

## Резюмета на трудовете след защита на докторска дисертация

### Резюмета на публикациите в специализирани научни издания на английски език след защита на докторска дисертация

1. **S. Panaiotov**, E. Bachiyska, V. Levterova, N. Brankova, A. Ivanova, D. Merdjanov, Y. Atanasova, T. Kantardjiev. 2010. Limited evidences for spread of *Mycobacterium tuberculosis* 'Beijing' genotype in Bulgaria. *Problems Infect. Parasit. Dis.* 38:1:7-9

През 1995 година е открит особен генотип при *M. tuberculosis* наречен „Пекински”. Щамове от този генотип доминират в цяла югоизточна Азия и са глобално разпространени. Този генотип се свързва с по-висока патогенност и мултирезистентност. В това проучване ние показваме, че пекинският генотип на *M. tuberculosis* е слабо разпространен в страната. Чувствителни и мултирезистентни щамове, събирани от цялата страна през последните шест години, бяха генотипирани чрез техниката „сполиготипиране”, считана за референтен метод за идентифицирането на пекински генотип. Само два щамове с характерния пекински генотип, бяха идентифицирани. Нашите резултати показват, че въпреки активния обмен със страни, където пекинският генотип е широко разпространен, в България той има слабо разпространение. Ние предполагаваме, че е необходимо да бъдат изследвани генетични и екологични фактори, с цел да се провери хипотезата за липса на предразположеност на местното население към този глобално разпространен генотип на *M. tuberculosis*.

2. Ivanov, R. Nenova, **S. Panaiotov**, M. Tiholova, K. Marinov. T. Kantardjiev. 2010. Clinical management of travel-associated brucellosis cases in Bulgaria. *Problems Infect. Parasit. Dis.* 38:1:15-18

В България не са били документирани случаи на бруцелоза през последните 50 години. През 2005 г. са докладвани сравнително голям брой случаи на пациенти със симптоматика за бруцелоза. Нашето изследване е свързано с епидемиологията, клиниката и диагностиката при тези случаи. В статията се описва метод за третиране на серумни проби подходящи за PCR анализ. Общо 63 пациента бяха клинично и лабораторно изследвани за бруцелоза, като се приложиха: епидемиологични проучвания, хематологични, микробиологични и молекулярно-биологични изследвания на проби от кръв. Ние разработихме PCR тест за директно доказване и потвърждаване на бруцелоза в серум. PCR анализ бе проведен на материали от починал. Чрез приложените комплексни методи бяха доказани 21 случая на бруцелоза от изследваните 63 души. Всички случаи на бруцелоза бяха определени като импортни. Всички пациенти са работили като животновъди (овчари) в райони на Гърция където бруцелозата е широко разпространена. Всички изследвани материали бяха с отрицателни посявки за бруцелоза, поради проведено вече антибиотично лечение.

**3. S. Panaiotov, M. Amicosante. 2010. Dynamics of the laboratory results in patients with pulmonary tuberculosis. Diagnostic Microbiology & Infectious Disease 67: 327-332 DOI : 10.1016/j.diagmicrobio.2010.03.002**

Процесът на инфекция с *M. tuberculosis* и развитие на заболяване трудно могат да бъдат проследени, преди диагностициране на заболяването. Лабораторните изследвания отразяват динамиката на този процес. С цел да определим динамиката на лабораторните резултати при суспектни и вече потвърдени пациенти с белодробна туберкулоза, ние изследвахме резултатите от 1467 клинични материали, събрани по време на хоспитализацията на 841 пациенти. Материалите бяха изследвани чрез три лабораторни методи: директна микроскопия, култивиране и полимеразна верижна реакция /PCR/. Нашите резултати доказват, че PCR техниката е по-чувствителна в сравнение с метода на култивиране. При няколко случая ние наблюдавахме PCR положителен резултат, две седмици преди първата положителна култура. По време на лечението, PCR резултатите могат да се запазят положителни за дълъг период от време – до четири – пет месеца след последната положителна култура. С цел по-доброто дефиниране на периода, през който микроскопските и културелни резултати се запазват положителни, ние изследвахме лабораторните резултати на 100 случайно подбрани културелно положителни пациенти с белодробна туберкулоза. Установено беше, че положителните резултати от микроскопия се запазват средно за 10 дни, а тези от посявка – средно за 25 дни.

Според динамиката на лабораторните резултати, ние наблюдаваме, че развитието на туберкулозния процес е много бързо, докато периодът на оздравяване на пациента е дълъг. При контролни изследвания в хода на лечението PCR резултатите е необходимо да бъдат последователно, трайно отрицателни, за да се приеме, че процесът на активна терапия е завършен и пациентът може да остане само за наблюдение. На базата на получените лабораторни резултати, ние предлагаме емпирични модели за динамиката на лабораторните резултати при пациенти с белодробна туберкулоза.

**4. Valcheva V, Mokrousov I, Panaiotov S, Bachiiska E, Zozio T, Sola C, Markova N, Rastogi N. 2010. Bulgarian specificity and controversial phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotype ST125\_BGR. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 59 (1): 90 - 99, DOI: 10.1111/j.1574-695X.2010.00667.x**

Разпространението на локални бактериални клонове на *M. tuberculosis*, може да се обясни с тяхно отдавнашно присъствие, или скорошно импортиране и бързо разпространение в даден район.

Сполиготип ST125 е значително разпространен в България и може да се счита за географски специфичен. Той има особено характерен сполитрофил и неясно присъствие сред филогенетичните семейства на *M. tuberculosis*. Най-често е отнасян към LAM/S семейството. Около 14 % от щамовете в България се идентифицират със сполитрофил ST125, докато неговото присъствие в базата данни SIT/VIT2 е незначително в света. Генетично ST125 се групира със ST34, който е считан за протогенотип на S семейството. Извършеното от нас 21VNTR генотипиране показва комплексно разпространение на ST125 в България. Нашите данни корелират с наскоро изказаната хипотеза, че загуба на единични повтори са основен модел за еволюцията на VNTR локусите при *M. tuberculosis*.

В заключение може да се каже, че сполитрофил ST125 е филогеографски специфичен за България. Този сполитрофил не се асоциира с

мултирезистентност или повишена трансмисивност. Неговото присъствие в България вероятно се дължи на исторически отдавнашна циркулация, което е довело, спекулативно, до адаптиране към местната човешка популация.

5. Victoria Levterova, **Stefan Panaiotov**, Nadia Brankova, Kristin Tankova. 2010. Typing of Genetic Markers Involved in Stress Response by Fluorescent cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism Technique. *Molecular Biotechnology*. DOI: 10.1007/s12033-009-9236-y

Идентифицирането на генетични маркери, свързани със стресов отговор на организмите към физични фактори, или химични субстанции е научно предизвикателство. Типирането на повишена генна експресия, вследствие на селективен антибактериален натиск, се явява обещаващ подход за проучване на молекулярните механизми, отговорни за развитието на резистентност.

Ние разработихме флуоресцентен AFLP подход за търсене на маркери, свързани с антимикотична лекарствена резистентност при медицинско значими гъбички. Разработеният от нас метод е алтернатива на микрочиповите технологии. Ние сравнихме променената генна експресия на два чувствителни референтни щамове на *S. albicans* и техни два мутанта резистентни към флуконазол и итраконазол. AFLP профилът на двата итраконазол резистентни мутанта показва завишена експресия на продукт с големина 500нб, в сравнение с чувствителните щамове. Резистентните към флуконазол щамове не показаха промяна на генната експресия.

Резултатите ни доказват, че AFLP техниката е сравнително бърз, лесен за изпълнение и надежден метод за типирание на генната експресия в отговор на стресови фактори.

6. **Panaiotov S**, Ciccozzi M, Brankova N, Levterova V, Mitova-Tiholova M, Amicosante M, Rezza G, Kantardjiev T. 2009. An outbreak of Q fever in Bulgaria. *Ann Ist Super Sanita*. 45(1):83

Ку-треската е акутно фибрилно заболяване, причинено от *Coxiella burnetii*. Случаи на Ку-треска на Балканския полуостров са описани още през Втората световна война. След 1990 година се отчита нарастване на случаите на Ку-треска в България. Ние докладваме епидемия от Ку-треска, възникнала в Ботевград – Западна България. Двеста и двадесет случая на Ку-треска са идентифицирани в периода 01. май – 09. юни 2004 година, като 168 от тях са от Ботевград, а другите са от околните села. Това е най-голямата епидемия на Ку-треска в България за последните двадесет години. Причините за възникналата епидемия са метеорологични и екологични фактори, както и разпространение на заболяването сред животни /кози и овце/ в самия град.

7. Boyanova L., Markovska R., Yordanov D., Marina M., Ivanova K., **Panayotov S.**, Gergova G., Mitov I. 2009. High prevalence of virulent *Helicobacter pylori* strains in symptomatic Bulgarian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 64(4):374-80.

