

До Научно жури
на НЦЗПБ
заповед №232/16.06.2017

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Росица Йотова Коцева, дм - член на научното жури съгласно заповед №232/ 16.06.2017 на Директора на НЦЗПБ

Относно дисертационен труд на тема: **„ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО И ГЕНЕТИЧНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ГРИПНИ ВИРУСИ, РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЕН ВИРУС И РИНОВИРУСИ В БЪЛГАРИЯ ПРЕЗ СЕЗОНИ 2014/ 2015 и 2015/2016г.“**

За получаване на образователна и научна степен **„ДОКТОР“** в област на висшето образование 4. «Природни науки, математика и информатика», професионално направление 4.3. "Биологични науки", научна специалност „Вирусология ” на докторанта **Ирина Любенова Георгиева**
Научен ръководител: проф. д-р Н. Корсун, дмн

Настоящото становище се отнася за свободна докторантура, разработвана от Ирина Любенова Георгиева и нейния научен ръководител проф. д-р Нели Корсун в Националната лаборатория по “Грип и ОРЗ” на Отдела по вирусология на НЦЗПБ в периода 2014-2016г. Запознаването ми с резултатите от работата по докторантурата и при двата етапа на нейното представяне пред Научния съвет на Отдела по вирусология (на етап 60% от разработката и при вътрешната защита на завършения труд), улесниха работата ми при написване на настоящото становище.

Няма съмнение, че темата на дисертацията е сполучливо избрана. Проблемът грип остава сред приоритетните проблеми в световен мащаб, особено с появата на нов пандемичен вирус през 2009г. и очакванията за възможни нови изненади на вирусите поради голямата им изменчивост. Този проблем е и ще продължи да бъде водещ при научно-изследователската работа на Националната лаборатория по грип и ОРЗ на НЦЗПБ, а включването на проучванията на другите два вида респираторни вируси в темата на дисертацията - РСВ и риновирусите, обогатява работата по докторантурата. Както е известно, в близката практика на Националната лаборатория по “Грип и ОРЗ” след 2000г. се полагат основите на използването на молекулярно-диагностичните методи с разработването и защитата на две дисертации: едната при грипните вируси (Т.Хаджиолова през 2006г.) и другата относно разпространението на пандемичния грипен вирус от 2009г. и РСВ (от д-р Сл.Павлова през 2015г.). **Трябва да се подчертае, че разработването на настоящата дисертация разширява и надгражда нивото на методологията в Националната лаборатория чрез използване не само на молекулярно-диагностичните, но въвежда използването на молекулярно-генетичните методи при анализа на тези вируси.**

От дисертационния труд се вижда, че Ирина Любенова Георгиева като свободен докторант по докторската програма, е усвоила теоретичните и практични знания по вирусология и е проучила разпространението и характеристиките на грипните вируси, респираторно-синцитиалния вирус и риновирусите през два епидемични за грипа сезона (2014/2015г. и 2015/2016г.).

Дисертационният труд на Ирина Георгиева обхваща общо 280 страници, написан е много компетентно, на много добър научен език. Разпределението на разделите на дисертацията е според изискванията на Закона и Правилника на НЦЗПБ.

Литературният обзор, в обем от 78 стр., представлява завършен преглед на литературните данни по трите проблема - грип, РСВ и риновируси. Естествено е съотношението на литературните данни за трите групи вируси (тези за грипните вируси са приоритетни и са в обем от 36 стр., за РСВ - 26 стр. и за риновируси-16 стр.) Обзорът показва много добрата литературна осведоменост на докторанта. От посочените литературни източници става ясно, че са използвани най-новите литературни данни (след 2000г. в приблизително 90%). В литературния обзор, базирайки се на 325 литературни източници (19 на кирилица и 306 на латиница), докторантката прави задълбочен анализ на литературните данни. Направена е детайлна характеристика на вирусите, включваща въпросите на съвременната класификация (вкл.новите генетични групи и субгрупи на грипните вируси), структура, репликация, съвременни методи за диагностика, клиника, възможности за профилактика и лечение на заболяванията.

