

РЕЦЕНЗИЯ

ОТ ПРОФ. Д-Р ЕМИЛ ГЕОРГИЕВ АЛЕКСАНДРОВ, Д.М.Н.  
ВОЕННО-МЕДИЦИНСКА АКАДЕМИЯ, НАУЧНО -ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКА ЛАБОРАТОРИЯ  
ПО ВИРУСОЛОГИЯ

НА ДИСЕРТАЦИОННИЯТ ТРУД НА ДОЦ. Д-Р НЕЛИ СТОЯНОВА КОРСУН, Д.М.  
"ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ЕТИОЛОГИЯТА НА ЕНТЕРОВИРУСНИ, НОРОВИРУСНИ И РОТА-  
ВИРУСНИ ИНФЕКЦИИ В БЪЛГАРИЯ /1999-2010Г./"

ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ : 7.1 МЕДИЦИНА

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ: ВИРУСОЛОГИЯ

ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА НАУЧНАТА СТЕПЕН "ДОКТОР НА НАУКИТЕ"

**Доц. Нели Корсун е завършила** през 1974г. математическата гимназия в Стара Загора със златен медал. През 1981г. завършва Медицинската академия в Санкт Петербург, Русия - специалност медицина. От 1983 до 1987 г. е редовен аспирант в Института по вирусология "Д.Й.Ивановский". Защитава кандидатска дисертация на тема "Получаване на специфични антитела към човешките левкоцитарни интерферони". От 1987г. досега работи в Националния център по заразни и паразитни болести /научен сътрудник II степен 1987-1997г.; научен сътрудник I степен 1997-2003г./. Избрана е за старши научен сътрудник II степен - 2003г. За периода 2006-2010г. завежда Националната референтна лаборатория по ентеровируси. Научните интереси на доц.Корсун през този период са в областта на чревните вируси и получаване на хибридиomi секретиращи моноклонални антитела към ротавируси, грипни вируси, вируса на хепатит В. От 2010г. завежда Националната референтна лаборатория по грип и ОРЗ, с научни интереси по проблема. Специализирала е в в НЦЗПБ. Има специалност по вирусология. През 2010 и 2011 година има две специализации по молекулярни методи за изследване на грипни вируси в Световния колабориращ център по грипа на СЗО в Лондон, Великобритания..

**Предмет на дисертационният труд на доц. Нели Корсун са проучванията върху етиологията на острите чревни инфекции предизвиквани от ентеровируси, норовируси, ротавируси и тяхното разпространение в България за дванадесет годишен период /1999-2010г./.** Тези инфекции са актуален, перманентен проблем с изключителна здравна и социална значимост. Характерни са със широкия спектър на предизвикваните заболявания - от леко протичащи стомашно-чревни разстройства до развитието на менингити, енцефалити, парализи, миокардити, перикардити, хепатити, някои от които с неблагоприятна прогноза. От съществено значение е водещата роля на чревните вируси за детската възрастова група . Наблюдават се особености в епидемиологията, клиниката свързани с появата на нови серотипове, голямо генетично разнообразие, антигенният шифт и дрейф при някои групи, цикличните епидемични взривове и др. Всичко това определя необходимостта от интензивни проучвания върху разпространението, усъвършенстване на диагностиката , въвеждането на нови методи за диагностика, търсене на обосновани подходи за контрол и въздействие. **У нас много от въпросите свързани с проблема чревни вируси са недостатъчно разработени или въобще не са били предмет на изучаване досега**- както норовирусите, за които няма никакви данни относно разпространението и участието в етиологията на гастроентеритите у нас и др. Всичко това определя значимостта и необходимостта от разработването на труда. Заложената цел е амбициозна, отговаря на съвременните изисквания и е свързана с влагането на много усилия.

**Дисертационният труд на доц. Корсун е написан на 369 стр.:** Съдържание и използвани съкращения - 6 стр.; Въведение - 1 стр.; Обзор на литературата - 112 стр.; Цел и задачи - 1 стр.; Материали и методи - 20 стр.; Резултати и обсъждане - 151 стр.; Обща дискусия - 24 стр.; Резюме на получените резултати /изводи/ - 2 стр., Научни приноси - 1 стр.; Резюме на дисертационния труд - 5 стр.; Библиография - 27 стр.; Публикации във връзка с дисертацията, участия в конгреси, конференции, участия в научно-изследователски проекти, цитирания - 17 стр. Трудът е илюстриран с 80 таблици и 51 фигури, от които 19 броя цветни, оформени много добре.

**Във Въведението доц. Корсун точно, ясно, с висок професионализъм и ерудираност,** представя същността и значимостта на проблема и произтичащите въпроси за разработване и разрешаване за нашата страна и в глобален порядък.