Цел на нашето изследване беше да оценим разпространението на вирулентни гени чрез техниката полеимерзно верижна реакция (PCR) сред щамове на *Helicobacter pylori*, изолирани от 116 пациенти. Беше определена чувствителността на всички изолирани щамове към амоксицилин, метронидазол и кларитромицин. За 6,9% от изследваните пациенти беше доказана, чрез PCR, множествена ко-инфекция с щамове на *Helicobacter pylori*,

които бяха изключени от статистическия анализ. Токсигенния генотип *vagA s1* доминираше (91,7%), което е по-висока стойност от обичайната за Европа. *cagA* положителен генотип беше открит при 81,5% от щамовете, като почти всички от тях бяха и с *vagA s1* генотип. Щамове с генотип *cagA+/vagA s1a* бяха 80,6%. Честотата на вирулентните щамове на *H. pylori* няма връзка с пола и възрастта на пациента, нито пък с антибактериалната чувствителност на щамовете.

В заключение трябва да се подчертае, че щамове на *Helicobacter pylori* с вирулентен генотип са широко разпространени сред симптоматични пациенти в България.

Лабораторията по „Молекулярна микробиология“ на НЦЗПБ взе участие при разработване на PCR метод за анализ на клинични материали и генотипиране на вирулентните маркери при *Helicobacter pylori*.

**8. S. Panaiotov, Y. Evstatieva, S. Ilieva, V. Levterova, N. Brankova, D. Nikolova, A. Ivanova, V. Stefanova, K. Tankova and A. Atev. 2009. Quantitative assessment of the dominant genome in fusant cultures. Biotechnol. Biotechnol Eq. 892-895**

Разработването на фузанти - продуценти на биоактивни вещества, е изключително важно за биотехнологичната промишленост. Ние изследвахме фузанти, получени чрез фузия на протопласти между щам на *Aspergillus oryzae* – продуцент на алфа-амилаза и *Aspergillus avamori*, продуцент на ксиланаза. Фузантите бяха изследвани морфологично, както и за комбинирана ензимна активност. Целта на проучването ни беше да разработим количествен метод за оценка на доминиращия геном при фузантите. В тази връзка разработихме подход за цялостно геномно типичане, базиран на техниката AFLP. В хода на нашата работа, изследвахме геномния разпад на фузантните култури от първо до четвърто поколение. Резултатите ни показаха, че морфологията на фузантите е различна от тази на изходните култури, но наподобява *Aspergillus avamori*. На базата на повече от 80 полиморфни маркери, геномния AFLP анализ показва, че повече от 85% от генома на фузанта принадлежи на *Aspergillus avamori*. Геномният разпад на фузантите от първо до четвърто поколение бе оценен на около 3%, чрез AFLP техниката.

В заключение можем да кажем, че AFLP техниката е ефективен и дискриминативен метод за количествена оценка на доминиращия геном при фузантни култури и за количествена оценка на степента на геномен разпад при субкултивиране.

**9. Stefan Panaiotov. 2009. Crystalline nitrate reductase reagent for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. Int. J. Antimicrob. Agents. 34(2):191-2**

В края на 80те години, българските учени Калфин и Енгибаров, публикуват метод за оценка на чувствителността на *Mycobacterium tuberculosis* към прилагани туберкулостатици. Методът се основава на биохимичната нитратредуктазна активност на *Mycobacterium tuberculosis*. Резистентните щамове продуцират нитратредуктаза, която редуцира присъстващите в средата нитрати, в нитрити. Класически използвания реактив за доказване на нитрити е реактивът на Грис. Този реактив е токсичен и с кратък период на годност. Ние разработихме прилагането на сух реактив за оценка на нитратредуктазната активност при *Mycobacterium tuberculosis*. Реактивът се основава на разработка на Lampe от 1981 година. В експериментални условия показахме, че реактивът

на Лампе има няколко предимства, пред реактива на Грис. Той е лесен за приготвяне, биохимичният тест лесно се изпълнява, не е токсичен, полученото оцветяване е стабилно и реактивът има срок на годност поне три години.

Предложеният от нас метод за оценка на чувствителността към прилагани туберкулозостатици е лек за изпълнение, бърз, евтин и надежден.

**10.** Sabtcheva, S., Kantardjiev, T., Georgieva, E., **Panaiotov, S.**, Kaku, M. Plasmid-mediated PER-1 extended-spectrum betalactamase in *Providencia rettgeri* from Bulgaria. 2008. *Problems Infect. Parasitic Dis.* 36(2):29-30

Мултирезистентен щам на *Providencia rettgeri* беше изолиран от урина на раково болна 38 годишна жена. Щамът беше резистен на бета лактамни антибиотици, с изключение на цефамицини и карбапенеми, резистен на аминогликозиди, флуорохинолони, хлоранфеникол, тетрациклин, триметоприм и сулфонамиди. Щамът бе идентифициран като ESBL. PCR с праймери за специфични ESBL гени идентифицираха присъствието на blaPER-1 ген. PER-1 маркерът беше прехвърлен експериментално чрез конюгация. Доказано бе, че мултирезистентността е плазмидно медирана. Това е първо съобщение на плазмидно медиран PER-1 при семейство Enterobacteriaceae в България. PER-1 положителни грам-отрицателни патогени са често изолирани в Турция и Европа. Това доказва необходимостта от проследяване разпространението на PER-1 маркера в България.

**11.** Martin A, **Panaiotov S**, Portaels F, Hoffner S, Palomino JC, Angeby K. 2008. The nitrate reductase assay for the rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 62:56-64

Стандартно прилаганите референтни методи за оценка на чувствителността на *Mycobacterium tuberculosis* към прилагани туберкулозостатици са бавни. С нарастване разпространението на мултирезистентни щамове на *Mycobacterium tuberculosis* се налага въвеждането на бързи, евтини и точни методи за оценка на чувствителността. Разработеният от Калфин и Енгибаров още през 80те години на миналия век нитратредуктазен метод, и подобрен от Панайотов и Кантарджиев е алтернативен, бърз метод за оценка на чувствителността към рифампицин и изониазид. Международен колектив от специалисти, работили за разпространението и утвърждаването на този метод през последните години, си поставиха за цел да обобщят и оценят резултатите от прилагането нитратредуктазния метод в световен мащаб.

Ние извършихме систематичен преглед и анализ на литературата, публикувана във връзка с прилагането на нитратредуктазния метод за детекция на чувствителност към рифампицин и изониазид. Приложението на нитратредуктазния метод за оценка на рифампицинова чувствителност, беше описано в петнадесет публикации, а за изониазидна резистентност – в тринадесет. Нашият анализ показва, че прилаганият нитратредуктазен метод върху изолирани щамове, има повече от 94% чувствителност и специфичност за рифампицин и повече от 92% - за изониазид. Три от анализираният от нас публикации цитират директно прилагане на нитратредуктазния метод за храчки, като чувствителността и специфичността към рифампицин и изониазид варира между 88% и 100%.

Нашето заключение е, че съществуват убедителни литературни данни, за високата специфичност и чувствителност на нитратредуктазния метод, прилаган за бърза детекция на резистентни чиски култури към рифампицин и изониазид. Необходими са допълнителни изследвания за прилагането на нитратредуктазния метод директно за храчки, като предварителните резултати са обещаващи и описват добра чувствителност и специфичност на метода. Необходима е по-точна финансова обосновка, с цел този метод да получи по-широко разпространение в страни с висока честота на заболяемост от туберкулоза, асоциирана с мултирезистентност.

**12.** Т. Kantardjiev, V. Levterova, **S. Panaiotov**, I. Ivanov, E. Hristozova. 2006. Molecular taxonomy of *Cryptococcus neoformans* varieties displaying phenotypic similarities. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, vol.2 p.101-103

*Cryptococcus neoformans* е широко разпространена, клинично значима патогенна гъбичка, която може да причини животозастрашаващи инфекции при хората и особено при имunosупресирани пациенти. Според сега съществуващата класификация, видът се състои от три вариетети. Таксономичната позиция на тези вариетети е дискутабилна.

Ние приложихме флуоресцентен AFLP анализ за генотипиране на *Cryptococcus neoformans* от серотипове А и D и клинични изолати. Резултатите от AFLP генотипирането показаха значителна генетична дивергенция между вариететите от серотипове А, D и клиничните изолати. Приложената от нас флуоресцентна AFLP стратегия за типичане, потвърди дивергенцията между вариететите.

На базата на специфичния профил се доказва, че флуоресцентната AFLP техника е надежден метод за таксономия, идентификация и типичане на вариететите на *Cryptococcus neoformans*.

**13.** Т. Kantardjiev, V. Levterova, N. Brankova, I. Ivanov, P. Angelov, **S. Panaiotov**. 2006. Role of fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis in taxonomy, identification and epidemiological examinations of yeast pathogens. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 1:103-106

Геномното молекулярно типичане има изключителна важност за таксономията, филогенетичните отнасяния и микробната епидемиология. През последните две десетилетия, изолирането на множество видове медицинско-значими гъбички значително нарасна. Геномът на гъбичките е сравнително сложен за генетичен анализ. Правилната идентификация на изолираните видове е от съществено значение. Идентификацията на някои патогенни видове гъбички е все още проблемна поради тяхната висока степен на фенотипно подобие.

Ние изследвахме прилагането на флуоресцентен AFLP анализ, като метод за идентификация и типичане на медицинско значими гъбички. Флуоресцентният AFLP профил ясно разграничава различните видове и родове гъбички. Флуоресцентният AFLP анализ е подходящ метод за таксономия, идентификация и типичане на гъбички.

