

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд, представен пред научно жури,
сформирано със заповед № 430/12.12.2016 г. на Директора на Националния
център по паразитни и заразни болести

за получаване за получаване на образователната и научна степен “доктор”

Автор: **Иван Маринов Симеоновски**

Тема: **Молекулярно-генетични проучвания върху бактериалните менингити, причинени от *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* в България**

Рецензент: **проф. Мария Ангелова, дбн**

Бактериалните менингити като спешни медицински случаи, изискващи незабавна диагноза и незабавно лечение, продължават да бъдат ключова дума за 21 век. Въпреки използването на все по-съвременни антибиотици и усилията за подобряване на грижите за болните, това заболяване все още е един нерешен въпрос на клиничната медицина с над 30% смъртност. Трябва да се добави, че диагнозата в тези случаи е изключително затруднена, особено поради факта, че могат да бъдат причинени от различни бактериални патогени. Ето защо, развитието на все по-бързи и точни методи остава постоянна задача пред микробиолозите в световен мащаб. През 2015 г СЗО обяви стратегия за справяне с менингитите, включваща 5 оси, една, от които касае развитието на бързи диагностични тестове. Идентифицирането на причинителя за кратко време не само осигурява правилното лечение на пациентите, но дава информация на здравното министерство за вземане на правилни решения при епидемии. Диагностичните лаборатории, които играят решаваща роля в този процес, се нуждаят от съвременни молекулярно-генетични методи, апробирани и валидирани в практиката. Всичко това аргументира актуалността на дисертационната тема в световен и още повече в национален мащаб. Основната насоченост на разработката е да се създаде научна база за бърза диагностика и подобряване на контрола на бактериалните менингити, причинени от *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*. Така фокусирана, основната насоченост определя дисертабилността на темата и предлага възможности за оригинални приноси. Искам да отбележа, че това е поредната дисертация в Отдела по микробиология на НЦЗПБ, която предоставя на диагностичните лаборатории съвременни решения. Докторантът Симеоновски е имал

шансът да работи под ръководството на проф. Тодор Кантарджиев, признат авторитет у нас и в чужбина в областта на клиничната микробиология.

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 141 компютърни страници и е онагледен с 29 таблици и 33 фигури. Една част от тях са включени в раздели „Литературен обзор” и „Материали и методи” и подпомагат читателя при възприемане на текста. Литературният обзор представя микробиологичната характеристика, факторите на вирулентност при отделните патогени, както и подробен преглед на методите за диагностика. Особено внимание е отделено на молекулярно-генетичните подходи, на техните предимства и недостатъци, както и на икономическата ефективност за използването им и изискванията към специализирана апаратура. Включеният в обзора материал е доказателство, че Иван Симеоновски много добре познава поставения проблем. В обзора са отразени общо 168 литературни източника (1 на кирилица). Всички те изцяло кореспондират с поставените задачи. Над 45% от статиите са от последните 10 години, а над 20% от последните 5, което подчертава още веднъж неговата актуалност.

Въз основа на този задълбочен анализ е изведена целта на настоящата дисертация: да се разработят, апробират, валидират и въведат в лабораторната практика молекулярно-генетични методи за диагностика и типизиране на причинителите на най-често срещаните бактериални менингити. Тук се включва и подобряване на контрола на тези заболявания, което повишава нивото на значимост на дисертацията.

Разделът "Материали и методи" описва общо 165 клиничните проби от последните 3.5 години, тяхното разпределение по градове и критериите за изпращането им. Подробно са описани изолирането на ДНК от различни видове проби, оценката на качеството и концентрацията и съхранението им. Със същата детайлност са представени и останалите молекулярно-генетични техники – PCR, RT-PCR, мултиплексна PCR за определяне на серотипове и примко-медираната изотермична амплификация (LAMP). Използвани са два статистически метода за доказване значимостта на получените резултати. Разделът е онагледен със схеми, таблици и снимки, обхваща 35 страници и може да се характеризира като методично ръководство за молекулярно-генетична идентификация на причинителите на менингити *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*.

В „Резултати и обсъждане” са представени данни от клинични проби, взети от лаборатории в цялата страна. Това е предпоставка за представителност и за степен на значимост. Докторантът използва съвременните молекулярни методи за разработване и

изпитване на бързи диагностични тестове. Проведена е идентификация и генотипизиране на причинителите на менингит в ликвор с методите на PCR и RT-PCR. Установено е разпределението на най-често срещаните причинители и доминиращите патогени в проби от менингити в България. Доказани са доминиращите серотипове на различните причинители. Статистически обработените резултати от мултиплексния PCR определят многообразието в серотиповете и нетипабилните серогрупи с използваните праймери. На базата на получените данни е направено разпределение на най-често срещаните причинители на бактериални менингити по възрастови групи, по пол и териториално местожителство. От проучените проби се установява най-висока степен на инвазивна менингококова инфекция при младите възрастови групи, на пневмококи - групата 45-64 годишни, а на менингити от *Haemophilus influenzae* – при кърмачетата и тези от напреднала възраст. Интерес представляват данните за заболяемостта при мъжете (38.5%) и жените (61.5%), които се различават съществено от тези в други европейски страни. Дисертацията би спечелила ако докторантът бе предложил обяснение на тези различия.

