



До уважаемите членове на Научно жури,
определено със заповед № 232/16.06.2017
на Директора на НЦЗПБ

Рецензия

от доц. д-р Любомира Николаева-Гломб,
завеждащ Отдел „Вирусология” на НЦЗПБ, София

на дисертационен труд за присъждане на ОНС “доктор”
в област на висше образование 4. Природни науки, професионално направление
4.3. “Биологични науки” по научна специалност “Вирусология”

на **Ирина Любенова Георгиева,**

магистър по молекулярна биология със специализация по вирусология
и докторант в самостоятелна форма на обучение в Отдел “Вирусология” на НЦЗПБ

на тема „Проучвания върху разпространението и генетичните
характеристики на грипни вируси, респираторно синцитиален вирус и
риновируси в България през сезони 2014/2015 и 2015/2016”

представен за защита пред научно жури, утвърдено със заповед
№ 232/16.06.2017 на Директора на НЦЗПБ

Темата на дисертацията

Грипът е бил, е и винаги ще бъде в приоритетите на общественото здравеопазване и личното здраве. Статистиката съобщава, че всяка година 5 до 20% от населението на Земята се разболяват от грип. Това означава средно около 600 млн. инфекции ежегодно като при 3-5 млн. от тях болестта протича тежко и води до смъртта на близо половин милион човека всяка година. Фокусирани обаче върху значимостта на грипната инфекция, не бива да се подценяват и другите причинители на остри респираторни заболявания, едни от които са риновирусите и респираторно-синцитиалният вирус. Взети заедно, тези три вируса имат огромно социално-икономическо въздействие, причинявайки милиардни парични загуби като преки разходи за здравните системи и пропуснати икономически ползи поради неоползотворени работни и учебни дни.

Рядко се намират научни трудове, които да не разглеждат причинителите на остри респираторни заболявания изолирано един от друг. Смятам, че именно разглеждането в цялост и взаимовръзка на най-важните и чести причинители на остри респираторни заболявания у човека е едно от достойнствата на представения дисертационен труд. Проучването на разпространението и генетичните характеристики на вирусите представлява както фундаментален научен интерес – разкриват се редица молекулярни, епидемиологични и еволюционни детайли за съответните вируси, така има

и пряк приложен ефект, тъй като данните ще се ползват за оценка на риска по отношение на циркулиращите респираторни вируси, а що се отнася до грипа – и за определяне на състава на бъдещата противогрипната ваксина за следващия сезон.

Актуалността и значимостта на темата на дисертацията са несъмнени.

Литературна осведоменост на автора

Прието е литературният обзор да показва какво е известно в тясната научна област по темата на дисертацията към момента. Той разкрива степента на осведоменост на автора, ширината на научния му кръгзор, фактичката му готовност за научна дейност. Смятам, че задачата е изпълнена изключително качествено, точно и изчерпателно. Обзорът респектира със своя обем и научен подход, показва отлична осведоменост и познаване в детайли на класификацията, структурата, репликативния цикъл и въобще молекулярната биология на вирусите, обект на изследването, както и на съвременните диагностични подходи за разкриване на етиологичната им роля в острите респираторни заболявания. Много добре са описани антигенните промени и причините за генетичното многообразие на грипните вируси. Това описание осигурява стабилната основа на раздела със собствените резултати, особено в частта за антигенната и генетичната характеристика на доказаните през двата сезона грипни вируси и за еволюцията на хемаглутининовия ген през последните години. Подобаващо внимание е отделено и на педантично извършвания надзор на грип и ОРЗ в нашата страна. Представени са дефинициите на СЗО за остро респираторно заболяване (ОРЗ, *ARI, acute respirartory infection*), за грипоподобно заболяване (ГПЗ, *ILI, influenza-like illness*), за тежко грипоподобно заболяване (ТГПЗ, *SARI, severe acute respiratory infection*). Функциониращата у нас система за сентинелен надзор на острите респираторни заболявания е описана подробно, като са представени и обяснения на използваните в нея полуколичествени показатели за интензивност, географско разпространение и тенденция в активността.

Подобаващо внимание е отделено съответно и на респираторно-синцитиалния вирус и на риновирусите, на структурата на вирионите, на организацията на генома, на репликативните стратегии, на антигенната структура, на епидемиологичните и патогенетичните особености на инфекциите, причинени от тези вируси, на съществуващата към момента специфична антивирусна терапия, на методите за лабораторното им доказване. Подразделите, посветени на различните вируси, са оформени по аналогичен начин, което значително улеснява възприемането на текста и лесно намиране на сходната информация по отношение на различните вируси.