14. Kremer K, Arnold C, Cataldi A, Gutierrez MC, Haas WH, **Panaiotov S**, Skuce RA, Supply P, van der Zanden AG, van Soolingen D. 2005 Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. J Clin Microbiol. 43(11):5628-38.

През последните години бяха разработени множество нови методи за ДНК типирание на *Mycobacterium tuberculosis*, които са по-бързи и по-лесни за изпълнение, в сравнение с международно стандартизирания IS6110 метод за рестриктазен фрагментен анализ. В действителност не е бил извършван преглед за практичността на тези нови методи за типирание и не е ясна тяхната полезност, сравнено с по-рано публикуваните методи. Нашето изследване прави анализ на дискриминативната способност и възпроизводимост на девет наскоро разработени PCR методи за типирание на *Mycobacterium tuberculosis*. Ние използвахме стандартизирана колекция от щамове разпределена между всички лаборатории, участващи в изследването. Тази колекция от щамове се състоеше от 90 щамове на *Mycobacterium tuberculosis*-комплекс и 10 non-*Mycobacterium tuberculosis*-комплекс микобактериални щамове. Така също колекцията включваше 31 дублирани ДНК проби, с цел да се оцени възпроизводимостта. Най-добра възпроизводимост бе доказана за методите VNTR и бърз лигазно-медиран PCR. Другите методи, които показаха добра възпроизводимост бяха сполитипирането, лигазно-медиран PCR и пет локусен VNTR. Слаба възпроизводимост имаха флуоресцентната AFLP техника, която бе проведена в три различни лаборатории. Нашето изследване доказва, че двата VNTR метода за типирание и бързият лигазно-медиран PCR са надеждни и дискриминативни, молекулярно-епидемиологични методи за типирание на *Mycobacterium tuberculosis*. VNTR типиранието е най-подходящ метод за типирание.

15. Ivanov I., N. Brankova, **S. Panaiotov**, V. Levterova, T. Kantardjiev. 2005. Internal positive control for PCR diagnosis of *Bordetella pertussis*: Design and laboratory evaluation. Problems Infec. Parasit. Dis. 2:30-33

PCR диагностиката се наложи като широко приложим подход през последното десетилетие. Множество изследвания касаят качествена оценка и валидиране на PCR методи. Един от най-сериозните проблеми остава контролът на инхибитори в клинични проби. Въпреки надеждността на сега прилаганите методи за ДНК екстракция, някои инхибитори могат да присъстват и да компрометират PCR анализа. През последните години бе предложено използването на вътрешни положителни контроли, които се амплифицират заедно с таргетната секвенция, с цел да се докаже инхибиране на реакцията от страна на изследвания материал. В настоящото проучване ние предлагаме метод за конструиране на такива вътрешни положителни контроли, които се амплифицират със същите PCR праймери използвани за анализ. Разработената от нас вътрешна положителна контрола беше използвана за PCR детекция на *Bordetella pertussis*.

16. **S. Panaiotov**, V. Levterova, I. Ivanov, N. Brankova, T. Kantardjiev, N. Vladimirova, V. Voinova, E. Kazarova. 2005. Pertussis in the Bulgarian population: role of PCR diagnosis. Problems Infec. Parasit. Dis. 2:38-40

Коклюшът /магарешка кашлица/ е разпространено респираторно заболяване сред децата и се причинява основно от *Bordetella pertussis*. Заболяването също е разпространено сред младежи и възрастни, при които симптомите на заболяването са често а-типични.

В това изследване ние си поставихме няколко задачи: да оценим разпространението на коклюшната инфекция в България, прилагайки PCR техниката за анализ; да съберем информация за трансмисията на коклюш от възрастни към деца; да оценим приложимостта на PCR техниката за детекция на *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, и *Legionella pneumophyla*, като причинители на респираторни инфекции често наподобяващи коклюш. Бяха изследвани 344 назофарингиални проби от деца със симптоми на коклюш и контактни на тях възрастни. Ние разработихме PCR тестове за всеки един от диагностицираните бактерии. Разработихме също и градиентен PCR метод, чрез който да докажем три от основните бактериални причинители на атипична пневмония. Резултатите от нашето изследване показаха, че коклюшът е широко разпространен в България, независимо от голямото ваксинационно покритие сред децата. Атипичните пневмонии, причинявани от микоплазми и легионела, могат да бъдат клинично погрешно диагностицирани като коклюш.

**17. S. Panaiotov, T. Kantardjiev, V. Levterova, R. Lazarova, I. Kadiev, E. Savov.** 2004. Evaluation of PCR strategies for laboratory diagnosis of mycobacterial infections. *Problems of Infec. Parasit. Dis.* 32:2, 31-35

Директната микроскопия и култивиране са широко приложими лабораторни методи за диагностика на туберкулозата. През последните две десетилетия, вниманието на специалистите бе фокусирано върху разработването на бързи, специфични и чувствителни лабораторно диагностични методи. PCR техниката е широко прилагана за диагностика на множество вирусни, бактериални, гъбни и протозойни инфекции. Усилията на голям брой научни групи по света, са насочени към трансформиране на теоретичните знания в практически приложими диагностични методи, имащи висока чувствителност, специфичност и възпроизводимост.

Нашето изследване фокусира върху оценката на няколко PCR метода, приложени за диагностика на туберкулозата. Бяха изследвани 1391 клинични материали, които включваха контролна група от 250 клинично здрави миньори и 636 пациента с туберкулоза, суспектни за туберкулоза и с белодробни оплаквания. Изследваните материали бяха 1208 храчки, 62 урини, 58 плеврални пунктата, 11 раневи секрета, 18 БАЛ, 1 биопсия и 27 ликвора. Бяха разработени и изпитани четири PCR двойки праймери.

Резултатите показаха, че PCR техниката е надежден и бърз метод за диагностика на туберкулозата.

**18. T. Kantardjiev, V. Levterova, S. Panaiotov, I. Ivanov.** 2004. Use of Amplified fragment length polymorphism analysis as a tool for identification and typing of yeast isolates. *Mikol. Lek.* 11:2, 113-117

Значително нараства изолирането на медицинско значими гъбички и такива от околната среда. Това налага необходимостта те да бъдат правилно видово идентифицирани. Идентификацията на някои видове гъбички е все още проблемна поради тяхното фенотипно подобие. Ние разработихме и изпитахме AFLP анализ за идентификация и типирание на гъбички. Получените резултати показаха, че AFLP профилът е строго специфичен за различните видове и родове. Бяха изследвани 77 вида гъбички. Построените дендрограми на базата на получените AFLP профили правилно отнесоха еднакви видове към общи клонове. Всеки вид образува самостоятелен клон. Различните родове бяха



разположени на значително разстояние. Нямаше случай на неправилно отнесен вид в общо построената дендрограма.

AFLP техниката е надежден метод за идентификация и типирание на гъбички.

**19.** N. Tsvetkova, M. Schild, **S. Panaiotov**, R. Kurdova, B. Gottstein, J. Walochnik, H. Aspöck, M. S. Lucas and N. Müller. 2004. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitology Res.* 92:405-413

За първи път в страната е направен опит да се идентифицират свободно живеещите амебни видове в природни източници. Бяха изследвани 280 проби, като в 171 от тях (61,1%), бяха изолирани *Acanthamoeba* от II и III морфологични групи, както и *Hatmannella*. Шест щамове изолирани от различни водоизточници и почва бяха молекулярно идентифицирани и генотипирани. Молекулярната идентификация потвърди тяхното отнасяне към род *Acanthamoeba*. Това бе в съгласие и с морфологичните белези. За тази цел ние частично секвенирахме 18S ДНК и проведохме филогенетичен анализ, сравнявайки нашите резултати с известни секвенции. Сравнителният анализ на тези секвенции сортира четири от изолатите в група Т-4, която включва повечето от известните вече патогенни щамове на *Acanthamoeba*. Петият изолат имаше морфологични характеристики на *Hatmannella*. Така също той беше и отрицателен, чрез специфичен PCR за *Negleria fowleri* и *Acanthamoeba*.

**20.** T. Kantardjiev, V. Levterova, **S. Panaiotov**, I. Ivanov. 2004. Development of AFLP and RAPD Methods for Typing of Clinically Significant Candida Species. *Problems of Infec. Parasit. Dis.* 32:1, 35-37

Ние разработихме и приложихме два молекулярно-епидемиологични подхода, с цел по-добра оценка на генетичното биоразнообразие сред клинично значими изолати на род *Candida*. Двата разработени метода бяха техниките: случайно амплифициране на полиморфна ДНК (RAPD) и амплифициране на специфични полиморфни фрагменти (AFLP). Нашата цел беше да оценим тяхната възпроизводимост, дискриминативна и типираща способност. Чрез RAPD бяха изпитани 6 къси олигомерни праймера, с дължини 10-15нб. AFLP техниката беше разработена за амплифицирането на специфични PstI/VamHI рестриктазни фрагменти. Двата метода приложихме за анализ на група от щамове, изолирани от пациенти с хронична вагинална кандидоза. Щамовете изолирани от различни анатомични места на един и същи пациент показаха различни полиморфни фрагменти. Направихме опит да изследваме вероятна трансмисия на *Candida* spp. сред хоспитализирани HIV положителни пациенти.

В заключение трябва да отбележим, че AFLP техниката има добра възпроизводимост, но е лабораторно трудна за изпълнение, докато RAPD техниката е лесна за изпълнение, но изисква строго стандартизиране на условията.

