

## СТАНОВИЩЕ

относно

дисертационен труд на тема „ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ЕТИОЛОГИЯТА НА ЕНТЕРОВИРУСНИ, НОРОВИРУСНИ И РОТАВИРУСНИ ИНФЕКЦИИ В БЪЛГАРИЯ (1999-2010г.)”, представен за присъждане на научната степен „Доктор на науките” в професионално направление 7.1. „Медицина”, научна специалност „Вирусология” от доц. д-р Нели Стоянова Корсун, д.м., отдел Вирусология, НЦЗПБ

**Автор на становището:** доц. д-р Божин Димитров Камаринчев, д.м.н., ВМА, член на научно жури, определено със заповед № 17 / 03.02.2012г. на Директора на НЦЗПБ

Острите чревни инфекции са актуален здравен проблем, поради свързаната с тях висока заболяемост с тежки клинични форми, възникване на епидемични и нозокомиални взривове с големи медицински и социални разходи. Обект на настоящото проучване са три групи чревни вируси с важно клинично и епидемиологично значение - ентеровируси, норовируси и ротавируси. Дисертантката си поставя за цел да проучи разпространението на тези вируси в България, участието им в различни по вид взривове от полиомиелит, взривове и спорадични случаи от менингити, енцефалити, тип I диабет и гастроентерити, да определи имунния статус на населението, да създаде алгоритми за бързото им доказване и типизиране, да извърши секвенционен и филогенетичен анализ на определени гени, кодиращи специфични протеини, както и аминокиселинен анализ на определени антигени.

В дисертационния труд са обобщени резултатите от 12-годишни проучвания за ентеро, норо и ротавирусите в България. Дисертантката използва както класически вирусологични и серологични методи (изолация на ентеровируси в клетъчни култури, вирус-неутрализираща реакция, латекс-аглутинация, имуно-хроматографски метод, ELISA за доказване на антиген или специфични антители), така и най-съвременни молекулярно-генетични техники (RT-PCR в различни варианти – едностъпков, двустъпков, nested RT-PCR, секвенционен и филогенетичен анализ, анализ на аминокиселинни секвенции. Използваните в RT-PCR праймерни двойки и протоколите на реакциите са от водещи изследователи в съответните направления, публикувани в литературата, като при някои методи са направени модификации. Методите са описани подробно и прецизно, като са посочени конкретните използвани китове.

За ентеровируси са изследвани вирусологично 12 499 клинични проби (фекални проби, носогърлени смивове, ликвори, трупни материали) от 6553 болни и контактни лица чрез клетъчно култивиране на клетъчните култури RD, L20B, Нер-2.

Дисертантката разшифрова епидемичен взрив от полиомиелит през пролетта на 2001г., като доказва ролята на див полиовирус I тип, внесен от Северна Индия. Изолира 4 диви полиовируса I тип от две деца с клиника на паралитичен полиомиелит и от две здрави деца. Секвенционният и филогенетичен анализ на изолатите потвърждават, че циркулацията на див полиовирус е била кратковременна. Извършените серологични изследвания на деца от малцинствени групи в 6 района на страната показват наличие на деца, напълно незащитени по отношение на полиовирусите.

Проучванията на случаи на остри вяли парализи, възникнали при деца на възраст под 15 год. в България и Македония за периода 1999-2010г., водят до изолиране на 27

полиовируса (7%), от които два „диви“, и 21 (5,6%) неполиомиелитни ентеровируса. Вирусологичните изследвания на пациенти на възраст под 15 год. с парези на лицевия нерв установяват ентеровируси при 3% от изследваните 1585 пациенти, като децата на възраст до 3-4 год. се оказват най-уязвими. При изследване на 505 случая на остри гастроентерити и 31 случая на херпангина с помощта на клетъчно култивиране, честотата на изолиране на неполиомиелитни ентеровируси е 2,8%.

За първи път в България дисертантката проучва на молекулярно ниво ваксинални полиовируси 3 тип, причинили ваксина-асоцииран паралитичен полиомиелит при три деца. Представени са резултатите от вирусологичните, молекулярно-генетични и серологични изследвания на болните деца и техните контактни. Секвенционния анализ на 4 участъка на генома на полиоизолатите установява деатенюиращата мутация в позиция 472 от 5' нетранслиращия се регион на генома, а при единия от полиоизолатите е установена рекомбинация с ваксинален полиовирус I тип в участъка 3D на генома.

Дисертантката доказва продължително отделяне с фекалните материи на генетически променен ваксинален полиовирус 2 тип при дете с тежък имуноен дефицит, развило парализи. Секвенирането на 2 участъка от генома на този вирус установява 9 мутации, свидетелстващи за продължителна репликация на ваксиналния полиовирус в организма на детето.

С цел оценяване на ефективността на полиоимунизациите и проследяване на нивото на колективния имунитет, дисертантката изследва имунния статус на населението по отношение на полиомиелита. Установява незадоволително ниво на защитеност в някои възрастови групи.

