



## РЕЦЕНЗИЯ

относно защита на дисертационен труд  
**“МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ЕТИОЛОГИЯТА НА  
ТУБЕРКУЛОЗАТА В БЪЛГАРИЯ”**

за придобиване на научна степен „ДОКТОР НА НАУКИ“

Научна специалност : Микробиология

Професионално направление: Медицина

с кандидат: **ДОЦ. СТЕФАН ВЪЧЕВ ПАНАЙОТОВ, ДМ**  
**НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ**

Рецензент: Доц. д-р Надя Димитрова Маркова, дб  
Институт по Микробиология, БАН

**Доц. Стефан Панайотов** работи в НЦЗПБ от 2000г. като завеждащ лаборатория „Молекулярна микробиология“. Основно направление в научната му дейност са проучванията върху причинителя на туберкулозата, а научните му интереси се разпростират главно върху модерните молекулярно-биологични методи за идентификация и типизиране на *Mycobacterium tuberculosis*, разпространението на мултирезистентните щамове и доминиращите генотипове у нас, както и върху техните филогенетични характеристики. През последните 12 години Доц. Панайотов има участие в 11 изследователски проекта (3 национални и 8 международни). На 5 международни проекта е ръководител от българска страна.

### **Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем**

Съвременният контрол на туберкулозата като социално-значимо заболяване изисква постоянен анализ на популационната структура от циркулиращи щамове на *Mycobacterium tuberculosis*. В този смисъл, проучванията върху динамиката на разпространение на туберкулозните щамове в България, анализирани в светлината на тяхната филогеографска специфичност, определят дисертационния труд като **значим и актуален**. Молекулярните маркери и тяхната универсалност и удобство на прилагане доведоха до възникването на нова методология – филогенетичния анализ и ново направление на изследване – филогеографията. Филогенетичната концепция признава строго монофилетичните видове, а в качеството на основа за тяхното разделяне често използва генните дървета заедно с широко развиващите се изследвания по филогеография. Обширните проучвания на дисертанта върху разпространените в

страната ни специфичните генотипове на чувствителни и мултирезистентни щамове на *M. tuberculosis* дават основание за задълбочен анализ на факторите влияещи върху трансмисията на туберкулозата. Особено внимание се отделя на комплекса от демографски, исторически и епидемиологични фактори обуславящи циркулацията на характерни генотипове, разпространени в различните географски региони и определени като «филогеографски специфични». Идентифицирането на епидемичните генотипове, адаптирани към населението в определени географски области, е от особено значение за провеждане на конкретни ефективни мерки за ограничаване трансмисията на туберкулозата. В този смисъл дисертационният труд е стойностен не само от научно-теоретичен аспект, но намира приложение и в практиката за реализиране на икономически или социален ефект.

### **Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите.**

Дисертационният труд е структуриран балансирано и съдържа всички задължителни дялове - Въведение, Литературен обзор, Цел и Задачи, Материали и Методи, Резултати и Обсъждане, Изводи и Приноси, изложени общо на 258 страници. Цитирани са 303 литературни източника от които 9 на български език, 9 интернет адреса и 285 заглавия на латиница. Дисертацията включва 39 фигури и 38 таблици.

*Литературният обзор* е посветен непосредствено на конкретната тема на дисертацията върху молекулярно-генетичните аспекти на туберкулозните причинители и фокусирано запознава читателя със съвременното състояние на тази проблематика, както и с тенденциите на развитието ѝ в близко бъдеще. Научната информация е систематизирано изложена в шест подразделения, засягащи основни проблеми като: 1. Систематизиране и обобщаване на методите за генотипиране на *Mycobacterium tuberculosis* (Рестриктазен анализ на полиморфни фрагменти; Сполиготипиране; VNTR анализ на вариабилния брой тандемни повтори); 2. Сравнителен анализ на тези методи; 3. Класификация на генотиповете на *Mycobacterium tuberculosis*; 4. Географско разпространение на генетичните групи при *Mycobacterium tuberculosis* 5. Процеси на хомоплазия; 6. Интернет средства за молекулярна епидемиология на туберкулозата. Литературният обзор хвърля сравнително широк поглед върху избраната проблематика, и същевременно откроява конкретни аспекти от тематиката на базата на натрупания опит в национален и световен мащаб. В заключителната част на обзора освен, че се обобщава информацията на цитираните източниците, посветени на конкретната тема за конкретния период от време, но се анализира и тяхното съдържание, както и

аргументирано се правят оценки и препоръки. Въз основа на обзорния анализ, дисертантът мотивирано определя предмета и обекта на изследването и логично формулира целта и задачите на дисертацията.

