

## РЕЦЕНЗИЯ

На

дисертация на тема:

### **ПРОУЧВАНЕ РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА НЯКОИ БУНЯ- И ФЛАВИВИРУСИ В БЪЛГАРИЯ,**

на **ЕЛИЦА ЖЕЧЕВА ПАНАЙОТОВА** за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”

с научен ръководител: **ПРОФ. Д.М.Н. ИВА СТЕФАНОВА ХРИСТОВА**

рецензент :Доцент д-р. **Д.М.Н. Божин Димитров Камаринчев**, вирусолог, ВМА, София.

Дисертационният труд е написан на 129 страници, цитирани са 203 литературни източника (18 от тях са на български език), включени са 26 фигури и 12 таблици. Структуриран е стандартно, съдържа Въведение – 2 страници, Обзор на литературата – 41 страници, Цел и задачи – 1 страница, Материали и методи – 14 страници, Резултати – 18 страници, Обсъждане – 19 страници, Изводи – 2 страници, Приноси – 2 страници. Приложени са публикации и участия в научни прояви, свързани с дисертацията – 3 страници и списък на използваната литература – 22 страници.

Арбовирусите, са широко разпространени по целия свят. Естествената им циркулация включва членестоногите, вектори и гръбначни животни – резервоари . Те причиняват заболявания на човека и животните в тропичните и субтропични региони в умерените и северни ширини. Предвид географското си разположение– кръстопът на миграционните пътища на птиците от Африка за Европа и Азия и благоприятните климатични условия, България е ендемична територия за част от тази разнообразна в таксономично отношение група вируси.

В тази връзка докторантът си поставя за цел:

**Да проучи актуалното разпространение на Бунявирусите: Найровируса СCHFV, Хантавирусите DOBV, PUUV и Флавивирусите WNV и TBEV в България чрез провеждане на еколого-епидемиологични и молекулярно-генетични методи в ендемични и неендемични райони на страната с оглед уточняване на ареала им.**

За постигане на целта докторанта си поставя и изпълнява следните задачи:

Да проучи разпространението на Найровируса ККХТ сред кърлежи , домашни животни, здрави хора и пациенти, болни съмнителни за ККХТ.

Да проучи разпространението на Хантавирусите Dobrava и Puumala сред гризачи здрави лица и пациенти, болни съмнителни за ХТБС

Да проучи разпространението на Флавивируса Западен Нил сред здрави лица ; пациенти с неясни фебрилни състояния ; такива с неврологични симптоми и клинична диагноза вирусен енцефалит

Да проучи разпространението на Флавивируса Кърлежов енцефалит сред здрави лица ; пациенти с неясни фебрилни състояния ; такива с неврологични прояви и клинична диагноза вирусен енцефалит.

**В литературния обзор**, за всеки от проучваните вируси и вирусни групи докторантът представя информация по отношение на: вирусна класификация; структура на вируса и вирусна репликация; генетично разнообразие; филогенетично дърво, за всеки един от тях показващо генетичните им взаимоотношения; вектори и резервоар, исторически преглед; епидемиология; патогенеза; клинични особености; диагностика; лечение; профилактика; и др. Обзорът е добра база за осмисляне на резултатите получени в настоящото проучване.

## **МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

Материали. Изследванията са проведени върху:

**2315 кърлежа** от видовете : *H. Marginatum*, *R.sanguineus*, *I.ricinus* *D. Marginatus*, *Haemaphysalis spp.* свалени от домашни животни –крави, кози и овце от 9 селища на 5 различни области на България-Благоевград, Кърджали, Хасково, Ямбол и Бургас

**109 броя гризачи** от видовете: *Apodemus spp* ,*Microtus arvalis* ,*Microtus spp.* ,*Myodes glareolus* , *Mus musculus* , *Mus macedonicus* , *Crocidura suaveolens* , *Sorex minutes* и *Micromys minutes* , уловени в 4 южни и югозападни области на страната,– Пазарджик, Пловдив, Смолян и Благоевград.

**711 серумни проби от домашни животни** – крави, кози и овце, за от всички области на страната .

**2262 броя клинични материали / кръв , серум урина и др./ от здрави или болни лица.**

## **Използвани готови търговски набори (китове)**

**За изолация на РНК, синтез на cDNA, провеждане на RT-PCR и RT-PCR в реално време:** за всеки от проучваните арбовируси са използвани стандартизирани китове на водещи фирми: Omega Bio-Tek, USA, Zymo Research, USA, Invitrogen Life Technologies, USA, Quanta Biosciences, USA и Sigma Aldrich, USA. . За целите на изследванията са използвани различни олигонуклеотидни праймери, заимствани от различни публикации в специализирани издания. Всяка от използваните системи е контролирана с положителни и отрицателни проби.