**21.** V. Levterova, T. Kantardjiev, **S. Panaiotov**, I. Ivanov, A. Kouzmanov. 2003. RAPD Typing of Isolates from Patients with Chronical Recurrent Vaginal Candidosis. *Problems of Infec. Parasit. Dis.* 31:2, 23-26

През последното десетилетие броят на случаите с кандидоза е значително нараснал. Около 75% от жените поне веднъж през живота си са имали проблеми с вагиналната кандидоза. Научната общност няма единно мнение по

въпроса дали щамовете *Candida albicans*, колонизиращи устната кухина или дебелото черво са причина за вагиналната кандидоза. Целта ни беше да изследваме фундаментални въпроси свързани с:

1. да изясним източника за реинфекция с *Candida albicans* при жени с рекурентна вагинална кандидоза;

2. да изясним има ли връзка между щамовете причинили реинфекция, с щамове изолирани от други анатомични места.

С цел оценяване на генетичната близост между щамовете, ние разработихме и приложихме RAPD техниката като типиращ метод. При нашето изследване голяма част от щамовете изолирани от различни анатомични места (букална лигавица, анус, и вагина) на един и същи пациенти показаха различни RAPD профили. Приложеният RAPD метод има добра възпроизводимост. Необходими са допълнителни изследвания, с цел да се изясни каква е клоналната връзка между щамове на *Candida albicans* изолирани от различни анатомични места на пациенти с вагинална кандидоза.

**22. Stefan Panaiotov, Velio Veleв, Toma Kostov, Todor Kantardjiev, Victoria Levterova.** 2003. 79-Year Old Man with Wrist-Joint Tuberculosis – Case Report. *Problems of Infec. Parasit. Dis.* 31:2, 22-23

Описваме случаи на извънбелодробна костно-ставна туберкулоза. Извънбелодробните форми на туберкулоза представляват около 10%, а костно-ставната туберкулоза е едва 1-3% от тях. Описания от нас случай е при 79 годишен мъж с туберкулоза на гривнената става, засягаща прилежащите меки тъкани и структури. От направената литературна справка, туберкулозата на гривнената става е изключителна рядкост, а микробиологичното ѝ доказване с изолиране на *Mycobacterium tuberculosis* не е било описано. На диагностицираният от нас пациент, бе приложена стандартна туберкулозостатична терапия и лабораторно проследяване за значителен период от време.

**23. S. Panaiotov, T. Kantardjiev.** 2003. Association of nitrate reductase activity of *M. tuberculosis* for drug susceptibility. *Problems of Infec. Parasit. Dis.* 31:2, 20-22

Разпространението на мултирезистентни щамове на *Mycobacterium tuberculosis* налага задължителното прилагане на бързи тестове, за определяне на чувствителността на изолатите към туберкулозостатични препарати. Ние приложихме модифициран нитратредуктазен метод за оценка на чувствителността на щамове. Изпитахме кристален нитратредуктазен реактив, описан от Лампе за биохимична оценка на нитратредуктазната активност. Чувствителността на 33 щамове на *Mycobacterium tuberculosis* беше изпитана с този модифициран, бърз биохимичен метод. Резултатите показаха отлична възпроизводимост, лекота на изпълнение, лесно приготвяне и дълъг срок на годност на реактива.

**24. E. Georgieva, S. Panaiotov, V. Levterova, T. Kantardjiev,** 2003. PCR detection of *Chlamydia trachomatis* in genitourinary specimens. *Probl. Infec. Parasit. Dis.* 31:1 p.12-1

*Chlamydia trachomatis* е причинител на полово предавани инфекции при мъже и жени. При голям брой от случаите, инфекцията от *Chlamydia trachomatis* се развива асимптоматично, като може да доведе до сериозни усложнения. Това налага навременната диагностика на хламидиалния причинител. Цел на нашето

проучване беше да разработим надежден PCR метод за доказване на *Chlamydia trachomatis* в урина и цервикални секрети. Разработеният от нас тест е на основата на специфичния *omp1* ген при *Chlamydia trachomatis*. Ние оценихме чувствителността и специфичността на избраните от нас праймери. Избраните от нас праймери имаха амплифицираща способност еквивалентна на 1,2 бактериални генома. В периода април 2000 - март 2003, ние изследвахме 572 урини и цервикални секрети прилагайки разработения от нас PCR метод за диагностика на *Chlamydia trachomatis*. 2,5% от изследваните материали бяха положителни за *Chlamydia trachomatis*.

**25.** V.Stavrakieva, T. Kantardjiev, **S. Panaiotov**, V. Levterova. 2003. PCR as a method for diagnosis of *Scopulariopsis brevicaulis*. Problems of Infec. Parasit. Dis. Vol. 31:1 p.14-15

Онихомикозата е гъбична инфекция по ноктите, причинявана от дерматофити или недерматофитни видове. Тя е широко разпространена. *Trichophyton rubrum* е дерматофит, който е причинител на 90% от случаите на онихомикоза в Европа. *Scopulariopsis brevicaulis* е недерматофит и причинител на около 10% от случаите на онихомикоза. За лечението на онихомикози, причинени от *Trichophyton rubrum* се прилага гризефулвин, кетоконазол, итраконазол, флуконазол и тербинафин. В същото време за лечението на инфекции причинени от *Scopulariopsis brevicaulis* ефективен е единствено итраконазол. Културелното изследване е трудоемко. Ние разработихме PCR метод за доказване на *Scopulariopsis brevicaulis*. Специфично амплифицираният фрагмент е с дължина 336 нб и е част от голямата рибозомална субединица на РНК гена на *Scopulariopsis brevicaulis*. Беше оценена специфичността и амплифициращата способност на избраните от нас праймери. Предварителните резултати дават основание да се смята, че диагностика и лечението на онихомикозите може да бъде подобрена, като времето за идентификация на *Scopulariopsis brevicaulis* значително се намали.

**26. Stefan Panaiotov**, Todor Kantardjiev. 2002. Nitrate Reductase Assay for Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* J. Clin. Microbiol. 40: 3881-3882.

В периода 1998 – 2000 година ние разработихме и изпитахме модифициран метод на нитратредуктазния тест, прилаган за оценка на чувствителността на *Mycobacterium tuberculosis* към прилагани туберкулостатици. Публикацията е в отговор на публикуван материал от шведски учени, свързан с прилагането на нитратредуктазния метод. Оригиналния нитратредуктазен метод е разработен от Емил Калфин още в средата на 80-те години на миналия век и публикуван от Калфин и Енгибаров през 1989 година. За съжаление, разработеният метод от Калфин остава непознат за научната общественост до 2000 година. Цитираме данни за усъвършенстването на този метод, заменяйки токсичния и нетраен реактив на Грис със сухия, нетоксичен и дълготраен реактив на Лампе. Този модифициран вариант на теста беше изпитан на 31 клинични щамове на *Mycobacterium tuberculosis*. Ние изпитахме чувствителността на щамовете към рифампицин (40mg/l), изониазид (0,2 mg/l) и етамбутол (2 mg/l). Получените от нас резултати бяха сравнени с класическия метод на пропорциите, разработен от Канети и препоръчан от СЗО за референтен. При приготвяне на хранителната среда на Льовенщайн, ние добавяхме 0,1% калиев нитрат. Осем – десет дни след

посявката на изследвания клиничен щам, редуцията на калиевия нитрат беше изпитана с добавяне на кристалния реактив на Лампе.

Модифицираният от нас нитратредуктазен метод на Калфин беше значително опростен като начин на работа.

**27.** V.Stavrakieva, T. Kantardjiev, **S. Panaiotov**, V. Levterova. 2002. PCR method for evaluation of *Scopulariopsis brevicaulis* infection of nails. Problems of Infec. Parasit. Dis. 30:1, 23-25

Онихомикозата е широко разпространено заболяване сред населението, причинено от дерматофитни и недерматофитни видове. Морфологичните, микроскопски и биохимични методи прилагани за диагностика, са трудоемки и сравнително трудно изпълними. Нашето изследване представя опита ни от прилагането на разработения от нас PCR метод за диагностика на *Scopulariopsis brevicaulis* в клинични материали. Клиничните материали са посявани на Сабуро агар и култивирани в продължение на една седмица. Изолираните чисти култури след препосяване, бяха използвани за изолиране на ДНК и PCR анализ.

Разработеният от нас PCR анализът е надежден метод за доказване на нокътни инфекции, причинени от *Scopulariopsis brevicaulis*

**28.** Christova, I. L. Schouls, I. Pol, J. Park, **S. Panaiotov**, V. Lefterova, T. Kantardjiev, J. Dumler. 2001. High prevalence of Granulocytic *Ehrlichiae* and *Borrelia burgdorferi* Senu lato in *Ixodes ricinus* Ticks from Bulgaria. J. Clin. Microbiol. 39:4172-4174

Лаймската борелиоза и човешката гранулоцитна ерихиоза (ЧГЕ) се разпространяват чрез кърлежи. Цел на нашето изследване беше с молекулярно-биологични методи, да оценим разпространението на коинфекцията от ЧГЕ и *Borrelia burgdorferi* в кърлежи. Бяха изследвани кърлежи от вида *Ixodes ricinus*, събрани от България. От възрастните кърлежи 34% имаха носителство за ЧГЕ, а 32% – за *Borrelia burgdorferi*. В ДНК изолирана от кърлежи, беше идентифицирано присъствието на няколко вида борелия и ЧГЕ. За анализ на пробите се приложиха съвременни методи като: PCR, ДНК секвениране, ДНК хибридизация и филогенетичен анализ. Доказа се, че кърлежите от вид *Ixodes ricinus* в България имат високо носителство на ЧГЕ *Borrelia*.