**Обзорът на литературата е направен на базата на 555 литературни източника** от които 15 на кирилица и 540 на латиница. Прави впечатление, че 92,80% от публикациите са след 2000 година. В три раздела: ентеровируси, норовируси, ротавируси са представени, разгледани и обсъдени най-новите данни относно класификацията; структурата; репликационният цикъл; механизмите на еволюция при ентеро и ротавирусите /мутации, рекомбинации, генетични вариации, селекция/ и изменчивостта наблюдавана при норовирусите, която е свързана с появата на нови антигени /антигенен дрейф, шифт/; патогенезата; епидемиологията; клиниката и особеностите на заболяванията причинявани от трите групи чревни вируси; вирусологична диагностика: значение и ефективност на молекулярно-генетичните методи; имунитет; специфична профилактика и възможностите при трите групи на настоящия етап. **Основателно вниманието е насочено към генералния въпрос - ерадикация на полиомиелат в глобален и локален аспект** - значението на острите и вяли парализи, които продължават да се срещат и значението на надзора при тези форми за постигане на поставената цел. **Литературният обзор е написан изключително компетентно, с отлично познаване на проблема в детайли.** В него се съдържа ценна и полезна информация, която би трябвало да се направи достояние на специалистите, на медицинската и широка общественост и се издаде като самостоятелен труд.

**Целта и задачите са поставени точно, ясно, конкретно** и отговарят на напълно необходимостта от проучване разпространението на чревните вируси у нас, значението им за инфекциозната патология и се усъвършенства вирусологичната диагностика чрез въвеждането на съвременни методи от типа на молекулярно-генетичните.

**В раздела "Материали и методи" е представен внушителен брой болни и здрави лица - общо 12 683, от които са изследвани:**

- **Ентеровируси:** за изолация на ентеровируси -12 499 клинични проби /фекални проби, носогърлени смивове, ликвори, трупен материал/ от 6553 лица заболели през периода 1999-2010 г. и техни контактни; за откриване на ентеровирусна РНК са изследвани 177 ликворни проби; серологични изследвания за определяне титъра на специфични антители - 1264 серумни проби; за проучване на етиопатогенетичната роля на ентеровирусите при деца с I тип диабет са изследвани серумни проби от 51 болни и 18 от здрави деца

- **Норовируси:** изследвани са 775 фекални проби от заболели с остър гастроентерит.

- **Ротавируси:** изследвани са 4640 фекални проби от пациенти развили остър гастрентерит.

За изолация на ентеровируси са използвани чувствителни към тях клетъчни линии от човешки и маймунски произход /RD, A549, GMK, KEP-2, L20B/. Използвани са референтни ваксинални полиовируси 1,2 и 3 тип. При изпълнение на вирус неутрализиращата реакция са използвани антисерумни пулове и референтен антиполиовирусен серум.

**Доц. Корсун** използва в своята работа класически, рутинни методи /изолация на ентеровируси в клетъчни култури; вирус-неутрализираща реакция за определяне на серотипа на изолираните ентеровирусни щамове; откриване на ротавирусни и норовирусни антигени във фекални проби посредством латекс-аглутинация и имунохроматография; ELISA за доказване на ротавирусни и норовирусни антигени във фекални проби и откриване на IgM антитела срещу Коксаки вируси/. Използвани са и най-съвременни молекулярно-генетични техники за детекция и генотипиране на ентеровируси, ротавируси и норовируси: RT-PCR /полимеразно-верижна реакция с обратен презапис/ в различни варианти - едностъпков, двустъпков, Semi-nested RT-PCR ; секвенционен и филогенетичен анализ на ентеровирусни и ротавирусни щамове. Участващите в RT-PCR праймерни двойки както и постановката на реакциите са съгласно разработки на CDC - Атланта, САЩ, Health Protection Agency, Лондон, Великобритания. При някои методи са направени коректни модификации. Посочени са търговските китове използвани при проучванията. Всички методи са описани подробно и точно. **Методичният комплекс е сполучливо подбран и осигурява реализирането на поставената цел и задачи.**

В хода на разработката на дисертационният труд са постигнати редица ценни, полезни, оригинални научни и практически резултати. Извършена е обемна, многообразна, прецизна, трудоемка работа. В този раздел са включени три подраздела.

**Ентеровируси.** Представени са и обсъдени редица нови, интересни и ценни данни относно циркулацията на полиомиелитните и неполиомиелитните ентеровируси в България за периода 1999-2010 г.; рисковите фактори, които определят, повлияват дивамиката; значение на имунният статус на населението по отношение на полиомиелита; участие на ентеровирусите в етиопатогенезата на острите вяли парализи, менингити, енцефалити, гастроентерити; генетични изменения на ентеровирусите, подходи за етиологична диагностика.