Въз основа на анализа от литературния обзор е изведена целта на настоящата дисертация: **проучване разпространението и генетичните характеристики на грипните вируси, респираторно-синцитиален вирус и риновирусите у нас**, като са формулирани основните задачи и подзадачи при проучванията: 4 основни задачи с 6 подзадачи по проблема грип, 2 задачи с 5 подзадачи – РСВ и 1 задача с 2 подзадачи.– риновирусите

Раздел „Материали и методи”, в обем от 20 стр. впечатлява с 1/. Огромния брой изследвани материали: 1985 проби за грипни вируси през двата сезона, по 610 - за РСВ и риновируси. 2/. Богат комплекс от молекулярни методи: Real Time RT PCR е прилаган нашироко не само за доказване на грипните вируси, но и на RSV и риновирусите; за детекция на мутацията, отговорна за резистентност на грипните вируси към озелтамивир; за разграничаване на РСВ група А от група В. 3/. Умелото боравене на авторите със секвенциите на гените на изолираните щамове за филогенетичен анализ на циркулиращите у нас щамове (грипни и РСВ) 4/. Използваните при изследванията стандартизирани фирмени китове; модерната апаратура и направената статистическата обработка като гаранция за коректността на получените резултати. 5/. Много добрата методическа подготовка на докторантката и нейния ръководител.

Разделът **“Резултати и Обсъждане”** се простира на 91 страници, разпределени както следва: 75 стр- Грипни вируси, 10- РСВ и 4 –риновируси. Разделът е онагледен общо с 30 таблици, 41 фигури и 18 приложения. Обсъждането на собствените резултати е убедително и се базира на библиографската справка и на участието на Ирина Георгиева в написването на 8 публикации (2– в международни списания). На 2 публикации Ирина Георгиева е първи автор и на 2 - втори. Получените резултати по време на разработката са представяни от дисертантката и нейния ръководител с доклади и постери в 19 национални и международни конгреса. Оригиналността на извършените изследвания е оценена с отпечатването на 2 статии в престижни международни списания с **общ импакт фактор 2, 758.**

I. Проблем Грип.. Разделът е много внушителен с многообразието на разработените задачи и богатството на получените резултати за двата епидемични сезона -2014/2015 и 2015/2016г. Резултатите по проблема грип като приоритетни са илюстрирани с 27 таблици, 35 фигури и 17 приложения. Тези резултати се отнасят за следните направления:

1. Анализ на циркулацията на грипните вируси. При изследваните с Real Time RT-PCR на 858 проби през първия епидемичен сезон от пациенти с грипоподобни заболявания са доказани 216 положителни детекции за грипни вируси (25%), а при 1127 проби през втория сезон - 318 положителни детекции (28%). Докторантката

доказва умерена активност на грипните вируси с едновременно циркулация на грипни вируси от двата подтипа на тип А и доминиране на подтип А(Н3N2) в 63% през първия сезон срещу 10% през втория и на пандемичния подтип А(Н1N1)pdm09 в 66% през втория сезон срещу 14% през първия. За грипния вирус тип В са показани почти еднакви стойности на разпространение през двата сезона (23% през първия и 24% през втория сезон). В допълнение на картината за циркулация на грипните вируси през двата епидемични сезона у нас в дисертацията са представени данни за разпространението на грипните вируси от различни региони на страната, седмична динамика за циркулацията на вирусите, клинична активност на грипните вируси, разпределение на положителните пациенти по области и лечебни заведения и възрастово разпределение на пациентите с доказани грипни вируси.

2. Антигенен анализ на изолираните щамове по РЗХА. Извършеният сполучлив подбор на положителни проби в Real Time RT-PCR прави възможна изолацията на щамове от двата подтипа на тип А и на тип В и през двата сезона и изпращането им за потвърждение и детайлен анализ в Световния център по грипа в Лондон. Изпратените 42 изолата на грипните вируси на тип А и В през първия сезон и 81- през втория, утвърждават имиджа на Националната лаборатория пред Световния център. Ниските хемаглутинационни титри на щамовете и променената чувствителност към видовете еритроцити, затрудняват идентификацията по РЗХА на всички изолати. Въпреки това е показан антигенният анализ по РЗХА на 3 щамове грипни вируси А(Н1N1)pdm09 през първия сезон и 57 щамове през втория, 3 щамове на грипни вируси А(Н3N2) през първия сезон, 5 щамове на грипните вируси тип В (линия ВYamagata) през първия сезон и 18 щамове от тип В (линия В/Victoria) през втория. на изолатите с богат набор от еталонни щамове и принадлежността им към новите генетични групи и субгрупи, а също така антигенното родство на българските изолати с ваксиналните щамове.