### **Резюмета на публикациите в специализирани научни издания и сборници на български език след защита на докторска дисертация**

**29.** Н. Бранкова, В. Левтерова, **С. Панайотов**, Т. Кантарджиев. 2011. Коклюш - съвременно състояние на проблема. Педиатрия, LI:1, 65-67

Материалът разглежда разпространението на коклюша в страната, както и актуалните проблеми с имунизацията и диагностиката на коклюша. Цитиран е опитът на лабораторията по „Молекулярна микробиология” при НЦЗПБ. Изнесените данни са на база 1974 изследвани клинични материали, за периода 2004 – 2009 година. От тях 471 – са положителни (23,86%) и 1503 – отрицателни. Най-засегнатата от коклюш възрастова група са деца под 1-годишна възраст. При анализ на местоживеене на заболелите от коклюш пациенти се доказва повсеместно разпространение в цялата страна. Получените от нас данни

съответстват и на световната тенденция за изместване на възрастовата група на засегнатите от коклюш, с лабораторно доказана инфекция към бебета и малки деца до 3-годишна възраст. Въпреки високата степен на ваксинационно покритие при бебета и деца, коклюшът в страната е разпространен. Прилаганата от нас PCR техника за диагностика се отличава с висока аналитична чувствителност. Методът позволява диагностициране в ранни етапи на болестта. По този начин чрез навременната диагностика и приложено адекватно лечение, може да се намали носителството и разпространението на болестта в обществото.

**30. С. Панайотов, Г. Иванова, Е. Бачийска 2009.** Молекулярни методи за генотипиране на *Mycobacterium tuberculosis*. Съвременна медицина. 60, 5-6:140-147

Съвременните методи за генотипиране на *Mycobacterium tuberculosis* бяха разработени в началото на 90-те години на миналия век. Генотипирането има за цел да решава редица практически задачи, като: трансмисия на щам от един пациент на друг, доказване на реинфекция при пациент, лабораторна кръстосана контаминация на клинични материали, идентифициране на доминантен генотип на *M.tuberculosis* за определен географски район, идентифициране на щамове с по-висока патогенност и трансмисивност и др. Обзорът има за цел да запознае читателите с теоретичните принципи на генотипиране, целите които си поставя молекулярната епидемиология за контрол на туберкулозата и най-прилаганите референтни методи за генотипиране на *M.tuberculosis*. През последните години три метода се наложиха като референтни: RFLP (рестриктазен фрагментен анализ) техниката за инсерционният елемент IS 6110, сполиготипиране и VNTR анализа (Variable Number of Tandem Repeats - типирание на вариабилния брой от тандемни повтори). С помощта на тези методи бяха доказани няколко генотипа на *M.tuberculosis* специфични за България.

**31. Л. Боянова, Вл. Панов, Д. Йорданов, Р. Марковска, М. Марина, Г. Гергова, К. Иванова, Ст. Панайотов, Н. Бранкова, В. Левтерова, И. Митов, Т. Кантарджиев, З. Кръстев, 2008.** *Helicobacter pylori* в устната кухина – предварителни проучвания. Българска Хепатогастроентерология, бр.1, стр. 3-10

*Helicobacter pylori* е считан за основен причинител на хронични гастрити, дуоденални и стомашни язви и кофактор за стомашния карцином при човека. Цел на нашето проучване беше да установим наличието на *Helicobacter pylori* в устната кухина на пациенти със стоматологични или гастродуоденални болести, с помощта на няколко метода: културелна изолация, бърз уреазен тест, имунофлуоресценция с моноклонални антитела и PCR. Бяха изследвани 36 материала от устна кухина (31 от зъбна плака и 5 от слюнка) на 25 пациенти нелекувани за *Helicobacter pylori* инфекцията. Всички проби бяха изследвани за 4 маркера на вирулентност при *Helicobacter pylori*. Щам на *Helicobacter pylori* беше изолиран от слюнка на дете. Освен това PCR на изследвания материал беше положителен. Чрез PCR за директно откриване на *Helicobacter pylori* в 58 орални проби, (46 зъбни плаки и 12 слюнки), - 4 от тях бяха положителни и 54 – отрицателни. Проведеното от нас проучване е първото по рода си за България, касаещо ролята на устната кухина като значим резервоар на *Helicobacter pylori*.

**32.** Н. Бранкова, **С. Панайотов**, В. Левтерова, Е. Добрева, Т. Кантарджиев. 2007. Молекулярна диагностика на причинители на атипични пневмонии – *Coxiella burnetii*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*. Съвременна медицина, 3:15-21

*Coxiella burnetii*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* причиняват респираторни инфекции, като атипични пневмонии придобити в обществото, хронични бронхити, астма и с по-малка честота инфекции на горните дихателни пътища. Настоящото изследване представя обобщение на разработени от лабораторията по „Молекулярна микробиология“ на НЦЗПБ, съвременни молекулярно-генетични методи за диагностика на *Coxiella burnetii*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* в различни респираторни материали. Методите са разработени на базата на видово-специфични: инсерционен елемент IS1111A за *Coxiella burnetii*, *omp1*-ген за *Legionella pneumophila*, *mp*-ген за *Chlamydomphila pneumoniae* и *P1*-ген за *Mycoplasma pneumoniae*. Всички клинични материали бяха анализирани чрез метода на полимеразно-верижна реакция. Бяха потвърдени епидемични взривове на Ку–треска в гр. Ботевград (2004г.) и атипична пневмония сред деца, причинена от *M. pneumoniae* в с.Ключ (2002г.) и гр. Павликени (2005г.). Положителните резултати са от бронхо-алвеоларни лаважи (БАЛ) и храчки. PCR методите се отличават с висока специфичност и чувствителност и могат да бъдат използвани в рутинната лабораторна диагностика на *C. burnetii*, *L. pneumophila*, *C. pneumoniae* и *M. pneumoniae*.

**33.** Т. Кантарджиев, П. Ангелов, В. Левтерова, **С. Панайотов**, Н. Бранкова. 2007. Молекулярни методи за епидемиологично типизиране на патогенни гъбички. Инфектология, Изънреден брой, стр. 29-32

Честотата на причиняваните от патогенни гъбички инфекции се е увеличила през последните две десетилетия, в резултат на повишаването броя на имунокомпрометираните пациенти, свързано с трансплантационните операции или съпътстващите заболявания. В отделенията за специализирана помощ, поради специфичният характер на лечение на болните, е налице риск от възникване на случаи на вътреболнични микози, голяма част от които завършват летално. С оглед проследяване родството между отделните патогенни щамове, ние разработихме молекулярно-епидемиологични методи за генно типизиране. Методите: случайно амплифициране на полиморфна ДНК и амплифициране на специфични полиморфни фрагменти, бяха приложени за типизиране на щамове от род *Candida* и *Geotrichum*, както и – на щамове *Candida albicans*, изолирани от болни с HIV и от болни с вагинална кандидоза. Двата метода имат добра дискриминативна способност. AFLP техниката отлично разграничава и идентифицира отделните видове *Candida* и *Geotrichum*.

Получените резултати дават основание да считаме, че двата метода са надеждни техники за молекулярно генотипиране.

**34.** И. Иванов, Т. Кантарджиев, П. Падешки, Р. Ненова, **С. Панайотов**, В. Левтерова. 2007. Мултилокусен анализ на тандемни ДНК повтори за генотипизиране на *Francisella tularensis* и приложението му при клинични материали. Инфектология, Изънреден брой, стр. 66-68

В периода 1997 – 2005 година, в България са регистрирани повече от 290 случая на туларемия по време на епидемията в Пернишко и Сливница. Нашата

цел беше, чрез прилагането на молекулярни методи за генотипиране, да охарактеризираме изолираните щамове. Мултилокусният анализ на вариабилния брой тандемни повтори в генома, има най-висока дискриминативна способност. Изследването ни включваше генотипирането на 30 щама на *Francisella tularensis*, чрез анализа на 6 VNTR локуса. Направен е опит за прилагането на метода за типизиране на причинителя директно в клинични материали. VNTR анализът е особено информативен при типизирането на мономорфни микроорганизми какъвто е *Francisella tularensis*.

**35. С. Панайотов, В. Левтерова, Н. Бранкова, К. Танкова, Т. Кантарджиев.** 2007. Организация на вътрешния и външен лабораторен контрол на молекулярно-биологичните изследвания. Инфектология, Изънреден брой, стр. 88-92.

