

До Председателя на Научното жури
определенено със Заповед № 27/01.02.2017 г.
На Директора на НЦЗПБ
Проф. д-р Тодор Кантарджиев, дмн, мзм

РЕЦЕНЗИЯ

От Проф. д-р Людмила Боянова Георгиева, дм, дмн
Професор в Катедра медицинска микробиология
на Медицински университет-София
e-mail l.boyanova@hotmail.com
Научна специалност – микробиология

Относно
дисертационния труд на
Мария Радославова Павлова
на тема „**Молекулярни методи за идентификация и типизиране на *Campylobacter coli / jejuni*“**
за придобиване на научната степен „**Доктор**“
по научна специалност „**Микробиология**“
Научен ръководител: Доц. д-р Петър К. Петров

Декларирам, че нямам конфликт на интереси от научно и друго естество с
Мария Павлова.

АКТУАЛНОСТ НА РАЗРАБОТВАНИЯ ПРОБЛЕМ

Campylobacter spp. са едни от водещите причинители на бактериални интестинални инфекции по света. В последните години, някои автори съобщават кампилобактериозите като най-честите зоонози в Европейския съюз.

Освен типичните гастроинтестинални симптоми, кампилобактериозите са свързани с до 1/3 от случаите на тежкото автоимунно нарушение на периферната нервна система - острата демиелинизираща полиневропатия, наречена Guillain–Barré синдром, с реактивен артрит и други усложнения. Въпреки това, много случаи и даже епидемии остават недиагностицирани и несъобщавани.

Тъй като кампилобактерите са микроаерофилни бактерии, бавно растящи и биохимично слабо реактивни, тяхната изолация и фенотипна идентификация може да създаде трудности.

Честотата на инфекциите, особено при децата на възраст под 5 години, или резистентността на причинителите в някои възрастови групи, напр. при болни с хронични чревни заболявания е висока.

За съжаление, съобщаваните случаи на кампилобактериози представляват най-често само върхът на айсберга от недиагностицираните, или несъобщаваните случаи. Контролът на тези инфекции е мултидисциплинарен, като важно място имат бързата и акуратната диагностика и типирането на причинителите с молекулярни методи. Всички тези съображения отразяват **актуалността** на разработваната тема.

РАЗДЕЛИ НА ПРЕДСТАВЕНИЯ ТРУД

Представеният материал е написан на **124 страници**, от които: Въведение (2 стр.), Литературен обзор (33 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (24 стр.), Резултати и обсъждане (38 стр.), Изводи (1 стр.), Приноси (3 стр.), Публикации във връзка с дисертацията и участие в научни проекти (4 стр.) и Литература (14 стр.). Прави впечатление богатото илюстриране на дисертацията, което включва 35 фигури и 17 таблици, което е от голяма практическа полза за специалистите ориентирани да работят по темата.

ВЪВЕДЕНИЕТО и ЛИТЕРАТУРНИЯТ ОБЗОР са добре и подробно написани. Прави ми много добро впечатление, че има критичен подход към представянето на някои литературни данни, напр. тези на FoodNet. Информацията в диагностичния раздел е от полза за разширяване на микробиологичната практика в нашата страна.

Лабораторната диагностика и идентификация на инфекциите е написана с акцент върху предимствата и недостатъците на отделните методи и факторите за неуспешно доказване на причинителя. Диагностично важно е, че е обрнато внимание на хипурат-негативните щамове *C. jejuni*. Това изисква стандартизиране на хипуратния тест, или използване на PCR диагностика. От значение е и подчертаването на необходимостта от използване на паралелно две различни селективни среди, или оптимален подбор на средите за изолиране на *Campylobacter* spp. Спецификата, предимствата и недостатъците на различните молекулярни методи за диагностика и типиране на кампилобактерите са добре сравнени и подчертани.

