

## РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ в професионално направление 7.1. *Медицина*, научна специалност *Вирусология*

Тема на дисертацията: „**Проучвания върху етиологията и разпространението на инфекции, причинени от респираторно-синцитиален вирус (RSV), метапневмовирус (MPV) и пандемичен грипен вирус през периода 2004-2009 г. в България**“

Автор на дисертацията: **д-р Слава Стефанова Павлова-Илиева** – докторант на самостоятелна подготовка  
научен ръководител: **доц. д-р Росица Йотова Коцева, дм**

Автор на рецензията: проф. д-р Нели Стоянова Корсун, д.м.н. - Отдел Вирусология, Национален център по заразни и паразитни болести, член на научно жури, определено със заповед № 45/11.03.2015 г. на Директора на НЦЗПБ

### **Кратки биографични данни**

Д-р Слава Павлова-Илиева е родена в гр. София. Завършила е 7-мо СОУ „Св.Св.Седмочисленици“ през 1994 г, а през 2000 г. завършва медицина в Медицински Университет-София. Има призната специалност по „Вирусология“ от 2008 г. През периода 01.01.2003 г. - 31.08.2010 г. тя работи като лекар и като научен сътрудник в Националната референтна лаборатория „Грип и ОРЗ“ към НЦЗПБ. От 01.09.2010 г. до настоящия момент е лекар-вирусолог в лаборатория „Молекулярна диагностика на чернодробни заболявания“ към Клиника по гастроентерология във ВМА-София. Преминала е 14 курса на обучение, от които 5 в чужбина. Владее английски и руски езици, притежава много добра компютърна грамотност.

### **Значимост и актуалност на темата**

Дисертационният труд на д-р Слава Павлова-Илиева е посветен на проучване на разпространението в България на три вирусни респираторни инфекции, причинени от респираторно-синцитиален вирус (РСВ), човешки мета-пневмовирус (МПВ) и пандемичен грипен вирус.

Значимостта и актуалността на темата произтичат от важното клинично и епидемиологично значение на тези инфекции и необходимостта от бърза диагностика с цел ранно прилагане на адекватно лечение и предприемане на противоепидемични мерки. РСВ и човешкият МПВ са водещи

причинители на тежки заболявания на долните дихателни пътища (бронхиолит и пневмония) при деца в кърмаческа и ранна възраст, а вирусът А(Н1N1)2009, известен още като пандемичен или „свински“ грипен вирус, причини първата за XXI век грипна пандемия, разтърсила здравните системи на всички страни по света. До настоящия труд у нас липсват задълбочени проучвания за разпространението на РСВ, извършени със съвременни вирусологични и молекулярни техники, а изследванията на МПВ и пандемичния грипен вирус са пионерни.

### **Обем и структура на дисертационния труд**

Дисертационният труд е структуриран в съответствие с изискванията на „Правилника за прилагане на Закона за развитието на академичния състав в Република България“. Той е в обем от 167 стр. и съдържа заглавна страница, съдържание (2 стр.), използвани съкращения (1 стр.) и 9 раздела, включващи: I. Въведение (3 стр.); II. Литературен обзор (56 стр.); III. Цел и задачи (1 стр.); IV. Материали и методи (15 стр.); V. Резултати и обсъждане (48 стр.); VI. Обща дискусия (7 стр.); VII. Изводи. Резюме на получените резултати (2 стр.); VIII. Декларация за оригиналност. Приноси (1 стр.); IX. Литература (30 стр.). Изложението е онагледено от 23 таблици и 28 фигури.

