



До Председателя на Научно жури
определено със заповед
№ 14 от 18. 01. 2016 г.
на Директора на НЦЗПБ,
София

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд представен за защита пред Научно жури
за получаване на научната степен „Доктор на науките” по професионално
направление Медицина, научна специалност Микробиология (шифър 01.06.12)

Автор: доц. Стефан Въчев Панайотов, дб завеждащ Националната референтна
лаборатория (НРЛ) по „Молекулярна микробиология” към отдела по
микробиология на Националния център по заразни и паразитни болест
(НЦЗПБ), София.

Тема на дисертационния труд: „Молекулярно-генетични проучвания
върху етиологията на туберкулозата в България”

Рецензент: чл.-кор. Христо Миладинов Найденски, дvmн от Института по
микробиология „Стефан Ангелов” при БАН, ръководител на Департамент
по Инфекциозна микробиология.

Декларирам, че не съществуват условия за конфликт на интереси между мен и
авторът на дисертационния труд по смисъла на ал.1, т.3 и 5 от ДР на ЗРАСРБ

Като една от най-древните, но и до днес със запазена социална значимост
инфекциозна болест, туберкулозата и нейния контрол са сред основните
приоритети на СЗО, Европейския център за превенция и контрол на
заболяванията (ECDC), министерства по здравеопазването и институции в
страните от целия свят. По данни на СЗО за 2012 г., туберкулозата е второто
водещо по леталитет инфекциозно заболяване в света, което със своите 122
регистрирани случая на 100.000, се характеризира като глобален здравен
проблем. През 2013 г. Регионалният офис на СЗО и ECDC публикуват съвместен

„Доклад за епидемиологичния надзор и мониторинг на туберкулозата в Европа – 2013 г.“, отчитайки, че през 2011 г., в 51 от общо 53 страни от Европейския регион на СЗО (без Сан Марино и Туркменистан) са регистрирани 380 366 случая с туберкулоза (42 случая на 100 000 население). Макар и наблюдаваното намаление на разпространението на заболяването да е с 27% спрямо нивото през 2007 г. (53.6 на 100 000) и с 5.6% спрямо 2010 г. (43.6 на 100 000), според СЗО болестта се разпространява със заплашителни темпове, като всяка секунда се заразява по един човек.

От особена важност е и широкото разпространение на мултирезистентната туберкулоза в света, като по данни на СЗО, България е сред 27-те страни с най-висока честота на разпространение.

Ето защо, доказването на географското разпространение на циркулиращите групи от чувствителни и мултирезистентни щамове на *Mycobacterium tuberculosis* в България, описанието на специфичните филогеографски генотипове и тяхното значение в исторически, демографски и епидемиологичен аспект, изясняват редица важни за контрола на туберкулозата въпроси от национално, регионално и глобално ниво.

Тези накратко представени констатации, очертават ясно значимостта и актуалността на представените изследвания и получените резултати върху популационната структура на циркулиращите щамове *M. tuberculosis* и динамиката на тяхното разпространение, и са надеждна основа за вземането на адекватни управленски решения за ограничаване на мултирезистентността и туберкулозата като цяло у нас.

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд на доц. Стефан Панайотов включва около 110 приравнени пълни машинописни страници и обхваща следните стандартни раздели: Въведение – 3 стр., Литературен обзор - 34, Цел и задачи - 1, Материали и методи - 15, Резултати и обсъждане - 142, Изводи от дисертационния труд - 4, Справка за приносите - 2, Публикации във връзка с дисертацията – 2, Справка за ръководство и участие в научно-изследователски проекти – 2. Представени са и 4 приложения, които отразяват Списъка на изследваните чувствителни щамове на *M. tuberculosis* с номера по

SITVIT2 системата, октетен код и MIT номера (генотип), разгъната дендрограма на тези щамове, списък на изследваните MDR щамове с техните лабораторни и SIT номера, VNTR профили, както и разгъната дендрограма на изследваните мултирезистентни щамове. Литературата е представена под черта в долното поле на страниците, паради което част от посочените в отделните раздели страници са непълни (някои с по 3 до 6 реда).

Литературният указател включва 389 заглавия, вкл. и 10 web адреса. Прави добро впечатление, че 152 от източниците (39%) са от последните 5 години. От всички заглавия 11 са на кирилица. Освен упоменатите раздели, са включени отделно Съдържание, Списък на съкращенията и Терминология с пояснителен характер. Така оформеният дисертационен труд отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), респективно Правилника на НЦЗПБ за развитие на академичния състав.

