

РЕЦЕНЗИЯ

от доцент, д-р Стоян Ангелов Шишков –
ръководител на Лаборатория „Вирусология“, Биологически факултет,
Софийски университет „Св. Кл. Охридски“

относно дисертационния труд 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 г. ”**

на Ирина Любенова Георгиева, докторант на самостоятелна подготовка
с научен ръководител: проф. д-р Нели Корсун, дмн

за присъждане на ОНС “Доктор“

Област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика,
Професионално направление 4.3. Биологически науки, Научна специалност Вирусология

Представеният дисертационен труд третира един от най-актуалните проблеми на медицинската вирусология в световен мащаб. Обект са острите респираторни заболявания (ОРЗ), предизвикани както от грипни вируси, като най-значим етиологичен фактор, така и от респираторно-синцитиалния вирус (РСВ) и риновируси. Включването на последните в изследването е много находчиво с оглед на обхващането на по-голям брой случаи на ОРЗ, регистрирани в страната през сезони 2014/2015 г. и 2015/2016 г.

Въпреки успехите в терапията и профилактиката на грипните инфекции, те продължават да предизвикват огромен брой заболявания повсеместно, като не малка част от тях протичат тежко, а приблизително 0.09% от регистрираните завършват летално.

Инфекциите, които причинява респираторно-синцитиалният вирус, представляват проблем за новородени, малки деца и имунокомпрометирани пациенти. Риновирусите, макар и предизвикващи леко протичащи заболявания, проявяват висока вирулентност и създават медико-социални проблеми. Заболеваемостта, предизвикана от разглежданите в дисертацията респираторни

вируси, има и значим негативен ефект върху икономиката на страната и поражда социални и семейни проблеми.

Изучаването на разпространението и генетичното охарактеризиране на тези вирусите предоставя важна биомониторингова информация за медицинските специалисти и фармацевтичните компании. Тя трябва да се използва за провеждането на адекватно лечение и предприемане на подходящи превантивни мерки. Последното касае особено разработването на подходящи противогрипни ваксини за приложение в страната и региона.

Представеният ми дисертационен труд е написан на 280 страници съгласно общоприети стандарти. Съдържа увод, литературен обзор, цели и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, обща дискусия, изводи, научни приноси, използвани литературни източници, приложения, списъци на научните публикации и на участията в научни форуми на дисертантката и списък с използваните съкращения.

В литературния си обзор (67 страници, онагледен е с 4 таблици и 12 фигури докторантката е отразила изчерпателно достъпната научна информация по разработваната тематика. Прави впечатление удачното излагане по сходен начин на световните научни данни за трите изследвани групи вирусите.

С оглед на значимостта на грипните вируси по-голямата част на раздела отразява детайлно тяхната класификация и архитектура; антигенна структура и жизнен цикъл на молекулярно равнище. Отлично впечатление прави информацията за установените промени в гените за вирусните белтъци, които са причина за антигенното разнообразие на грипните вируси, затрудняващо овладяването на инфекциите.

Изчерпателно са изложени клиниката и възможностите за тяхната терапия и профилактика. Дисертантката правилно обръща внимание и на значението на установяване на чувствителността на грипните щамове към прилаганите в практиката инхибиторите, като един от подходите за оптимизиране на терапията. Представени са в сравнителен аспект съвременните диагностични директни и индиректни методи за идентифициране и типизиране на тези вируси. Описана е детайлно държавната система за извършване на сентинелен надзор на ОРЗ, вкл. и на грипните заболявания. Добро попадение е включването в обзора на официалните определения за острите респираторни заболявания (ОРЗ),

грипоподобните заболявания (ГПЗ) и тежките грипоподобните заболявания (ТГПЗ) на Световната здравна организация.

Представени са достатъчни по обем и съдържание данни за биологичните и патогенните характеристики на РСВ и риновирусите. Очертани са възможностите за идентификация, лечение и превенция на предизвикваните от тях инфекции.

Предложеният исторически преглед на изследванията на остри респираторни заболявания и причиняващите ги вируси в страната подсказват, че г-жа Георгиева много добре познава работата и успехите в това направление. Те са отлична отправна база за разработването на дисертационния труд.

Отлично познавайки българската и световната литература по проблема (цитирани са 326 литературни източници, от тях 20 са на български език), дисертантката и нейният научен ръководител са определили амбициозната цел на тезата - проучване на разпространението на грипните вируси, респираторно-синцитиалния вирус и риновирусите в България през сезони 2014/2015 г. и 2015/2016 г., съчетано с антигенно и генетично анализиране на доказаните вируси.