- През 2011г., на фона на 10 годишно благополучие, у нас възниква малък епидемичен взрив от полиомиелит в Бургаски и Ямболски регион - резултат на внос на див полиовирус I тип от Индия. Своевременното идентифициране на причинителя и проведените противоепидемични мероприятия, включително имунизация с орална полиоваксина, ограничават взрива и осигуряват неговото бързо ликвидиране. Изолирани са били четири диви полиовируса I тип от две деца с клиника на паралитичен полиомиелит и от две здрави деца. В CDC - Атланта, САЩ е извършен секвенционен и филогенетичен анализ на четирите щамове и е установено, че взривът е предизвикан от див полиовирус тип I внесен от Северна Индия. Потвърден е факта, че циркулацията на див полиовирус е била кратковременна и ограничена. Проведени са вирусологични изследвания в три етапа - общо 529 фекални проби от 7 окръга със цел откриване циркулирането на див полиовирус. Извършените в началото на взрива серологични изследвания на деца от малцинствени групи на възраст 0-83 месеца от 6 района на страната са показали

наличие на деца от ромски произход с много ниско ниво на имунитет. Този епидемичен взрив показва необходимостта от подържане на висок имунизационен обхват и бързото доказване на причинителя. В това отношение Националната референтна лаборатория по ентеровируси е реагирала своевременно и е осигурила предприемането на насочени противоепидемични мероприятия.

- В тази връзка специален интерес представлява проучването на имунния статус на населението по отношение на полиомиелита като се има предвид участието на НРЛ по ентеровируси в Глобалната полио лабораторна мрежа на СЗО и усилията за ерадикация на полиомиелита. Състоянието на колективния имунитет на населението е от съществено значение за профилактиката на паралитични заболявания в резултат на внос на диви полиовируси или ваксина-дериватни полио-вируси. В дисертационния труд са представени резултатите от мащабните проучвания проведени в 3 етапа. Обхванати са били предимно деца и младежи на възраст от 1 месец до 18 години от различни райони на страната с големи малцинствени групи. Изследвани са били 1159 серумни проби. Резултатите показват **незадоволително ниво на защитеност при някои възрастови групи**. Проучването е направено много прецизно и точно. Обсъждат се възможностите на инактивираната и орална полиоваксина, критериите за приложение, както и **необходимостта от ефективен контрол за стриктното провеждане на противополомиелитните имунизации**.

- Много ценни са проучванията върху етиологичната роля на полиомиелитните и неполиомиелитните ентеровируси при случаите на вяли парализи. Острата вяла парализа е сложен клиничен синдром характерен с полиетиологичност и полиморфизъм на клиничните прояви, които варират в зависимост от възрастта и географския регион. Ентеровирусите /полио и неполиомиелитни/ са едни от най-честите етиологични агенти на ОВП в детската възраст, а острата вяла парализа е известна като най-честа проява на острата полиоинфекция. **Надзорът на ОВП е златният стандарт за откриването на случаи на полиомиелит**. Националната референтна лаборатория по ентеровируси изпълнява ролята на Национална и Субрегионална полиолаборатория, която осъществява вирусологичния надзор на ОВП в България и Македония. За периода 1999-2010 са изследвани общо 374 случая с остри вяли парализи при деца на възраст 0-15 години /756 фекални проби/ и 431 контактни /420 фекални проби/. Изолирани са били 27 полиовируси /7%/ от които два диви и 25 ваксинални и 21 /5,6%/ неполиомиелитни. Честотата на изолируемост на неполиомиелитни ентеровируси и типовете им са сходни с тези в други европейски страни. **В системата на надзора са включени и постоянните изследвания и наблюдения на болни на възраст под 15 години с парези на лицевия нерв**. Тези данни дават допълнителна възможност за откриване на случаи на полиомиелит и проследяване циркулацията на полиомиелитните и неполиомиелитните ентеровируси в страната. **Установено е слабо участие на ентеровирусите в етиологията на лицевите парези в детска възраст**. За посочения период в България са изследвани вирусологично 1585 болни на възраст под 15 години /изследвани 3132 фекални проби/ - 48 броя изолати /3%/ и 59 контактни /изследвани 61 фекални проби/ - 1 изолат /1,7%/. Фекалните проби са тествани едновременно на клетъчните култури RD и L20B, които са препоръчани от СЗО.