В подробният и информативно представен Литературен обзор ясно проличава добрата осведоменост на автора в контекста на заявените за изпълнение експериментални задачи. Основно място е отделено на описанието на основните методи за генотипиране на *M. tuberculosis*, и е направена сравнителна характеристика между тях на базата на задълбочен анализ на литературните източници, постоянно възникващите нови молекулярно-епидемиологични данни и свързаните с тях предизвикателства и потребности. В исторически план най-напред е разработен RFLP анализът, базиран на рестриктазен анализ на полиморфни фрагменти. След това се разработва техниката „сполиготипиране”, а от началото на настоящето столетие се създава и въвежда т.н. VNTR анализът, базиран на типичане на вариабилния брой на тандемните повтори. За всеки един от тези методи са представени особеностите в организацията на данните, сравнителния анализ, обработката на резултатите и техния обмен, като най-важна част от вътрешните и международни изследвания. Внимание се отделя и на показатели като дискриминативна способност, възпроизводимост, трудоемкост и цена. В тези раздели доц. Панайотов обръща внимание, че качеството на типичане значително се повишава с прилагането на

два и повече метода за генотипиране и че доказването на генетична близост не означава задължително епидемична връзка. Ето защо резултатите следва да се съпоставят подробно с наличната епидемиологична информация за пациентите. Нова перспектива е рутинното въвеждане на метод с още по-висока резолюция на анализите, а именно цялостното геномно секвениране за молекулярно-епидемиологични изследвания. Работи се интензивно за създаване на нови софтуери, които да осигуряват адекватен анализ и интерпретация на все по-натрупващата се огромна база данни, превръщайки този метод в нов „златен стандарт”. На базата на данни от секвенирането на няколко десетки генома на *M. tuberculosis* е предложена алтернативна класификация и ново групиране на генотипове от Азия, Африка, Индия, САЩ, Европа и др., целящо да коригира недостатъците в базата данни SITVIT2, редактирана за последен път през 2012 г. Напълно логично, литературния обзор завършва със заключение, което обуславя необходимостта от мониториране на генотиповете на *M. tuberculosis*, циркулиращи в България, допускайки навлизането на нови и необичайни генотипове, което може да се окаже критично както за лечението на пациента, така и за цялата ни здравна система, изправена днес пред нови предизвикателства – циркулация на мултирезистентни щамове, рискови групи население, екологични и други фактори. Не на последно място, изяснената филогеографска структура на циркулиращите щамове ще бъде реална база за разработване на нови ваксини, схеми на лечение и програми за борба с туберкулозата.

Съобразно поставената цел и заявените за изпълнение експериментални задачи, ясно се открояват капацитета на автора и лабораторията като цяло за провеждане на молекулярно-биологични изследвания с висока дискриминативна способност. Те са насочени основно към доказване на щамовото биоразнообразие на *M. tuberculosis* за 10 годишен период в България, към задълбочен сравнителен филогеографски анализ с тези разпространени в региона, Европа и света, и към даване на научно обосновани и обективни препоръки за подобряване на контрола на туберкулозата у нас.

Разделът **Материали и методи** представя богата колекция от щамове на *M. tuberculosis* – общо 694, от които 441 чувствителни и 253 мултирезистентни щама (MDR), изолирани от пациенти от цялата страна, вкл. и от затворници като високо рисков контингент. 97% от изследваните MDR щамове са от пациенти с белодробна туберкулоза (храчка), но има и такива от стомашни промивни води, бронхоалвеоларен лаваж, плеврален пунктат и др. Добре описани са класическите молекулярно-биологични методи (изолиране и стандартизиране на бактериалната ДНК, PCR амплификация) и най-съвременните молекулярно-генетични техники – сполиготипиране и 24 локусен MIRU-VNTR анализ за определяне броя на тандемните повтори в 24 независими полиморфни локуса в *M. tuberculosis*. Резултатите са обработвани със специализиран софтуер MIRU-VNTRplus, който позволява сравняване на изходните данни с тези за референтни щамове по показателите LSP (дълги секвенционни полиморфизми), SNP (единични секвенционни полиморфизми), IS6110-RFLP типирание, MIRU-VNTR профил, профил на чувствителност, видова принадлежност, групово отнасяне и епидемиологична информация за референтните щамове. За целите на изследването е използван и софтуера SITVIT2, който е най-голямата база данни за сполуго- и MIRU-VNTR профили, със способност постоянно да се обновява и усъвършенства.

В разделът **Резултати и обсъждане** са представени стегнато и систематизирано (в 37 таблици и 37 фигури, по-голямата част от които цветни), получените експериментални данни от изследваните щамове *M. tuberculosis*. За около 90% от тях е получен SIT номер, принадлежност към група и субгрупа. За първи път, група щамове са включени в субгрупа Урал, впоследствие Урал-2, разпространен в провинция Шираз на Югозападен Иран, а понастоящем в група NEW-1. Има и групи щамове отнесени към група Haarlem (H), субгрупа H1, субгрупа TUR (SIT41 и производните генотипове, които със своя профил допълват SITVIT2 системата). Установените при тях 3 характерни и специфични локуса (VNTR QUB26, MIRU4 и MIRU26) са умело използвани от автора за разработване на скринингов метод за идентифициране на щамове с генотип SIT41. За оценка на дискриминативната способност на използвания метод за

