

С Т А Н О В И Щ Е

От доц. д-р Ива Стефанова Христова, д.м.

Зав. Национална референтна лаборатория

по Предавани с кърлежи инфекции, НЦЗПБ

за дисертационния труд на Ива Петрова Трифонова

на тема:

**Оптимизиране на серологичната диагностика и проучвания
върху патогенезата на Лаймската борелиоза с рекомбинантни антигени
от *Borrelia burgdorferi***

Диагностиката на Лаймската борелиоза, една от най-широко разпространените предавани с вектори инфекции в света, продължава да бъде предизвикателство пред световната научна общественост. Редица са нерешените проблеми, сред които се открояват ниската чувствителност на тестовете в ранната фаза на болестта предвид забавеното повишаване на нивата на специфичните антитела, а също така друг проблем е многообразието на причинителите на болестта и произхождащата от това нужда от адаптиране на диагностичните тестове.

Дисертационният труд на Ива Трифонова си поставя за цел чрез клониране и експресия на четирите основни *B. burgdorferi* протеини да проследи участието им в имунния отговор на организма и приложимостта на всеки един антиген или на различни техни комбинации в серологичната диагностика на Лаймската болест в различни фази – ранна, напреднала и късна. Задачите са ясно и точно формулирани и произхождат от поставената цел.

Прави впечатление подробната информация, представена в раздел **Материал и методи**. Детайлно са описани PCR амплификацията, клонирането, трансформацията на амплифицираните гени в различни компетентни *E. coli* щамове, експресията и пречистването на получените рекомбинантни протеини. Този раздел спокойно може да служи като методичен наръчник при извършване на подобни проучвания.

Глава **Резултати и обсъждане** включва две части – едната е базирана на генетичните методи по клонирането и експресията на 4 имунодоминантни *B. burgdorferi* протеини, а втората част е базирана на изпитването и приложението на тези протеини в серологичната диагностика на Лаймската борелиоза.

Първата част много подходящо започва с разработване на теоретична постановка, в която са включени основните етапи при работата. Разработени са 8 оригинални праймерни двойки за амплифициране на *ospC* гените от *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* и *B. garinii*, за амплифициране на *flaB* гена от *B. burgdorferi sensu lato*, *vlsE* гените от *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* и *B. garinii* и на *ospA* гена от *B. burgdorferi sensu stricto*. Определена е чувствителността и специфичността им и са уточнени условията за амплификация. Представени са етапите от конструирането на рекомбинантния плазмид до експресията и пречистването на рекомбинантния протеин. Това е много трудоемък процес, изискващ изпитване и адаптиране на всеки един компонент от системата - плазмидни вектори, щамове химиокомпетентни клетки и условия на провеждане и прави чест на докторантката, че е успяла да финализира процеса при цели 4 протеина.

Във втората част са представени резултатите от проведените серологични изследвания с панели serumни преби от болни в различни фази на Лаймската борелиоза. За целта, с получените рекомбинантни протеини са разработени ELISA тестове. С OspC ELISA е установена висока IgM реактивност в ранните етапи на инфекцията, но също и при напредналата фаза на болестта. FlaB ELISA

е показала по-висока реактивност, както ИгМ, така и ИгГ. Най-високата установена реактивност е с VlsE като антиген за ELISA, както в ранната, така и в напредналата и късната фаза на Лаймската борелиоза, като изненадващо дори и в ранната фаза се откриват преимуществено ИгГ антитела. Установената OspA реактивност не е висока, но е във всички стадии на болестта. Аналитичният подход на докторантката проличава в проучванията, направени с комбинации от рекомбинантни протеини. В резултат е намерена двойката антигени, която осигурява максималната чувствителност на изследването, а именно VlsE/ OspC.

Считам, че дисертационният труд е новаторски, изпълнен е прецизно, получени са съществени резултати, които са принос в решаването на редица диагностични проблеми и ще са насоки за бъдещи проучвания в тази област. Като основни се очертават следните приноси:

1. Разработването за първи път у нас на системи за ефективно клониране и експресия на четири главни *B. burgdorferi* протеини. Към този обобщен принос включвам разработването на оригинални полимеразно-верижни системи за амплифициране на целите гени, кодиращи протеините OspC, FlaB, OspA и VlsE; изпитване и адаптиране на подходящи плазмидни вектнори и химиокомпетентни клетки, условия за експресия и пречистване.
2. Разработването на първите у нас ELISA тестове с рекомбинантни антигени. Проучваният, извършени с тях, хвърлят светлина върху участието на всеки един от изпитваните 4 *B. burgdorferi* протеини в антитяло отговора в различните етапи на Лаймската болест.

В заключение, предвид гореизложеното становище давам положителна оценка за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” по научната специалност 01.06.12 на Ива Петрова Трифонова

01.08.2011 г.

Подпис:



/ доц. д-р И.Христова, дм /