- Проучена възможността на ваксиналните полиовируси да предизвикват ваксина-асоцииран паралитичен полиомиелит /ВАПП/. През 2006 година в района на град Бургас са наблюдавани три случая на ВАПП: при 2 деца от контактен

и при едно от реципиентен тип. От фекалните проби на трите деца са изолирани полиовируси тип 3. Доказана е сероконверсия към тях. Пробите и изолатите са били изпратени за допълнителни изследвания в Референтната лаборатория в Рим където с ELISA и RT-PCR е потвърден ваксиналният произход на щамовете - ваксинородствени /Sabin-like/. Извършеното секвениране на различни участъци от генома на трите полизолати открива в участъка кодиращ големия капсиден белтък VP1 - пет точкови мутации и в региона кодиращ капсидния белтък VP3 - четири точкови мутации. **Доказана е динамика на натрупване на мутации в процеса на репродукция на полиовируса. Такива мутации са доказани при повечето случаи на ваксина-асоцииран полиомиелит причинени от полиовирус 3 тип и се счита, че води до реверсия на невровирулентността.** Представени са резултатите от подробни вирусологични, молекулярно-генетични и серологични изследвания на болните деца и техните контактни. Обсъдени са факторите, които могат да провокират тези процеси: недоносеност, изкуствено хранене, вътремускулни инжекции по време на инкубационния период на полиинфекцията, пропуски в подържане на хигиенните стандарти и др. **Решението на Министерството на здравеопазването да се замени оралната с инактивирана полиоваксина в рутинната имунизационна практика ще допринесе за избягване на подобен риск.**

- Проучен и анализиран подробно случай на продължително отделяне с фекалите на генетично променен ваксинален полиовирус тип 2 при дете с тежък имунен дефицит, развило парализи, с летален изход. При секвениране на два участъка от генома са установени девет мутации, които показват продължителна лепликация на ваксиналния вирус в организма на детето.

- Извършени са проучвания за етиологичната роля на ентеровирусите при случаи на менигоенцефалити и енцефалити в периоди на епидемични подеми на заболяемостта /2001 и 2004г./ и при спорадични случаи на заболявания. И двата големи взрива се развиват през летните месеци. През 2001г. са обхванати предимно южните и югоизточни райони. През 2004г. най-засегната е Западна България. Общият брой на болелите за 2001г. е 703, за 2004г. - 699. **Водещ причинител през 2001г. е ентеровирус ЕСНО30 /74% от изолираните общо 103 щамата от болни с невроинфекции/. Най-засегнати са били възрастовите групи 7-15 и 3-6г. На второ място по значимост в етиологията на серозните менингити е вируса Коксаки В.** Предизвиканите от него заболявания обхващат повече възрастови групи. Най-засегнати са били децата от възрастовата група 6-10 години. изолирани са били неполиомиелитни ентеровируси от пет серотипа /ЕСНО 14, 4р бр 25р Коксаки В4. Заболяванията и при двата взрива са протичали благоприятно. В НРЛ по ентеровируси са извършвани постоянни вирусологични и серологични изследвания на болни със серозни менингити и енцефалити. за периода 1999-2010г. са изследвани общо 2293 пациента /5211 вирусологични проби/ и 209 контактни /219 проби/. Изолирани са били общо 280 неполиомиелитни ентеровируси. Установен е високият потенциал на ентеровирусите Коксаки В и ЕСНО 30, 6, 14 и 4 като етиологични агенти на тези невроинфекции. Генетичният анализ на два български ЕСНО30 изолата с RT-PCR и праймери специфични за VP1 региона на ентеровируси от вид В и последващо секвениране е показал при единия /3037/2001/ генетична близост със съвременни щамове изолирани в Белгия, Франция и Русия. Проучването е направено с оглед разработването на алгоритъм за молекулярна идеинтификация на типа ентеровирус.

- Специален интерес представляват проучванията на етиологичната роля на ентеровирусите невроинфекции с молекулярно-генетични методи и в частност

разработеният през 2006г. от доц. Корсун диагностичен метод RT-PCR за откриване на ентеровирусна РНК в ликвори. Извършени са сравнителни изследвания на новия метод с рутинният метод за вирусна изолация в клетъчни култури както и клинична оценка на възможностите на новия метод. През 2006г. са изследвани ликворни проби от 62 пациента. Ентеровирусна РНК е открита в 24 / 38,7%/. За периода 2008-2009г. са изследвани 110 ликвора като ентеровирусна РНК е открита в 60 /54,5%/. Тези проучвания показват от една страна значителното участие на ентеровирусите в етиологията на серозните менингити и енцефалити и от друга - **необходимостта от въвеждането на молекулярно-генетичните методи /RT-PCR/ като рутинни в диагностичната практика:** съкращава се срокът на изследването, по-чувствителни са, избягват се различни допълнителни процедури и пр. **Безспорно при разработването на диагностичния комплекс /алгоритъм/ за диагностика на ентеровирусите е необходимо да се прецени освен молекулярно-генетичните какви други методи е целесъобразно да се включат:** серологични изследвания /сероконверсия/, в някои случаи и изолиране на клетъчни култури и пр.