### **Литературна осведоменост, постановка на целите и задачите, оценка на използваните материали и методи**

*Литературният обзор* включва 18 подраздела: 1. Кратки исторически данни за РСВ и МПВ; 2. Класификация на РСВ и МПВ; 3-15. РСВ. 16. Човешки метапневмовирус; 17. Нов пандемичен грипен вирус; 18. Заключение

Обзорът съдържа подробна и богата информация, касаеща всички аспекти на инфекцията с РСВ – структура и репликативен цикъл на РСВ, размножение на РСВ в лабораторни модели, епидемиология и патогенеза на РСВ инфекция, клинична картина, имунитет, лабораторна диагностика, терапия, имунопрофилактика (общо 32 стр.). Сравнително по-накратко са представени човешкият МПВ (7 стр.) и пандемичният грипен вирус (14 стр.). Литературният обзор отразява най-новите данни относно класификацията, структурата и разпространението на тези респираторни патогени, съвременните методи за тяхното доказване и характеризиране, отличителните особености на инфекциите. От него проличава важната роля на РСВ и МПВ като причинители на тежки инфекции на долния респираторен тракт при деца на възраст под 5 год. Обоснована е необходимостта от тяхната бърза диагностика и проучване. Разгледана е подробно първата за XXI век грипна пандемия, причинена от уникален „свински“ грипен вирус, която представляваше сериозно изпитание за

здравните системи в целия свят. Литературният обзор е изчерпателен, информативен, написан на много добър стил, ориентиран към целите и задачите на изследванията. Онагледен е с 2 таблици и 6 фигури. От него проличава добрата теоретична подготовка и професионална осведоменост на дисертантката, умението ѝ да обобщава, систематизира и интерпретира литературните данни.

*Целта и задачите* (6) са формулирани точно и ясно. Използваните вирусологични и молекулярни *методи* позволяват тяхното постигане. Дисертантката прилага широк набор от класически вирусологични техники като изолация на РСВ в клетъчни култури, бързи антиген-доказващи методи (имунофлуоресцентни и имуносорбентни) и молекулярни техники (конвенционален RT-PCR при доказване на РСВ и МПВ и Real-Time RT-PCR при доказване на пандемичния грипен вирус). Описано е в детайли използването на различни китове за екстракция на РНК и за RT-PCR. Важно постижение са оптимизираните и внедрени от дисертантката протоколи за RT-PCR и Real Time RT-PCR, използвани за първи път у нас в диагностиката на респираторните вирусни инфекции. С помощта на количествен Real Time RT-PCR тя определя прага на чувствителност на използвания от нея метод за доказване на РСВ - конвенционален RT-PCR (30 копия/мл), с което потвърждава високата чувствителност на метода. Real Time RT-PCR е методът, препоръчен от СЗО за доказване на новия пандемичен грипен вирус, който се прилага от дисертантката от началото на грипната пандемия 2009/2010 г. Всички методи са описани подробно и прецизно с възможност за тяхното възпроизвеждане. Става ясно, че дисертантката познава в детайли методологията, като сама изпълнява описаните лабораторни методи и техники. Експерименталната работа е извършена в Националната лаборатория „Грип и ОРЗ“ към НЦЗПБ, която по време на работата на д-р Слава Павлова-Илиева бе призната от СЗО като Национален грипен център въз основа на обстоен анализ на дейността и резултатите от ежегодните международни оценки на качеството на прилаганите лабораторни методи. Лабораторията е акредитирана по БДС/ISO/EN 17025, което е гаранция за качеството на извършените експерименти.

### **Оценка на резултатите и тяхната научна стойност**

В раздела „Резултати и обсъждане“ е представен анализ на резултатите от проведените вирусологични и молекулярно-биологични изследвания на 846 пациента - деца на възраст под 5 год., изследвани за РСВ, от които 452 са тествани паралелно и за МПВ през периода 2004-2009 г. (5 епидемични сезона). Изследвани са също 2429 пациента и контактни лица по отношение на пандемичния грипен вирус.

