

ДО ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА НАУЧНОТО
ЖУРИ, НАЗНАЧЕНО СЪС ЗАПОВЕД
№ 95/23.04.2018 г. на Директора на НЦЗПБ,
Проф. д-р Тодор Кантарджиев, дмн, мзм

НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР
ПО ЗАРАЗНИ И
ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

Изх. № 20.... г.

Вх. № 2844/29.10.18 20... г.

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

РЕЦЕНЗИЯ

относно процедура за придобиване на ОНС „Доктор“ с кандидат **Евгения Иванова Тасева**, докторант на самостоятелна подготовка в НЦЗПБ, в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, по научната специалност „Микробиология“

Тема на дисертационния труд: „МИКРОБИОЛОГИЧНИ И ЕПИДЕМИОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ЛЕПТОСПИРОЗИТЕ ПРИ ХОРАТА В БЪЛГАРИЯ“

Научен ръководител: Проф. д-р Ива Стефанова Христова, д.м.н.

Изготвил рецензията: Доц. Иван Николаев Иванов, дм завеждащ Национална референтна лаборатория по контрол и мониториране на антимикробната резистентност, отд. Микробиология, Национален център по заразни и паразитни болести

Представените ми конкурсни документи са изготвени коректно и в съответствие със Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и правилника за прилагането му в НЦЗПБ.

Кариерно развитие. Евгения Тасева се дипломира като магистър биолог в БФ на СУ „Св. Климент Охридски“ през 1993г. и работи като специалист биолог в различни институти на БАН, където придобива и първоначалните си знания и умения в областта на векторно-преносимите инфекции. През 1998г. започва работа в Националната референтна лаборатория по инфекции предавани с кърлежи, лептоспири и листерии“ към НЦЗПБ, където работи и до днес. През 2005г. придобива медицинска специалност „Микробиология“. Научните интереси на Г-жа Тасева са в областта на микробиологичната диагностика на кърлежово-преносимите инфекции, серологични методи и генетични

методи за изследване на лептоспирозата, микроскопско и генетично изследване на кърлежи.

Актуалност на темата. Лептоспирозата се отнася към така наречените новопоявяващи се (re-emerging) инфекции. Според данни на СЗО заболяемостта варира между 0,5/100 000 за Европа до 95/100 000 за Африка, като в световен мащаб се докладват над 1 млн. нови случаи на година, от които > 58 000 фатални (Costa и сътр. 2015).

През последните 10 години се наблюдава един своеобразен ренесанс на изследванията в върху лептоспирите и лептоспирозата. Броят на публикациите в тази област през последното десетилетие е съотносим с общия брой статии публикувани през първите 50 години след откриването на рода *Leptospira*. Благодарение на развитието на молекулярните методи за типизиране като MLST, бяха извършени значителни промени в таксономията и идентификацията, и добавянето на няколко нови вида. Огромен напредък беше реализиран и в знанията за биологията на *Leptospira* и механизмите на взаимодействие с гостоприемника на клетъчно и молекулно ниво. Този прогрес бе улеснен от публикуването на множество завършени геномни последователности на патогенни лептоспири, със съответните усъвършенствания в биоинформатиката, сравнителния геномния анализ, протеомните подходи и разработването на системи за мутагенеза на патогенните представители на р. *Leptospira*.

Структура на дисертационния труд и библиография. Дисертацията е с впечатляващ обем от 262 страници и е структурирана стандартно както следва: Въведение - 2 стр.; Литературен обзор - 80 стр.; Цел и задачи – 1 стр.; Материали и методи 14 стр.; Резултати и обсъждане - 94 стр., Обобщение - 20 стр., и Изводи и приноси - 2 стр. Включва 59 фигури и 24 таблици както и 446 литературни източника, 23 от които на кирилица. Библиографската справка сочи, че 160 от цитираните статии са публикувани през последните 10 години, а 58 от последните 5 години, което подчертава още веднъж актуалността на работата.