- **Проучванията върху циркулацията на ентеровирусите в страната обхващат периода 1999-2010г.** Извършвани са целогодишно като са обхванати болни със suspectни за ентеровирусна етиология заболявания и важно медицинско значение. По-горе бяха разгледани броя на изследваните пациенти и тестваните брой и видове проби. За периода са били изолирани 514 ентеровирусни щамове от 500 лица: 4 диви полиовируса I тип, 88 ваксинални щамове /20 от полиовирус I тип и по 34 от полиовирус II и III тип/ и 422 неполиомиелитни ентеровируси от различни серотипове. С най-засилена циркулация са били Коксаки В - 104 изолата и ECHO 30 - 101 изолата, **След въвеждането у нас на инактивираната поливаксина полиовируси не са били доказвани.** Най-често ентеровируси са били изолирани при болни със серозни менингити, енцефалити и вяли парализи -12%, следвани от пациенти с гастроентерити-6,5% и най-рядко при болни с остри вирусни инфекции и парези на лицевия нерв - 3,8%-3%. Ентеровируси са изолирани и от контактни лица. Установено е, че някои серотипове се окриват ежегодно в единични случаи, други имат циклично разпространение с епидемични подеми /ECHO 30, 6,14/. Ентеровируси се доказват през цялата година като най-голям е броят на изолатите в интервала юли-ноември - сезон на повишена активност на ентеровирусите. Анализът на възрастовата структура показва, че най-силно е засегната възрастовата група 0-5 години /средно 56% от доказаните ентеровируси/; при възрастовите групи 6-10 и 11-15 години процентът на ентеровирусните прогресивно намалява - 23% и 11%; при лицата над 15 години са установени единични случаи на ентеровирусни инфекции /при по-млади индивиди/.

- **Интерес представляват проучванията върху ролята на ентеровирусите при възникване на диабет I тип.** Изследвани са 3 групи: I. деца с новооткрит I тип диабет, II. деца с установен тип I диабет /средна възраст 8,3 г./ и III. здрави /средна възраст - 7 години/. Посредством RT-PCR с панентеровирусни праймери ентеровирусна РНК е открита в децата от I група - 36%. При II и III стойностите са 6,7% и 5,6%. При децата от II група са открити IgM антитела срещу Коксаки вирусите. Тези начални проучвания показват реалната необходимост от разгръщане на изследователската работа в това важно направление и особено значението на молекулярно-генетичните реакции за тяхната точна, своевременна диагностика.

**Норовируси.** Както е известно норовирусите са най-честите причинители на епидемични взривове от остри небактериални гастроентерити при лица от

**всички възрастни групи.** Епидемичните взривове обхващат здравни заведения, детски градини, училища, ресторанти, старчески домове, семейства и пр. Норовирусите имат водеща роля при възникване на хранителни взривове. Те са широко разпространени по целия свят. Имат повишена активност през студените месеци Човешките калицивируси не се култивират *in vitro* и лабораторни животни. Поради това съвременния диагностичен алгоритъм при тях е на база ELISA и молекулярно-генетични методи RT-PCR, Real-Time RT-PCR. Доц. Корсун използва успешно този комплекс при своите изследвания.

**Проучванията обхващат периода 2007-2010 година и включват:**

- **Участие на норовирусите при възникване на епидемични взривове от остри гастроентерити в България.** Представени са резултатите от проучването на епидемичен взрив в гр. Самоков през месец февруари 2007г. Заболяват 977 лица от различна възраст с характерна клинична симптоматика: гадене, повръщане, коремни болки и диария. В НРЛ по ентеровируси са изследвани 147 фекални проби. 36 проби са били изследвани с RT-PCR, а останалите чрез ELISA. При 37 /25,2%/ от изследваните фекални проби е открито наличие на норовирусна РНК или антиген. 12 проби са били проучени в Istituto Superiore di Sanita в Рим. Установено е, че норовирусите от всичките секвенирани 12 проби от взрива в Самоков се отнасят към генетичен вариант, който през този сезон е бил широко разпространен в Европа.

- **Анализирани са четири нозокомиални взрива от остри гастроентерити** избухнали през месеците януари, февруари, април и декември 2008г. сред възрастни пациенти на лечение в две вътрешни отделения. Симптоми на гастроентерит развиват 68 болни. Изследвани са били чрез RT-PCR 47 фекални проби за норовируси. Норовирусна РНК е била открита в 50% от изследваните проби. Доказана е етиологичната роля на норовируси широко разпространени в света през последните години.

