

## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен "Доктор" по  
научната специалност Вирусология (01.06.13)

Тема: „Разработване и усъвършенстване на RT-PCR системи за диагностика на някои  
найро-, ханта- и flavivируси”

Автор: Д-р Николай Златков Кълвачев (Научен ръководител – Доц. Д-р Ива Христова,  
Научен консултант – Доц. Д-р Божин Камаринчев)

Рецензент: Доц. Д-р Евелина Шикова, ИЕМПАМ-БАН (Заповед № 53/19.05.2011 на  
Директора на НЦЗПБ)

**Актуалност и значимост на дисертационната тема.** Найро-, ханта- и flavivирусите са причинители на множество заболявания, разпространени в различни части на света, някои от тях и в Европа, като в световен мащаб поради климатични и екологични промени се наблюдава тенденция за увеличаване на заболеваемостта. Кримска-Конго хеморагичната треска (ККХТ), Хеморагичната треска с бъбречен синдром (ХТБС) и Кърлежовият енцефалит (КЕ) са заболявания с природно-огнищен характер, предизвикани съответно от найро-, ханта- и flavivируси, които създават сериозни проблеми на здравните власти в Европа, особено в ендемичните региони. Причините за това са, че в голяма част от случаите тези заболявания са с епидемичен потенциал, тежко протичане и висока смъртност, липсват достатъчно ефективни средства за превенция и контрол. В тази връзка ранната етиологична диагностика е от решаващо значение за клиничната практика и за ограничаване разпространението на инфекцията. Понастоящем в повечето европейски страни лабораторната диагноза се основава главно на серологични изследвания и откриване на вирусна РНК чрез RT-PCR. В последно време RT-PCR се утвърждава като бърз, с висока чувствителност и специфичност метод за доказване на вирусна инфекция при тези заболявания.

България е сред срните считани за ендемични зони за ККХТ и ХТБС. Ситуацията с КЕ предстои да бъде изяснена. Това налага своевременна и надеждна диагноза чрез използването на съвременни бързи методи с висока чувствителност и специфичност. У нас понастоящем етиологична диагностика на тези заболявания се осъществява главно със серологични методи, като най-често се използва РСК.

Известно е, че щамовете изолирани в различни географски райони показват генетични различия, определящи тежестта на протичане на заболяването и други аспекти на инфекцията. Затова и по-доброто познаване на генетичното разнообразие, факторите на вирулентността и биологията на вирусните щамове, в това число и на тези циркулиращи в България, е от съществено значение за създаването на нови терапевтични стратегии, подобряването на диагностичните средства и разработване на ваксини.

Всичко това ми дава основание да определя тематиката на предоставения ми за рецензиране дисертационен труд като актуална и значима.

**Структура, цел и специфични задачи на дисертацията.** Дисертационният труд е представен на 147 страници и включва 41 фигури и 16 таблици. Структуриран е в 10 раздела, като основните от тях следват общоприетата схема - обзор на литературата (36 стр.), цели и задачи (1 стр.), материали и методи (27 стр.), резултати и обсъждане (42 стр.), обща дискусия (6 стр.), изводи (1 стр.) и библиография (17 стр.).

Заглавието на дисертацията е добре подбрано и ясно дефинира основната цел и периметъра на проведените изследвания. Целта и задачите на дисертационния труд са формулирани ясно и точно като специфичните задачи съответстват на поставената цел.