Авторката проучва участието на ентеровирусите при случаи на серозни менингити и енцефалити в България. Доказва етиологичната роля на вирус ЕСНО30 при голям епидемичен взрив от серозни менингити през лятото на 2001г., както и на 5 ентеровирусни серотипа по време на повишената заболяемост от невроинфекции през лятото на 2004г. От пациенти с невроинфекции изолира множество ентеровируси от различни серотипове, като най-значителна е честотата на Коксаки В и ЕСНО вирусите (30, 6, 4, 14 тип). Извършва изследване с помощта на RT-PCR на ликвори на пациенти с невроинфекции и доказва наличието на ентеровирусна РНК в 47,5% (19 от 40) от изследваните пациенти със серозен менингит и при 23% (5 от 22) от тези с енцефалити през 2006г. При проучване през 2008/2009г на 110 ликворни проби на пациенти с невроинфекции, ентеровирусна РНК е открита в 60 (55%) проби. Сравнени са резултатите от използване на методите RT-PCR и клетъчно култивиране. Дисертантката разработва диагностичен алгоритъм за детекция и типизиране на ентеровируси с помощта на молекулярни методи, който включва откриване на ентеровирусна РНК с помощта на RT-PCR с праймери от високо-консервативни участъци на 5' нетранслиращия се регион на генома и молекулярно типизиране с помощта на RT-PCR с праймери от региона VP1 с последващо секвениране. Дисертантката извършва секвенционен и филогенетичен анализ на геномните участъци VP1 на два български ентеровирусни щама и доказва генетичната близост на българските изолати с тези, изолирани във Франция, Белгия и Русия.

През периода 1999-2010 г. дисертантката извършва изолации на ентеровируси от клинични материали на пациенти с различни клинични диагнози и здрави лица в клетъчни култури. Най-много ентеровируси са изолирани от пациенти със серозни менингити (12,4%) и остри вяли парализи (12%), а най-малко от пациенти с парези на лицевия нерв (3%) и гастроентерити (2,8%). За периода изолира 514 ентеровирусни щама, от които 92 полиовируса, от тях 4 „диви“, и 422 неполиомиелитни ентеровируса. Най-активна е била циркулацията на Коксаки В вирусите, следвани от ЕСНО типове 30,

6, 4, 14 тип, и ЕСНО 2, 13 и 25 тип. Анализът на възрастовата структура на ентеровирусните инфекции показва предимно засягане на детската възраст под 2 год. Заболявания с ентеровирусна етиология се срещат целогодишно с най-голяма честота през периода юли-ноември.

Дисертантката изследва пациенти с тип I диабет с RT-PCR за ентеровируси. Ентеровирусна РНК е доказана в 36% от изследваните серумни проби на деца с новооткрит тип I диабет и при 5,6% от серумните проби на здравите деца, служещи като контролна група. Проучването потвърждава участието на ентеровирусите в патогенезата на автоимунния диабет.

За първи път в България дисертантката провежда изследвания за норовируси чрез RT-PCR и ELISA за откриване на норовирусни антиген. С помощта на тези методи доказва етиологичната роля на норовирусите при взрив от остри гастроентерити в гр.Самоков през 2007г. и при 4 нозокомиални взрива от остри гастроентерити в столична клиника през 2008г. При взрива в Самоков норовирусен антиген или РНК са доказани при 25,2% фекални проби. При секвениране на 12 положителни за норовируси PCR ампликони от взрива в Самоков, дисертантката установява, че норовирусите, причинили взрива, се отнасят към генетичен вариант GII.4(2006b), а секвенирането на 17 положителни за норовируси проби от спорадични случаи на заболявания доказва норовируси от 5 генетични типа и варианта. С помощта ELISA за ротавирусни, норовирусни, чревни аденовирусни и астровирусни антигени дисертантката извършва анализ на етиологичната структура на вирусните гастроентерити сред хоспитализирани деца и установява, че ротавирусите от група А имат водещата роля (29% от случаите), а норовирусите заемат второ място (12% от случаите). В друго проучване с RT-PCR на спорадични случаи на остри гастроентерити в детска възраст дисертантката открива норовируси в 23,6% от изследваните 110 фекални проби, събрани в 4 региона на страната.

Проучванията на вирусологичните, епидемиологични и молекулярно-генетични характеристики на ротавирусната инфекция в България през периода 2005-2009г. дисертантката извършва чрез изследване на 4640 фекални проби на хоспитализирани с остър гастроентерит лица от 18 региона на страната, повечето от които деца на възраст под 5 год. Честотата на ротавирусните гастроентерити е варирала от 26,5% до 44%, средно 34,5%.

С помощта на RT-PCR и секвениране на амплифицираните с ДНК-ки дисертантката извършва типизиране на циркулиращите в страната ротавирусни щамове според генотипа на двата повърхностни протеина. Сред общо 1364 щамове с определен G (VP7) генотип, най-голяма честота на разпространение има типът G2, следван от типовете G9, G1 и G4. Общо тези типове представляват 98,6% от всички идентифицирани у нас G типове. Много ограничено разпространение имат типовете G5, G6, G8 и G12. Сред общо 1401 ротавирусни щамове с идентифициран P (VP4) генотип, най-голяма честота на разпространение има типът P[8], следван от P[4], а типовете P[3], P[6], P[9], P[10] и P[14] имат разпространение под 1%.

Дисертантката доказва 23 различни комбинации между G и P типовете ротавируси в качеството на моноинфекции. Най-интензивна е циркулацията на щамове с формула G2P[4] (28,6%), следвани от щамове G9P[8] (23%), G1P[8] (22,9%), G4P[8] (22,5%) и слаба циркулация на щамове от тип G3P[8]. Авторката установява малък брой необичайни за човешките ротавируси комбинации на повърхностните протеини и смесени инфекции по G тип и по P тип. От типизираните генетично 1415 ротавирусни щамове 49 щамове са с определен само G тип, 84 щамове – с определен само P тип, а 34 щамове са били напълно нетипирани.