- **Проучен е относителният дял на норовирусните инфекции в етиологичната структура на острите гастроентерити сред хоспитализирани деца в България.** Изследвани са били 470 фекални проби от деца с клиника на остър гастроентерит хоспитализирани в различни клиники в страната за периода декември 2006г.-април 2007г. Възрастта на болните е била от 25 дни до 12 години. Изследването е извършено със специфичен антиген-доказващи ELISA тестове: Rotavirus, Norovirus, Astrovirus, Adenovirus. Положителните резултати за норовирусен антиген са били потвърдени и с RT-PCR метода. Вирусни ентеропатогени са били доказани в 220 /46,8%/ от изследваните проби. Норовирусите са причинили 57 /12,1%/ от случаите на остър гастроентерит. На първо място са ротавирусите от група А - 136 случая /28,9%/. Секвенционният анализ е показал наличие на няколко типа и варианти норовируси. През периода 2009г. - 2010г. са изследвани 110 проби от деца хоспитализирани в болници в София, Пловдив, Перник и Стара Загора чрез RT-PCR. Норовирусна етиология на заболяванията е била доказана при 26 деца /23,6%/.

**Извършените проучвания показват важната роля на норовирусите в инфекциозната чревна патология в България к необходимостта от разработване на система за надзор на тези актуални, широко разпространени заболявания.**

**Ротавируси.** Ротавирусите от група А са основните причинители на остри гастроентерити в детската възраст. Тези заболявания представляват сериозен здравен и социален проблем. Проучванията в това актуално направление обхващат периода 2005-2009г. Последователно са представени следните резултати:

- **Проучване на относителния дял на ротавирусните гастроентерити в етиоло-гичната структура на острите гастроентерити сред хоспитализирани лица.** За този период са регистрирани 87 473 случая на остри гастрентерити и ентероколити. Броят на заболелите деца под 14 години / 2006-2009г. / е 47 276 /64,67%/ спрямо общият брой на регистрираните за този период. За ротавируси са изследвани фекални проби от 4640 болни. От тях 4614 /99,4%/ са били хоспитализирани и двадесет и шест са лекувани амбулаторно. 91,3% са били деца под пет години, 7,3% - деца на възраст 5-18 години, а 1,4% - възрастни над 18 години. За детекция на ротавируси във фекалните проби са прилагани различни антиген-доказващи методи и RT-PCR. От изследваните 4640 фекални проби позитивни за ротавируси от група А са били 1603 -34,5%. Изводът е, че ротавирусните гастроентерити заемат голям относителен дял сред хоспитализираните деца: от 26,5%/2008г./ до 44%/2009г./.

- **Епидемиологична характеристика на ротавирусните гастроентерити сред хоспитализирани лица за периода 2005-2009г.** Установено е, че най-засегната е възрастовата група 12-23 месеца /41,6%/ , следвана от групите 6-11 месеца /37,3%/ и 24-35 месеца /36,9%/ . Общо децата на възраст до 3 години са съставяли 84,8% от доказаните случаи на ротавирусни гастроентерити, а децата до 5 години - 92,7%. Не е установена статистически значима разлика по отношение на пола на лицата с доказана ротавирусна етиология на заболяването. Месечното разпределение на случаите показва, че ротавирусни гастроентерити се доказват през цялата година, като най-голяма честота са имали през студените месеци /ноември-април/. Наблюдавана е флукутация на пиковете на ротавирусна активност /декември 2005г. и 2008г./ февруари /2006г./, ноември и март /2007г./ . Най-висок е процентът на позитивните за ротавируси проби в следните райони: Варна - 41%, София-38%, Стара Загора-33%, Плевен-29%, Пловдив и Пазарджик - 26%, Хасково - 25% и пр.

- **Интерес представлява извършеното типизиране на циркулиращите в България ротавирусни щамове според генотипа на двата повърхностни протеина: G /VP7/ и P/VP4/ посредством молекулярно-биологични методи /RT-PCR и секвениране/ .** Сред общо 1364 щамове с определен G/VP7/ генотип най-голяма честота има типът G2 /28,2%/ следван от типовете G9 /25,7%/ , G1 /23,5%/ и G4 /21,2%/ - общо тези типове представляват 98,6% от всички характеризирани G типове. Сред общо 1401 ротавирусни щамове с идентифициран P /VP4/ генотип , най-голяма честота на разпространение през периода 2005-2009г. има типът P [8] /67,7%/ следван от P [4] /29,9%/ . Спорадично разпространение са имали типовете P[3], P[6], P[9], P[10], P[14]. Доказани са 23 различни комбинации между G и P типовете ротавируси в качеството на моноинфекции. Най-широко разпространение са имали ротавирусните щамове с формула G2P[4] - 28,6%, G9P[8] - 23%, G1P[8] - 22,95%, G4P[8] - 22,5%, които имат най-широко разпространение в глобален мащаб. Интерес представлява слабата циркулация у нас на ротавируси от тип G3P[8], които са широко разпространени в другите страни. Активно-ста на циркулацията на ротавируси с определени G/P комбинации се характеризира с циклични колебания с ежегодна смяна на доминиращия тип. Щамове с комбинация G9P[8] са доказвани ежегодно и най-често през 2006г. /84,5%/ , 2005г. /48,1%/ . С най-голяма епидемиологична значимост през 2008г. са щамове с формула G1P[8] /39,9%/ , а тези с комбинация G4P[8] през 2009г. /47,95/ и пр. Установено е, че ротавирусните типове G1, G3, G4, G9 се комбинират най-често с тип P[8], докато G2 се комбинира с тип P[4]. Тези комбинации, обичайни за човешките ротавируси, съставят общо 97% от всички доказани ротавирусни комбинации. През периода 2005-2009г. са доказани и 15