Литературен обзор. Г-жа Тасева представя компетентно написан, съвременен и информативен обзор. Изчерпателно са разгледани всички аспекти на проблема. Историческата справка представя сбито всички важни моменти от откриването на

лептоспирозата през 1886г. до наши дни. В раздела таксономия много нагледно е представено разпределението на установените серовари и серогрупи, в съответствие с новата генотипна класификация както и методите за генетично диференциране (секвениране на 16S rRNA, groB и gyrB и WGS). Тук в съответствие с последната номенклатура базирана на целогеномно секвениране, може да се направят две уточнения, а именно че видовете в рода са вече 24, а не 19, а патогенните от тях са 16, а не 13 (вкл. *L. mayottensis*, *L. broomii* и *L. venezuelensis*). По-нататък специално внимание е обърнато на морфологията, физиологията, културелните особености със съпътстващите проблеми при поддържането на щамовете, антигенната структура, факторите на вирулентност, патогенезата, имунитета и имунния отговор. Основната част в обзора е фокусирана върху епидемиологията и диагностичните подходи, което е в унисон с целта на дисертационния труд. Детайлно са описани всички етапи от лабораторния процес, включвайки както традиционните микробиологични методи, така и съвременните молекулярно-генетични. Разделянето на епидемиологията е в две точки съответно в средата (т2.12) и в края (2.21) на литературния обзор, представлява известно затруднение при четене. Независимо от това анализът на епидемиологичната обстановка в Европа и у нас онагледен със съответните таблици и карти, са изключително информативни и предоставят солидна основа за последващите епидемиологични анализи в дисертационния труд. Много изчерпателно са разгледани проучванията върху лептоспирозата проведени в България до 1996г. В заключението на обзора дисертантката извежда и систематизира най-важните проблеми свързани с лептоспирозата в България, като набляга на необходимостта от нови проучвания върху огнищата, въвеждане на съвременни серологични и молекулярно-генетични методи за диагностика както и скрининг за носителство при гризачи и др., заключения които логично водят към целта на дисертацията.

Цел и задачи. Целта и шестте задачи са прецизно формулирани, отразявайки основните аспекти и същността на дисертационния труд.

Материалите и методите са детайлно и коректно описани, от което личи високото ниво на компетентност на кандидатката. Много добро впечатление прави умелото използване на значително разнообразие от серологични, молекулярни и статистически методи, които докторантката е усвоила. Комбинирането на няколко серогични метода (MAT, ELISA и

бърз ИХМ) за доказване на IgM и IgG антитела срещу различни серовари и серогрупи *Leptospira* (MAT), дава възможност за повишаване на специфичността и чувствителността. Nested-PCR методът за детекция на ДНК от лептоспири е много добре описан, като са спазени всички мерки за превенция на ДНК контаминация при прехвърляне на ампликоните от стъпка 1 в стъпка 2, проблем който често води до фалшиво-положителни резултати при този метод. Като таргетна последователност много подходящо е подбран консервативен участък от 16S rRNA гена. Повторен най-малко два пъти в генома на *Leptospira*, използването му обуславя едновременно висока аналитична чувствителност в комбинация със съвместимост на праймерите с всички видове в рода, включително новооткритите. Заболеваемостта от лептоспироза е анализирана в корелация спрямо количеството на валежите по региони чрез два независими статистически метода : тест на Monte Carlo и регресионен анализ.

Резултатите и дискусия. Резултатите се базират на значителен брой материали събрани в продължение на 17 години (1997-2017г). С MAT като референтен метод са изследвани общо 2393 серумни проби от пациенти, суспектни за лептоспироза, като съответно 69 и 99 от тях са паралелно изпитани с ELISA и имунохроматографски метод. С разработеният от дисертантката nested-PCR метод, са изследвани общо 19 болни суспектни за лептоспироза. Същият метод е приложен за ДНК скрининг на *Leptospira interrogans* в 109 тъканни проби от гризачи.

На базата на установените 287 случая лабораторно потвърдени по MAT, е установена динамиката както и средната заболеваемост за страната за изследвания период, със съответния анализ на трите установени пика. Дисертантката асоциира необичайно завишения леталитет през 2000, 2005 и 2013г, с по-честото доказване на серогрупа *Icterohaemorrhagiae*, чиито дял е над 50% през тези периоди. Направен е ценен анализ и на заболеваемостта по региони, като се дискутират причините за повишените нива (напр. в Бургаско). Почти във всички области се регистрират случаи на лептоспироза (25 области) като са установени следните четири ендемични региона: Бургас - (16,38%), София област - (13,24%), Шумен – (10,11%) и Плевен – (8,71%). Установени са и основните рискови фактори свързани най-вече с дейности като риболов и по-слабо професионални рискове. Наблюдаваните клинични прояви са свързани основно с токсинфекциозен синдром,

бъбречна недостатъчност, хепатит и др., които поотделно трудно се асоциират с лептоспироза от клиницистите, причина която дисертанктата правилно дискутира като основна за ниското ниво на регистриране.