Поставени са 7 основни задачи. Те са детайлизирани и обхващат необходимите проучвания за постигането на целта.

Подбраните съвременни методи очертават научните способности и вещината на г-жа Георгиева (22 стр.). За постигане на целта са приложени следните молекулярно-биологични и серологични методи: екстакционен метод за изолиране на вирусни РНК; конвенционален RT-PCR и Real time RT-PCR за диагностициране и субтипизиране на грипни вируси и РСВ, за детекция на мутация H275Y, определяща резистентност на грипните вируси към оселтамивир, за диагностициране на риновируси; секвениране на гени на грипни вируси и РСВ; филогенетичен анализ на грипни вируси и РСВ чрез утвърдени в практиката софтуерни продукти; аминокиселинен анализ на грипните белтъци; реакция на задръжка на хемаглутинация (РЗХА) за антигенно характеризиране на грипните изолати, реакция хемаглутинация (РХА) за определяне на хемаглутинационен титър; флуоресцентен метод за определяне на неврамнидазната активност и чувствителността към неврамнидазни инхибитори и клетъчно култивиране на грипни вируси.

Прави впечатление големият брой изследвани назо-фарингиални проби - 1985 за изолиране на грипни вируси. От тях са подбрани 610 за изолиране на РСВ и риновируси.

Полученият огромен брой резултатите и обсъждането им са представени в стегнат научен стил на 92 страници според проучваните вируси аналогично на литературната справка. Илюстрирани са оптимално с 39 таблици, 12 фигури, както и с 18 приложения, съдържащи установения аминокиселинен състав на протеини на изследваните грипни вируси и на респираторно-синцитиалния вирус.

Първоначално е описана установената епидемиологична картина на грипните заболявания - седмичната динамика, географско и възрастово разпределение, установените циркулиращите типове вируси. Доказаният доминиращ грипен вирус е от тип А и през двата изследвани сезони. Доказано е, че през сезон 2014/2015 той е от тип А(Н3N2), докато през втория сезон такъв е пандемичният тип А(Н1N1),pdm09. Извършен е генетичен анализ на циркулиращите доминиращи вируси след изолирането им в клетъчна линия МВСК-SIATI. Посредством РЗХА е доказана антигенно сходство на изолатите от субтип А(Н1N1),pdm09 с ваксиналния вирус А/California/7/2009 както и срещу референтни за субтипа вируси.

Антигенният и филогенетичният анализ са извършени в Световния център по грипа в Лондон и Атланта и е осъществено секвениране на гените на хемаглутинаина и невраминидазата. Конструирани са съответните филогенетични дървета. На базата на секвенции на гена за хемаглутинин (НА) българските изолати се отнасят към най-разпространената в световен мащаб и в Европа субгрупа 6В. Секвенционният анализ на гена за невраминидаза (NA) потвърждава тази принадлежност. Данните показват, че идентифицираните вируси от този подтип не са претърпели реасортация.

Дисертантката провежда и аминокиселинен анализ на молекулите НА и NA на грипни вируси тип А(Н1N1)pdm09. Открити са общо 12 замени в НА и 13 замени в NA на българските вируси, доказани през сезон 2014/2015 г. в сравнение с ваксиналния вирус А/California/7/2009. През следващия сезон откритите замени са съответно 14 в НА и 15 в NA. За другия циркулиращ подтип А(Н3N2) е установен антигенен дрифт, който предопределя промяна в антигенни характеристики, рефлектираща върху аглутинационните свойства на вируса.

Изследвано е антигенно сходство на грипните вируси тип В и от двете линии с ваксиналните шамове. Важно е да се отбележи доказаното генетично несъответствие между тип В, линия Yamagata, който циркулира през първия изследван сезон и

вакциналният за сезона щам В/Massachusetts/02/2012. Подобни данните са получени и при сравнението на циркулиращите през сезон 2015/16 г. вируси от тип В, линия Victoria и вакциналният вирус В/Brisbane/60/2008. Тези данни на докторантката имат потвърдителен характер по отношение на ежегодната промяна на доминиращата линия при грипните вируси тип В в световен мащаб. Дисертационният труд включва и анализ на еволюционните промени в гена за НА на вирусите от тип А(Н1N1 и Н3N2) и тип В, през последните години.