Широкото разпространение и натрупаният опит от прилагането на молекулярно-биологичните изследвания в клиничната практика, наложи създаването на задължителни процедури за качествен контрол на изследванията. Качественият контрол има за цел да гарантира повторимост и адекватност на провежданите изследвания. Лабораторията по “Молекулярна микробиология” на НЦЗПБ се насочи към създаването и изпитването на мероприятия, които да гарантират високото качество на молекулярно-биологичните изследвания. Разработиха се мерки, които да включват принципни препоръки за архитектурата на лабораторните помещения, стандартизиране на работните процедури, и цялостната лабораторна организация. Дадените препоръки са изключително само на базата на личния опит на специалистите от Националната референтна лаборатория по молекулярна микробиология на НЦЗПБ и могат да послужат за въвеждане на мерки за добра лабораторна практика от заинтересованите диагностични звена. Оценката на всички описани проблемни ситуации и тяхното практическо решение е вследствие дългогодишният практически опит на лабораторията и вследствие обобщение на световния опит.

**36. С. Панайотов, В. Левтерова, Н. Бранкова, Р. Томан, Т. Кантарджиев.** 2007. Разработване на градиентен PCR метод за едновременно диагностициране на причинители на коклюш и атипични пневмонии. Съвременни методи в молекулярната диагностика. Инфектология, Изънреден брой, стр. 103-106.

Развитите през последните години молекулярно-генетични методи за анализ на специфични ДНК последователности предлагат огромен потенциал за рутинна лабораторна диагностика в сферата на клиничната микробиология. Тези методи на анализ се характеризират с висока, т.нар. аналитична чувствителност, голяма специфичност и бързина на изпълнение. Ние разработихме градиентен PCR метод за едновременно диагностициране на *Bordetella pertussis*, *C. burnetii*, *L. pneumophila*, *S. pneumoniae* и *M. pneumoniae* – причинители на коклюш и атипични пневмонии. Методът е надежден, дава бърз резултат и се прилага рутинно от лабораторията по “Молекулярна микробиология” на НЦЗПБ. Бе направен опит да разработим нови диагностични методи за молекулярно-биологична диагностика на *C. burnetii*. Разработките са свързани с изпитване и прилагане на техниките: циклична амплификация (rolling-cycle amplification), и лигиране в близост (proximity-ligation), с цел въвеждане на

специфичен и чувствителен диагностичен метод за идентифициране на *S. burnetii* в клинични материали, хранителни продукти и околна среда.

**37. С. Панайотов, Р. Томан.** 2007. Съвременни аналитични техники в геномиката и протеомиката – кръгова амплификация и лигиране в близост. Инфектология, Изънреден брой, стр. 98-101.

Нуклеиновите киселини кодират информацията необходима на организма да приведе генетичния си код в структурни белтъци. ДНК молекулата се транскрибира в РНК молекули, които от своя страна се превеждат в белтъци.

Измина почти десетилетие откакто завърши секвенирането на човешкия геном, който включва около 3,2 милиарда нуклеотидни бази, кодиращи около 30,000 белтъка. В момента има огромна нужда от технологични решения, които да изяснят функцията на кодираните белтъци. Тази изследователска стратегия беше наречена протеомика и е съпътстваща част от геномиката. Ние правим преглед на два молекулярно-биологични метода, които биха имали огромна значимост за развитието на геномиката и протеомиката. Това са техниките: кръгова амплификация (rolling-cycle amplification) и лигиране в близост (proximity ligation). Описани са принципните подходи за разработване и прилагане на двете техники.

**38. Н. Бранкова, С. Панайотов, В. Левтерова, И. Иванов, Е. Георгиева, Т. Кантарджиев.** 2007. PCR за диагностика на причинители на коклюш и атипични пневмонии. МедикАрт. 1: 8-12

PCR техниката е особено ценна при доказване на трудно култивируеми микроорганизми. Статията описва в достъпен за общопрактикуващите специалисти научно-популярен стил за диагностичните възможности на съвременните генетични методи. Ние разработихме PCR методи за диагностициране на *B. pertussis*, *S. burnetii*, *L. pneumophila*, *S. pneumoniae* и *M. pneumoniae*, като причинители на коклюш и атипични пневмонии. Методите са надеждни, дават бърз резултат и се прилагат рутинно от лабораторията по “Молекулярна микробиология” при НЦЗПБ. Описват се конкретни примери от нашата диагностична практика за последните 5-7 години, разпространението на изследваните от нас инфекциозни причинители в страната и тенденциите за подобряване на тяхната диагностиката.

**39. Т. Кантарджиев, Н. Бранкова, Е. Добрева, С. Панайотов, В. Левтерова.** 2006. Съвременна диагностика на атипични пневмонии придобити в обществото, причинени до *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*. Мед. Преглед, 42. 2:58-60

*Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* причиняват остри респираторни инфекции, като атипична пневмония, придобита в обществото, хронични бронхити, астма, и с по-малка честота – инфекции на горните дихателни пътища. Изследването ни представя обобщение на разработени съвременни методи за диагностика на *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* в различни респираторни материали. PCR методи бяха разработени на базата на видово специфични *omp1* и *P1* гени. Всички изследвани клинични материали бяха анализирани чрез полимеразно верижна реакция. Бяха потвърдени епидемични взривове на атипична пневмония сред деца причинена



от *Mycoplasma pneumoniae* в с. Ключ /2002/ година и в гр. Павликени /2005/. Положителните резултати са от носогърлени секрети и храчки.

Прилаганите от нас PCR методи се отличават с висока специфичност и чувствителност, и могат да бъдат използвани в рутинната лабораторна диагностика на *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*. Чувствителността на PCR методите разработени от нас за диагностициране на *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* е от порядъка на 20-50 геномни копия. Храчката е по-подходящ материал за изследване в сравнение с назофарингиалния и гърления секрет.

**40. Н. Бранкова, С. Панайотов, В. Левтерова, Т. Кантарджиев. 2006.** Скринингово проучване на асимптоматични пациенти с инфекция с *C. trachomatis* в София. Акуш. Гинек. 2:25-28

Полово предаваната хламидиална инфекция много често е асимптоматична. Поради това целта на нашето проучване беше да проследим нивото на инфектираност сред млади мъже и жени на възраст между 16-45 години в гр. София, с или без оплаквания. Изследвани бяха 568 материала за *C. trachomatis* чрез PCR с помощта на оригинални праймери. Резултатите показаха 2,4% положителни пациенти. Процентът на разпространение на хламидиалната инфекция в София е сравнително нисък и е съпоставим с данните от други скринингови проучвания в Европа.

**41. С. Панайотов. 2005.** Приложение на генотипирането за превенция и контрол на туберкулозата. Информ. Журнал НЦЗПБ, бр.6: 9-19

През последните двадесет години фенотипните маркери за типирание на щамове на *Mycobacterium tuberculosis* бяха заменени от по-точни молекулярни маркери и техники за тяхното изследване. Прилагането на тези нови техники, осигури по-добър епидемиологичен надзор и контрол на туберкулозата. Програмите за контрол на туберкулозата на СЗО, CDC на САЩ и ECDC на Европа задължават всяка страна да разработи програма за контрол на туберкулозата, която да включва генотипиране на изолираните щамове на *Mycobacterium tuberculosis* с референтни методи, съхранение и обмен на резултатите. Два са утвърдените референтни метода: сполиготипиране и анализ на тандемните повтори при *Mycobacterium tuberculosis*. Въпреки че, рестриктазният фрагментен анализ за IS6110 на *Mycobacterium tuberculosis* е високо информативен и стандартизиран, той се прилага в по-малка степен, поради неговата трудоемкост и затруднен обмен на данни. Прилаганите методи за генотипиране дадоха възможност да се изясни в детайли биоразнообразието на *Mycobacterium tuberculosis* в различни географски райони в света. С помощта на тези методи беше доказано съществуването на селективен натиск в определени географски райони, довел до селекцията и разпространението на определен доминантен генотип, какъвто е в случая генотипът „Пекин“ на *Mycobacterium tuberculosis* широко разпространен в Азия. Представеният обзор дава детайлно описание на наложилите се в практиката молекулярни методи за генотипиране на туберкулозата.

**42.** Т. Кантарджиев, Н. Бранкова, И. Иванов, **С. Панайотов**, В. Левтерова. 2005. Актуални проучвания за разпространението на коклюша в България и молекулярно-генетичната му диагностика. Педиатрия, 4:31-33

Коклюшът /магарешка кашлица/ се причинява от б пертусис. Диагнозата при липса на класически симптоми на болестта е проблематична. Ние разработихме PCR тест на базата на инсерционния елемент IS481 който е представен в генома на бактерия с 80-100 копия и е считан за видово специфичен само за *Bordetella pertussis*. Бяха изследвани 388 назофарингиални секрети от пациенти с индикация за коклюш, или контактни такива. Материалите бяха събирани от 10 градове в България. Най-голям положителен брой резултати бяха получени за деца 0-3 годишна възраст. Разработеният от нас метод позволява диагностициране в ранни етапи на болестта. С този метод диагностиката е независима от имунизацията и титъра на антитела в серума. Чувствителността и специфичността на PCR метода значително превъзхожда другите рутинно използвани методи за лабораторна диагностика на коклюша – директна имунофлуоресценция и ELISA.

