

СТАНОВИЩЕ
ОТНОСНО

Дисертация на тема „Проучвания върху етиологията и разпространението на инфекции, причинени от Респираторно-синцитиален вирус (RSV), Метапневмовирус (MPV) и пандемичен грипен вирус през 2004-2009г. в България“
За получаване на образователна и научна степен „Доктор“
по научна специалност Вирусология, шифър 01.06.13

на докторанта

д-р Слава Стефанова Павлова-Илиева
с научен ръководител доц. Росица Йотова Коцева, д.м.

от

Доц. д-р Божин Димитров Камаринчев, д.м.н., ВМА

Слава Стефанова Павлова-Илиева е назначена за докторант на самостоятелна подготовка в Национална Референтна Лаборатория „Грип и ОРЗ“, НЦЗПБ.

Острите респираторни заболявания с вирусна етиология заемат водещо място сред заболяемостта сред населението. Сред тях водещо място заема RSV, като най-чест причинител на респираторни инфекции сред деца до 5 годишна възраст. Метапневмовирусът, открит през 2001г. засяга същата възрастова група, причинявайки заболявания клинично неразличими от RSV. Другият вирус обект на настоящото проучване е новопоявил се грипен вирус А/Н1N1/2009г., който получи пандемично разпространение през 2008/2009г.

Дисертанта д-р Слава Павлова си поставя за цел да проучи разпространението на гореспоменатите инфекции с използването както на класически методи така и на молекулярно генетичен анализ. В областта на класическите вирусологични методи дисертанта е ползвал модел клетъчни култури за изолация на RSV, както и директното му откриване с имуофлуоресцентен метод в носоглътчни смивове. Вирусът в клетъчните култури е доказан и с имуносорбентен тест. От друга страна RSV, метапневмовируса и пандемичния грип А вирус дисертанта проучва с помощта на полимеразно-верижна реакция, в различни нейни разновидности-RT-PCR за RSV и MPV и Real Time –PCR за пандемичния грипен вирус. За пандемичния грипен вирус е направен филогенетичен анализ по гените на хемаглутинаина и невраминидазата.

Получените резултати са групирани по отношение на различни групи пациенти, сезони на изследване и методи на проучване, по клинична диагноза. За RSV и MPV са групирани във възрастови групи до 5 годишна възраст, а данните за пандемичния грипен вирус обхващат всички боледуващи. За RSV са сравнени резултатите от класически методи-вирусна изолация и тези получени с PCR.

Структурата на дисертацията е добре оформена. В обзора ясно е описана номенклатурата, структурата и вирусологичните аспекти на RSV, MPV и пандемичния грипен вирус. Дадена е съвременна информация за произхода и еволюцията на грипните вируси. Представени са съвременни данни за посочените вируси и световните тенденции в тяхното проучване, което определя целите и задачите на това проучване.

Целта и задачите са формулирани ясно и коректно и логично кореспондират с получените резултати от поучването.

Материалите и методите са описани подробно и с добре структурирана последователност. Изследваните проби са колектирани по предварително определени критерии. Разработен е in-house вариант на RT-PCR за RSV директно в носоглътчни смивове, с последващо определяне на чувствителност и специфичност, докато за MPV е

използван протокол на Румънската референтна лаборатория по Грип и ОРЗ. Грипният вирус е изследван с рекомандиран от СЗО протокол. Изолацията на RSV е извършвана на два вида клетъчни култури-HEp-2 и MRC, а идентификацията е правена поетапно с ИФМ, имуносорбентен метод и RT-PCR.

Разделът резултати и обсъждане е богато илюстриран с добре интегрирани към текста фигури, графики и таблици. Последователно са представени резултатите от проучването на RSV върху 846 проби, MPV-452 броя и пандемичния грипен вирус-2429 проби. Резултатите показват, че RSV и MPV са основни причинители бронхиолит и пневмония при децата до 5 годишна възраст. В хода на проучването са изолирани 15 щамове на RSV от болни деца. Показано е разпространението на RSV и MPV по сезони на фона на сезонните грипни епидемии. Доказана е паралелната циркулация на тези два вируса заедно с грипните вируси. Използваните PCR системи за RSV и MPV позволяват на дисертанта да направи анализ на причинителите на бронхиолити, пневмонии и ОРЗ, причинени от грипни вируси и бактериални инфекции сред малки деца. Доказана е ролята на RSV като основен причинител на тежко протичащи респираторни заболявания в най-малката възрастова група от 0-11 месеца. За първи път у нас е приложен RT-PCR за проучване на RSV като причинител на респираторни заболявания при деца. Проучванията показват предимствата на метода пред вирусната изолация на клетъчни култури.