типирание, с успех е приложен индекса на Хънтър-Гастон (HGDI), като вариабилността на локусите от чувствителни, мултирезистентни и мултирезистентни със SIT41 са оценявани поотделно. Доказани са локуси с добра дискриминативност (индекси $>0,50$), както и най-слабо полиморфни локуси с индекс равен на 0,009. Оригинални резултати са получени при изследвани щамове от група Пекин, като е доказано, че два локуса (VNTR QUB11b и MIRU39) могат да бъдат използвани като маркери за бърз скрининг на щамове с този генотип. Изследването за вариабилност при чувствителни щамове за 12 MIRU VNTR локуса на 84 щама, както и проведения сравнителен анализ с мултирезистентни щамове подвърждават факта, че чувствителните щамове са по-хетерогенна група от профили, а мултирезистентните щамове са значително по-хомогенна група от генотипове. Определена клинична насоченост и от значение за изясняването адаптивната микроеволюция на определен генотип под натиска на прилагани туберкулостатици е определянето на динамиката на промените в сполиго- и MIRU VNTR профилите в хода на лечението на пациенти с мултирезистентна туберкулоза – въпрос по който малко данни се откриват в литературата. Експериментално, при изследване на представителна група от 30, респективно 29 пациенти с MDR туберкулоза се доказва, че сполигопрофилът се е запазил идентичен в продължение на 7 години, а VNTR профилите са относително стабилни в продължение на 6 години. Подчертано епидемиологично значение имат данните за циркулиращите в България генотипове на чувствителни и MDR щамове на *M. tuberculosis*. На база изследвани 441 чувствителни, респективно 253 мултирезистентни щама, са изготвени дендрограми, очертаващи разпространените, филогеографски специфични и доминиращи клонове/генотипове в страната, а също и степента на тяхната генетична близост/отдалеченост. Установено е, че най-разпространеният у нас (и рядко изолиран в други страни) сполиготип сред чувствителните щамове е SIT125, субгрупа T2, а сред MDR щамовете е SIT41, субгрупа TUR. Компетентно, интересно и четимо с удоволствие е описанието на необичайните генотипове на *M. tuberculosis* в България, навлизането и доказването на разпространението на генотип Пекин у нас и на Балканите, филогеографската

разпространеност и произход на SIT41 и др. генотипове. Получените нови и оригинални данни за разпространените генотипове на *M. tuberculosis* у нас позволяват сравнителен анализ в световен мащаб и доказват, че географския произход на пациента има връзка с генотипа на щамата изолиран от него, т.е. в определен географски район и местно население циркулират специфични генотипове на *M. tuberculosis*. Освен това, резултатите от молекулярно-епидемиологичните изследвания са сериозно основание за преосмисляне на прилаганите мерки за контрол на туберкулозата, насочвайки въздействието към специфичните биологични, географски, екологични и др. фактори за нейното разпространение.

Към настоящият дисертационен труд бих искал да направя някои критични бележки и препоръки. В окончателния вариант все още се намират пропуски свързани с номерацията на таблици, фигури, литературни източници, стилистични грешки и др. Тези пропуски имат технически характер и не намалят стойността на работата. Бих препоръчал в бъдеще да се определи и честотата на разпространение на различни генотипове *M. tuberculosis* сред етносите групи в страната. Прекалено амбициозно звучи намерението на автора за извеждане от циркулация на щамове със SIT41 с цел справяне или ограничаване на мултирезистентната туберкулоза в България, предвид създадените компенсаторни механизми, водещи до резистентност на *M. tuberculosis* от една страна и размерът на средствата, усилията и мащабите на организационните мероприятия от друга.

Изводите съответстват на получените резултати и подчертават съвременното звучене и актуалност на изследванията и тяхната теоретична и приложна значимост. Приемам представените изводи и получените приноси като оригинални и същевременно като отправна точка за следващи разработки, независимо от допуснатото им припокриване или смесване на изводи със препоръки за клиничната практика.

В заключение, обобщавайки цялостно представеният ми за оценка дисертационен труд, считам че това е логично поставена, прецизно изпълнена и напълно завършена работа, с редица оригинални и потвърдителни приноси за

микробиологичната наука и медицинската клинична практика. Публикуваните статии в престижни международни списания, глави от монографии, успешно изпълняваните международни и национални проекти, както и личните ми наблюдения върху изследователската дейност на доц. Панайотов ми дават основание да твърдя, че той е изграден изследовател с национално и международно признание. Представеният от него дисертационният труд на тема „Молекулярно-генетични проучвания върху етиологията на туберкулозата в България” отговаря на изискванията на чл.12 от ЗРАСРБ, поради което препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да гласуват единодушно с положителен вот за присъждане на научната степен „Доктор на науките” на доцент Стефан Въчев Панайотов.

01.04.2016 г.

Подпис:

