

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Иван Гергов Митов, дмн., Ръководител Катедра по медицинска микробиология при Медицински университет – София

Относно: Защита на дисертация на доц. д-р Ива Стефанова Христова, дм на тема: „Проучвания върху етиологичната диагностика и разпространението на предаваните с кърлежи и сродни инфекции в България” за придобиване научната степен “ДОКТОР НА НАУКИТЕ”, област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина и научна специалност „Микробиология”

След завършване на медицинското си образование в Медицинска академия – София през 1989 г., доц. Ива Христова започва изключително успешното си развитие като учен и преподавател в Националния център по заразни и паразитни болести – Микробиологичния отдел и Катедрата по микробиология. Постъпва като научен сътрудник в Референтната лаборатория по предавани с кърлежи инфекции, лептоспири и листерии. Утвърждава се като водещ национален специалист в областта на изследванията и диагностиката на Лаймската борелиоза и обичан от студентите преподавател по микробиология. През 1994 г. придобива специалност по микробиология. От 1995 до 2007 завежда лабораторията, която през 2007 прераства в Референтна лаборатория по предавани с кърлежи инфекции, лептоспири и листерии. В периода 1995-2009 обогатява знанията и уменията си чрез множество специализации във водещи научни центрове като Университет Джон Хопкинс, Института по медицинска микробиология Макс фон Петенкофер, Институт по обществено здравеопазване и околна среда, гр. Билтховен, Холандия. За кратък период през 1998 г. капитализира резултатите от изследванията и специализациите в защита на докторска дисертация на тема “ Проучвания върху микробиологичната диагностика, хуморалния имунен отговор и антигенните особености на причинителите на Лаймската борелиоза у нас”. Оценена е високо с множество награди: на Института по Микробиология "Ст. Ангелов" към БАН за най-успешен млад микробиолог в България за 1999 г., Награда Morrison Rogosa на Американската асоциация по микробиология за принос в медицината през 2002, Първа награда от Фонд "Научни изследвания", МОН, за научно-изследователски проект през 2004 г.; Първа награда за принос в медицината от Съюза на Учените в България, 2006.

Настоящият дисертационен труд е обобщение на резултатите от разширения научен обхват и интереси на доц. Христова. Целта е формулирана ясно и точно съобразно повишените отговорности и изследвания по кърлежовопреносимите инфекции, а именно да се създадат и апробират съвременни диагностични методи за изследвания върху диагностиката и разпространението не само на Лаймската борелиоза, но и на редица други значими за страната бактериални и вирусни причинители на инфекции като рикетсиите, ерлихиите и анаплазмите, *Francisella tularensis*, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*, арбовируси причинители на кърлежов енцефалит и хантавирусите на ХТБС. Поставените задачи, които успешно са постигнати, са свързани с разработването и апробирането на съвременни имунологични и молекулярно-имунологични и генетични методи като ELISA тестове от ново поколение с получени от автора рекомбинантни антигени за диагностика на Лаймската борелиоза; разработване и апробиране на различни варианти геномни амплификационни тестове (PCR, nested PCR, RT-PCR, обратно-транскриптазна PCR). Важна задача на труда е провеждането на широкомащабни изследвания върху разпространението на горепосочените причинители сред кърлежи, гризачи и пациенти.

В изследванията си доц. Христова е постигнала значителни оригинални и потвърдителни научни приноси, както и приноси с научно-приложен характер, по-значимите от които могат да се обобщят както следва:

- Проведени са първите у нас оригинални насочени проучвания с PCR върху заразността на кърлежите с борелии и анаплазми. Установеното доминира не на *B. afzelii* в изследваните кърлежи при известното доминиране на невроборелиозата, свързана с *B. garinii*, сред късните прояви на Лаймската болест, подкрепят хипотезата на автора за по-висок патогенетичен потенциал на *B. garinii*.

- При пациенти с Лаймска борелиоза най-подходящ материал за изследване с PCR е кожната биопсия от лезията еритема мигранс. Потвърждава се ранната хематогенна разсейка на бактериите, поради което алтернативен неинвазивен метод е доказването на борелиите в кръвта. Процентът на доказване на борелии в урината е сравним с този при изследване на кръв.

- Съществени приноси са постигнати в изучаването и разработването на нови имунологични методи в диагностиката на Лаймската болест.

- Намерено е, че в началния стадий на Лаймска борелиоза използването в ELISA на рекомбинантен VlsE протеин на *Borrelia burgdorferi*, може да постигне сходна чувствителност с рутинните търговски китове с няколко рекомбинантни антигена. Други получени от доц. Христова рекомбинантни антигени като FlaB, OspC и OspA показват съществено по-ниска реактивност. В напредналата и късна фаза използването като антигени на VlsE и FlaB позитивират повече случаи на заболяването в сравнение с в сравнение с ранната фаза на болестта. Добавянето на още един антиген - OspC или OspA осигурява максимална реактивност и специфичност в тази фаза. Както в ранната, така и в късната фаза VlsE осигурява най-висока чувствителност на теста, докато OspA играе минимална роля като антиген.

- OspC е силно хетерогенен протеин на *B. burgdorferi*. Само 18-20% от серумите на болни с ранна Лаймска борелиоза имат антитела към всички генотипове OspC протеини и нито един генотип не открива антителата във всички серуми, което налага включване на повече от един генотип в диагностичния тест. За първи път е установено, че OspC типове К, Е, F и В са най-подходящи за включване в мултиантигенен диагностичен набор. Комбинирането на OspC генотипове К с F или Е открива 100% от българските пациенти с предварително доказани антитела срещу OspC.

- Със синтезирани от автора С6 пептиди са разработени ELISA тестове. Установена е висока реактивност на тези пептидите, което е в подкрепа на твърденията за висока имуногенност на този участък от молекулата на VlsE антигена. В контраст с общоприетата теза, че С6 участъкът е силно консервативен, е установено, че с С6 пептиди от различните видове борелии се получават различни резултати. Установена е по-висока реактивност на С6 пептида от *B. burgdorferi* s.S. в сравнение с С6 пептидите от *B. garinii* и *B. afzelii*, както при американски, така и при български болни. Реактивността към С6 пептидите от *B. garinii* и *B. afzelii* е по-висока при българските пациенти, което отразява разпространението на съответните видове борелии в света.

- Доказана е висока честота (13,4%) на инфектиране на кърлежите с *Anaplasma phagocytophilum* и *B. burgdorferi*. Важна находка е фактът, че около 1/3 от болните с фебрилна реакция след ухапване от кърлеж и около половината от болните едновременно с фебрилитет и еритема мигранс са заразени с А

phagocytophilum. Много по-често тези коинфекции се откриват в кърлежи, носители и на рикетсии. Направено е едно от първите в света и първото за България проучване за инфекция с *A. phagocytophilum* сред ухапаните от кърлежи лица у нас, което показва, че заболяването е широко разпространено в страната. Приблизително 1096 от болните с Лаймска борелиоза имат серологични данни за инфекция и с *A. phagocytophilum*. По-висок е процентът (20%) на човешка гранулоцитна анаплазмоза сред болните, развили фебрилна реакция след ухапване от кърлеж. Откриването на специфичните антитела и при здрави лица, потвърждава циркулацията на *A. phagocytophilum* в България.

- Секвенирането генома на българските щамове показва над 99% хомоложност с типовия американски щам *A. phagocytophilum*. Съчетаването на PCR и серологичните техники разширява диагностичните възможности при анаплазмозата. PCR позитивира рано в хода на болестта, преди появата на специфичните антитела.

- Установено е, че заразността на иксодовите кърлежи с рикетсии е по-висока от заразността им с другите кърлежово преносими бактериални патогени - *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* и *Francisella tularensis*.

- Важно значение имат първите генетични проучвания на български вируси на кримската хеморагична треска (ККХТ), изолирани от кръв на пациенти през 2003-2009 г., които показаха генетичната им стабилност, както и че принадлежат към Европейско-Турската група на изолатите от Югоизточна Европа, Русия и Турция.

- В диагностиката на хеморагичната треска с бъбречен синдром най-подходящ метод е Real time RT-PCR с TaqMan сонди за откриване на хантавируси в гризачите. Доказано е че хантавирусите се задържат предимно в далака и бъбреците на гризачите, и в по-малка степен в белите дробове и кръвта. За първи път е изследвано разпространението на различните видове хантавируси в България. Установено е доминиране на хантавирус Dobrava-Belgrade хантавирус чрез секвениране на циркулиращи в страната вирусни щамове.

- Проведените за първи път мащабни проучвания върху пациенти с неясен фебрилен синдром в България откриват инфекция с вируса на кърлежовия енцефалит при 2,5% от изследваните 527 болни, хантавирусни инфекции — при 14% от болните и ККХТ - при 4%.

- С високо национално значение са проведените микробиологични епидемиологични проучвания върху заразността на кърлежи и животни с дискутираните тук причинители на инфекции при хората. Определят се географски ендемични райони в страната.

- Достоянство на труда са разработените диагностични геномни амплификационни техники и ELISA тестове с рекомбинантни антигени.

Резултатите от дисертационния труд са достояние на широката научна общественост в страната и чужбина. След защита да докторската дисертация през 1998 г. доц. Христова публикува 35 научни труда в родни и чуждестранни списания. Единадесет от статиите са публикувани в престижни списания с импакт фактор (общ ИФ 20, 228). Девет от статиите са цитирани 229 пъти от чуждестранни учени, които е много висока оценка за научната дейност на доц. Христова. В 18 от статиите е първи автор и в 3 – ръководител на научния колектив, което е показател за водещ принос в разработването на труда.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Познавам доц. Ива Христова от постъпването ѝ в НЦЗПБ и като преподавател в първите години в Катедрата по микробиология при тогавашната Медицинска Академия. Амбициозна и в овладяване диагностичните методи в Референтната лаборатории по борелии, лептоспири и листерии, уважавана от своите колеги, студенти и специализанти, с желание за овладяване новостите в научните изследвания и рутинна диагностика чрез редица специализации и спечелени научни проекти. Настоящият дисертационен труд представя доц. Христова като завършен учен и високо уважаван експерт в областта на медицинската микробиология, обхванала един значителен по важност дял от инфекциозната патология – кърлежово-преносимите бактериални и вирусни инфекции. Трудът е разработен с най-съвременните генетични и имунологични методи. Постигнатите наукометрични показатели – публикации в реферирани издания и цитирания на трудовете, надхвърлят значително изискванията на Националния център и сродни научни институции. Всичко това ми дава основания да подкрепя убедено присъждането на научната степен “Доктор на науките” на доц. д-р Ива Стефанова Христова.

Рецензент:



София, 18.02.2012

(Проф. д-р Иван Митов, дм., дмн)