комбинации с участието на редки за човешките ротавируси типове, които е възможно да имат животински произход. От общо доказаните 1603 ротавирусни щамове - 99 /6,2%/ са представлявали смесени инфекции от два или повече ротавирусни щамове. Открити са частично или напълно нетипируеми ротавирусни щамове /133--9,4% само с определен G тип, 84 с определен само P тип и 34 - 2.4% щамове са били напълно нетипируеми/. Нетипируемите ротавирусни щамове заслужават специално внимание, тъй като могат да съдържат необичайни за човешките вируси G (VP7) или P (VP4) типове с повишена вирулентност. Установено е, че не съществува зависимост между възрастта на пациента и G типа на ротавируса, причинител на заболяването.

- **Секвенционен и филогенетически анализ на ротавирусни щамове G и P типове широко разпространени сред човешката популация.** Проучванията на генетичните и антигенни вариации в рамките на серотипа /основен механизъм, използван от ротавирусите за избягване на имунната защита на организма/ са особено ценни и полезни в научен и практически аспект. За първи път у нас е извършено характеризиране на циркулиращите ротавирусни щамове с молекулярно-биологични методи /RT-PCR и секвениране/. Извършен е секвенционен и филогенетичен анализ на 35 секвенции на доказани у нас ротавирусни щамове, представители на най-често срещаните типове /G1, G4 и G9; P[4] и P[8]/, а така също и на някои редки типове /G3, G5, G6, G8, и G12; P[6], P[9] и P[14]/. Тези проучвания показват генетичната близост на българските щамове със съвременните щамове, които са разпространени в други близки и по-далечни страни. Идентифицирани са единични секвенции с вероятен животински произход. Щамовото характеризиране показва, че циркулиращите у нас ротавируси са предимно от типове по отношение на които лицензираните в ЕС ваксини Rotarix и Rota Teq са с висока ефективност. Извършен е и антигенен анализ на български щамове със специфичност G1, G3, G4, G8 и G9. Сравнени са техните аминокиселинни секвенции в областта на антигенните региони с тези на референтни щамове и щамове циркулиращи в други страни. Установено е сходство в антигенните райони както и някои секвенционни различия. Проучванията за откриване на антигенни различия между българските ротавирусни щамове и аналогичните щамове от двете ваксини установяват в нашите щамове /от типове G1, G2, G3, G4 и P[8]/ различен брой /2-7/ замени на аминокиселини в някои от антигенните райони на протеините VP7 и VP4 в сравнение с ваксиналните щамове. Подчертава се необходимостта от постоянен мониторинг на подобни аминокиселинни промени, някои от които могат да доведат до формиране на варианти - избягващи индуцираната от ваксините защита.

**Дисертационният труд на доц. Нели Корсун завършва с изключително добре направена обща дискусия. Извършена е мащабна, многообемна и трудоемка работа, която е представена и анализирана компетентно, професионално, ерудирано. Много добре е очертано съвременното състояние на проблема "Остри чревни инфекции" : постигнатото, перспективите, насоките, подходите на бъдещата изследователска и проучвателна дейност, усъвършенстване на диагностиката, ефективния надзор на тези актуални, социално-здравно значими заболявания, ролята мястото и постиженията на НРЛ по ентеровируси в модернизиране и повишаване ефективността на работата. Получените резултати при разработката на дисертационния труд са много добре обобщени в 11 пункта: проучено е участието на полиомиелитните и неполиомиелитни ентеровируси при възникване на взривове от полиомиелит, ваксина-асоцииран паралитичен полиомиелит, остри вяли парализи при деца под петнадесет години, серозни менингити и енцефалити, диабет I тип;**