**Литературна осведоменост.** Литературният обзор е логично структуриран в 3 подраздела, съответстващи на разработваните от докторанта системи за етиологична диагностика съответно на ККХТ, ХТБС, и КЕ. Във всеки от подразделите е направен обстоен преглед на съществуващата информация относно характеристиката на вирусите, в това число на генетичните разновидности, а също относно патогенезата, клиниката и епидемиологията на заболяванията, които те причиняват. Обърнато е специално внимание върху

съществуващите методите за диагностика (изолиране на вируса, серологични и молекулярно-генетични методи) като са отчетени предимствата и недостатъците им. Подробно представени са възможностите и предимствата на конвенционалния RT-PCR и real-time RT-PCR, поради които днес те се използват в много страни не само за допълнение на серологичната диагностика, но и като основен диагностичен метод при тези заболявания. Дадена е и характеристика на разпространението на ККХТ, ХТБС, и КЕ в България и приносът на българските учени в изследването на тези инфекции, а също и използваните понастоящем в страната методи за етиологична диагностика, свеждащи се основно до серологични тестове. Докторантът стига до логичния извод, че е необходимо внедряване в лабораторната практика у нас на съвременни молекулярни методи каквито са RT-PCR методите, които да осигурят бърза и качествена диагноза на тези заболявания.

Представената информация е илюстрирана с 12 фигури, а класификацията и разпространението на вирусите обобщени в 3 таблици. Библиографията включва 128 източника, голяма част от които са публикувани в последните 10 години. 96 от заглавията са на английски език.

Обзорът е изчерпателен, написан в добър стил и показва, че д-р Николай Къlvачев е добре запознат със състоянието на проблемите, по които работи и компетентно борави с наличната научна литература.

**Методология.** Докторантът е използвал широк арсенал от съвременни молекулярни методи, съобразени с изпълнението на поставените цел и задачи. Те включват техники за екстрагиране на РНК от различни материали, обратна транскрипция и синтез на комплементарна ДНК, едностъпков RT-PCR и nested PCR, гел-електрофореза, real time RT-PCR, секвениране. Той успешно прилага и методи на биоинформатиката за разработване на нови праймерни системи и за филогенетичен анализ. За откриване на вирусни антитела използва РСК и ELISA, а чрез електронна микроскопия визуализира вирусните частици в клинични материали. Използваните методи са описани ясно и подробно до степен, позволяваща възпроизведимост на резултатите, и оставят впечатление за много добра професионална подготовка на докторанта. За това несъмнено е допринесло и участието му

в редица теоретично-практически курсове и стажове като „Филогенетичен и еволюционен анализ на микробни секвенции” - курс по програма Фар и „Съвременни техники за вирусна диагностика” - стаж в Раковия център в Хайделберг.

**Резултати и обсъждане.** Получените резултати стриктно следват специфичните задачи, които си поставя докторантът. Първоначално той определя най-ефективната техника за екстрагиране на РНК от различни материали, инфицирани с найро-, ханта- и flavivируси (тъкани от заразени новородени бели мишелета, клинични материали – кръв и serum, кърлежи) – QIAamp Viral RNA, която впоследствие успешно прилага в работата си.

Голяма част от резултатите са свързани с разработването на RT-PCR системи за детекция и анализ на вирусите на KKXT, ХТБС и KE. Това са системи за едностъпков RT-PCR и nested PCR за амплифициране на участъци от S, M и L сегментите от генома на вируса на KKXT и на S сегмента от генома на вируса на ХТБС. Разработени са и real time RT-PCR системи във вариант SYBR Green real time RT-PCR за амплифициране на участъци от S, M и L сегментите от генома на вируса на KKXT, S сегмента от генома на вируса на ХТБС и участък от генома на KE като докторантът определя специфичността на амплифицираните продукти чрез анализ на кривите на топене. Д-р Николай Кълвачев конструира свои праймерни системи, специфични съответно за M и L сегментите от генома на вируса на KKXT, за S сегмента от генома на вируса на ХТБС и за вируса на KE, които използва както в конвенционален RT-PCR и nested PCR, така и в real time RT-PCR системите. Чрез използването на правилно подбрани хетерологни и хомологни вирусни РНК доказва високата специфичност на използваните праймерни двойки. Докторантът провежда множество експерименти с цел оптимизация на отделните параметри на различните PCR системи, в резултат на които успява да определи най-ефективните протоколи за амплификация на различни фрагменти от генома на изследваните вируси. Чувствителността на разработените PCR системи за откриване на найро-, ханта- и flavivируси е  $0.05\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

По-нататък д-р Николай Кълвачев доказва ефективността на разработените от него RT PCR системи за доказване на специфична вирусна РНК в клинични материала (кръвни и

серумни преби) като изследва общо 342 материала: 194 материала - за вируса на ККХТ, от които в 12 установява вирусна РНК; 135 - за хантавирус, от които 5 са положителни; сред 13-те материала изследвани за вируса на КЕ не се откриват положителни. Логично, докторантът сравнява разработените от него молекулярни методи със серологичните техники, използвани рутинно в България за откриване на антитела срещу вирусите причинители на ККХТ, ХТБС и КЕ и установява съответствие на резултатите, като отбелязва че предимството на RT-PCR е възможността за диагноза в ранните стадии на тези заболявания.

Особено ценни са резултатите от изследване на генетичната вариабилност при найро- и хантавируси изолирани от пациенти, пребивавали в типично ендемични за тези вируси природо-огнищни зони на страната ни. След секвениране на участъци от S, M и L сегменти от генома на 4 български ККХТ изолата и последващ филогенетичен анализ е установено че българските изолати са в общ клон с вирусите от Европа като са най-близки до вирусите циркулиращи в Косово, Турция и Русия. Филогенетичният анализ на S- сегмента на хантавирус Добра показва, че българският изолат е с най-висок процент на хомологност с хантавирусите циркулиращи в Северна Гърция и Източна Словакия. Тези резултати са добра основа за по-нататъшни генетични изследвания, обхващащи и други участъци от генома на тези вируси, а също и на по-голям голям брой български изолати.

Резултатите са подкрепени с илюстративен материал (29 фигури) и са обобщени в 5 таблици.

В раздел “Обща дискусия” авторът с много професионализъм и вештина обобщава и анализира резултатите в светлината на литературните данни и на ситуацията с разпространението и диагностиката на тези заболявания в България. Описани са подробно предимствата на разработените и внедрени от него за първи път в България молекулярни методи.

**Резюме на резултатите. Изводи.** Приемам формулировката на изводите от дисертационния труд и смяtam, че те отразяват правилно същността на получените резултати.

Съгласна съм със справката за приносите, които авторът е представил и приемам като приноси с оригинален характер резултатите от секвенционния и филогенетичен анализ на найро- и хантавируси изолирани в България и разработените от дисертанта нови праймерни системи.

Резултатите от изследванията са публикувани в 12 научни статии, две от които в списания с импакт фактор (Emer.Infec.Diseases –IF 6 и Доклади на БАН). В повечето от статиите д-р Николай Кълвачев е първи автор, което свидетелства за водещата му роля в тези изследвания. Три от статиите са цитирани общо 15 пъти. Докторантът има и 3 публикации в GENBANK. Резултатите от дисертацията са докладвани на 13 национални и международни конгреси, симпозиуми и конференции.

Авторефератът отразява обективно получените резултати и е изгoten в съответствие с общоприетите изисквания.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Дисертационният труд на д-р Николай Кълвачев „Разработване и усъвършенстване на RT-PCR системи за диагностика на някои найро-, ханта- и флавивируси“ е посветен на важен за страната и региона здравен проблем. Представени са резултати със съществен научно –приложен принос в изследването на тези инфекции, което е предпоставка за оптимизиране на превенцията и контрола им у нас.

Дисертационният труд е изработен на високо методично ниво и характеризира автора си като висококвалифициран изследовател, който има знанията, уменията и компетентностите да решава самостоятелно научни проблеми в областта на вирусологията.

Всичко това ми дава основание да препоръчам на научното жури да присъди на д-р Николай Кълвачев образователната и научна степен Доктор.



Рецензент:

София, 10.06.2011 г

Доц. Д-р Е. Шикова