**Китове за ELISA и имуноблот: За откриване на IgG и IgM** срещу всеки един от проучваните вируси са използвани търговски китове на водещи фирми от Русия, Германия и Франция : Vector Best, Русия, NovaTec, Germany, Euroimmun, Germany, EDENext, France.

## **РЕЗУЛТАТИ**

### **Разпространение на вируса на ККХТ в България**

#### **Разпространение на вируса на ККХТ сред кърлежи в ендемични региони на България**

Изследвани са 623 кърлежа от вида *H. marginatum* и 107 кърлежа от вида *R. sanguineus s.l.* за наличие на РНК на вируса на ККХТ с помощта на RT-PCR в реално време като вирусният геном е открит в 39 кърлежа от вида *H. marginatum*, и в нито един от вида *R. sanguineus s.l.* Контролно, положителните 39 проби са изследвани и чрез RT-nested PCR като , 28 от тях са били положителни.

Нивото на заразеност на кърлежите от вида *H. marginatum* варира между 2.7% и 15.2% за отделните селища на областите Бургас и Кърджали. Средните стойности възлизат на 8.8% за област Бургас и 8.6% за област Кърджали.

С помощта на втори RT-nested PCR за доказване на AP92-подобни щамове /ККХТ вирус линия 6/ дисертантът изследва 415 кърлежа от вида *R. sanguineus s.l.* и открива 49 /11,8 % / положителни. При кърлежите събрани от Кърджалийска област този процент е 40.4%), от Хасковска 2,6% ,. докато в областите Бургас, Благоевград и Ямбол подобен щам не е открит.

### **Серопревалиране на ККХТ сред домашни животни в България**

Специфични анти-ККХТ IgG антитела са открити в общо 127 животински серума (86 крави, 21 овце, 16 кози и 3 неизвестни), произлизащи от 20 области на страната като средното ниво на серопозитивни възлиза на 17.9%, като варира между 0 и 100% за отделните области. Най-високи стойности на серопозитивни са открити в областите Кърджали (100%), Бургас (33.8%), Плевен (36.8%) и Габрово (35.7%). По-ниски нива на серопозитивност бяха открити в областите Благоевград (20%) и Търговище (25%), както и в Русе (15.7%), Силистра (14.7%), Хасково (14.6%), Ямбол (14%), Кюстендил (13.3%), Пловдив (10%), Добрич (10%), Сливен (9.4%), Видин (8.9%), София (7.7%), Стара Загора (4.8%) и Ловеч (3.2%). Серопревалирането показва най-високи нива сред кози – 16 положителни серумни проби от общо 73 или 21.9%, последвани от крави – 86/413 или 20.8% и овце – 21/125 или 16.8%.

### **Серопревалиране на ККХТ сред здрави лица в България**

Дисертантът изследва 1600 серумни проби от здрави лица от всички области на България, за анти-ККХТ IgG антитела като 55 (3.4%) от 20 области на страната са се оказали положителни. Най-много положителни са открити в областите Хасково (28%), Ямбол (12%) и Добрич (8%).

### **Изследване на пациенти за ККХТ**

От изследваните 141 проби (113 серумни и 28 кръвни проби) на пациенти със съмнение за инфекция с вируса на ККХТ, вирусът е открит с real-time RT-PCR при трима пациенти, а IgM антитела в 11 от изследваните серумни проби на 9 пациента произхождащи от областите – Пловдив, Благоевград и Ямбол.

### **Разпространение на Хантавируси в България**

#### **Разпространение на Хантавируси сред резервоарни животни в ендемични области на България**

С помощта на real time RT-PCR са изследвани са 109 дребни бозайници от 4 области на южна България – Смолян, Пловдив, Пазарджик и Благоевград, като при , 3 *Myodes glareolus*-а по един в Благоевград, Смолян и Пазарджик са били положителни PUUV и нито един от 109 -те за DOBV.

## **Серопревалиране на хантавируси сред здрави лица в различни области на България**

От 1439 серумни проби изследвани за IgG антитела срещу хантавируси 92 (6.4%) произхождащи от общо 23 от областите на страната са били положителни.. Най-високи стойности на серопозитивност са открити в областите Благоевград (20.31%) и Враца (22%), Ямбол (14%), Сливен (12%), Смолян (12%), Пазарджик (11%). От положителните 96 проби 29(32%) са били потвърдени в имуноблот , като 21 са били положителни за PUUV ,а 8 за DOBV .

### **Изследване на пациенти за Хантавируси**

От изследваните за PUUV и DOBV с RT-PCR 117 проби (113 серумни и 4 кръвни проби) на пациенти със съмнение за ХТБС, вирусът DOBV е открит в една проба , а PUUV не е открит. Антитела от клас IgM срещу DOBV са открити при 14 от пациентите, а за PUUV не са открити.