Добре би било да се включи и кратък раздел за токсините на тези бактерии. На стр 33: "Честотата на отстраняване на здрав апендикс е по-висока от 25%." Честотата често е около 9-14% (Gamal Khairy, 2009, Lee 2014, Annals RCS)

ЦЕЛТА и свързаните с нея **4 ЗАДАЧИ** отговарят на нуждата от оптимални и съвременни молекулярни методи за доказване и типиране на щамовете у нас.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ

В работата са проучени 123 клинични изолати и щамове от колекции, от които 23 референтни щама *Campylobacter* spp.

Използвани са фенотипни и молекулярни методи като

- **Multiplex PCR** за идентификация и диференциация на *C. jejuni* и *C. coli* от култура,
- **Eva Green-базиран мултиплекс real-time PCR при оптимизиране с 3 двойки праймери**, до сега невключвани в обща реакция (методът е успешен за директно доказване и разграничаване на *C. jejuni* и *C. coli* във фекални преби) и
- **метод за типиране на щамовете-пулсовата гел-електрофореза (PFGE)**. Методите са много подробно описани и илюстрирани.
- Представени са **ползите от молекулярните техники** в случаите на културално фалшиво-негативни резултати.
- Определени са чувствителността и специфичността на използваните молекулярни методи.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите и обсъждането са представени и анализирани съответно на поставените цели и задачи и са богато илюстрирани.

В тях има практически ползи за рутинната диагностика на тези бактерии, като сравнение на среди за съхранение на щамовете. Протоколът за изолиране на ДНК от преби фецес е от значение, заради множеството инхибитори в такива преби.

В този труд са проучени, оптимизирани и внедрени три молекулярни метода, като:

1. с **мултиплекс PCR** за идентификация и диференциация на *C. jejuni/coli* от култура се търсят три гена: *cadF* (16S рДНК, родово специфичен ген за адхезин) за *Campylobacter* spp. и гените за хипуриказа *hipO* за *C. jejuni* и за аспартокиназа *asp* за *C. coli*. Гените са добре подбрани, като по литературни данни е известно, че гените *hipO* за *C. jejuni* и *asp* за *C. coli* са специфични и има само единични съобщения за фалшиво-позитивни резултати с *cadF* намерени за *Enterococcus casseliflavus* and *Pasteurella aerogenes* (Al Amri et al., 2007).
2. за **Eva Green Real-time mPCR** е използвана оригинална комбинация три двойки праймери (за региони от родовия ген за род *Campylobacter*, за специфичен регион на *cj041* гена за *C. jejuni* и за *ceuE* гена за транспорт на ентерохелин на *C. coli*) с цел доказване и разграничаване на *C. jejuni* / *coli* директно от преба фецес. По литературни данни, *ceuE* секвенциите на *C. coli* са силно консервирани в около 97% от случаите (van Rensburg et al., 2016), докато праймерът за регион на *cj041* гена за *C. jejuni* е по-слабо проучен.

Посочени са трудностите във фенотипното и молекулярно тестване на *Campylobacter* spp. в замразени фекални преби и преби с минимално количество бактерии и са посочени методи за тяхното преодоляване. Важно предимство на Eva Green-базирания real-time PCR е това, че се явява като добър метод за откриване на причинителите в смесени инфекции, в замразени до 12 ч. фекални преби и в преби с много малък обем, около 100 µl. Така са доказани *C. jejuni* и *C. coli* в 19 културално негативни преби.

3. Методът PFGE за типиране на щамовете *C. jejuni* има голям потенциал за проучване на свързани инфекции и възможни епидемии. Направени са опити да се оптимизира PFGE техниката на *C. jejuni* на базата на протоколи, използвани от PulseNet. Предвидени са насоки за по-нататъшното подобряване на метода за минимизиране на броя нетипизирани щамове. Този въпрос оставя място за бъдещо продължаване и разширяване на разработките.

ИЗВОДИ

Изводите са написани добре и компактно отразяват получените резултати и обсъждането, но също така дават добри насоки за разширяване на проучванията, напр. на тези върху PFGE метода.