**43. С. Панайотов**, Д. Пейчев, В. Левтерова, Т. Кантарджиев, И. Иванов. 2004. PCR метод за лабораторна диагностика на *Bordetella pertussis*. Инфектология. –16:4, 22-25

Класическата лабораторна диагностика на *Bordetella pertussis* се основава на директни и индиректни методи, като много често тяхната чувствителност и специфичност е повлияна от имунологичното състояние на пациента, лечение с антибиотици и др. Молекулярно-генетичните методи предлагат огромен потенциал за рутинна диагностика в клиничната микробиология. Ние разработихме PCR диагностичен тест, който се базира на тандемно повторения инсерционен елемент IS481 при *Bordetella pertussis*. Големината му е 1053 нб и е представен в 50-100 копия. Големият брой копия на IS481 в генома, дава възможности за многократно повишаване чувствителността на теста. Бяха изпитани две двойки диагностични праймери, с цел комбинирането им и създаването на високо специфичен 'nested-PCR'. Двете двойки праймери амплифицират фрагменти с големина 748нб и 310нб. При определяне на оптималните температури на хибридизация на праймерите, циклите на амплификация и специфичността на праймерите беше намерено, че двойката праймери, амплифицираща фрагмент от 748нб е диагностично надеждна и предпочетена за по-нататъшна практическа работа.

**44.** Е. Георгиева, С. Панайотов, В. Левтерова, Т. Кантарджиев. 2003. PCR метод за етиологична диагноза на полово предавана хламидиоза. Инфектология. Бр. 4., 19-21

*C. trachomatis* е облигатна вътреклетъчна Грам- отрицателна бактерия, причиняваща полово предавани инфекции при мъже и жени, очни инфекции и пневмонии у новородени. Настоящото изследване представлява разработването на надежден PCR метод за диагностика на *C. trachomatis* в урина и генитални секрети. Методът е разработен на базата на *omp1* гена. Установено беше, че проектираните и изпитани праймери Ctra1/Ctra2 имат отлични амплификационни възможности – амплифицират 1,24 молекули от специфична ДНК. В периода април 2000 – юни 2002 бяха изследвани 518 материали от урина, уретрални и цервикални секрети – 227 бяха от жени и 291 от мъже. Всички клинични материали бяха анализирани чрез метода на

полимеразно-верижната реакция, при предварително установени параметри и условия. От проведените изследвания сред жените, 1,32% бяха положителни, а сред мъжете – 3,09%. Резултатите от това проучване (2.7%) сочат, че процентът на положителните за изследвани клинични материали на лекувани и сравнително болни мъже и жени е нисък. Въз основа на получените резултати за чувствителността на праймерите и от изследваните материали, можем да обобщим, че разработеният от нас метод може да бъде използван за рутинна лабораторна диагностика на *C. trachomatis*.

**45. С. Панайотов.** 2003. Генофондът – система за глобален информационен обмен. 10-ти конгрес по микробиология. Сборник доклади, София. Том 2, стр.308-310.

Резултатите от проекта за декодиране организацията и ДНК последователността на човешкия и други организмови геноми доказват, че стотици гени са преминавали от микроорганизми, към растения и животни и обратно. Информационната мрежа, която образува генофондът на Земята, може да се сравни с Интернет мрежата. Развитието на молекулярната биология и в частност на бактериалната генетика, доказаха, че съществуват механизми за генетична обмяна, при които всеки организъм участва в мрежата на генофонда на Земята. Микроорганизмите са основни вектори, които участват в този информационно-генетичен обмен чрез познатите механизми на трансформация, конюгация и трансдукция. Основен механизъм за междувидов генетичен обмен е хоризонталният пренос. Молекулярно-генетичните изследвания започват да стават все по-атакуеми от етични, философски, религиозни и политически аргументи. Всички страни в света активно изработват и прилагат закони, регулиращи разпространението на практическите резултати от фундаменталната изследователска работа в областта на генното инженерство.

**46. Т. Кантарджиев, Б. Попов, С. Панайотов,** и колектив от отдел „Микробиология“ на НЦЗПБ-София. 2003. Микробиологична диагностика на *Bacillus anthracis* – класически и молекулярно-биологични методи. 10-ти конгрес по микробиология. Сборник доклади, София. Том 2, стр.42-44.

Малко след първите съобщения за терористични актове с антракс в САЩ, Микробиологичният отдел на НЦЗПБ беше натоварен от Правителството, Министерството на здравеопазването, службите на МВР и Гражданска защита, да организира микробиологичното изследване на всички съмнителни с антракс материали. Всички материали се насочваха за изследване в лабораторията по „Особено опасни инфекции“ на НЦЗПБ.

Ние разработихме PCR метод за доказване на *Bacillus anthracis*, който диагностицира вирулентния плазмидно детерминиран pag-фактор и видово специфичния хромозомен маркер *Va813*. Специфичността на праймерите и избраните от нас условия за амплификация се нуждаят от подобряване и допълнителна оценка, с цел адекватна диагностика.

**47.** В. Левтерова, **С. Панайотов**, Т. Кантарджиев, И. Иванов, Е. Георгиева, В. Ставракиева, А. Кузманов. 2003. Анализ на методите AFLP, RAPD, и място-специфична PCR амплификация за типирание на *Candida albicans*. 10-ти конгрес по микробиология. Сборник доклади, София. Том 2, стр.30-34.

Цел на нашата работа беше да се разработят генетични методи за епидемиологично типирание на щамове *Candida albicans*. RAPD техниката беше изпитана, чрез прилагането на два праймера – M13 с дължина 15нб и (GACA)<sub>4</sub> с дължина 16нб. Освен това разработихме AFLP техника, чрез която специфично да бъдат амплифицирани полиморфни BamHI/PstI фрагменти. AFLP техниката беше разработена с прилагането на радиоизотопно белязани праймери с P<sup>32</sup>. Резултатите бяха отчитани след акриламидна електрофореза и визуализация чрез радиография. Нашите резултати показаха, че AFLP методът е високо дискриминативен, но трудоемък за изпълнение и е свързан с работа с радиоактиви. RAPD техниката е лека за изпълнение, но слабо дискриминативна.

**48.** Т. Кантарджиев, **С. Панайотов**, В. Левтерова, И. Иванов, Б. Попов, Ц. Велинов. 2003. Етиологична диагностика и генетични методи за епидемиологично маркиране на *Francisella tularensis*. 10-ти конгрес по микробиология. Сборник доклади, София. Том 2, стр.39-41

Туларемията е ендемична за България, с голям брой резервоари и приносители, с множество фактори и пътища на разпространение. С цел подобряване на етиологичната диагностика на туларемията, ние разработихме PCR метод, на базата на *fopA* гена при *Francisella tularensis*. Чувствителността на разработения тест, беше оценена на около 18fg геномна ДНК, което представлява около 10 клетки. Разработеният метод приложихме върху експериментално заразени мишки. От убитите на 8-ия ден и умрели преди това мишки, се изолира ДНК от далак, бял дроб и лимфен възел. Най-подходящ материал за изследване се оказа далакът на мишките.

Радиоизотопна AFLP техника беше приложена за типирането на 24 щамове на *Francisella tularensis*, изолирани през последните 80 години. Сравнителният компютърен анализ показва, че изолираният български щам край езерото Сребърна през 1962 година има много близък AFLP профил с изолиран през 1953 година щам в Норвегия. Щамът изолиран от Сливница – България, през 1998 година е различен от този – от Сребърна, според AFLP профила.

**49.** В. Левтерова, Т. Кантарджиев, **С. Панайотов**, И. Иванов, В. Ставракиева, Е. Георгиева. 2003. AFLP техниката като нов подход за генетична идентификация на микроорганизми. 10-ти конгрес по микробиология. Сборник доклади, София. Том 2, стр.10-13.

Амплифициране на специфични полиморфни фрагменти (AFLP) е радиоизотопен анализ, чрез който сравнително лесно може да бъде изследван рестриктазния полиморфизъм на голяма част от генома. AFLP профилът дава информация, както за клоналността между организмите, така и за тяхната видова и филогенетична връзка. AFLP профилът анализира множество специфични рестриктазни места, пръснати в целия геном. Сравнителният анализ между различни профили на изследвани организми, показва различна генетична организация. Ние приложихме радиоизотопен вариант на AFLP техниката, като подход за генетична идентификация на микроорганизми. Изследвахме AFLP профилите на 12 вида дрожди и бактерии. Бяха

наблюдавани значителни различия в AFLP профилите. Полиморфната вариабилност е значителна при филогенетично отдалечени видове. Въпреки ограничения брой изследвани микроорганизми, можем да заключим, че специфичният AFLP профил може да се използва за видова идентификация.

**50.** Т. Кантарджиев, Р. Вачева, **С. Панайотов**, А. Бачварова, Ц. Велинов, В. Левтерова. 2002. Сравнително проучване на полимеразно верижна реакция и конвенционални микробиологични методи за доказване на метицилин-резистентни стафилококи сред клинични изолати. *Инфектология*, 39:4, 16-19

Метицилин резистентните *S. aureus* и *S. epidermidis* са едни от най-важните множествено-резистентни патогени. Идентифицирането на метицилин резистентните стафилококи има голямо клинично значение и сериозно влияе върху антибиотичната терапия. Цел на нашето проучване беше да сравним диск-дифузионният тест, оксацилин–скриин агар метода и PCR, за доказване на *mecA* ген при диагностициране на мултирезистентни стафилококи. В изследването бяха включени 50 клинични изолата (41 *S. aureus* и 9 *S. epidermidis*). PCR за присъствие на *mecA* ген, бяха установени при 23 *S. aureus* и 6 *S. epidermidis* щама.

