

СТАНОВИЩЕ

От:

Доц. д-р Ива Стефанова Христова, д.м.

Зав. Национална Референтна Лаборатория „Предавани с кърлежи
инфекции, лептоспири и листерии”, НЦЗПБ

Относно:

Дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”
на д-р **Николай Златков Кълвачев**

Дисертационният труд е посветен на решаването на актуален проблем в арбовирусологията, а именно разработването и усъвършенстването на молекулярно-вирусологични методи за диагностика и идентификация на арбовирусите. Систематично и задълбочено авторът подхожда към набелязаните задачи в съответствие с целта на работата – да се разработят и усъвършенстват RT-PCR системи за диагностика на найро-, ханта- и флавивируси.

Трудът е написан на 146 страници, достатъчно илюстриран с фигури и таблици и се позовава на 128 литературни източника, от които 32 на кирилица. Проучени и сравнени са 4 различни подхода за екстракция на вирусна РНК. Авторът доказва предимствата на QIAamp тестовете по отношение както на добива и чистотата на РНК, така и по отношение на времето за изпълнение, което при тях е най-кратко.

Авторът представя разработването и оптимизирането на RT-PCR реакции за доказване вируса на Кримската Конго хеморагична треска. В съответствие със строежа на генома на найровирусите, а именно сегментирането му на малък, среден и голям сегмент, са подбрани подходящи праймерни двойки за всеки един от сегментите. Трябва да се отбележи, че праймерните двойки за откриване на средния и на големия сегмент на вируса, причиняващ ККХТ са лично дело на автора. С всички праймерни двойки е изпитана диагностичната чувствителност и специфичност на разработените RT-PCR реакции. Оптимизирани са условията на nested RT-PCR и за първи път у нас е разработена и приложена RealTime RT-PCR система за доказване вируса на ККХТ, която позволява бързо и точно откриване на вирусния геном. Освен това, като съществен принос на автора считам филогенетичния анализ на български щамове на ККХТ вируси. Четири български щамове на ККХТ вируси са сравнени с нуклеотидните секвенции на известните такива вируси в света. Българските щамове са сравнени по

отношение на малкия, средния и големия сегмент на вирусния геном, което е значителен по обем труд със съществен научно-теоретичен принос.

Спазвайки същата научно издържана схема на работа, авторът разработва nested RT-PCR и RealTime RT-PCR реакции за хантавируси и по-специално за хантавирус Добрава, известен с клинично много тежките заболявания, които причинява, и с ендемичното си разпространение на Балканите. Оптимизирани са условията, конструирани са оригинални праймери и е демонстрирана приложимостта на разработените диагностични реакции за откриване на хантавируса в клинични материали от болни с ХТБС (хеморагична треска с бъбречен синдром). Отново съществен принос е филогенетичният анализ на български щам хантавирус Добрава, който показва, че българският щам е с най-висока степен хомоложност на нуклеотидния състав с хантавирусите Добрава, изолирани в Гърция и след тях с изолираните в източна Словакия.

Последно в основния радел „Резултати и Обсъждане“ е представено разработването на RT-PCR системи за доказване на представител на семейството на флавивирусите, а именно на вируса на кърлежовия енцефалит. С познатия от предишните две групи вируси задълбочен и детайлен подход, авторът представя и убедително доказва ефективността на RT-PCR системата за доказване на този вирус.

Считам, че дисертационният труд на д-р Николай Кълвачев съдържа следните важни приноси:

1. Разработени са оригинални RT-PCR системи за доказване вирусите на ККХТ, ХТБС и кърлежовия енцефалит.

2. Разработените едностъпкови RealTime RT-PCR, конвенционални и nested RT-PCR реакции са приложени в клиничната практика и убедително доказват предимствата на молекулярно-генетичната диагностика при арбовирусните инфекции.

3. Направени са филогенетични анализи на изолирани в България щамове ККХТ и хантавируси. Въз основа на хомоложността на щамовете на нуклеотивно ниво, филогенетичният анализ на ККХТ вирусите разкрива принадлежността на българските ККХТ щамове към Европейско-Турската географска линия, а филогенетичният анализ на нашите хантавируси показва сходството им с гръцките Добрава щамове.

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 12 журнални статии, от които 3 в реномирани списания с импакт фактор. Данните са представени и на 13 български и международни конференции.

В заключение, дисертационният труд представлява сериозен принос в усъвършенстване на диагностиката на най-честите у нас арбовирусни инфекции, свързан с разработването и прилагането на модерни молекулярно-вирусологични методи, позволяващи ранно и високоспецифично откриване на вирусните геноми в клинични материали.

Оценявайки достойнствата на дисертационния труд и съобразяването му с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Р. България, Правилника за неговото приложение и Правилника на НЦЗПБ, давам своята **положителна оценка** за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” на д-р Николай Златков Кълвачев.

04.07.2011 г.

гр. София

Подпис:



/доц. д-р И. Христова, дм/