензимната комбинация (BamHI/PstI), приложена от докторантката. Чрез AFLP анализа е установен значителен процент на геномно сходство (88%) между *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*. Методът се оказва подходящ, както за идентификация, така и за типизиране на род *Bordetella*. AFLP техниката и софтуерният анализ дават точна количествена информация за генетичната близост/отдалеченост на изследваните щамове. С AFLP анализа Надя Бранкова отново установява различия между повечето циркулиращи щамове *B. pertussis* и ваксиналния щам.

Всички получени резултати са обсъдени в светлината на това, което съществува в момента по проблема в света и в Европа в частност. Под ръководството на научния ръководител, проф. Кантарджиев, Надя Бранкова постига важни резултати, които имат значими научно-теоретични и научно-приложни приноси.

Считам, че дисертационният труд съдържа следните по-важни приноси:

1. Разработването и изпитването за първи път в България на молекулярно-генетични методи за диагностика на коклюша.
2. Установяване на таргетната възрастова група и разпространението на коклюша в България.
3. Отново за първи път в България, разработването, модифицирането и оптимизирането на MLVA и AFLP техники за типизиране на *B. pertussis*.

4. Доказването, че през последните 6 години в България са циркулирали почти еднакви в генетично отношение щамове *B. pertussis*, но различни от ваксиналния щам, което посочва необходимостта от разработване на нови щамове за ваксини.

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 11 журнални статии, от които 4 на английски език, една от които с импакт фактор. Данните са представени и на 4 научни форума, включително на два Европейски конгреса по клинична микробиология и инфекции. Нейни трудове са цитирани 5 пъти в публикации и дипломни работи у нас. Надя Бранкова е първи автор на 5 от 11 журнални статии и на 2 от 4 научни съобщения на конгреси. Това приемам като доказателство, че докторантката има личен принос и основно участие за тяхното осъществяване.

Критичните ми бележки като вътрешен рецензент, главно по техническото оформление на труда, бяха напълно съобразени от докторантката.

В заключение, дисертационният труд на Надя Боянова Бранкова е един много стойностен труд, изпълнен на високо методично ниво. В него тя се представя като изследовател, способен да разработва, изпитва и прилага в лабораторната практика модерни молекулярно-генетични методи за диагностика и типизиране. Считам, че рецензирианият дисертационен труд отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Р. България, Правилника за неговото приложение и Правилника на НЦЗПБ. Като давам положителната си оценка, убедено подкрепям присъждането на образователната и научна степен „Доктор” по научна специалност 01.06.12 – Микробиология на Надя Боянова Бранкова.

Гр. София

02. 06. 2013 г.

Рецензент:

(Проф. Д-р И. Христова, дмн)