Много приятно впечатление прави подробната историческа справка за предходните проучвания на грипните вируси и на други вирусни причинители на остри респираторни заболявания в България. Справката обхваща времето още от самото създаване на Лабораторията по грипни вируси през 1949-1950 г. Настоящата референтна лаборатория “Грип и ОРЗ” на НЦЗПБ става част от лабораторната мрежа на грипните лаборатории на СЗО още в далечната 1960 г. Споменати са научните трудове на видни български вирусолози от миналото и настоящето на грипната лаборатория на НЦЗПБ, разкривайки по този начин българския принос в изучаването на глобалния

проблем грип и остри респираторни заболявания. Очертано е постоянството на направлението в годините, приемствеността между поколенията и непрекъснатото надстройване и трупане на нови успехи върху предишните постижения.

Цели и задачи на дисертацията

Целта на дисертацията логично изхожда от подробно описаното в обзора състояние на избраната тематика. Тя е: да се проучи разпространението в България на грипните вируси, на респираторно-синцитиалния вирус и на риновирусите през сезони 2014/2015 г. и 2015/2016 г. и да се направи генетичен и антигенен анализ на изолираните през двата сезона вируси. Задачите са разделени в 7 основни логически групи, като почти всяка задача има по няколко подзадачи. Така се получават общо 15 очертани задачи, поставени в логическата им последователност за изпълнение на целта.

Методична страна

В методично отношение дисертацията е издържана на отлично ниво. Използвани са най-съвременни молекулярно биологични методи без да се пренебрегват класическите, т.нар. златни стандарти. Всички приложени методи са напълно адекватни за изпълнението на поставените задачи и цел.

Резултати и значимост на дисертационния труд

Поставените цел и задачи са осъществени експериментално като получените резултати са изложени ясно и достъпно с помощта на таблици и цветни фигури. Изследвани са внушителен брой клинични проби – почти 2000.

Резултатите са представени прегледно в три обособени части, посветени съответно на грипните вируси, на респираторно-синцитиалния вирус и на риновирусите като за грипните и респираторно-синцитиалния вирус е направен задълбочен анализ на разпространението и генетичните им характеристики, а за риновирусите за първи път е направен анализ чрез прилагане на молекулярно-биологични методи на разпространението им в нашата страна.

В първата обособена част, посветена на грипните вируси, е очертана ясна картина на двата грипни сезона: описана е седмичната динамика в заболяемостта от грип и възрастовото разпределение, определени са доминиращите и ко-доминиращите грипни вируси. Установено е, че през сезон 2014/2015 доминира грипен вирус *A(H3N2)*, а през следващия сезон 2015/2016 – *A(H1N1)pdm09*. Подобна смяна е установена и при грипен вирус *B* – доминиращата през първия сезон линия Ямагата се заменя през втория сезон от линия Виктория.

Една от основните задачи на дисертацията е да се проследят генетичните промени в циркулиращите грипни вируси. За да се осъществи това, е нужно вирусите да бъдат изолирани в пермисивна клетъчна култура. Изолацията на актуалните за двата проучвани сезона грипни вируси е извършена в клетъчна линия *MDCK-SLAI1* от клиничните проби, които са положителни според полимеразноверижната реакция и които са показали стойности на праговия цикъл под 27 ($C_t < 27$). Чрез реакция на задръжка на хемаглутинацията е установено, че всички изолати от субтип

A(H1N1)pdm09 са антигенно близки с ваксиналния щам *A/California*. По-прецизен антигенен и филогенетичен анализ на успешно изолираните вируси е направен в Световния център по грипа в Лондон и в Атланта, а анализът на аминокиселинните замени – в НРЛ “Грип и ОРЗ” на НЦЗПБ. Доказано е, че и през двата сезона циркулиращите грипни вируси подтип *A(H1N1)pdm09* са антигенно близки с ваксиналния щам *A/California/7/2009*, а циркулиращият подтип *A(H3N2)* претърпява антигенен дрифт и променя своите антигенни характеристики и биологични свойства (вече не аглутинира еритроцити).

Циркулиращите грипни вируси *B* и от двете линии (Ямагата и Виктория) са антигенно близки със съответните ваксинални щамове. Налице обаче е разминаване с щама, влизащ в състава на ваксината за съответния сезон: циркулиращите щамове на грипни вируси *B* през сезон 2014/2015 са от линия *B-Yamagata* и са генетично близки с щам *Phuket*, но като компонент във ваксината за този сезон е включен щам *Massachusetts*, който е от същата линия, но се различава генетично от *Phuket*. Щам *Phuket* е включен във ваксината за следващия сезон, 2015/2016, но тогава циркулира линия *B-Victoria*. Линия *B-Victoria*, циркулираща през сезон 2015/2016, е включена в състава на ваксината чрез близкородствения щам *B-Brisbane*, но в 4-компонентната ваксина. Но тя не е внесена в България през този сезон. Тогава е внесена 3-компонентната ваксина, която обаче съдържа *B-Yamagata*. Тези резултати на дисертанта са от изключително значение, защото водят до извода, че 4-компонентните ваксини са по-добрият избор. Популяризирането на този резултат както на по-високо административно ниво, така и сред широката общественост ще допринесе за реално информирано съгласие при избора на противогрипна ваксина.

