



ДО ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА НАУЧНОТО  
ЖУРИ, НАЗНАЧЕНО СЪС ЗАПОВЕД  
№ 27/01.02.2017 г. на Директора на НЦЗПБ,  
Проф. д-р Тодор Кантарджиев, дмн, мзм

## РЕЦЕНЗИЯ

относно процедура за придобиване на ОНС „Доктор“ с кандидат **Мария Радославова** Павлова, редовен докторант в НЦЗПБ, в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, по научната специалност „Микробиология“ – 01.06.12,

**Тема на дисертационния труд:** „МОЛЕКУЛЯРНИ МЕТОДИ ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ТИПИЗИРАНЕ НА CAMPYLOBACTER JEJUNI / COLI“

**Изготвил рецензията:** Доц. Иван Николаев Иванов, дм завеждащ Национална референтна лаборатория по контрол и мониториране на антимикробната резистентност, отд. Микробиология, Национален център по заразни и паразитни болести

Представените ми документи по процедурата са изгответи коректно и в съответствие със Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и правилника за прилагането му в НЦЗПБ.

**Кратки Биографични данни за дисертантката.** Мария Павлова се дипломира като бакалавър в Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ през 2009г, а през 2011г. успешно придобива и магистърска степен по Биология на развитието. През 2014г е приета като редовен докторант в отдел Микробиология на НЦЗПБ. Преминала е редица курсове за следдипломна квалификация, организирани в центъра.

**Актуалност на темата.** Бактериите от род *Campylobacter spp.* са познати като един от четирите най-важни причинители на оствър диариен синдром, но все по-често се докладват и при системни и живото-застрашаващи инфекции. Родът обхваща 18 вида и шест подвида

като през последните години се изолират нови атипични щамове (вкл. и от хора), които предстои да се проучат и класифицират. Като основни причинители на ентерит в 90% от случаите се докладват *C. jejuni / coli*. Нормално те се откриват като коменсали в чревния тракт на широк спектър от животни, по-специално домашни птици. Трансмисията при човек се осъществява най-често посредством контаминирана вода (особено при взривове), както и чрез пряк контакт с животни или животински продукти. Клиничните симптоми при ентерит, дължащ се на *C. jejuni* и *C. coli* са неразличими помежду си и в извънлабораторни условия трудно се диференцират от диариен синдром причинен от *Salmonella*, *Shigella* и др. Най-честото усложнение е т. нар синдром на Guillain-Barre (GBS), който се докладва с честота едно на 2500-5000 заразявания.

Според последните данни от Европейска агенция по безопасност на храните (EFSA) чревните инфекции, причинени от *Campylobacter spp.* са най-често съобщаваните зоонози сред населението в Европейския съюз, с честота от 50 случая на 100,000 в повече от 17 страни и общо 190 000 случая годишно. Реалният брой случаи, обаче се изчислява на над 9 млн., а разходите за здравеопазване и загубите в производителността възлизат на над 2,4 милиарда годишно (по данни на EFSA).

Като референтен диагностичен метод се счита културелното изолиране и биохимичната идентификация, но поради микроаерофилния си метаболизъм и високателните си характеристики, се налага използването на специални техники, условия и среди за култивиране и като цяло изолируемостта остава ниска особено при материали от хранителни продукти и околната среда. Ето защо през последните години за детекция и диагностика все по-често се прилагат по-бързите и чувствителни молекулярно-генетични методи. При направена от мен справка в PubMed с ключови думи „*Campylobacter AND PCR*”, от 1991г. насам се откриват 1497 статии, като 621 от тях са публикувани само за последните 5 години, което категорично демонстрира актуалността на проблема.

За епидемиологично маркиране се прилагат класическите схеми за серотипизиране на Penner и Lior, които изискват обширен набор от скъпоструващи анти-серуми, и не винаги са в състояние да типизират епидемичните щамове, при което се налага допълнително биотипизиране и фаготипизиране. Понастоящем тези методи също биват извествани от по-

надеждните молекулярни техники като PFGE и MLST, за които вече са създадени стандартизириани световни бази данни, улесняващи междулабораторния обмен на данни и ранното регистриране на взривове и международни рискови клонове.

Не на последно място проблемът *Campylobacter* се разглежда и от гледна точка на нарастващата антибиотична резистентност. Само преди седмица, на 27.02.2017, СЗО обяви списъка на най-проблемните в световен мащаб бактерии, за които спешно е необходимо разработване на нови антибиотични молекули, като флуорохинолон-резидентните *Campylobacter spp.* се нареждат в категорията „висок приоритет“ на четвърто място, след ванкомицин резистентните *E. faecium*, MRSA/VISA и кларитромицин резистентните *H. pylori*.

В България като цяло проблема с кампилобактериозите е слабо проучен, активен надзор и съвременни систематични данни, практически липсват или са докладвани само за района на София. Това в голяма степен се дължи на факта, че масово в лабораторната мрежа диагностиката на кампилобактериозите се неглигира, като се разчита на това, че в повечето случаи те протичат като самоограничаващи се инфекции, а взривовете най-често се пропускат или не се докладват. Налице е остра необходимост от популяризиране и задълбочаване на проучванията върху този проблем в страната.