3. Определяне чувствителността на изолираните щамове към невраминидазните инхибитори с Real Time RT-PCR. Този метод е приложен за откриване на мутацията Н275Y, отговорна за резистентността на грипните вируси към противогрипния препарат oseltamivir, като са изследвани 21 български изолата от субтип А(Н1N1)pdm09 от сезон 2014/2015г. и 210 - от сезон 2015/2016 г. Не са установени вируси с тази мутация, което е важно за клиничната практика. Нормалната чувствителност на циркулиращите у нас грипни вируси към невраминидазните инхибитори е потвърдена с още един тест-изследване чувствителността на невраминидазата с фенотипния MUNANA тест при 61 грипни изолата А(Н1N1)pdm09, 32 - А(Н3N2) и 24 - тип В.

4. Генетичните проучвания на грипните вируси от двата подтипа на тип А и тип В. Разделът "Резултати и обсъждане" по проблем Грип особено силно впечатлява с представените данни от успешното секвениране на отбрани образци български щамове в Световния център по грипа в Лондон и умелото боравене на докторантката с депозираните секвенции в web-сайта GISAID за филогенетичен анализ на гените на епидемичните щамове и сравнението им с други еталони и с ваксиналните за сезона щамове. Построените дендограми позволяват на докторантката да проследи преди всичко еволюцията на гените на HA и NA на българските щамове и да се определи принадлежността им не само към генетичните групи и субгрупи, но и към новите клейдове и субклейдове според класификацията на СЗО. Проследени са също аминокиселинните замени и местата на гликозилиране на изолатите - някои от тях характерни за генетичната група и субгрупа, а други специфични само за българските изолати. Независимо, че българските щамове следват антигенната и генна структура на еталоните, направеният филогенетичен анализ позволява доказването и на специфични аминокиселинни замени, отговорни за отличаването на циркулиращите щамове от тип А и В у нас от ваксиналните.

Дисертантката прилага филогенетичен анализ в различни направления, а именно:

а/. Филогенетичен анализ на гените на HA и NA на българските щамове. През сезон 2014/2015г. този анализ се отнася за 3 щамове от субтип A(H1N1)pdm09, 15 щамове на подтип A(H3N2) и 5 щамове от тип В(Yamagata), а през сезон 2015/2016г. - за 57 щамове от субтип A(H1N1)pdm09, 3 щамове на подтип A(H3N2) и 20 щамове от тип В(Victoria).. Чрез него се показва следното:

- ✓ Потвърждава се стабилността на изолатите от пандемичния подтип A(H1N1)pdm09, наблюдавана за щамове в света и Европа. Независимо, че през втория сезон се наблюдават известни антигенни промени на изолатите и през двата сезона щамове показват сродство с ваксиналния щам и принадлежност към генетична група 6В.
- ✓ Българските щамове от субтип A(H3N2) показват по-голямо генетично разнообразие. Изолатите от първия сезон принадлежат към субклейдовете 3С.2а, 3С.2 и 3С.б и се различават от ваксиналния щам (субклейд 3С.1). Щамове от втория сезон показват принадлежност към генетичен субклейд 3С.2а и са близки с ваксиналния щам.
- ✓ Вирусите от тип В (В/Yamagata) от първи сезон се отнасят към клейд 3 и показват различия от ваксиналния щам, принадлежащ към клейд 2.. Изолатът от тип В(Victoria) от втори сезон преинадлежи към клейд 1А, към който се отнася и ваксиналния щам.