В заключение ние установихме, че PCR методът е по-сигурен, отколкото рутинните тестове за бърза диагноза на инфекциите причинени от MRSA, отчасти поради хетерогенната резистентност на много изолати.

**51.** Кантарджиев, Т. Г. Асева, В. Богатинов, А. Бачварова, **С. Панайотов**, В. Левтерова, П. Петров и др. 2002. Новости в микробиологичната диагностика на важни заболявания. *Инфектология*, 38:1, 21-29

Статията разглежда актуалните новости, настъпили в микробиологичната диагностика през последните десет години. Усилията на Отдела по „Микробиология“ на НЦЗПБ са насочени към разработване на съвременни методи за доказване на нови причинители на инфекции. Въведохме стандартизирани методи на национално ниво. Организирахме външен лабораторен контрол на лабораториите в България. Направихме преценка на доминиращите механизми на резистентност. Разработихме стратегия на антибиотична политика. За значителен брой инфекции, беше разработена генетична диагностика.

**52.** И. Христова, **С. Панайотов**, В. Левтерова, Е. Тасева, Т. Кантарджиев. 2001. Доказване чрез PCR на коинфекция с *B. burgdorferi* и причинителя на човешката ерлихиоза в кърлежи. *Инфектология* 38:2.

Кърлежи от вида иксодес бяха събрани от растителността в един от централните паркове в гр. София и бяха изследвани за наличие на ДНК, специфична за *B. burgdorferi* и за причинителя на човешката гранулоцитна ерлихиоза (ЧГЕ), чрез полимеразна верижна реакция. От 11 сборни проби на 50 кърлежа, 6 - бяха положителни за *B. burgdorferi*, 5 – за причинителя на ЧГЕ. От общия брой сборни проби – 3 се оказаха положителни за двата патогена. От изследваните след това поединично 46 кърлежа, 18 (39%) от тях, бяха положителни за *B. burgdorferi* и 15 (33%) - за причинителя на ЧГЕ, както и 9 (20%) за двата патогена. Доколкото ни е известно има само едно съобщение от Европа за коинфекция на кърлежи с *B. burgdorferi* и с причинителя на ЧГЕ – 2%. Неочаквано високият процент на заразеност на кърлежите с причинителя на

ЧГЕ, намерен от нас, е стъпка в посока към изясняване потенциалната роля на кърлежите иксодес като вектори на ЧГЕ. Освен това нашите изследвания подчертават необходимостта от щателно клинично наблюдение и лабораторни изследвания на ухапаните от кърлежи лица.

### **Списък на публикации реферирани преди защита на докторска дисертация**

**53.** Велев, В., **С. Панайотов**, Т. Костов. 1998. Костно-ставна туберкулоза при 79-годишен мъж. Съвременна медицина. 49:4,36-42.

**54.** **Панайотов, С.**, А. Дечева, А. Simoni, Е. Tortoli, Е. Савов, Р. Вачева, М. Simonetti, М. Buiatti. 1998. Кръстосана PCR амплификация на *Corynebacterium* spp. със “специфични” праймери за род *Mycobacterium*. 9-ти конгрес по микробиология, София. Сборник доклади. Том 1, стр.171-174.

**55.** **Панайотов, С.**, И. Кадиев, Р. Лазарова, Д. Дочев, В. Мирчев, А. Янев, Е. Савов, Р. Вачева. 1998. Динамика на някои лабораторни изследвания при пациенти с белодробна туберкулоза. 9-ти конгрес по микробиология, София. Сборник доклади. Том 1, стр.224-227.

**56.** **Панайотов, С.**, Е. Tortoli, А. Simoni, Г. Гаврилов, Е. Савов, М. Buiatti. 1998. Изолиране и характеристики на *Mycobacterium gilvum* подобен вид. 9-ти конгрес по микробиология, София. Сборник доклади. Том 1, стр.236- 238.

**57.** Савов, Е., Б. Герасимов, Х. Димитрова, **С. Панайотов**, В. Мирчев, В. Пашкунов, К. Пенкова, К. Плочев, Р. Вачева. 1998. Изолиране на *Mycobacterium tuberculosis* при случай на туберкулозен менингит. 9-ти конгрес по микробиология, София. Сборник доклади. Том 1, стр.239-242.

**58.** Маноилов, Л., **С. Панайотов**, В. Мирчев, Е. Савов. 1998. Изолиране на *Mycobacterium tuberculosis* при периферен шиен лимфаденит. 9-ти конгрес по микробиология, София. Сборник доклади. Том 1, стр.243-246.

**59.** Велев, В., **С. Панайотов**. 1998. Изолиране на *M. tuberculosis* при туберкулоза на гривнената става. 9-ти конгрес по микробиология, София. Сборник доклади. Том 1, стр.247-250.

**60.** **Панайотов, С.**, Е. Александров. 1997. Съвременни подходи в лабораторната диагностика на туберкулозата. Инфектология. 34:3,3-7.

**61.** **Панайотов, С.**, Р. МакНърни, Д. Дочев, Ю. Атанасова. 1996. Нов метод за изолиране на ДНК на *Mycobacterium tuberculosis* от храчки, бронхиални лаважи, пунктати и урина. Пневм. и Фтизиатрия. 31:1, 3-5.

**62.** **Панайотов, С.**, Р. МакНърни, Д. Дочев, Ю. Атанасова, Р. Лазарова, М. Шиндов, С. Савов, Г. Генадиев, Д. Славева, В. Велев, С. Уилсон. 1996. Използване на PCR-техниката за бърза диагностика на *Mycobacterium tuberculosis*. Пневм. и Фтизиатрия. 31:1, 27-31.

## Глави от монографии на английски език след защита на докторска дисертация

1. **S. Panaiotov**, M. Amicosante, N. Brankova, M. Ciccozzi, M. Ciotti, M. Equestre, V. Levterova, G. Pisani, T. Kantardjiev. 2010. Guidelines and quality control in molecular biology diagnostics. ISBN 978-954-92298-2-0

Широкото разпространение и натрупаният опит от прилагането на молекулярно-биологичните изследвания в клиничната практика наложи създаването на задължителни процедури за качествен контрол на изследванията. Общите рамки за организация на работата на медицинските лаборатории са описани в стандарт ISO 15189:2007.

Голямото разнообразие от апаратура, техники и методики за диагностициране на инфекциозни причинители изисква въвеждане на правила за контрол на качеството описани в конкретни стандарти по молекулярна диагностика. Всички наши предложения са съобразени с националния стандарт по „Микробиология“ (Наредба № 4 на МЗ, ДВ. бр.11/9.02.2010) и други международни стандарти по молекулярна диагностика (MM3-A2 на NCCLS сега преименуван като Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2006; European Pharmacopoeia, стандарт 2.6.21), според които молекулярно-биологичните изследвания за доказване на инфекциозни причинители следва да се извършват само в микробиологични лаборатории. Качественият контрол има за цел да гарантира повторимост и адекватност на провежданите изследвания.

Разработените указания описват общите принципи за разработване, оценка и прилагане на молекулярно-биологични тестове предназначени за директно откриване на микроорганизми в клинични материали. Указанията предлагат разработени аргументирани препоръки, които са следствие от практическия опит на множество международни експерти участвали в написването на това ръководство. Ние разглеждаме значителен брой въпроси касаещи организацията, техническите изисквания и клиничното приложение на молекулярната диагностика.

2. **Stefan Panaiotov**, Massimo Amicosante, Marc Govaerts, Elizabeta Bachiyska, Nadia Brankova, Victoria Levterova. 2011. Diagnostic and Molecular Epidemiology Methods of Mycobacteria. In: *BSL3 and BSL 4 Agents*. Eds.: Elschner, Cutler, Weidmann, Butaye. В печат от WILEY-VCH Verlag GmbH

Род *Mycobacterium* е близкородствен на родовете *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium* и *Rhodococcus*. Състои се от повече от 130 описани вида. Значителен брой видове причиняват заболявания у човека и животните, като най-разпространени и значими са туберкулозата и лепрозата. По данни на СЗО, *Mycobacterium tuberculosis* причинява годишно туберкулоза при близо 9 милиона души като 1.7 милиона годишно умират от туберкулоза. *M. leprae*, причинява заболяването на 250,000 души годишно. Повечето атипични микобактериални (MOTT) видове са опортюнисти, като могат да причинят тежки заболявания при имunosупресирани пациенти, пациенти с ХИВ и страдащи от муковисцидоза.

Обзорът включва описание на основните характеристики на род Микобактериум, прилаганите съвременни референтни методи за изолиране, диагностика и молекулярно типизиране.

## Патенти

**1. С. Панайотов, Т. Кантарджиев.** 2003. Метод за определяне на лекарствената устойчивост на микроорганизми от род Микобактериум. Патентно ведомство на Република България, Рег. №. 108 464/2003,

През 2003г. бе подадена заявка за патентоване на метод за оценка на чувствителността на *M. tuberculosis* към прилагани туберкулостатици. Ние разработихме прилагането на сух реактив за оценка на нитратредуктазната активност при *Mycobacterium tuberculosis*. Цел на нашата разработка бе изпитването и въвеждането на прахообразен, нетоксичен и траен реактив за визуализиране на резултата. Предложението от нас метод е лек за изпълнение, бърз, евтин и надежден.