

СТАНОВИЩЕ

от доцент, д-р Стоян Ангелов Шишков

Относно: дисертационния труд на д-р **Николай Златков Кълвачев**
, „Разработване и утвърждаване на RT-PCR системи за диагностика
на някои найро-, ханта- и flavивируси”

за присъждане на образователна и научна степен “доктор”,
научна специалност „Вирусология”, шифър 01.06.13.

Представеният дисертационен труд третира един от актуелните проблем на клиничната вирусология с национално здравно значение. Посветен е на практическите проблеми при идентифицирането на предизвикани от найро-, ханта- и flavивируси инфекции. Докторантът в литературния си обзор (37 страници) отбелязва разнородните причини за увеличаване на разпространението на тези арбовируси и честотата на предизвиканите от тях заболявания. Разгледани са прилаганите класически методи за диагностика им. Аргументирано е изложена необходимостта от въвеждане на молекуларни техники за детекция на вирусните геноми с цел навременна и по-точна диагноза на заболяванията. Докторантът се е насочил към проблематичните за страната в момента Кримската-Конго хеморагична треска (ККХТ), хантавируната хеморагичната треска с бъбречен синдром (ХТБС) и Кърлежовия енцефалит (КЕ).

На тази базата и отлично познавайки българската и световната литература по проблема (128 заглавия), дисертантът е определил точно целта на тезата си както и осем конкретни задачи за постигането ѝ. Те се свеждат до съпоставяне на четири екстракционни методи за получаване на оптимално количество геномна РНК и разработване и усъвършенстване на RT-PCR системи за детекция и анализ на геномите на вируса на ККХТ, хантавируса Добраша и на вируса на КЕ. Както и допълнително да се определят филогенетичните връзки на базата на сенквенционен анализ на първите два вируса.

Изследваните четири типа материали – два клинични, един лабораторен и един от 226 пула от кърлежи, изолирани от хора, животни и околната среда, са достатъчно информативни за набелязаните цели. Приложените екстракционни техники, избраните и конструираните праймери, молекуларнобиологичните и серологичните методи са подбрани методично и правилно. Прилагането им очертават научните способности и вешината на докторанта.

Резултатите и обсъждането им са представени в 8 подглави (43 страници), илюстрирани с множество таблици и фигури. Първоначално е отразено количественото и качественото съпоставяне на четири екстакционни техники при прилагането им към изследваните материалите. Авторът установява че, най-висок добив на РНК има при прилагане на реагента QiAamp Viral RNA. Безспорен принос на автора са разработените системи RT-PCR с използването на лично конструираните праймерни двойки за амплификация на L и M сегментите от генома на вируса на KKXT, на S сегмента на хантавирус Добраша и на генома на вируса на KE. Тяхната специфичност, наред с тази на използваните общоприети праймери за S сегмента на вируса на KKXT, е доказана с негативния резултат при прилагането им спрямо четири геноми на хетероложни и хомологични РНК вируси. Находчиво е използването на nested-PCR за повишаване на чувствителността на real-time RT-PCR теста и за установяване на минимален брой геномни копия.

Авторът за пръв път в страната използва real-time RT-PCR, nested-PCR и конвенционален RT-PCR за диагностициране на съответните вирусни инфекции. Тяхната чувствителност и специфичност, наред с бързината им, показват необходимостта от въвеждането им повсеместно в практиката. Пролучените резултатите от докторанта съответстват на тези от серологичните изследвания. Разработената real time RT-PCR система идентифицира прецизно причинителите на KKXT, ХТБС и KE в кръвни и serumни преби от пациенти и в суспензии от аутопсирани животни. Дисертантът отклоява и предимството на real-time RT-PCR пред конвенционален RT-PCR изразявашо се в намаляване на необходимото време за анализ и повишаване на специфичността.

Изследванията на докторанта се разпростират и върху секвенирането с последващ филогенетичен анализ на четирите изолирани щама на вируса на KKXT и на щама на хантавирус Добраша. Определените секвенции са сравнявани с достъпните секвенции на вирусите, съхранявани в колекцията GenBank. Получените резултат потвърждават принадлежността на българските щамове на KKXT към групата на Европейско-Турска географска линия за вируса (линия V). Доказано е генетично им сходство с изолирани от Косово, Турция и южна Русия щамове на вируса, вариращо между 94% и 100% идентичност на фрагментите. Докато получените данни за българския щам на хантавирус Добраша е най-близък до щамовете, циркулиращи в Гърция (97% идентичност) и Източна Словакия (96% идентичност).

Научните резултати и изводи на д-р Кълвачев са подкрепени с убедителен фактологичен материал и публикации в чужбина. По темата на дисертацията той е представил 12 публикации, от които 3 с импакт фактор. В базата данни „GenBank“ е публикувал три статии. Освен това той е докладвал свои резултати на 6 научни форуми в чужбина и на 7 в страната. Има участие и в изработената препоръчителна инструкция за изпращане на клинични материали за изследване на носителство на причинителите на ККХТ, ХТБС и КЕ до Националната референтна лаборатория.

За осъществяване на резултатната научно-изследователска дейност несъмнено са допринесли и курсовете и специализациите на д-р Й. Кълвачев в чужбина и страната. С негово участие и във ръзка с дисертацията са 1 международен и 2 ведомствени проекта.

В заключение може да се каже, че дисертацията на д-р Николай Златков Кълвачев е свързана с актуална тема, добре структурирана е, издържана е в методологично отношение, написана е прецизно и има важни приноси от научен и приложен характер. Трудът напълно удовлетворява критериите за получаване на образователната и научна степен "доктор", поради което му давам **положителна оценка**.

01.07.2011 г.

Подпись:


/Доцент, д-р С. Шишков/