б/. Генетични проучвания за проследяване еволюцията на гена на HA на българските щамове от тип А и В. Тези проучвания се отнасят за 32 български изолата от подтип A(H1N1)pdm09 в продължение на 6 епидемични сезона (от появата на вируса в сезон 2009/2010г. до 2015/2016г.), както и за 41 български секвенции на гена на HA на грипните вируси подтип A(H3N2) (от 2011/2012 до 2015/2016 г.). Потвърдена е по-бавната еволюция на щамове от първия подтип от генетична група 1 до 6. и по-голямото генетично изменение на щамове от втория подтип (принадлежността им към различни генетични групи и подгрупи (3С.3, 3С.2, 3С.2а и 3С.3б.). Проследена е еволюцията на гена на HA и на 11 български секвенции на грипни вируси от тип В, линия В/ Ямагата от сезон 2012/2013 до 2014/15. Доказан е шифтът на българските щамове от клейд 2 в клейд 3, което се наблюдава при вирусите в цял свят.

в/. Проследени са аминокиселинните замени в гените на българските щамове. При щамове от подтип A/H3N2/ през сезон 2014/2015 са наблюдавани множество генетични промени в повече от един антигенен участък, доказателство за антигенния дрейф. За вирусите от този подтип се наблюдава и нарастване на броя на участъците за гликозилиране, което обяснява по-бързата еволюция на щамове от този подтип и може би това се проявява също и с вариабилната аглутинация на различните видове еритроцити..

г/. Мутации на вътрешните гени. Това е показано при 3 български секвенции от субтип A(H1N1)pdm09, като най-вероятно дължащи се на адаптацията на щамове, съдържащи птичи гени към човешкия организъм.

д/. Мутации, отговорни за резистентността към M2 инхибитори (адаманти). показващи резистентността на българските щамове от тип А към този инхибитор.

II. ПРОБЛЕМ РСВ.

Изследванията за доказване разпространението на РСВ са извършени с Real Time RT-PCR и допълват картината на циркулация на респираторните вируси у нас през двата посочени сезона. Резултатите и обсъждането по проблема РСВ са в обем от 10 страници, включващи 1 таблица и 4 фигури.. Анализът за разпространение на РСВ се

отнася за проби на деца на възраст до 5г. преимуществено хоспитализирани (в 81,8%), Изследванията по този проблем са в следните насоки:

1. Детекция на РСВ и анализ на положителните проби

Направеният сполучлив подбор на 610 проби на деца до 5г. с ОРЗ е позволило на дисертантката да улови циркулацията на RSV в относително висок процент - при общо 157 проби (26%). Доказана е почти еднаква честота на положителните детекции за РСВ през двата епидемични за грипа сезона - 28,6% през първия сезон и 24.2% през втория, с което докторантката потвърждава литературните данни за съвпаданието на епидемиите от този вирус с грипните епидемии.

Новост при изследването с Real Time RT-PCR са данните за разграничаване циркулацията на група А от група В на РСВ. От 157 положителни проби в 35% са детекциите за РСВ-група А, 51%-за РСВ-група В и в 5%-смесени за двете подгрупи, като РСВ- група А преобладава през първия сезон и се доказва в 53%, докато през втория – РСВ - група В и се доказва в 31,8%. Анализът по възрастови групи потвърждава факта, че докато грипните вируси се доказват при по-големите деца 48-59 м.(в 32%), РСВ се доказва главно при кърмачета под 6 мес. (в 38,9%) и 7-11 мес (в 35,3%), а по клинични диагнози РСВ се доказва в 48% от случаите с бронхиолит и 38% с пневмония.

2. Генетична характеристика на РСВ

За първи път у нас са представени данни за генетичната характеристика на този вирус. Филогенетичният анализ на 46 щамове на РСВ е направен на базата на гена G. Определена е генната принадлежност на българските щамове от група А и група В и изясняване на техните филогенетични взаимоотношения с други, циркулиращи по света РСВ щамове. В анализа са включени 8 секвенции на български РСВ-А от сезон 2014/2015 г. и 13 секвенции на български РСВ-А от сезон 2015/2016 г. В анализа са включени също 3 секвенции на български РСВ-В от сезон 2014/2015 г. и 22 секвенции на български РСВ-В от сезон 2015/2016 г. В дендограмите за сравнение са включени секвенции на вируси, доказани и в други страни..