Резултати са обогатени и с данни за чувствителността на изолираните грипни вируси от двата типа към прилагането невраминидазните инхибитори oseltamivir и zanamivir. Практиката показва, че терапията с вирусни инхибиторите се последва от селектирането на резистентни щамове по редица причини. Затова е важно да се откриват на време такива мутанти. Отчетените резултати очертават липсата през изследваните сезони на резистентни към тези инхибитори циркулиращи щамове.

Изследването на циркулацията на респираторно-синцитиалния вирус установява едновременна циркулация на двата му субтипа - РСВ-А и РСВ-В. През сезон 2014/2015 г. слабо доминира субтип А, докато през следващия сезон превес имат вирусите от субтип В. Г-жа Георгиева изказва предположението, че тази смяна на доминираща подгрупа се дължи на формирането на популационен имунитет срещу подгрупата, която е доминирала през предходния сезон. Това предположение се подкрепя от наличните литературни данни. Доказана е ко-инфекция от двата субтипа в няколко проби.

Определена е и възрастовата и седмичната динамика заболяемостта в резултат на инфектиране с респираторно-синцитиалния вирус. Получените данните за по-висока заболяемост при момчетата потвърждават литературните данни за този феномен.

Изследванията на докторантката се разпростират и върху секвенирането с последващ филогенетичен анализ на доказаните изолирани РСВ на базата на гена, отговорен за синтеза на повърхностния гликопротеин G. Извършеният аминокиселинен анализ на втория хиперварабилен участък на гликопротеина (HVR2) отчита натрупване на промени. Г-жа Георгиева изказва вярното предположение, че отчетените промени както и силно застъпеното гликозилиране на протеина представляват механизъм за бягство на вируса от хуморалния имунен отговор на гостоприемника и представляват сериозна предпоставка за възникване на епидемични взривове и за реинфекции на индивидите.

Третата част на раздела отразява проведеното проучване на циркулацията на риновируси. Установено е протичането на риновирусна инфекция в 8% от изследваните случаи. При някои от тях доказано се касае за ко-инфекция с друг или други респираторни вируси – респираторно-синцитиален вирус, аденовирус или парагрипен вирус 3. Данните за доказаните респираторни вируси в проби, взети от амбулаторни и хоспитализирани деца, находчиво са обобщени в табличен вид. Очертани са също възрастовата и седмичната динамика на заболяемостта. Тези данни потвърждават данните от подобни изследвания, проведени в други държави.

Отличната научна осведоменост на г-жа Георгиева й дава възможност да дискутира много акуратно представените в дисертационния труд разнообразни резултати като ги съпоставя с достъпните литературни данни (раздел „Обща дискусия“, 5 стр.).

Съобразно получените данни, представени в дисертацията, са формулирани логически обосновани седем основни изводи (2 стр.), с които съм съгласен.

Декларацията за оригиналност отразява достоверно личните приносите на дисертантката за разширяване и задълбочаване на медико-биологичните изследвания на острите респираторни заболявания в страната. Те отразяват и осъществените за първи път в страната проучвания на аминокиселинната последователност на вирионните протеини на циркулиращите грипни вируси; на чувствителността на грипните вируси A(H1N1)pdm09 към невраминидазния инхибитор оселтамивир с помощта на генотипен метод; на молекулярно-епидемиологичното и аминокиселинното характеризиране на циркулиращите респираторно-синцитиални вируси. Също за първи път са получени данни за разпространението на риновирусите.

Представеният автореферат е оформен надлежно съобразно дисертационния труд и отговаря на очакванията на специалистите.


Научните резултати и изводи на г-жа Георгиева са подкрепени от убедителен фактологичен материал и публикации. По темата на дисертацията си тя е представила 8 научни публикации, като в 2 от тях е първи автор. Три от статиите са публикувани в списания с импакт фактор: Compt Rend Acad Bulg Sci., IF 0.23; American Scientific Research Journal for Engineering, Technology and Sciences, IF 0.167 и Infection, Genetics and

Evolution, IF 2.591. Общият импакт фактор е 3,052. Постигнатите резултатите са докладвани на 19 престижни научни форуми, от които 3 са международни.

В заключение, дисертацията на г-жа **Ирина Любенова Георгиева** е свързана с актуални за научните среди и обществото теми, отлично структурирана е, издържана е в методологично отношение. Написана е прецизно и стегнато, а данните са интерпретирани с вещина. Тя предоставя съществени приноси с научен и приложен характер. Дисертационният трудът напълно удовлетворява законовите критерии за получаване на образователната и научна степен "Доктор", поради което му давам **положителна оценка**.

14.09.2017 г.

Подпис:


/Доцент, д-р С. А. Шишков/