### **Разпространение на вируса на Западно-Нилската треска (WNV) в България**

От изследваните 1451 серумни проби за наличие на специфични антитела от клас IgG срещу вируса на Западния Нил. 22 (1.5%) от пробите, събрани от 11 от областите на страната са били положителни Най-много положителни серуми са открити в областите София област (10%) и Видин (7.5%), Русе (6%), Силистра (6%) и Враца (4%) и др.

### **Изследване на пациенти за ЗНТ**

От изследвани 225 серумни проби на пациенти с неясни фебрилни състояния и/или неврологични прояви от различни болнични заведения на страната. В 8 (3.6%) са открити IgM антитела срещу WNV, като IgG антитела не са открити в никоя от пробите.

Изследвани са и други 117 проби(серум, ликвор и урина) от болни съмнителни за ЗНТ като вируса е доказан като причинител в 3 от случаите в София и Варна с помощта на real-time RT-PCR и ELISA.

### **Разпространение на вируса на кърлежовия енцефалит (TBEV) в България**

#### **TBEV сред здрави лица в България**

От изследваните 1138 серумни проби от здрави лица за IgG антитела срещу вируса на Кърлежовия енцефалит 7 серума (0.6%) от 5 области на страната са били положителни.

#### **Изследване на пациенти за кърлежов енцефалит.**

Изследвани са 225 пациенти при двама /2/(0.8%) от които са открити IgM и IgG антитела срещу TBEV. В 5 от други 55 изследвани пациенти, съмнителни за Кърлежов енцефалит са открити антитела към вируса.

**Въз основа на резултатите, получени при изпълнението на целта и задачите на този дисертационен труд докторанта прави следните по-важни изводи:**

Кърлежите от род *Hyalomma* в ендемичните за България региони е основен резервоар и вектор на вируса. Щамовете ККХТ изолирани от тях се групират в общи клъстери с щамове изолирани от пациенти с ККХТ от същите области.

В България циркулират ниско патогенни ККХТ вируси (AP92-подобни щамове).

Високият процент серопозитивни за ККХТ домашни животни в неендемични райони, е показател за риск от заболяване хора пребиваващи в районите.

Наличието на антитела към вируса на ККХТ сред здрави лица показва все повече разширяващия се ареал на вируса.

Появата на случаи от ККХТ в стари заглъхнали огнища на ККХТ

PUUV и DOBV циркулират в различни райони на България доказано с комплект молекулярно-генетични и серологични методи, а изявена тежка форма на ХТБС, причинява само DOBV .

Заболяванията от Западно Нилската треска в България се причиняват от щамове WNV линия 2, които се групират в общ клъстер с гръцки щамове.

Вирусите WNV и TBEV циркулират в България и са причинители на заболявания протичащи с фебрилен синдром и неврологични прояви.

**Някои от по важните приноси на дисертационния труд са следните:**

Проведените проучвания с real time RT-PCR върху заразеността на кърлежите с CCHFV - линия 5 (Европа 1) и линия 6 (Европа 2). и доказването на CCHFV линия 6 (Европа 2) - в кърлежи от вида *R.sanguineus s.l.*

Проведено изследване върху разпространението на вируса на ККХТ, базирано на откриването на специфични антитела срещу вируса с помощта на ELISA метод - както сред домашни животни, така и сред здрави хора.

Откриването на PUUV в България с помощта на молекулярно-генетични методи.

Проведеното проучване върху разпространението на Хантавирусите сред хора и животни / гризачи/ доказваща циркулацията им в ендемични и неендемични райони.

Доказани случаи на Западен Нил в България с помощта на real time RT-PCR , както и самостоятелната еволюция на вируса у нас и близките му филогенетични връзки с щамове от Гърция.

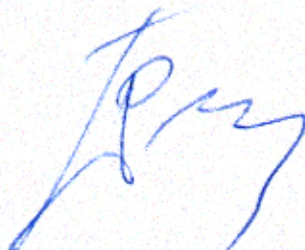
Откриването на WNV при 3.5% и TBEV - при 2.2% от болни неясен фебрилен синдром и/или неврологични прояви с помощта на молекулярно генетични методи.

Представените в дисертационния труд данни са публикувани в статии на списания и изнесени на симпозиуми и конгреси.

В заключение, дисертационни труд : ПРОУЧВАНЕ РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА НЯКОИ БУНЯ- И ФЛАВИВИРУСИ В БЪЛГАРИЯ, на Елица Жечева Панайотова напълно съответства на изискванията за присъждане на образователна и научна степен "Доктор"

23.11.2016 г.

Подпис :



Доц. Д-р. Божин Д. Камаринчев ДМН.