Въз основа на получените данни в дисертацията е направен много прецизен анализ на еволюцията на гена на хемаглутинаина на грипни вируси *A(H1N1)*, *A(H3N2)* и *B* като в дискусията са обхванати всички сезони след появата на пандемичния щам *A(H1N1)pdm09*, когато съответните вируси са циркулирали. Смятам този еволюционен анализ за един от големите приноси на дисертацията.

Друго достойнство на труда е направеното изследване за определяне на чувствителността на изолираните вируси към антивирусния ефект на невраминидазните инхибитори, които вече относително широко се прилагат в лечението на грипната инфекция. Следеното на появата на резистентни вирусни мутанти е от изключително практическо значение за клиничната практика. Доказано е, че сред циркулиращите през последните два сезона грипни вируси в България няма резистентни щамове по отношение на невраминидазните инхибитори. За сметка на това пък всички изолирани грипни вируси тип *A* са носители на мутацията, на която се дължи резистентността към блокерите на белтъка *M2*.

Втората обособена част от резултатите в дисертацията е посветена на проучването на циркулацията на респираторно-синцитиалните вируси в България през последните два сезона. Изследвани са пробите на 610 деца, подбрани на възрастов принцип (деца под 5-год. възраст) измежду клиничните материали, включени в проучването. Установена е едновременна циркулация на двете подгрупи на респираторно-синцитиалния вирус, но все пак през сезон 2014/2015 доминира РСВ-*A*, а през сезон 2015/2016 – РСВ-*B*. Доказаната промяна в циркулацията на доминиращата

група на респираторно-синцитиалния вирус през двата сезона най-вероятно се дължи на формирането на колективен имунитет. Би било много интересно да се продължат тези изследвания и в следващите сезони, за да се установи алтернирането между двата подтипа в продължение на по-дълъг период от време. Мисля, че такива по-дългосрочни изследвания досега не са правени за нашата страна.

Оценявам изключително високо направената генетична характеристика на доказаните респираторно-синцитиални вируси. Извършен е филогенетичен анализ на гена на вирусния G-протеин, както и анализ на аминокиселинния състав във втория хипервариабилен регион на този белтък. Установено е, че е налице натрупване на аминокиселинни промени, което заедно с високото ниво на генетична вариабилност е в основата на ежегодните епидемични взривове, предизвикани от РСВ. Смятам, че данните, получени в този дисертационен труд, трябва да станат научният мотив за установяване на редовен, целогодишен, институционализиран надзор на инфекциите с респираторно-синцитиален вирус в нашата страна.

Третата обособена част на резултатите е за риновирусите. Макар и кратка, тя е изключително приносна, защото мисля, че това е първо проучване за циркулацията на риновируси у нас. Изследвани са пробите на 610-те деца, подбрани на възрастов принцип. Доказана е циркулацията на тези вируси в нашата страна. Установено е, че за разлика от респираторно-синцитиалната вирусна инфекция, която преобладава при кърмачета и съвсем малки деца, риновирусната инфекция е по-характерна за възрастта на 5-годишните. Риновирусите са много интересен патоген, макар и подценяван заради леката симптоматика на инфекциите, които причинява. Има публикации, посветени на взаимовръзката между тежка инфекция с респираторно-синцитиален вирус в ранна кърмаческа възраст и риновирусна инфекция в по-късна детска възраст - при такива деца се наблюдава отключване на астма с по-голяма честота. Добре би било изследвания в тази насока да бъдат подкрепени, да обхванат целогодишни периоди, всички възрастови групи и анамнестични данни за минали респираторни инфекции.

Добре би било този тип изследвания да бъдат подкрепени, да обхванат целогодишни периоди и всички възрастови групи.

Изводи и приноси на дисертационния труд

Въз основа на получените резултати са формулирани **изводите**, с които съм напълно съгласна.

