

## РЕЦЕНЗИЯ

От доц. д-р **Галина Железова Железова**, дм, Катедра по биология, медицинска генетика и микробиология, Медицински факултет, СУ „Св. Климент Охридски“

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”, научна специалност 01.06.12 - Микробиология

Тема на дисертационния труд: **ОПТИМИЗИРАНЕ НА СЕРОЛОГИЧНАТА ДИАГНОСТИКА И ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ПАТОГЕНЕЗАТА НА ЛАЙМСКАТА БОРЕЛИОЗА С РЕКОМБИНАНТНИ АНТИГЕНИ НА *BORRELIA BURGDORFERI***

Автор на дисертационния труд – **Ива Петрова Трифонова**, докторант към отдел Микробиология, НЦЗПБ, София

Дисертационният труд на Ива Петрова Трифонова е посветен на актуален медико-диагностичен научен проблем – оптимизиране на серологичната диагностика на Лаймската борелиоза с рекомбинантни антигени от *Borrelia burgdorferi* и проучване върху патогенезата на инфекцията. Съществуващите рутинни методи за диагностика ELISA и Western blot са в процес на непрекъснато развитие за постигане на възможно максимална чувствителност, специфичност и стандартност в диагностиката на Лаймската борелиоза. *B. burgdorferi* се характеризира с изключително голямо антигенно разнообразие и високо ниво на вариации в експресията на различни имунодоминантни антигени, зависещо от редица фактори. Проблемът в диагностиката на база тестове, доказващи специфични антитела е от световен мащаб и се свежда до това кои антигени, колко на брой и в какви комбинации могат да се използват при различните стадии на заболяването. Това е предметът на настоящата дисертация.

На базата на 234 литературни източника е направен анализ на съвременното състояние на проблема в изчерпателен и задълбочен обзор от 51 страници и 6 фигури. Представени са данни относно класификация, морфология и генетични особености на *B. burgdorferi*. Като най-разпространена трансмисивна кърлежова зооноза, Лаймската борелиоза е характеризирана с нейните епидемиологични особености - вариации в географското разпределение на причинители, вектори и гостоприемници. Представени са данни за нейната патогенеза, клинично протичане и терапия. Специално внимание е отделено на въпроса за антигенныхия състав на *B. burgdorferi*. Разглеждат се основни повърхностни белтъци на външната мембра на ахезини, гените, които ги кодират, ролята им като имунодоминантни антигени, закономерности в експресията им и характеристика на имунния отговор, който индуцират. Обзорът завършва с представяне на целия спектър от възможни диагностични методи с акцент върху серологичните, като най-често използвани. Направен е анализ в етапите на развитие на реакция ELISA - цялоклетъчни тестове, ELISA с рекомбинантни протеини и най-нови варианти на ракията с пептидни антигени. Характеризирани са търговски тестове по отношение на специфичност, чувствителност и значимост за различните стадии на заболяването, както и използвани комбинации от антигени. Представени са нерешените проблеми на серологичните тестове – липса на стандартизация и единни критерии за оценка на

диагностичните тестове, невъзможност за обхват на всички потенциални имунодоминантни антигени, наличие на кръстосано реагиращи антитела и др. В обзора са използвани цитати от основни ключови публикации.

Авторката на обзора Ива Трифонова се представя като компетентен специалист с широк поглед върху проблема в цялото му разнообразие и много добре и напълно аргументирано обосновава нуждата от създаване на тестове ELISA с комбинация от рекомбинантни антигени за извършване на диагностика с възможна максимална чувствителност и специфичност при различните етапи на Лаймската борелиоза, подходящи за прилагане в нашата страна. Целите и задачите са ясно формулирани, конкретни и логично свързани.

Раздел материали и методи е в обем от 25 страници, онагледен много добре с 2 фигури и 4 таблици. Използван е широк спектър от съвременни методи за клониране и експресия на гените ospC, fla B, ospA, vlsE при използване на основните щамове характерни за Европа - *B. burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii*. Серологичното проучване е извършено върху 116 serumni преби от болни, група контролни здрави лица и контролна група за определяне на кръстосанореагиращи антитела. Всички използвани методи са адекватни на поставените задачи и постигането на резултати. Описанието им е коректно, пълно и точно, а овладяването им - изключително сериозно постижение за докторанта.

Резултати и обсъждане от собствени изследвания са представени на 56 страници и са илюстрирани с 31 фигури и 3 таблица. Описанието им е точно, ясно и на добър научен език. Фигурите са с необходимото добро качество. Резултатите са представени в два основни раздела, следващи логичната последователност на задачите.