Показана е принадлежността на българските РСВ от група А и група В и от двата сезона към циркулиращите в света еталонни щамове. Изолатите от група А от двата сезона се отнасят към генотип ON1, идентифициран за първи път в Онтарио, Канада през 2010 г., който е вариант на геногрупа NA1, към който генотип се отнасят повечето съвременни РСВ-А вируси. Болшинството български изолати от група В и от двата сезона принадлежат към геногрупа ВА9, а само един към ВА10. Независимо от генетичните прилики със световните еталони дисертантката открива в българските щамове аминокиселинни замени и промяна на участъците на гликозилиране, което ги отличава от прототипните представители, което показва необходимостта от определяне на генетичната характеристика на изолираните у нас щамове на този вирус и връзката им с клиниката на заболяванията, причинени от него..

III. ПРОБЛЕМ РИНОВИРУСИ

Резултатите по този проблем, отразени в дисертацията на 4 страници и илюстриран с 2 таблици и 2 фигури не изчерпват напълно проблема за разпространението и генетичните характеристики на риновирусите у нас. Те обаче показват възможностите на Националната лаборатория за използване на молекулярните методи при проучване разпространението не само на грипните, но и на други вируси на ОРЗ, включително и на малко известните у нас риновируси. При изследването с Real Time RT-PCR е използвана същата група деца до 5г. възраст - общо 610 проби, от които 217- от сезон 2014/2015 и 393 - от сезон 2015/16. От изследваните проби 81,8% са на хоспитализирани лица, а 18.2%-амбулаторни. Риновирусна нуклеинова киселина е

открита само в ограничен брой проби - 48 проби (8%), като в някои случаи става дума за ко-инфекция с друг респираторен вирус. По-голям брой доказани за риновируси са сред амбулаторните случаи, което е в подкрепа на литературните данни за по-лекото протичане на риновирусната инфекция. Направени са опити за седмично разпределение на положителните детекции и за възрастово разпределение, което показва че за разлика от РСВ риновирусите се доказват при по-големите деца-4-5 годишни, което се съобщава и при други автори. Проучванията по проблем риновируси у нас без съмнение ще бъдат продължени и задълбочени в бъдещата работа на лабораторията..

Настоящият труд надхвърля по обем и постижения изискванията на дисертация за научна и образователна степен "Доктор" и може да се защитава само с резултатите за разпространение и генетични характеристики на грипните вируси. Сполучливият подбор на проби при малките деца, получени по време на сезонната грипна заболяемост и умелото използване на молекулярните методи за диагностика и на РСВ и риновирусите, обогатяват работата на докторантката и позволява да се направят полезни за клиничната практика анализи за сезонното разпространение и на тези вируси у нас и за генетичната характеристика на циркулиращите щамове (на РСВ) в сравнение с тези в световен мащаб..

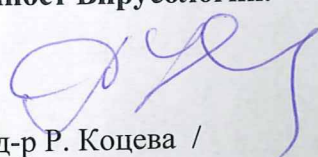
Дисертацията завършва с **сбща дискусия** на получените резултати, следвана от **заклучение, изводи и приноси** в обем от 8 страници, отразяващи реалистично в резюме най-съществените постижения от дисертацията. Приемам напълно 6-те приноси по дисертацията. Нямам забележки по дисертационния труд на представения за защита етап. Направените от мен препоръки при 60% представяне на дисертационния труд, са взети от дисертантката под внимание при окончателното му оформяне..

Считам, че представеният **автореферат** също е оформен съгласно изискванията и отразява обективно резултатите от дисертационния труд.

В заключение, настоящият дисертационен труд е несъмнено принос в изучаване разпространението и генетичните характеристики на грипните вируси, респираторно-синцитиалния вирус и риновирусите у нас през двата сезона (2014/2015 и 2015/2016г.) чрез използване на богат арсенал от съвременни молекулярно-биологични и молекулярно-генетични методи за диагностика. Считам, че трудът отговаря напълно на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България и Правилника за неговото приложение и Правилника на НЦЗПБ, поради което давам положителна оценка на 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 2015/2016г.“** и препоръчвам на уважаемите членове на журито към НЦЗПБ да гласуват за присъждане на научната и образователна степен **„Доктор“** на докторантката Ирина Любенова Георгиева - **по научна специалност Вирусология.**

30.08.2017г.

Доц. д-р Росица Коцева :


/ д-р Р. Коцева /