От раздела „*Материали и Методи*“ става ясно, че за разработване на дисертационната теза са използвани модерни молекулярно-биологични методи за генотипен анализ на *Mycobacterium tuberculosis*, както и съвременни софтуерни програми за обработка на резултатите. Прави впечатление големият брой изследвани туберкулозни щамове - 694, от които 441 чувствителни и 253 – мултирезистентни, изолирани от различни региони в България за един относително дълъг период от време (2002 – 2014г.). Данните от всички изследвания са статистически обработени и дават основание за обективни резултати и изводи.

Най-голям дял в дисертацията заема разделът „*Резултати и Обсъждане*“, където дисертантът последователно излага изследванията си, стартирайки с идентифициране на щамове на *Mycobacterium tuberculosis* чрез сполиготипиране. Авторът умело борави с правилата за класификация на сполиготиповете и интерпретира резултатите в светлината на най-новите схващания за групова и субгрупова принадлежност на щамовете. Идентифицирани са и щамове с нов сполиготип. Вариабилността на чувствителните и мултирезистентни изолати на *Mycobacterium tuberculosis* е оценявана с помощта на MIRU-VNTR локусния анализ, като много обстойно е коментирана дискриминативната способност на този метод. Охарактеризирани са особеностите на вариабилните локуси при изследваните щамове от България. Дисертантът проследява биоразнообразието на циркулиращите в България щамове на *Mycobacterium tuberculosis* за различен период от време чрез комбиниран анализ от сполиготипиране и MIRU-VNTR и извършва сравнителен анализ на преобладаващите генотипове сред чувствителните и мултирезистентни щамове. Особена стойност имат прецизно изградените дендрограми, проследяващи филогенетичните връзки между отделните щамове и очертаващи най-разпространените и специфични за страната клонове/генотипове. Бих искала да отбележа и оценя високо изследванията свързани с идентифицирането на преобладаващите клъстери и доминиращи генотипове сред мултирезистентните щамове в страната. Вниманието привличат и интересните наблюдения на дисертанта върху динамиката на сполиго- и MIRU-VNTR профили в хода на лечението на пациенти с мултирезистентна туберкулоза, както и разпространението на *Mycobacterium tuberculosis* сред лишените от свобода хора. Без да се спирам подробно, бих искала да отбележа като положителен

факт и направените от автора разнообразни и задълбочени сравнителни анализи на най-често срещаните генотипове на *Mycobacterium tuberculosis* сред Балканските страни и по света с тези циркулиращи в България. Авторът обобщава, че определени групи, субгрупи и генотипове на *Mycobacterium tuberculosis* еволюират в тесен контакт с определени популации от хора, а демографските процеси, локалните екологични условия и имунния статус на населението са фактори, които влияят върху филогеографската структура на генотиповете. Искам да отбележа, че тези анализи звучат особено актуално в днешно време, когато сме свидетели на големи миграционни процеси и вероятно ще наблюдаваме възможни трансмисии на туберкулозата в различни географски региони у нас и по света.

Уповавайки се на голям брой данни, доц. Панайотов разсъждава върху феномени като дивергенция и хомоплазия при генотиповете на *Mycobacterium tuberculosis*. С примери от собствените си изследвания той обогатява съществуващите знания и теории по въпроса.

Съвсем основателно дисертантът отделя специално внимание върху генотип SIT41, TUR като маркер за мултирезистентна туберкулоза в България. Провежда и анализира голям обем исторически факти, на базата на които той се опитва да изясни филогенетичния и филогеографски произход на този генотип и по този начин успява да очертае евентуалния молекулярен сценарий за неговата еволюция като доминиращ мултирезистентен генотип сред шамове на *Mycobacterium tuberculosis* в България. Базирайки се на резултатите, че 97% от пациентите с туберкулоза в България, инфектирани със сполиготип SIT41 на *M. tuberculosis* задължително развиват мултирезистентна форма на туберкулоза, доц. Панайотов формулира оригинална хипотеза. Хипотезата е практически проверена, като събраните данни доказват съществуването на статистически значима зависимост между специфичен генотип и мултирезистентност на изолирания шам на *M. tuberculosis*. Дисертантът намира приложение на научните си постижения в практиката като търси обяснение дали лечението на туберкулозата се влияе от генотипа на шата и дали е възможен индивидуален подход за лечение на пациенти инфектирани с генотип SIT41 на *Mycobacterium tuberculosis*. Във финалната част на раздела се предлагат препоръчителни мерки за ограничаване разпространението на генотип SIT41 на *Mycobacterium tuberculosis* в България. Авторът предлага също и схема от специфични MIRU-VNTR локуси за скрининг и идентификация на SIT41.

В заключение дисертантът очертава перспективи за молекулярно-епидемиологични изследвания на комплекса на *Mycobacterium tuberculosis* с цел реализиране на икономически или социален ефект. Коректно са формулирани и 26 извода, изведени от конкретно проведените изследвания.