Предвид изложеното дотук считам, че тематиката е изключително актуална и умело подбрана от ръководителя на дисертационния труд. За това свидетелства и факта, че над 75% от цитираните заглавия в библиографията са публикувани след 2000г.

**Структура на дисертационния труд.** Дисертационния труд е написан на 124 стандартни страници и включва 35 фигури и 17 таблици. Библиографията съдържа 153 заглавия, от които 12 на кирилица. Работата е структурирана по общоприетата схема: Използвани съкращения - 1 стр.; Въведение - 2 стр., Литературен обзор - 33 стр., Материали и методи - 24 стр., Резултати и обсъждане - 38 стр., Изводи - 1 стр., Справка за приноси – 3 стр., Публикации във връзка с дисертацията и участие в научни проекти (4 стр.), Библиография (14 стр.)

**Литературният обзор** е структуриран адекватно, текстът е компетентно написан и обхваща всички по-важни аспекти на изследвания проблем. Обстойно са разгледани, историята, таксономията, класификацията, патогенезата, епидемиологията, методите за идентификация и типизиране, резистентността към антимикробни средства.

Към литеатурния обзор имам следните препоръки:

Подзаглавието в точка „2. СЛУЧАИ НА КАМПИЛОБАКТЕРИОЗИ“ би следвало да се обедини с точка „5 ЕПИДЕМИОЛОГИЯ И МЕХАНИЗЪМ НА ПРЕДАВАНЕ НА ИНФЕКЦИЯТА“, тъй като информацията засяга основно данни за заболеваемостта. Първите две подзаглавия са погрешно номерирани като 4 и 5, което създава известно объркане (вероятно е техническа грешка). При използване на фигури от чужди източници би следвало те да бъдат цитирани (например при фиг. 4)

Много информативно са представени културелните методи за диагностика и особено мембрano-микрофилтрационната техника, която предвид че не изисква скъпи селективни среди, се оказва атрактивна и достъпна за въвеждане в лабораторната мрежа. Все пак трябва да се посочи като недостатък, че чувствителността на метода не позитивира при наличие на  $< 10^5$  КОЕ/г фецес, особено при използване на филтър 0,45 $\mu\text{m}$ .

Подробно и компетентно са разгледани основните генетични методи за идентификация, диагностика и типизиране като критично са изтъкнати както предимствата така и недостатъците им. Посочено е в кои случаи се налага видово диференциране и кои са най-подходящите таргетни гени в зависимост от целта на конкретния тест.

В заключението на обзора, г-жа Павлова много подходящо обобщава нерешените до момента проблеми, което логически води към целта на дисертацията.

**Цел и задачи.** Целта и четирите задачи за изпълнение ѝ са формулирани правилно и отразяват основните елементи на дисертационния труд.

**Материали и методи.** В раздела са описани подробно изследваните щамове *Campylobacter* (общо 123), включващи клинични, животински, и референтни. Значителен е и броя изследвани фекални преби събрани само за две години (общо 114). Предвид

методичния характер на работата, считам че обема на извадката, е достатъчен, за да осигури представителния характер на проучването. Щамовете са идентифицирани чрез комплекс от културелни, микроскопски и биохимични методи, които са подробно описани.

Генетичните методи са адекватно представени и дават възможност лесно да бъдат усвоени от други колеги. В протокола за ДНК екстракция от съхранявани култури, на стр. 45 не е посочена концентрацията на добавения NaCl (вероятно се касае за физиологичен разтвор). Докторантката оптимизира два различни мултиплени PCR метода доказване и диференциране на *C. jejuni* и *C. coli* от култури и фекални преби, при които точно са описани праймерните двойки, размера на очакваните продукти и условията на реакциите. При агарозната електрофореза не става ясно кой от двата посочени буфера е реално използван - ТВ или ТВЕ; в текста е посочен 1x ТВЕ, но е даден състава на ТВ.

Докторантката прилага коректно редица методи за лабораторното валидиране на PCR методите, което е важно условие за гарантиране тяхната надеждност в диагностиката. Протоколът за провеждане на PFGE е подробно описан, а приложения снимков материал е уместен и допълва изложението.

По отношение използваните критерии за оценка на стр. 64, би следвало да се цитира литературен източник.

**Резултати и обсъждане.** Считам, че обединяването на резултатите и обсъждането в подобен род дисертации е подходящо с цел по-лесното проследяване на взаимовръзките и логиката на отделните методи, получените резултати и следствията от тях.

Резултатите от културелните и биохимичните методи са онагледени богато с подходящ снимков материал. Едновременно впечатляваща и смущаваща е установената според мен твърде висока степен изолируемост - 38 щама от 114 фекални преби или 33%. За Европа по литературни данни, този процент е под 10% и само в някои африкански държави достига 45%. Тази находка може да се окаже значима както в диагностичен така и в епидемиологичен аспект и заслужава по-нататъшно обсъждане.

