

НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР
ПО ЗАРАЗНИ И
ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

№ 1609
27.05.2013 г.

бул. „Янко Сакъзов“ № 26
София 1504, тел: 9446999

Становище

за защита на дисертационен труд

за присъждане на

образователна и научна степен „Доктор“

в област на висше образование

4. „Природни науки, математика и информатика“ по
профессионалено направление 4.3. „Биологически науки“ и
научна специалност „Микробиология“ шифър 01.06.12
на тема

„МОЛЕКУЛЯРНО – ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ЕТИОЛОГИЯТА НА КОКЛЮША В БЪЛГАРИЯ“

Автор на дисертацията

Надя Боянова Бранкова - Ненчовска

Научен ръководител

Проф. д-р Тодор Кантарджиев, дмн, мзм

РЕЦЕНЗЕНТ

заповед №142/26.04.2013 г. на Директора на НЦЗПБ

Проф. Д-р Людмила Боянова Георгиева, дм, дмн

Професор в Катедра медицинска микробиология

На Медицински университет- София

Тел. 08877 39 086; e-mail l.boyanova@hotmail.com

Научна специалност – микробиология

Декларирам, че нямам общи научни трудове с докторанта.

АКТУАЛНОСТ НА ТРУДА.

В последните години се съобщава нарастващ брой на случаи с коклюш и случаи на тежко протичане на инфекцията при новородени въпреки ваксинациите, което налага задълбочено проучване на диагностиката и епидемичната характеристика на инфекцията с подходящи молекулярни методи. Тези методи са необходими, защото културелното изследване има ниска чувствителност, а серологичната диагностика е субоптимална в ранния стадий на заболяването. Това съвпада с целта на дисертационния труд и определя неговото съвременно значение.

СТРУКТУРА И РАЗДЕЛИ НА ПРЕДСТАВЕНИЯ ТРУД

ЛИТЕРАТУРНИЯТ ОБЗОР обхваща подробни и добре анализирани данни за клиниката, епидемиологията и диагностиката на коклюша.

ЦЕЛТА включва разработване и въвеждане в диагностичната практика на съвременни молекулярни методи за идентификация и типиране на щамовете *Bordetella pertussis* в нашата страна. За тази цел са поставени 4 задачи.

Добър подход е, че се цели не само разширената диагностика на инфекцията с генетични методи, но и актуалната характеристика на коклюша у нас в последните години.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ. Прави впечатление големият брой (>2200) назофарингеални секрети от болни и контактни лица, проучени за 6-годишен период, както и голям брой щамове от международни колекции. Важно е също така, че са изследвани материали от много градове и области на страната.

Използвани са различни генетични праймери и методи:

- ✓ определени са в проучването 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 типиране на щамовете и е въведен от дисертанта чифт праймери BP VNTR 11 FR за този метод. MLVA методът не изисква култивиране и може да се прилага директно с клиничните преби,
- ✓ разработена е техника за специфична амплификация на полиморфни ДНК рестриктазни фрагменти (AFLP) за вътревидово и междувидово

разграничаване на щамовете в род *Bordetella*. Потенциалът на AFLP метода за тази цел е досега слабо проучен.

Използването на тези генетични методи позволява постигането на добро охарактеризиране на щамовете.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите са правилно описани, онагледени с таблици и фигури и анализирани, като изводите отговарят на поставените задачи.

- ✓ 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).
- ✓ Въведените молекулярни методи са подходящи за внедряване в лабораторната диагностика.
- ✓ Разработен е и е апробиран модифициран MLVA метод, подходящ за работа с на 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.
- ✓ Въведена е AFLP техника за идентифициране и типиране на щамовете. С този метод е определено високо геномно сходство на щамовете *B. pertussis* и филогенетично сходство между други видове от род *Bordetella*-*B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*.

ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

Цитираните литературни източници са 112, от които 6 на кирилица и повечето (106) на латиница. Цитирани са публикации за период от 34 години (1979-2013 г.), като много от тях са от последните 5 години.

ПРИНОСИ

В дисертационния труд има **ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ** относно

- разработване и въвеждане с допълнителни собствени праймери на качествено нов MLVA метод за типиране на щамове *B. pertussis* и определяне с този метод на клинични щамове със сходни профили, но различни от ваксиналния щам според вариабилните tandemни повтори,
- определяне на стойността на AFLP анализа за извършване на филогенетични изследвания и определяне на родовата и видова генетичната близост/отдалеченост в род *Bordetella*.

Важни са и **НАУЧНО-ПРИЛОЖНИТЕ ПРИНОСИ** на дисертанта за

- въвеждането за първи път у нас на молекулярни методи за диагностика на *B. pertussis*,

- използването на нов MLVA маркер за типизиране на щамовете *B. pertussis* и възможността за прилагане на MLVA анализа за изолирана ДНК от клинични преби и
- прилагането на AFLP анализа за идентификация на бактериалните видове и родове.

ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Надя Бранкова представя 11 публикации, в 5 от които е първи автор, което указва нейното лично участие. Публикациите са в наши списания, като едно от тях (Biotechnol & Biotechnol Eq) има понастоящем име и импакт фактор.

Трудовете са цитирани 5 пъти в публикации и дипломни работи у нас. Кандидатът има и 4 конгресни участия, от които 2 в чужбина и е първи автор на 2 от конгресните участия.

ПРЕПОРЪКИ ЗА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Имената в някои цитирания в книгописа напр. № 4 и 5 трябва да се дадат като инициали на малкото име. Тези препоръки не намаляват по стойността на дисертационния труд, защото са от технически характер.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Научният ръководител проф. Кантарджиев е насочил дисертанта към актуална тема, по която у нас досега няма комплексни проучвания със съвременни генетични методи. Под негово ръководство Надя Бранкова е разработила и внедрила молекулярни методи за диагностика и типиране на *B. pertussis*, които са от диагностична полза и е направила изводи, които разкриват актуални клинични и епидемиологични черти на инфекцията. Затова мога уверено да предложа на членовете на научното жури да присъдят образователната и научна степен „доктор“ на Надя Боянова Бранкова.

Проф. Д-р Людмила Боянова Георгиева, дм, дмн.

София, 17.05.2013 г.