КНИГОПИС

Дисертацията цитира над 153 литературни източника, от които повечето (над 90%) на латиница.

ОЦЕНКА НА НАУЧНИТЕ И НАУЧНО-ПРИЛОЖНИТЕ ПРИНОСИ

❖ ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕН ХАРАКТЕР,

Оптимизирането на някои молекулярни методи като Eva Green-базирания мултиплекс real-time PCR с комбинирането на 3 двойки праймери допринася за по-добра и много по-бърза диагностика на инфекциите от *Campylobacter* spp.

❖ ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР ЗА НАШАТА СТРАНА.

Установено е значението на комплексното подобряване на бързината и акуратността на диагностиката на кампилобактериозите с молекулярни техники.

Потвърдено е, че молекулярните техники са по-добри от класическите фенотипни техники за доказване на увредените бактериални клетки и на батерии в малко количество.

❖ ПРИНОСИ С ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР

Има много приноси с приложен характер за улесняване, стандартизиране и осъвременяване на диагностиката на кампилобактериозите у нас.

- Направена е оптимизация и валидиране на мултиплекс PCR за идентификация на *C. jejuni* и *C. coli* от култура с висока чувствителност (109 геномни копия) и максимална специфичност.
- Направена е оптимизация и валидиране на EvaGreen-базиран мултиплекс real-time PCR за симултанно доказване и диференциране на *C. jejuni* и *C. coli* от фекални преби с много висока акуратност (100% при проучване на 31 фекални преби).
- Дадени са насоки за по-нататъшно разработване и оптимизиране на PFGE метода за типиране на *C. jejuni*.

ПУБЛИКАЦИИ И ДРУГИ НАУЧНИ АКТИВНОСТИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

Мария Павлова представя 8 публикации в български списания във връзка с темата на дисертацията и е първи автор на повечето (5) от тях, както и участие в 6 научни форума. Има две награди за доклад и за постер на научни форуми у нас.

Мога да препоръчам една бъдеща публикация в международно списание с импакт фактор на базата на оптимизираните методи и с висок брой тестувани щамове.

Бележки: Дисертантът се е съобразил с повечето мои препоръки. Имам само някои бележки, които **не засягат** естеството и стойността на дисертацията.

- Стр 16 и 20: има недовършени изречения.
- На някои страници, напр. стр. 30, 31, 33 и 106: има някои граматически грешки.
- Стр 50 и Табл. 6: Споменаването на Jun Kawase et al. и Botteldoorn et al. би трябвало да се придружи със съответни референции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Считам, че дисертационния труд на Мария Павлова фокусира един клинично и диагностично важен проблем, една честа инфекция, която за съжаление все още не е рутинно диагностицирана, или съобщавана в много страни.

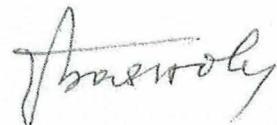
Използваните молекулярни методи за доказване на *C. jejuni* и *C. coli* от култура, или директно от клинични преби и методът за щамово типиране са от полза за едновременно бързата и акуратна диагностика на свързаните инфекции, както и за епидемиологични цели.

Работата носи значими приноси с **приложен характер** и отговаря на **изискванията на ЗРАСРБ и правилника на неговото прилагане**. Този труд е една важна стъпка към **необходимата ни рутинна диагностика на кампилобактериозите у нас** с използване на оптимизирани и стандартизириани методи и оттук към по-добрия контрол на тези инфекции.

В допълнение, работата на дисертанта може да бъде полезна не само за микробиолозите, но и за лекари от други специалности, напр. инфекциозни болести, гастроентерология и педиатрия.

Като имам предвид актуалността и приносите на дисертационния труд, убедено препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да присъдят на Мария Павлова образователната и научната степен «Доктор» по научната специалност Микробиология.

София,
19.02.2017 г.



Проф. д-р Людмила Боянова, дм, дмн
Катедра медицинска микробиология
на Медицински университет-София