

НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР
ПО ЗАРАЗНИ И
ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Стефана Донева Събчева, дм

ръководител на Лаборатория по клинична микробиология в СБАЛО, София
член на научното жури назначено със заповед № 142 /26.04.2013 г. на Директора на
Националния Център по Заразни и Паразитни Болести

lex. № 1705
11.00 член № 26
бул. „Янко Сакъзов“ № 26
София 1504, тел: 9446999
относно дисертационен труд на тема: „Молекулярно-генетични проучвания върху
етиологията на коклюша в България“ за присъждане на образователна и научна
степен „Доктор“ по научна специалност 01.06.12 Микробиология

на Надя Боянова Бранкова-Ненчовска, свободен докторант в отдел
Микробиология на НЦЗПБ

Научен ръководител: проф. д-р Тодор Веселов Кантарджиев, дмн, мзм

Коклюшът е респираторна инфекция, с висока контагиозност, която продължава да бъде проблем на здравеопазването въпреки все по широките ваксинационни програми по света. За това свидетелстват данните за нарастващия брой на заболелите и на смъртните случаи при новородените дори и в страни с традиционно добра ваксинационна политика. Основните причини за това са: генетични промени, водещи до антигенен шифт, адаптация на микробния причинител, намаляваща с възрастта имунитет. Доказано е, че именно разминаването между щамовете на ваксината и циркулиращите в населението щамове обуславя цикличните епидемии от коклюш по света, дори и в страни с високо ваксинационно покритие. Ето защо, молекулярното охарактеризиране на щамовете е важно, както за установяване на причините за активизиране на епидемиите от коклюш, така и за актуализиране на ваксинационните програми.

В България не са провеждани подобни генетични изследвания. Не са разработвани методи за изследване на циркулиращите щамове *Bordetella pertussis* на територията на страна и за типизирането им. Липсват сравнителни изследвания между наши щамове и тези, циркулиращи в Европа. Всичко това обуславя актуалността на дисертационния труд и необходимостта от проведените молекулярно-генетични проучвания върху етиологията на коклюша в България.

Дисертацията е написана на 160 стр., и е структурирана по общоприетата схема със съразмерно разпределение на текста в отделните раздели. Изложението е хармонично илюстрирано с 48 разнообразни и прецизно изработени нагледни материали. Библиографията включва 112 источника, които показват добрата

литературна и нормативна осведоменост на докторанта и отразяват хронологията и съвременното състояние на проблема у нас и в световен мащаб.

Литературният обзор е изчерпателен, като включва необходимата като обем и анализ информация за епидемиологията, клиниката и диагностиката на коклюша, както и методите за фенотипно и генотипно откриване и типизиране на етиологичния причинител - *Bordetella pertussis*.

Систематично и задълбочено авторът подхожда към набелязаните задачи в съответствие с целта на работата - разработване, апробиране и въвеждане в лабораторната практика молекулярно-генетични методи за диагностика и типизиране на причинителя на коклюш за контрол на заболяването в България.

За провеждане на изследванията са използвани голям набор съвременни методи, прецизно апробирани и умело адаптирани за рутинно приложение у нас. Впечатляващ е големият брой (>2200) назофарингеални секрети от болни и контактни лица, проучени за шест годишен период, както и големият брой щамове от международни колекции. Важно е също така, че са изследвани материали от много градове и области на страната. Използвани са множество праймери и генетични методи: определени са праймери (BOR) за диагностика на инсерционния елемент IS481, както и праймери за гена за пертусис токсина (Ptox); въведен е метод за доказване на вътрешна положителна контрола с цел избягване на действието на инхибиращите вещества в клиничните материали; разработен е модифициран метод за мултилокусен анализ на тандемно повторени вариабилни участъци (MLVA метод) с небелязани праймери за типизиране на щамовете и е въведен от дисертанта чифт праймери за този метод; разработена е техника за специфична амплификация на полиморфни ДНК рестриктазни фрагменти (AFLP) за вътревидово и междувидово разграничаване на щамовете в род *Bordetella*. Чрез тези генетични методи е постигнато добро охарактеризиране на щамовете.

Извършена е значителна по обем и разнообразна по характер експериментална работа. Получените резултати и тяхното обсъждане следват стриктно поставените задачи: (1) Установено е, че коклюшът е разпространен във всички области на нашата страна и са определени най-засегнатата група по възраст (кърмачета и деца на възраст <4 г.), както и най-честите носители и резервоари на инфекцията (подрастващи и възрастни); (2) Въведените

молекулярни методи са подходящи за внедряване в лабораторната диагностика; (3) Разработен е и е апробиран модифициран MLVA метод, подходящ за работа с ДНК от чисти култури и от клинични преби. С този метод е определено, че в страната са разпространени щамове с много сходни MLVA профили, но различни от ваксиналния щам; (4) Въведена е AFLP техника за идентифициране и типизиране на щамовете. С този метод с определено високо геномно сходство на щамовете *B. pertussis* и филогенетично сходство между други видове от този род.

В дисертационния труд Надя Бранкова е постигнала значителни оригинални и потвърдителни научно-теоретични и практически приноси, които могат да се представят в следния обобщен вид: (1) Разработване и въвеждане с допълнителни собствени праймери на качествено нов MLVA метод за типизиране на щамове *B. pertussis* и определяне с този метод на клинични щамове със сходни профили, но различни от ваксиналния щам според вариабилните tandemни повтори; (2) Определяне на стойността на AFLP анализа за извършване на филогенетични изследвания и определяне на родовата и видовата генетичната близост/отдалеченост в род *Bordetella*; (3) Въвеждането за първи път у нас на молекулярни методи за диагностика на *B. pertussis*. (4) Използването на нов MLVA маркер за типизиране на щамовете *B. pertussis* и възможността за прилагане на MLVA анализа за ДНК, изолирана от от клинични преби; (5) Прилагането на AFLP анализа за идентификация на бактериалните видове и родове.

Резултатите от обемната изследователска работа на Надя Бранкова са публикувани в 11 публикации, в 5 от които тя е първи автор. Публикациите са в наши списания, като едно от тях има импакт фактор. Трудовете са цитирани 5 пъти в публикации и дипломни работи у нас. Дисертанта има и 4 конгресни участия, от които 2 в чужбина и е първи автор на 2 от конгресните участия.

В заключение смятам, че темата е актуална и клинично значима. Представената от автора дисертация е завършен и задълбочен труд със съществен принос в областта на етиологията на коклюша. Достойнство на труда е въвеждането на нови молекулярно-генетични методи за диагностика и типизиране на *B. pertussis*. Дисертацията отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и Правилника на НЦЗПБ. Това ми дава основание убедено да

подкрепя присъждането на образователната и научна степен "Доктор" по
научната специалност 01.06.12 - Микробиология на Надя Боянова Бранкова.



Доц. д-р Стефана Събчева, дм