В следващите експерименти, Симеоновски проучва възможността за използване на LAMP техниката за диагностика на причинители на бактериални менингити. Тази техника се характеризира с висока чувствителност. В експериментите са използвани проби с *Neisseria meningitidis*. Избрани са подходящите праймери, което е от съществено значение за проучването, определени са всички задължителни критерии за изготвяне на бързи тестове – специфичност, чувствителност, стабилност и бързина. Докторантът сравнява LAMP-метода с PCR, един метод признат за водещ в диагностичната практика. Използваните 7 критерия дават основание да се очертаят предимствата на LAMP-метода: не се изисква скъпа апаратура; постига се висока чувствителност и специфичност; реакцията не се влияе от неспецифични инхибитори в пробите; не са необходими пост-амплификационни процедури; лесно и бързо изпълнение. Отчетени са и недостатъците на този метод като едновременно с това се предлага решение за избягването им.

В края на разработката докторантът прави заключение, че LAMP е модерен метод с голям потенциал за бързи диагностични тестове, с по-висока чувствителност и специфичност от тази на PCR техниката.

За обсъждане на резултатите Иван Симеоновски използва голям брой литературни източници от последните години. Дискусията не е обособена в отделен раздел и това предпазва автора от излишни повторения. Тя е интересна и полезна и

включва критично сравнение с данни от други автори. Авторът защитава много убедено своите тези, което позволява на читателя с доверие да ги приеме.

Изводите са логично следствие от експерименталните данни и дават необходимата информация за стойността на проведените изследвания.

Приемам и формулировката на приносите, според мен най-важните от тях са:

1. Направен е научнообоснован анализ на разпространението на бактериалните менингити в страната и е доказана съпоставимостта на данните с тези в Европа.
2. За първи път в диагностичната практика у нас са въведени оптимизирани и валидирани молекулярно-генетични методи на базата на PCR, RT-PCR и LAMP техники в диагностиката на бактериалните менингити. Те позволяват бърза идентификация на *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* и определяне на серотипове от тях.
3. За първи път е въведен метод за типизиране на 15 серотипа от *Streptococcus pneumoniae* чрез мултиплексен конвенционален PCR.
4. Доказани са предимствата на LAMP метода като лесно достъпен, чувствителен, специфичен и бърз за изпълнение.

Данните, представени в дисертацията са включени в 5 научни статии и 5 съобщения за конгреси. Статиите са отпечатани в български списания. Искам да препоръчам на автора да представи материали и за списание в чужбина, което ще даде възможност резултатите да получат и международно признание. Във всички статии и в 2 от докладите Иван Симеоновски е на първо място, което ми дава основание да считам, че основният принос за разработката е на докторанта.

Освен отбелязаните по-горе в текста забележки искам да добавя още:

1. В справката за публикации във връзка с дисертационния труд е включена статия № 6, която според мен е извън проблема на бактериалните менингити.
2. Въпреки отбелязаните в „Материали и методи“ статистически методи, в някои от фигурите и таблиците не са нанесени стойности от използването им.

Това, разбира се, са грешки от техническо естество и не се отразяват на стойността на дисертацията. Още повече, че трудът на Симеоновски има доказани достойнства - много доброто оформление, стегнатия научен стил, на който е написан и коректното отразяване на резултатите. Представените снимки и електрофорези са с отлично качество. Трябва да се отбележат и достоверността на материала и предпоставките, на които се градят приносите.

Авторефератът отразява достоверно най-съществените резултати, получени при разработката на дисертационния труд.

В заключение искам да подчертая, че поставената цел е постигната – в диагностичната практика у нас са въведени модерни молекулярно-генетични методи за бързо идентифициране на бактериални причинители на менингити. Материалът е дисертабилен, темата е изключително актуална и перспективна, експериментите са поставени методично правилно и са осъществени на високо съвременно ниво. Получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки, открояват се оригинални научни и приложни приноси. В процеса на обучение докторантът е усвоил широк набор от модерни методи, а така също умението да интерпретира получените резултати, да търси и критично да оценява подобни изследвания в литературата и да формулира обяснения.

Направеният разбор на дисертацията и представените материали ми дават основание да считам, че приносът на Иван Симеоновски е решаващ за разработването на представената дисертация.

Едни от най-впечатляващите характеристики на дисертацията са нейната насоченост в полза на човешкото здраве и създаването на научна база за разработване бързи диагностични тестове.

Въз основа на направения разбор и като имам предвид актуалността и нивото на работата, убедено предлагам на уважаемите членове на Научното жури, сформирано със заповед № 430/12.12.2016 г на Директора на Националния център по паразитни и заразни болести да присъдят на **Иван Маринов Симеоновски** образователната и научна степен “доктор”.

21.12.2016

София

Рецензент:.....


/проф. М. Ангелова, дбн/