Проучването на пандемичния грипен вирус обхваща периода 2008/2009г. и се базира на проби колектирани от цялата страна. С Real Time PCR са изследвани 2429 проби, от които 792 са дали положителен резултат. Направено е анализ на получените данни и разпределението им по възрастови групи, клинична диагноза, контактни, починали, бременни и родилки. Изследването установява по-голямо засягане на възрастовата група от 20-40 години и по-слабо засягане на възрастта до 5 години и над 60г. За пръв път грипния вирус е доказан с Real Time PCR в трупни материали. За първи път в лабораторната практика у нас е разшифрована етиологията на нова грипна пандемия, възникнала през 2008/2009г. с приложение на препоръчан от СЗО метод, базиращ се на праймери и сонди към специфични нуклеотидни последователности на пандемичния вирус. Направен е антигенен анализ и генетична характеристика на хемаглутинаина и невраминидазата на избрани образци положителни български проби, които показва липсата на мутации определящи резистентност към противогрипния препарат озелтамивир. Изследването показва близкото антегенно родство и генетична хомология на българските щамове с ваксиналния вирус A/California/7/2009.

Изводите и дискусията в дисертацията съответстват на зададените цели и на получените резултати и обсъждане. На кратко ще отбележа някои от най-значимите постижения достигнати в настоящата докторантура, като разработения протокол за in-house RT-PCR за детекция на вирусни нуклеинови киселини на RSV и MPV директно в изходни носогърлени секрети и са анализирани данните от детекцията на тези два вируса с посочения метод в три последователни сезона. Определена е ролята на RSV и MPV в заболяемостта на деца с на молекулярно-биологични методи. Приложен е за пръв път у нас протокол на CDC за Real Time PCR, съдържащ праймери и сонди към специфични нуклеотидни последователности на пандемичния Грип А вирус. За първи път в лабораторната диагностика на грипа у нас е разшифрована етиологията на нова грипна пандемия с приложение на рекомандиран от СЗО молекулярно-диагностичен метод Real Time RT-PCR. Направения антигенен и генетичен анализ на хемаглутинаина и невраминидазата на български щамове грип А, които показват липсата на мутации определящи резистентност към озелтамивир.

Извършеното проучване дава възможност на МЗ в периода 2008/2009 да взема адекватни мерки за ограничаване на епидемията от пандемичния грип А вирус. В

международен мащаб резултатите от това проучване са принос към усилията на СЗО в изясняване на епидемията от пандемичния грип А в световен мащаб. Циркулиращият в България грипен вирус по време на пандемията е А/California/7/2009 и измества от циркулация всички сезонни вируси за периода 2008/2009г.

Дисертацията на докторанта Слава Павлова е в рамките на конкретно проучване на вирусите на Грипа и ОРЗ. Използва класически и съвременни генетични методи за анали и проучване на тази група вируси.

На редица симпозиуми и конгреси дисертанта е представил резултатите от своите проучвания, участва като водещ автор и съавтор в научни публикации в български списания-7 броя, международни списания-3 броя, обзори -4 броя, доклади-10 броя и 4 внедрявания. Участвала е в обучения от водещи специалисти в областта на диагностиката на грипа и ОРЗ. Член е на българското дружество по Вирусология.

В заключение, категоричното ми становище е, че дисертационният труд „Проучвания върху етиологията и разпространението на инфекции, причинени от Респираторно-синцитиален вирус (RSV), Метапневмовирус (MPV) и пандемичен грипен вирус през 2004-2009г. в България“ на д-р Слава Павлова е изпълнен отлично и напълно съответства на изискванията за присъждане на научната и образователна степен „доктор“

17.04.2015г.

Подпис:
(доц. д-р Божин Камаринчев, дмн)