При резултатите от директната микроскопия на фецес (стр. 65) е посочен метод на директно оцветявяне с карбол-фуксин, докато в материали и методи, същия е означен като

оцветяване по Грам (стр. 43). Броят на изолатите от фекалните преби варира на различни места в текста и в табл. 14 и не е ясно 38 или 39 е реалния брой.

При сравняването на средите за съхранение на щамовете е установено, че ВНІ с 15% глицерол, се оказва оптимална за дългосрочно съхранение, което е важно условие за провеждането на по-нататъшни проучвания. Значим резултат е разработването на метод за ДНК екстракция директно от средата за съхранение, което дава възможност за ретроспективно проучване на щамове неподаващи се на ревитализиране.

Разработения конвенционален триплексен PCR анализ е използван за реидентификация на 85 архивни лабораторни щама от колекцията на НЦЗПБ както и 38 клинични щама, като данните сочат, че генетичната идентификация превъзхожда фенотипната, давайки възможност за отдиференциране на близкородствени видове (напр. *Arcobacter*) и доказване на смесени култури/resp. инфекции от *C. jejuni/ coli*. По-нататък докторантката изпитва възможностите на метода за директно доказване от фекални преби, но поради нарушената специфичност това се оказва невъзможно. За директната диагностика на *Campylobacter* във фецес, докторантката разработва нов бърз триплексен EvaGreen Real-time PCR, като умело комбинира маркерни гени и праймерни двойки, от различни източници. За да се постигне надеждна диференциация при този вид анализи, е важно всеки продукт да се амплифицира с приблизително еднаква ефективност, а разликата между температурите на топене на отделните ампликони да е не по-малка от 2°C. Тази сложна задача изисква немалък предхождащ *in-silico* анализ и значителни биоинформатични умения, както и последваща прецизна оптимизация на реакционните условия. За тази цел е използвана експериментална постановка използваща иновативния алгоритъм на Тагучи, при който могат едновременно да се оптимизират множество параметри. Рядко може да се наблюдава в дисертационен труд, толкова щателно и прецизно валидиране на лабораторен тест. От представените резултати личи, че докторантката се е справила отлично и оптимизирания метод демонстрира над 95% специфичност и чувствителност (вкл. аналитична и диагностична) и се оказва значително по-надежден и бърз от конвенционалните методи. Като обект на бъдещи проучвания би било подходящо към триплексния метод да се добави подходяща вътрешна инхибиторна контрола със съответните праймери.

Отчитам като неправилно поставянето на резултатите от валидирането на mPCR методите (чувствителност и специфичност) в края на резултатите и обсъждането им, и би следвало да бъде в началото на изложението на всеки метод.

По отношение на епидемиологичното маркиране, докторантката правилно се е насочила към апробирането и въвеждането PFGE, който въпреки че е скъп и трудоемък, все още се счита за златен стандарт и се предпочита при проучването на взривове. Въпреки допълнително извършените множество оптимизации в стъпките и условията спрямо стандартния протокол на PulseNet, все още е отчетена ниска типизираща способност и голяма част от щамовете остават нетипабилни.

В дисертационния труд липсва заключителна част, която следва да обобщи резултатите и да направи сравнителен анализ с други подобни проучвания, както и да постави насоките бъдещи такива.

**Изводите с** изключение на извод 5, са правилно формулирани и не възпроизвеждат елементи от резултатите. Не съм съгласен с извод 5, тъй като противоречи на представените резултати, от които е видно, че PFGE е ненадежден в настоящия си вариант и са необходими допълнителни изпитвания.

**Приноси.** Към приносите с оригинален и потвърдителен характер нямам забележки. По отношение на приносите с приложен характер, формулировката на принос 4, касаещ PFGE, отново не корелира с получените резултати, в следствие на което фразата „успешно разработен“ по-скоро следва да се замени с „апробиран“.

**Мария Павлова е първи автор в пет и втори в две от представените осем публикации** по темата, една от които е публикувана в престижно българско списание реферирано в PubMed. Взела е и участие в шест научни форума, един от които с международно участие в чужбина. Публикациите свидетелстват за водещото участие на дисертантката в дизайна и провеждането на експерименталната работа, демонстрирайки много добри умения за анализ и тълкуване на резултати.

Познавам лично Мария Павлова, от 2014г и винаги ми е правила отлично впечатление на амбициозен и последователен млад изследовател-микробиолог, което е видно и от

представения ми дисертационен труд. Изложените от мен забележки и препоръки в никакъв случай не намаляват стойността на работа и целят единствено да оптимизират съдържанието ѝ.

**На базата на изложеното, считам че Мария Павлова напълно изпълнява критериите за придобиване на ОНС Доктор и давайки своя положителен вот, предлагам на уважаемите членове на научното жури да одобрят кандидатурата ѝ.**

Дата: 06/03/2017

Изготвил рецензията:

  
/Доц. Иван Иванов/