В първи раздел - Клониране и експресия на гените кодиращи основните имунодоминантни антигени на *B. burgdorferi* s.l. - OspC, FlaB, OspA, VlsE на *B. burgdorferi* в последователен ред са представени основните етапи на работата и получените резултати. Сравнени са генните секвенции на гените ospC, flaB, ospA, vlsE, конструирани са праймерни системи и избрани оптimalни условия за амплификация на избраните гени. Определени са подходящите плазмидни вектори за клониране на гените - pET 200/D TOPO за гените ospC, flaB, ospA и pQE30-Xa за ген vlsE. Извършена е успешна трансформация на щам *E. coli* BL21 с последваща ефективна експресия на рекомбинантните протеини OspC, FlaB и OspA и успешна трансформация на щам *E. coli* SURE 2 Supercompetent cells с последваща ефективна експресия на рекомбинантните протеини VlsE. След пречистване и анализ, получените рекомбинантни протеини са определени като специфични и с високо ниво на добив.

Основните резултати по втори раздел – изследване на панели serumni преби от пациенти с Лаймска борелиоза са на база разработени ELISA тестове с получените рекомбинантни протеини. Изследването за специфичност на реакция ELISA е определено чрез изследване на 50 serumni от пациенти с различни диагнози при които се очаква неспецифична /кръстосана/ реактивност. Получените резултати показват високо ниво на специфичност с малък или липсващ брой неспецифични реакции по

отношение на различните изследвани рекомбинантни антигени. При сравнение на разработения ELISA тест с четири рекомбинантни антигена с други търговски тестове (цялоклетъчната ELISA и китове с рекомбинантни антигени) се установява статистически значима по-висока чувствителност както в ранната (68%), така и в късната (83%) фаза на Лаймската борелиоза. Наличието на по-високо ниво специфичност се отдава предимно на добавения рекомбинантен VlsE антиген. Определени са праговите стойности за преценка на положителни, гранични и отрицателни резултати. С разработения ELISA тест е направена характеристика и на типа антитялов имунен отговор (IgM и IgG) според стадиите на заболяването – ранна и напреднала /десиминирана/ фаза на болестта. Анализирана е реактивността на serumите по отношение на всеки един рекомбинантен антиген поотделно, двойка антигени и комбинация от четирите рекомбинантни антигена (OspC, FlaB, OspA, VlsE).

Получените резултати са извършени върху достатъчен обем клиничен материал. Коректно са изпълнени поставените цели и задачи. Биха могли да имат ценно значение за практиката.

Считам, че дисертационния труд съдържа следните основни по-важни научни приноси:

1. За първи път у нас е разработена система за ефективно клониране на основни имунодоминантни пропротеини на *B. burgdorferi* – OspC, FlaB, OspA, VlsE. Характеризиран е антитяловият имунен отговор към тези протеин в различни фази на заболяването.
2. Разработени са оригинални полимеразно-верижни системи за амплифициране на целите гени кодиращи пропротеините, уточнени са плазмидите вектори, осигуряващи ефективното клониране на гените, както и подходящите видове химиокомпетентни клетки, позволяващи успешна трансформация и ефективна експресия на рекомбинантните пропротеини.
3. Разработен е първи в България ELISA лабораторен тест с рекомбинантни пропротеинови антигени (OspC, FlaB, OspA, VlsE), показващ висока специфичност и по-изразена чувствителност, в сравнение с тази на търговски китове. Тестът позволява характеризиране на антитяловия имунен отговор в различните фази на Лаймската борелиоза.

Представена е декларация за оригиналност и приноси на научната работа от докторанта. Представен е автореферат, написан на 61 страници с ясно и синтезирано характеризиране на основните цели, методи, резултати, изводи и приноси. Коригирани са технически детайли според направените препоръки при апробацията.

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 4 български списания, 9 национални конференции и една международна. Публикациите са колективни. В 6 от тях авторката е на първо място и в 3 на второ, което показва, че докторантката има основен личен принос при планиране и осъществяване на изследванията.

## **Заключение**

Дисертационният труд на **Ива Петрова Трифонова** представлява едно много добре планирано научно изследване, изпълнено на високо методично ниво и поставяющо си изключително амбициозна и отговорна задача – разработване на ELISA тест за диагностика на Лаймска борелиоза на базата на избор и получаване на рекомбинантни антигени на *B. burgdorferi*. Докторантката се представя като прецизен изследовател, способен да провежда комплексни изследвания, да подлага на задълбочен анализ получените резултати, да формулира добре обобщения и заключения.

Считам, че дисертационният труд отговаря на всички изисквания според правилника за прилагане на ЗРАСРБ.

Въз основа на анализа на предоставения ми за рецензиране научен труд „Оптимизиране на серологичната диагностика и проучвания върху патогенезата на Лаймската борелиоза с рекомбинантни антигени на *Borrelia burgdorferi*“, давам положителна оценка и предлагам **Ива Петрова Трифонова** да придобие образователната и научна степен “Доктор” по научна специалност 01.06.12 – Микробиология.

София 05.08- 2011

Рецензент: доц. д-р Г. Железова, дм