### **Основни научни и научно-приложни приноси**

Справката за приносите, представени с дисертационния труд, отразява обективно реалните постижения и личното участие на дисертанта.

От приносите с научно-теоретичен характер бих искала да открия по-значимите от тях, а именно:

- Направен е детайлен анализ на циркулиращи генетични групи и субгрупи на *M. tuberculosis* в България сред чувствителните и мултирезистентни щамове
- Доказани са характерни за страната клонални комплекси на SIT41 и SIT53, които образуват филогеографски градиенти от MIRU-VNTR клъстър.
- Доказано е, че клонът SIT41/MIRU-VNTR доминира сред мултирезистентните щамове разпространени в България и има свои отличителни характеристики.
- На базата на преобладаващи вариабилни стойности на MIRU-VNTR локусите са изведени правила за идентифициране принадлежността на щамовете към четири субгрупи.

Сред приносите с научно-практически характер, бих посочила най-стойностните сред тях, а именно:

- Направена е детайлна карта според географското разпространение на циркулиращите групи и субгрупи от чувствителни и мултирезистентни щамове на *M. tuberculosis* в България.
- Доказано е, че генотип Пекин на *M. tuberculosis* е импортиран в страната в периода 2006-2008г.
- Генотип SIT41 е определен като маркер за мултирезистентна туберкулоза в България и е единствен подобен пример в света. Същият генотип има подчертана приспособимост и толерира акумулирането на мутации водещи до резистентност.
- Разработен е метод за скринингово идентифициране на SIT41 на базата на подбрани MIRU-VNTR локуси.
- Доказани са филогеографски специфични за България генотипове (SIT2042, SIT2049, SIT2050 и SIT2051).
- Установен е локус VNTR4052(QUB26) с най-добра дискриминативна способност за MIRU-VNTR типирание на български щамове.

## **Описание и оценка на представените материали и отражение на научните публикации на кандидата в литературата**

Представени са 21 публикации във връзка с темата на дисертацията (16 на английски език и 5 на български език) и две глави в монографии на английски език, публикувани след защита на докторска дисертация с общ импакт фактор 44.842. Отбелязани са над 200 цитирания, свързани с публикации по дисертацията с индекс на Хирш 6.

Представеният проект за автореферат отразява адекватно съдържанието и резултатите на дисертационния труд.

## **Критични бележки и препоръки към научните трудове на кандидата**

Критичните ми забележки и препоръки се отнасят главно към някои редакторски пропуски а именно:

- Първата част от ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР (от стр.10 до стр.16) е без подзаглавие. Би могло да се включи такова, като например: 2.1. Съвременни тенденции и подходи за генотипично охарактеризиране на *M.tuberculosis*

- Първият абзац от ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР на стр.10 се нуждае от цитат/ти.

- Препоръчвам терминът „стари шамове“, в превод от ancestral (ancient), използван в класификацията на Brosch от стр. 27 да бъде заменен с „прародителски“ или „предшестваци“.

- В Материали и Методи на стр.46 е отразено, че са изследвани 441 чувствителни щамове, а в таблица 7, на стр. 48 е написано, че шамовете са общо 484?

- Позаглавие „4.4. 24 локусен MIRU-VNTR анализ“ на стр.50 е по-добре да остане само като „MIRU-VNTR анализ“, тъй като там са отразени освен 24-локусната, но също и другите две схеми (15 и 12 локусните).

- На стр. 51 липсва номер на таблицата?

- Има дублиране на две различни таблици с номер 21- от стр.85 и стр.87?

- Текстът към фиг.8 от стр.94 трябва да се корегира като „субгрупи“ се замени със „сполиготипове“.

- Не става ясно описанието на резултатите на стр. 98 към коя фигура се отнася т.е. необходимо е да се цитира съответната фигура.

- Изводите и приносите за да звучат по-ясно и убедително биха могли да бъдат синтезирано съкратени и изчистени от подробности.

Бих искала да отбележа, че критичните бележки са от незначителен характер и не засягат достойнството на дисертацията.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Рецензираният дисертационен труд представлява задълбочено изследване върху молекулярно-генетичните аспекти на туберкулозата в България, което като тематика, теоретични обобщения, изводи и препоръки има своето безспорно значение за теорията и практиката. Дисертантът демонстрира умения за задълбочен и аргументиран анализ, обобщения и критично мислене. Публикационата активност във връзка с дисертацията е достатъчна и отговаря на изискванията за тази научна степен.

Всичко това ми дава основание да предложа с увереност на уважаемите членове на Научното жури да присъдят на ДОЦ. СТЕФАН ВЪЧЕВ ПАНАЙОТОВ научната степен „Доктор на науките“ по научна специалност „Микробиология“ и професионално направление „Медицина“.

Дата: 18.03.2016

Гр. София

Рецензент:



Доц. д-р Надя Маркова, дб