Анализът на разпределението по серогрупи показва, водещата роля на двете серогрупи причиняващи заболяване в България - *Icterohaemorrhagiae* и *Pomona*, които се установяват в почти всички области в страната. Тези групи са водещи и в Сърбия и Румъния и често се асоциират с усложнения. Считаю, че в тази точка представянето на карти с общото разпределение на случаите по области и периоди повтаря информацията от предходните раздели и е излишно.

Резултатите от ELISA метода (75% чувствителност и 100% специфичност) сочат, че той е много подходящ за въвеждане в рутинната диагностика, бидейки значително по-лесен за изпълнение, покрива най-честите серогрупи за България и не налага необходимостта от работа с живи култури. ИХМ метод от своя страна дава възможност за изследване както на ИгМ, така и на ИгГ антитела и е подходящ за бърз скрининг в рутинните микробиологични лаборатории, но резултатите трябва да се потвърждават от втори метод. Установено е, че ИХМ позитивира още на седмия ден от острата фаза на заболяването в случаите на инфекции със серогрупи *Icterohaemorrhagiae* и *Pomona*, което е значително предимство. Разработеният Nested-PCR метод е изпитан върху двойки проби от 19 пациента с клинично поставена диагноза лептоспироза и негативни по МАТ в острата фаза. Доказано е наличие на специфична ДНК в 17 от тях (90% диагн. чувствителност), което доказва ефективността на метода при откриване на ранната фаза на заболяването при ниво на антителата неподаващо се на детекция чрез серологичните методи. Тези данни в комбинация с установената диагностична специфичност 100%, както и възможността за използването му при скрининг на гризачи, определят разработката на този метод като едно основните достойнства на дисертационния труд. От 109-те изследвани с nested-PCR гризачи в четири области на страната, най-висок дял носителство е открит в Пазарджишко – 30%. Данните сочат високо ниво на обща заразеност възлизащо на 28,44%, като очевидно не се наблюдава корелация с вида на гризачите.

Изводите десет на брой, са прецизно формулирани и отразяват адекватно изпълнението на целта и поставените задачи едновременно акцентирайки върху най-важните находки от дисертационния труд.

Работата представя значителни оригинални и и практически приноси, които могат да се обобщено както следва: Разработен и валидиран е нов молекулярно-генетичен метод – nested PCR за ранна диагностика на лептоспирозите от кръвни проби, взети в острата фаза на заболяването, което е предпоставка за провеждане на етиотропно лечение и за понижаване на риска от усложнения; методът успешно е приложен и за скрининг за носителство на гризачи, което е от важно значение за локализиране на огнищата. Валидирани са и два нови, бързи и лесноизпълними метода – ELISA и имунохроматографски тест подходящи за скрининг и рутинно прилагане в микробиологичните лаборатории; Получени са осъвременени данни за 17 годишен период за епидемиологията, клиниката и ареала на разпространение на лептоспирозата както и характеризиране на циркулиращите серогрупи в България. Всички тези данни са крайно необходими за подобряване надзора на лептоспирозата, особено в условията на наблюдаваните климатични промени.

Евгения Тасева представя 13 публикации свързани с дисертационния труд. В 12 от публикациите тя е първи или втори автор, което свидетелства за нейния водещ и съществен принос в изследванията. Шест от публикациите са на латиница, в т.ч. една статия в международно списание – Scand. J. Infect. Dis., с Impact Factor 1.117 . Представени са и 9 участия в научни форуми (8 в български и 1 на международен конгрес) като в 8 от тях тя е първи автор. Считаю че наукометричните показатели надхвърлят критериите за придобиване на ОНС „Доктор“ заложен в правилника на НЦЗПБ.

Заклучение. Въпреки наличието на обширна информация по проблема, все още лептоспирозата остава диагностично предизвикателство за клиницистите в страната. Нарастването на заболяемостта в европейски и световен мащаб, както и все по-често докладваните мащабни епидемични взривове сочат, че лептоспирозата ще представлява все по-значим проблем в близко бъдеще. Ето защо представената ми за рецензия работа

освен, че е актуална предоставя научната основа върху, която да стъпят мерките за контрол на лептоспирозата в бъдеще.

На базата на изложеното, смятам че г-жа Евгения Тасева напълно изпълнява критериите за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“ според Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и правилника за прилагането му в НЦЗПБ и убедено предлагам на уважаемите членове на журито и НС да одобрят кандидатурата ѝ.

Дата: 29/10/2018

Изготвил рецензията:.....


/Доц. Иван Иванов/