

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. Ивайло Алексиев Иванов дв

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор”

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Научна специалност: Вирусология

Тема на дисертацията:

**ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО В БЪЛГАРИЯ И ГЕНЕТИЧНИТЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ЧОВЕШКИТЕ МЕТАПНЕВМОВИРУСИ, ПАРАГРИПНИ
ВИРУСИ И БОКАВИРУСИ**

Автор: Ивелина Трифонова Трифонова,
редовен докторант в национална референтна лаборатория "Грип и ОРЗ", Отдел
“Вирусология”, НЦЗПБ

Научен ръководител: проф. д-р Нели Корсун, дмн

Актуалност на проблема.

Острите респираторни инфекции са свързани с висока заболеваемост, значителна смъртност, огромни медицински, икономически и социални разходи. Информацията за досегашните проучвания на парагрипните вируси, човешките метапневмовируси и бокавирусите в страната са непълни. В настоящия дисертационен труд авторът си поставя за задача да проучи тези три групи респираторни вируси, тяхното значение за заболеваемостта в България и генетичните им характеристики с използването на съвременни методи за анализ.

Структура на дисертационния труд.

Дисертацията е структурирана съгласно възприетата форма и е написана на 215 страници със стандартно междуредие (1,5). Документът съдържа: заглавна страница, използвани съкращения - 2 страници, списък на таблици и фигури – 5 страници, съдържание – 3 страници, въведение – 3 страници, литературен обзор – 49 страници, цел и задачи – 2 страници, материали и методи – 24 страници, резултати – 63 страници, обсъждане – 14 страници, изводи и заключение – 2 страници, декларация за оригиналност – 1 страница, библиография – 358 източника написани на 32 страници и приложения – 9 страници, публикации и участия в научни форуми 3 страници.

Литературна осведоменост и оценка на обзорния материал.

Представеният литературен обзор е значителен по обем, добре изгoten и показва задълбочената теоретична осведоменост на автора. Информацията, макар и доста подробна е структурирана добре и последователно се описват характеристиките на всеки от трите патогена. В началото са представени исторически данни за вирусите, обект на настоящия дисертационен труд. Обзорът следва класическата схема с описание на класификация, структура, геномна организация, протеини, репликативен цикъл, генетичното и типовото разнообразие на вирусите, устойчивост на външни условия, съвременни лабораторни методи за изследване и анализ, епидемиология, патогенеза, клинична манифестация, лечение и профилактика и взаимодействия с имунната система.

Информация е добре онагледена с фигури и таблици.

Литературният обзор завършва със справка за предходни проучвания върху респираторните вируси в България, извършени от други автори, повечето от които са работили в Националната референтна лаборатория "Грип и ОРЗ", в която е изпълнена и настоящата дисертация.

Цел и задачи

Целите и задачите, които си поставят за решаване Ивелина Трифонова и нейният научен ръководител са значими и перспективни, предвид амбициозната цел в тази разработка да бъдат включени три отделни вида респираторни вируси, а именно, да се проучи разпространението на човешкия метапневмовирус, парагрипните вируси и бокавирусите в България, тяхното участие при възникване на някои клинични състояния и да се извърши генетичен анализ. Мотивирано са формулирани 7 главни задачи, които определят посоката на изследванията.

Материал и методи

В този раздел се посочва, че за тригодишен период са изследвани 1842 клинични преби от пациенти със симптоми на остро респираторно заболяване в различни региони на страната. Изследвани са предимно носогърлени секрети и по-малък брой материали от други тъкани. Големият брой изследвани преби са събирани през три последователни зимни сезона, от 2016 до 2019 г.

Проучването се основава на доказването на вирусна нуклеинова киселина. Клиничните материали са обработени по начин и с методи, отговарящи на целта и задачите на дисертацията. Те позволяват да се правят достоверни анализи и заключения относно разпространението и основните вирусологични характеристики на изследваните патогени.

Екстракцията на нуклеиновите киселини е извършена със стандартизирани методи. Доказването на метапневмовируси, парагрипни вируси и бокавирусите е извършено с Real-Time RT-PCR, чрез използването на високо чувствителни и специфични праймери и Taqman сонди. Описани са пълните секвенции на праймерите и сондите, както и протоколите за реакционните смеси и режимите на PCR реакциите.

Успоредно с проучването на трите вируса, които са обект на нейната дисертация, Ивелина Трифонова е изследвала клиничните преби и за наличието на други причинители

на респираторни инфекции, включително: грипни вируси, респираторно-синцитиални вируси, риновируси, аденоидни вируси и корона вируси, като за целта е използван multiplex PCR метод с кит, позволяващ доказване на 15 различни респираторни вируса.

След доказване на вирусния причинител е извършено генотипиране, чрез секвениране на гена F на метапневмовирусите и гена VP1 на бокавирусите. Като предварителна стъпка е извършен nested PCR, за амплификация, пречистване и секвенционна реакция на двата вируса, като протоколите и всички други необходими процедури са описани в детайли. Генотипирането е извършено чрез филогенетичен анализ. С помощта на BLAST-search са изтеглени референтни секвенции на отделните геногрупи на изследваните вируси, както и секвенции на представителни вирусни изолати от други страни. За подравняването и филогенетичния анализ е използвана програма MEGA 6.0. Филогенетичният анализ е извършен с алгоритъм Maximum Likelihood, а надеждността на топологията на филогенетичните дървета е оценявана с bootstrap анализ с 1000 повторения, като клъстерите са дефинирани с резултат от bootstrap анализ $\geq 70\%$. С *p*-дистанционния метод в MEGA6.0. е анализирана генетичната отдалеченост на получените секвенции.

