

РЕЦЕНЗИЯ

на представения дисертационен труд, на редовен докторант **Ива Петрова**

Трифонова към Национален център по заразни и паразитни болести

на тема:

„ОПТИМИЗИРАНЕ НА СЕРОЛОГИЧНАТА ДИАГНОСТИКА И ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ПАТОГЕНЕЗАТА НА ЛАЙМСКАТА БОРЕЛИОЗА С РЕКОМБИНАНТНИ АНТИГЕНИ ОТ *Borrelia burgdorferi*,

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”, по научна специалност 01.06.12 – Микробиология ;

Научни ръководители: доц. Д-р Ива Христова, дм и проф. д-р Тодор В. Кантарджиев д.м.н.,

Рецензент: доц. д-р Светла Трифонова Данова, Секция Микробна генетика при Институт по микробиология „Стеван Ангелов”, БАН

Съгласно заповед № 79 /19.07.2011 г. на Директора на НЦЗПБ

1. Актуалност и значимост на разработвания проблем

Дисертационният труд е посветен на една от най-разпространените векторно-преносими инфекции за нашите географски ширини, чието зачествяване на случаите поставя сериозно предизвикателство пред медицинската и научна общност. Инфекциозният агент за лаймската болест е спирохетата *Borrelia burgdorferi*, която се предава на човека посредством кърлежите и главно тези от genus *Ixodes*. В резултат на интензивни изследвания имунните отговори при *Borrelia burgdorferi* инфекции са добре характеризирани и са разработени различни имунологични тестове. Но клиничната практика налага нуждата от по-чувствителни и надеждни методи за диагностика и следене на патогенезата. Затова усъвършенстването на съществуващите и търсенето на нови подходи и продължава да бъде сериозна задача за учени и клиницисти. Това доказва актуалността на разработения дисертационен труд. В унисон с най-модерните търсения работата е насочена към серологични тестове базирани на рекомбинантни белтъци. Те са естествен еволюционен продукт от научното търсене, базиран на използването първо на цялостни клетъчни бактериални лизати, а впоследствие на отделни имуногонни белтъчни препарати с подобрена чувствителност, специфичност, възпроизводимост при тестовете за нуждите на диагностиката. Докторантката провежда едно задълбочено и иновативно изследване с четири от основните имунодоминантни белтъка на *Borrelia burgdorferi*.

2. Обем и структура на дисертацията

Дисертацията е изложена на 148 страници текст и спазва общоприетата схема както следва: *използвани съкращения* – 1 стр., *въведение* – 1 стр., *литературен обзор* – 55 стр., *цел и задачи* – 1 стр., *материал и методи* – 25 стр., *результати и обсъждане* – 54 стр., *заключение и изводи* – 2 стр., декларация за оригиналност и приноси – 2 стр. *литература* – 14 стр.; списък на публикации и участия в научни форуми – 2 стр. Спазени са препоръчителните съотношения между отделните части на труда.

Цялостно работата се отличава със стегнат научен стил и отлично техническо оформление. Получените резултатите са илюстрирани с 1 схема, 30 фигури и 6 таблици. В литературния отбор също са представени 9 фигури, в подкрепа на научната информация по разработвания проблем. Сравнително малко са използваните чуждици и то главно такива, които са утвърдени в научната практика.

3. Литературна осведоменост и постановка на целта и задачите

Литературният обзор е конкретен и в логическа последователност са разгледани въпросите за лаймската борелиоза (причинители, епидемиологични особености, патогенеза, клиника, лечение), антигенен състав и повърхностни белтъци на *Borrelia burgdorferi*; диагностика на лаймска болест, методите за диагностика – предимствата и недостатъците им. Представени са стегнато данни за България и такива от най-съвременните изследвания като личи, че докторантката е запозната с постиженията на световната наука и практика и това и позволява правилно да се насочи към нерешени научни въпроси в серологичната диагностика на борелиозата. Литературата е тясно свързана с дисертационната тема, като трябва да се подчертвае, че над 80 % от цитираните работи са от последните 10 години. Литературният списък включва 234 заглавия в т.ч. 228 на латиница и 6 на кирилица, което потвърждава добрата теоретична осведоменост на докторантката. Този широкообхватен обзор е структуриран правилно, следвайки логическата обвързаност на информацията.

В литературния обзор Ива Трифонова е съумяла не само да информира за научните факти по темата, но подчертавайки проблемите и неизяснените моменти аргументирано достига до необходимостта от усъвършенстване на методичните подходи за диагностика при този вид инфекции. В светлината на най-новите научни търсения по проблема е формулирана ясно целта на докторантурата: да се разработят системи за ефективно клониране и експресия на гените *ospA*, *ospC*, *VlsE* и *flaB*, кодиращи основните

имуногенни белтъци на *Borrelia burgdorferi*. Формулирана е в 2 части, които са логически свързани и първата е основен гарант за втората, което дава връзката с приложението на резултатите в ELISA тестове за различните фази на лаймската болест. В съответствие с поставените цели са дефинирани 7 ясни и логични задачи.