Съгласна съм и с направената от автора справка за **приносите**. Сред тях трябва да се изтъкнат:

- Проучената генетична и антигенна характеристика на циркулиращите в България грипни вируси през сезони 2014/2015 и 2015/2016;
- Извършеният анализ на аминокиселинните последователности в молекулите на хемаглутинаина, невраминидазата и на някои вътрешни белтъци на грипните вируси, циркулиращи в страната през тези два сезона;
- Изследването на чувствителността на изолираните грипни вируси към оселтамивир;

- Молекулярно-епидемиологичното охарактеризиране и анализът на аминокиселинните последователности в G-протеина на циркулиращите през двата сезона респираторно-синцитиални вируси;
- Доказването на разпространението на риновирусите в нашата страна.

Публикации във връзка с дисертацията

Във връзка с разработването на дисертацията са публикувани 8 статии: в две от тях дисертантът е пръв автор, в 2 е втори, в 3 – 3-ти и в една – 5-ти. В едната статия, където дисертантът е първи автор, се съобщават резултатите от проучването на девет различни вирусни патогена в етиологията на острите респираторни заболявания при деца под 5-годишна възраст като е установена водещата роля на грипните вируси, респираторно-синцитиалния вирус и риновирусите. Другата статия, в която е първи автор, е посветена на ролята на респираторно-синцитиалния вирус в инфекциозната патология при децата под 5-годишна възраст през двата проучвани сезона.

Общият импакт-фактор на публикациите, в които дисертантът е един от участниците в авторския колектив, е 3,052 [2,885 (*Infection, Genetics and Evolution*, 5-ти автор) + 0,167 (*ASRJETS*, 2-ри автор)].

Резултати от експерименталната част на дисертацията са представяни като постери или доклади на 2 чуждестранни и 17 национални научни форума. В 5 от тях докторантът е пръв автор.

Оформяне на дисертационния труд

Представеният ръкопис се състои от 280 страници и следва традиционната схема на изложение: увод – 2 стр., литературен обзор – 66 стр. (представляващи заедно с увода около $\frac{1}{4}$ от дисертацията) собствени изследвания – 185 стр., състоящи се от: цел и задачи – 2 стр., материали и методи – 22 стр., резултати и обсъждане – 96 стр., изводи – 3 стр., декларация за оригиналност (приноси) – 1 стр., приложения – 61 стр. Представен е и списък на научните публикации и участия на автора – 3 стр., а списъкът на цитираната литература е на 18 стр. и обхваща 326 източника, от които 20 на кирилица.

Съответствие с изискванията на ЗРАСРБ, Наредбата за приложението му и с Правилника за прилагането на ЗРАСРБ на НЦЗПБ:

Критерий	Съответствие
Образователно-квалификационна степен “магистър”	Да, магистър по молекулярна биология със специализация по вирусология от Софийски университет “Св. Кл. Охридски”
Отчислен с право на защита	Да, с решение на Научния съвет на НЦЗПБ от 15.06.2017 г.
Оригинални научни приноси	Да
Задълбочени теоретични знания	Да
Способност за самостоятелни научни изследвания	Да
Вид и обем, съответстващи на Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на НЦЗПБ	Да
Основната част от резултатите да бъдат публикувани в национални и международни списания	Да
Поне 2 публикации в научни списания	Да, 8 публикации Общ <i>IF</i> на публикациите 3,052
Поне едно участие в научен форум	Да, 19 участия

Оформяне на автореферата

Авторефератът е в обем 54 стр., съответства на изискванията и отразява в съкратена форма съдържанието и основните постижения и приноси на дисертацията.

Лични впечатления от дисертанта

Познавам Ирина Георгиева още от студентските ѝ години в Биологическия факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски”, от 2003 г. Още тогава ми направи впечатление с любознателността си и сериозното отношение, с постоянството и прецизността на работата си. Тя се изгради като много мотивиран млад учен, който влага мисъл и дълбочина във всяко свое начинание. Притежава устрем и въодушевление при изпълнение на задачите, с усет към изпипване на детайла. Убедена съм, че има дълбоко вкоренени навици за изчерпателно търсене на информация по зададен проблем, за намиране на подходящия методичен подход, за коректна обработка на получените резултати. Смятам, че представеният дисертационен труд е ярко доказателство за тези мои твърдения.

Заклучение

Смятам, че дисертационният труд на Ирина Любенова Георгиева съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България, на Правилника за прилагането му и на съответния Правилник на Националния център по заразни и паразитни болести. Дисертационният труд показва, че докторантката притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения и демонстрира способност за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Убедено давам своята положителна оценка и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен “доктор” на Ирина Любенова

Георгиева в област на висше образование 4. Природни науки, професионално направление 4.3. “Биологични науки” по научна специалност “Вирусология”.

София, 25 юли 2017 г.

Рецензент:



доц. д-р Любомира Николаева-Гломб