Извършен е и статистически анализ за сравняване на възрастта, пола на пациентите, клиничните синдроми и честотата на доказване на отделните вируси.

В дисертацията са използвани голямо разнообразие от молекулярно-биологични методи и биоинформационни програми за анализ. Проведените изследвания са поставени методологично правилно, експериментите са стриктно изведени, което позволява възпроизвежданост на резултатите.

Обсъждане

Обсъждането и дискусията върху резултатите са разпределени на 8 части представени логично и последователно.

В дисертация е анализиран делът на проучваните инфекции в етиологичната структура на острите респираторни заболявания, тяхната сезонност, възрастовото разпределение на инфицираните пациенти, географското и времево разпространение на вирусите-причинители, участието им в развитието на клинични синдроми, в смесени ко-инфекции, както и генетичните им характеристики.

Характеризирана е етиологията на острите респираторни инфекции в България за изследвания период и е установено, че проучваните вируси са със средна честота на разпространение. Географското им разпространение показва, че в две трети от областите на България е доказана инфекция с поне един от тези три патогена, като с най-голям процент те са установени в София. Над 60% от доказаните случаи на инфекции са моноинфекции, което доказва и тяхната етиологична роля в заболяването, като по-често се срещат при най-малките деца (0-4 г.).

Анализът върху сезонността на разпространение показва, че метапневмовирусите по-често се установяват през зимните и пролетни месеци, бокавирусите през есента и

пролетта, а парагрипните вируси тип 1 и 2 циркулират по-често през есента, докато тип 3 през цялата година.

С помощта на Real Time RT-PCR Ивелина Трифонова е извършила генотипиране на циркулиращите в България парагрипни вируси, при това е установено наличието на всички съществуващи 4 типа, като най-разпространен е тип 3. Чрез филогенетичен анализ е установено е, че метапневмовирусите принадлежат към двете големи геногрупи (A и B), като секвенциите от геногрупа A принадлежат към субгрупа A2b, а тези от геногрупа B към субгрупи B1 и B2. Проведеният филогенетичен анализ на VP1 гена на български бокавирусни секвенции показва, че те принадлежат към генотип BoV-1.

Резултатите представени в раздела са онагледени прецисно и разбираемо.

Изводи

Изоводите в дисертационния труд са ясно изведени и отговарят на поставените цели и задачи.

Като **съществени приноси** с научно-приложен характер могат да бъдат посочени следните постижения:

- Проучено е разпространението на човешкия метапневмовирус, парагрипните вируси и бокавирусите в България, като данните за разпространението на бокавирусите са първи за страната.
- Анализиран е делът на проучваните инфекции в етиологичната структура на ОРЗ, тяхната сезонност, възрастовото разпределение на инфицираните пациенти, географското и времево разпространение на вирусите- причинители, участието им в развитието на някои важни клинични синдроми в смесени инфекции.
- Извършено е генотипиране на парагрипните вируси. Установена е циркулация на 4-те типа парагрипни вируси.
- Извършен е филогенетичен анализ на гена F на метапневмовирусите и гена VP1/VP2 на бокавирусите.

Науко-метрични показатели.

Ивелина Трифонова е съавтор в 5 публикации в престижни научни списания, 2 от списанията са с импакт фактор, с общ импакт фактор 4,957. Публикациите са цитирани 7 пъти. Едно от списанията е оценено с квартил 2, а едно е с квартил 3. Общийят брой кредити на Ивелина Трифонова за 2017-2019 е 615.

Тя има 20 участията в научни форуми свързани с темата на дисертацията, 7 от тях са в чужбина, 13 в България.

Съгласно Закона за развитието на академичния състав в република България, по показателите от точка Г, са необходими 30 точки за научна степен доктор, а тя има 75.

Критични бележки и коментари.

Дисертационният труд е оформлен прецизно и нямам съществени забележки. При окончателното оформяне дисертантът се е съобразил с коментарите и предложениета, направени по време на вътрешната защита.

Заключение.

Дисертацията на Ивелина Трифонова е актуална, прецизно изпълнена и подходящо оформена под отговорното ръководство на научния ръководител и има съществен принос в областта на съвременната диагностика на вирусните заболявания. Разработвайки я, авторът е придобил както необходимите знания за събиране и анализ на специализирана научна информация, така и значителни практически умения за работа с молекулярни техники.

Дисертационният труд напълно отговаря на научните критерии в ЗРАСРБ и Правилника на НЦЗПБ за ОНС "Доктор" и това ми дава основание да гласувам за присъждане на образователната и научна степен „Доктор" по научната специалност „Вирусология" на Ивелина Трифонова Трифонова.

06.01.2020 г.

Автор на рецензията:
Доц. Ивайло Алексиев Иванов дв