4. Оценка на използваните методи и материали

Използваният набор от методи е съвременен и адекватен за реализацията на дисертационния труд. Описани са точно и подробно и изцяло покриват многостранните области на работата: култивиране, изолиране на тотална и плазмидна ДНК, агарозна и SDS-PAGE електрофореза, Western blot, имуноблот, ELISA и PCR анализи, трансформация на компетентни клетки, клониране, изолиране на рекомбинантни белтъци и пречистване. В работата са подбрани най-съвременни и доказали своята ефективност вектори и подходи за клониране. Още на ниво разработка на стратегията на изследването личи правилния методичен подход на докторантката.

Използвани са достатъчно голям брой серумни клинични преби (116) на пациенти с различен стадий на инфекция, както и 10 контролни преби на здрави кръводарители. Това също е показател за едно значително по обем и вид изследване с разнообразен материал и съвременни методи.

5. Оценка на получените резултати

Извършена е значителна по обем и изключително разнообразна експериментална работа в рамките на амбициозно и мащабно интердисциплинарно изследване. Получените резултати и тяхното обсъждане са изложени в две части:

- 1) Клониране, експресия на гени и получаване на рекомбинантни белтъци *ospA*, *ospC*, *VlsE* и *flaB* и**
- 2) Изследване на серумни преби от пациенти с лаймска борелиоза с новополучените рекомбинантни протеини антигени.**

Високо оценявам схемата обобщаваща отделните експериментални етапи, което представлява оригинална постановка на докторантката за постигане на целта ива Трифонова умело подбира и прилага методи за генетичен анализ и програми за дизайн на двойки праймери, които специфично да амплифицират кодиращи секвенции на гените *ospA*, *ospC*, *VlsE* и *flab*, за основните имуногенни белтъци при *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia*

garinii, *Borrelia afzelii*. Получените секвенции са анализирани като са отразени и степента на хомология на съответните гени при трите различни вида *Borrelia*. Успешно са клонирани и експресирани 4^{te} гени: *ospA*, *ospC*, *VlsE* и *flab* и са пречистени рекомбинантните белтъци. Това е огромен обем от експериментална работа, изискващ добра теоретична и методична подготовка. Резултатите са представени и дискутиирани последователно за всеки един от гените. Те са важни не само за постигане целта на дисертацията, но и от методична гледна точка:

- 1) избрани са най-подходящите условия и компетентни клетки *E. coli* за трансформация и генна експресия на важни имуногенни белтъци от *Borrelia burgdorferi* s.s. и са оптимизирани съответните протоколи;
- 2) създадени са оригинални двойки праймери и е оптимизиран протокол за високо-чувствителен PCR анализ на *ospA*, *ospC*, *VlsE* и *flab*.

Получените рекомбинантни белтъци *OspA*, *OspC*, *VlsE* и *Flab* успешно са приложени в ELISA тестове с клинични серумни преби. С висока специфичност се отличават получените рекомбинантни *VlsE* включително и в ранните стадии на инфекцията. Оригинален характер имат резултатите от тестовете поотделно и на комбинираните двойки от имуногенни белтъци. Бих искала да подчертая, че проучванията с рекомбинантни антигени са предимно на колективи в САЩ, а в Европа има само единични лаборатории в Германия, които изследват единствено комбинация от антигени, без да са получени данни за всеки от тях по отделно. Следователно работата на докторантката Трифонова е иновативна и бих препоръчала да бъде продължена, така че резултатите да могат да послужат за усъвършенстване диагностините/ научни изследвания на лаймската болест.

Високо оценявам прилагането на получените имуногенни белтъци за проучване патогенезата и характеризиране специфичния имунен отговор в различните фази на лаймската болест. Докторантката критично оценява резултатите от използването на получените рекомбинантни белтъци самостоятелно и в комбинация. Имам и един допълнителен въпрос:

Какво накара докторантката да избере за обект на разработка именно тези 4 имуногенни белтъка и кой (кои) от тях, въз основа на получените резултати счита, че може да намери практическо приложение за нуждите на диагностиката?

Направените 7 извода са логично следствие от цялата разработка и дават информация за стойността на проведените експерименти .Представена е декларация за оригиналност, в съответствие с новите изисквания на правилника и са формулирани точно и обективно 8 приноса с научно-теоритичен, методичен и научно-приложен характер.

Резултатите от дисертационния труд са представени в 4 публикации (1 под печат), на които Ива Трифонова е първи автор и на 10 научни форума у нас и в чужбина.

В заключение искам да подчертая, че материалът е дисертабилен и дори надхвърля обема за образователната и научна степен „доктор”. Темата е актуална, докторантката е усвоила съвременни методи, експериментите са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки. Открояват се оригинални научни и приложни приноси.

Считам, че рецензираният дисертационен труд отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и Правилника на НЦЗПБ. Всичко това ми дава основание за цялостна отлична оценка позволяваща ми да предложа на уважаемите членове на научното жури да присъдят на Ива Петрова Трифонова образователната и научна степен „Доктор"по научната специалност 01.06.12 Микробиология.

Гр. София
04.08.2011 г.

Рецензент:.....
(доц. Д-р Светла Т. Данова)