Обект на изследванията за РСВ и МПВ са пациенти на възраст под 5 год, поради по-голямата клинична тежест на инфекциите в тази възрастова група. Клиничните проби са събирани в периода октомври-април, тъй като епидемичното разпространение на РСВ и МПВ съвпада с разпространението на грипните вируси. Проучванията на РСВ започват с използване на класически вирусологични техники – изолация на вирус в клетъчни култури и използване на антиген-доказващи методи. Въпреки широкото използване на молекулярни техники през последните години, изолацията на РСВ в клетъчни култури е запазила своята ценност и остава „златен стандарт” в изследванията на РСВ. Тя предоставя възможност за получаване на инфекциозен вирус, който по-нататък може да се изследва допълнително по отношение на антигенни и генетични характеристики. Изолацията на РСВ е истинско предизвикателство поради голямата лабилност на този вирус и трудностите в неговата идентификация. Успехът на изолацията е постигнат благодарение на създадената добра организация за вземане, транспортиране на клинични проби и навременното им инокулиране в клетъчни култури.

Дисертантката прилага два широко използвани антиген-доказващи метода – имунофлуоресцентен и имуноензимен. Поради установената от нея ниска чувствителност на тези методи, тя ги модифицира, като предварително култивира клиничните проби в клетъчни култури, с което повишава ефективността на вирусната детекция. Антиген-доказващите методи се прилагат и с цел идентификация на РСВ в клетъчни култури, показали характерен ЦПЕ.

Поради недостатъчната чувствителност на класическите вирусологични методи дисертантката се ориентира към прилагане на молекулярния метод RT-PCR за доказване на РСВ, а по-късно и на МПВ. Анализирани са подробно резултатите от прилагане на този метод по епидемични сезони и календарни месеци, според възрастта на пациентите и клиничната диагноза. Разделът с резултати от изследвания на РСВ и МПВ завършва с дискусия, в която се анализират получените резултати и се сравняват с данните от други страни. Направен е изводът, че своевременното доказване на РСВ и МПВ има значение за клиничното поведение (избягване на ненужната употреба антибиотици, съкращаване на болничния престой) и за предотвратяване на нозокомиалните инфекции. Потвърдено е, че методът RT-PCR превъзхожда вирусната изолация по отношение на бързина, чувствителност и специфичност. Установен е значителен дял на инфекциите с РСВ сред хоспитализирани с ОРЗ деца на възраст под 5 год., което говори за водещата роля на РСВ в развитието на бронхиолит, пневмония и други тежко протичащи респираторни инфекции в детска възраст. Установен е по-висок процент (39,2%) положителни резултати за РСВ при хоспитализирани деца в сравнение с този при амбулаторно лекувани (27,7%). Потвърждава се наблюдаваното и от други

изследователи най-силно засягане с РСВ инфекция на възрастовата група под 1 год. При инфекциите с МПВ значителни различия в засягането на отделните възрастови групи деца не са констатирани. Доказана е ролята на РСВ и МПВ като причинители на епидемични взривове от ОРЗ в детски колективи от затворен тип (ДМД).

Разделът 5. „Нов пандемичен грипен вирус А(Н1N1)2009” включва резултатите от изследвания, свързани с разшифроване етиологията на първата за XXI век грипна пандемия през 2009/2010 г. По време на пандемията Националната лаборатория „Грип и ОРЗ“ е единствената лаборатория в страната, която извършва диагностика на новия пандемичен грипен вирус. Броят на изследваните клинични проби е впечатляващ - 2429. Изследванията са проведени с препоръчания от СЗО метод Real Time RT-PCR с използване на праймери и сонди, разработени и изпратени от CDC-Atlanta. Направен е задълбочен анализ на положителните резултати според възрастта на пациентите и клиничната диагноза, както и разпределение на положителните детекции по седмици и месеци. Установено е най-силно (36,7%) засягане с инфекция с вирус А(Н1N1)2009 на възрастовата група 15 - 29 г., следвана от групата 30-64 г. (29%), т.е. активното възрастно население. По-слабо (5%) е засягането на най-малката възрастова група 0 - 4 г., в противовес с традиционно високото ѝ засягане от сезонните грипни вируси. Пандемичният грипен вирус е доказан в най-голям процент (35,4%) при пациенти с ОРЗ без усложнения; сравнително в по-малък процент (24,6%) – при пациенти с пневмония, както и в 7% от клинично здравите контактни лица. Анализирани са рисковите групи (бременни, родилки). Първият за България случай на заболяване с доказан пандемичен грипен вирус е регистриран на 01.07.2009 г., а пикът в доказването на вируса е през 45 седмица на 2009 г. Извършено е антигенно и генетично характеризиране на репрезентативни положителни проби. Всички изследвани изолати на вирус А(Н1N1)2009 са антигенно и генетично близки с ваксиналния вирус А/California/7/2009. При генетичния анализ не са установени мутации, асоциирани с резистентност към невраминидазния инхибитор озелтамивир или с по-тежко протичане на заболяванията. Извършеният от дисертантката анализ разкрива редица важни характеристики на грипната пандемия 2009/2010 г., отнасящи се до нейната възрастова структура, динамика, сезонност, биологичните особености и клиничната активност на вируса-причинител.

Проучванията и експериментите са проведени прецизно, резултатите от тях са изложени ясно, в логическа последователност, като са онагледени с таблици и фигури. В раздела „Обща дискусия” са обобщени и анализирани получените данни по отношение на 3-те изследвани респираторни инфекции.

**Изводите** (12 бр.) съответстват на изпълнението на поставените задачи и отразяват същността на получените резултати. Те са добре формулирани и логически издържани. В извод 5.1 би могло да се посочат конкретни заключения относно най-засегнатите възрастови и рискови групи.

**Приносите** на дисертантката са безспорни, дори са формулирани доста скромно. Най-важните приноси могат да се обобщят по следния начин: за първи път у нас е проучено разпространението на РСВ с помощта на съвременни молекулярни методи; за първи път е доказан човешки МПВ и е проучено неговото участие при случаи на ОРЗ в детска възраст; разшифрована е етиологията на първата за ХХІ век грипна пандемия. Приносите имат научно-приложен характер и разширяват съществуващите знания относно три важни респираторни инфекции в България.

Библиографският списък включва 356 литературни източници – 12 на български и 316 – на английски език, от които 23 са Интернет страници. 31% от източниците са от последните 10 год.

**АВТОРЕФЕРАТЪТ** в обем 67 стр. е структуриран съобразно възприетите у нас стандарти и отразява точно съдържанието, изводите и приносите на дисертацията.

### **Наукометрични показатели**


Във връзка с дисертацията има отпечатани общо 14 публикации: 3 в международни списания (2 в списание Eurosurveillance и 1 в Biotechnology&Bioequipment) и 11 - в български научни и специализирани медицински издания, от които 2 на английски език. Четири от публикациите са с обзореен характер. Макар че публикациите нямат импакт фактор, двете статии в престижното международно списание Eurosurveillance, получило през следващите години висок импакт-фактор, заслужават да бъдат специално отбелязани. Има участия с доклади и постери в 10 национални научни форума. Д-р Павлова е първи автор в 10 (71%) публикации и 9 (90%) участия, което говори за нейната водеща роля в проучванията. Тя е участник в 4 внедрявания.

**В заключение:** дисертационният труд на д-р Слава Павлова-Илиева представлява една задълбочена, изпълнена на съвременно методично ниво разработка, посветена на значима и актуална тема в областта на вирусологията. Той е лично дело на дисертантката и я характеризира като висококвалифициран и компетентен изследовател, притежаващ теоретични знания и практически умения да изпълнява съвременни вирусологични и молекулярни техники, както и способност за самостоятелни научни изследвания и анализи. Получените от нея резултати представляват съществен научно-приложен принос в изучаване на вирусните респираторни инфекции в България.

С пълно основание считам, че представеният дисертационен труд съответства на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), на Правилника за прилагането на ЗРАСРБ и на Правилника за прилагане на ЗРАСРБ в Националния център по заразни и паразитни болести.

Давам положителна оценка на дисертационния труд и предлагам на уважаемите членове на научното жури да присъдят на д-р Слава Павлова-Илиева образователната и научна степен **доктор** по професионално направление *7.1. Медицина*, научна специалност *Вирусология*.

01.05.2015 г.

  
.....  
/проф.д-р Н.Корсун, дмн/