установена е констелация от циркулиращи ентеровируси и динамиката на тяхното разпространение през дванадесет годишен период; проучванията върху имунния статус на населението показват, че подържането на добър имунен статус гарантира избягване на взривове от полиомиелит; оптимизираният алгоритъм за бърза детекция и типизиране на ентеровируси в клинични проби чрез молекулярно-биологични методи /RT-PCR/ е много ценен, позволява бърза идентификация на ентеровирусите без клетъчно култивиране. Тук би трябвало добре да се обсъди включването в диагностичния комплекс и на други методи, които ще разширят възможностите и точността на изследванията; установено е, че норовирусите имат значително участие при възникване на епидемични и нозокомиални взривове у нас, водещи причинители са норовирусите от тип GII,4; проучванията върху етиологичната структура на вирусните гастроентерити сред хоспитализирани деца показват водещата роля на ротавирусните инфекции /29%/ следвани от норовирусните /12%/; установено е широкото разпространение на ротавирусите в България през периода 2005-2010г. /26,5% - 44%/; извършеното мащабно характеризиране на циркулиращите ротавирусни щамове по G и P тип са показали предимно разпространение на ротавирусите със специфичност G2P[4], G9P[8], G4P[8], G1P[8]; филогенетичният анализ на циркулиращи у нас ротавирусни щамове разкрива техните еволюционни взаимоотношения с щамове от други страни и наличието на вътретипова хетерогенност при някои ротавирусни щамове; сравнителният антигенен анализ на български ротавирусни щамове показва сходство на аминокиселините в основните антигенни участъци на повърхностните протеини VP7 и VP4 с ротавирусните щамове от други страни и с щамовете включени в лицензираните ротавирусни ваксини; ротавирусите от група А у нас са характерни с генетично многообразие, промени в спектъра и разпределението на отделните типове, вътретипова хетерогенност - това обуславя необходимостта от постоянен мониторинг на циркулиращите ротавирусни щамове.

**Реализирането на поставената цел и задачи е свързано с интензивна, многообразна и обемна работа, преодоляването на редица трудности, усъвършенстване на диагностичния процес, въвеждането на нови ефективни методи, постоянно наблюдаване на заболяемостта, своевременно реагиране и осигуряване на бърз и точен диагностичен отговор. Целта и задачите на дисертационния труд са изпълнени изцяло на съвременен равнище. При разработването на труда са постигнати редица научно-теоритични приноси с оригинален характер и значимост в национален и международен аспект, приноси с потвърдителен характер, както и ценни за практиката научно-приложни приноси. Приемам изцяло представеният списък и разпределението по групи на направените приноси. По същество те бяха представени, разгледани и коментирани в хода на рецензирането на труда.**

**Нямам никакви бележки по отношение на труда и го приемам изцяло като завършен и много ценен.**

**Личните ми впечатления от доц. Корсун са отлични. Тя е изграден специалист, ерудиран и компетентен научен работник, който умело съчетава необходимостите, изискванията на науката и практиката. Познавам научната продукция на доц. Корсун и я оценявам високо. Представеният списък на публикациите показва нейната научна продуктивност: 43 публикации в наши и международни списания, от които в международни списания - 12, в български на латиница - 6, в български - 25. Общият IF е 45,135. Представен е списък на 116 цитирания. Доц. Корсун има публикувана 1 монография, участие в един учебник.**

Има участие в 38 конгреси, конференции и симпозиуми, от които 20 в чужбина и 18 в България. Участва в разработването на 7 научно-изследователски проекта. Изнася лекции по вирусология на студенти биолози и на лекари в курсове по линия на СДО.

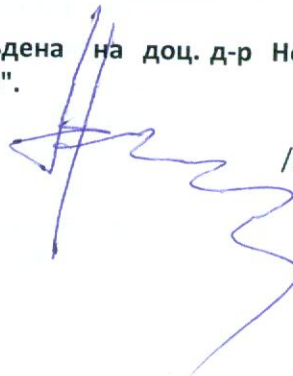
Авторефератът е направен много добре и отразява точно и пълно извършената трудоемка и много ценна и полезна работа

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Дисертационният труд на доц. д-р Нели Стоянова Корсун, д.м. "ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ЕТИОЛОГИЯТА НА ЕНТЕРОВИРУСНИ, НОРОВИРУСНИ И РОТАВИРУСНИ ИНФЕКЦИИ В БЪЛГАРИЯ /1999-2010Г./" за присъждане на научната степен "Доктор на науките" притежава всичките необходими качества: актуалност на разработвания проблем с изключителна здравна и социална значимост, мащабни проучвания върху разпространението на ентеровирусите, норовирусите, ротавирусите в страната и значението им в етиологията на острите чревни инфекции, особеното значение за някои възрастови групи, характерната изменчивост на тези вируси и проблемите свързани с ефективния надзор, усъвършенстването, разработването, въвеждането на иновационни технологии, на нови съвременни методи за бърза и точна диагностика на чревните вируси, откриването и изучаването на нови, неизвестни досега факти, нови подходи в борбата и профилактиката. Трудът представлява трудоемка, многостранно, мащабно проучване с редица оригинални научни и научно-приложни приноси. Доц. Н.Корсун е отлично подготвен, високоерудирани специалист и изграден научен работник, който е допринесъл много за съвременното развитие на Националната референтна лаборатория по ентеровируси.

Предлагам, с убеденост, да бъде присъдена на доц. д-р Нели Стоянова Корсун, д.м. научната степен "Доктор на науките".

7.03.2012г.

Проф.:



/Александров/