



До Председателя на Научното жури
назначено по Заповед № 521/15.12.2022 г.
на Директора на НЦЗПБ за обявения конкурс
за „Доцент” по научна специалност 01.06.12
„Микробиология” в НЦЗПБ
Държавен вестник, бр. 87/01.11.2022 г., стр. 77

Рецензия

За конкурс за заемане академична длъжност Доцент в областта на висшето образование
4. „Природни науки, математика, информатика“ в професионално направление
4.3. „Микробиология“ за нуждите на отдел Микробиология на НЦЗПБ

С единствен кандидат гл.асистент Ива Петрова Трифонова, дм Ръководител НРЛ
„Кърлежово-векторно предавани инфекции, лептоспири и листерии“ на НЦЗПБ

от Проф. Д-р Тодор Кантарджиев, дм, дмн

Нямам общи публикации и нямам
конфликт на интереси от друг характер по
смисъла на ал.1, т.3 и 5 от ДР на ЗРАСРБ с
единствения кандидат

Всички представени и класифицирани документи на кандидата за академичната
длъжност са акуратно представени според изискванията на Закона за развитие на
академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и правилника и критериите на
НЦЗПБ за академичната длъжност „Доцент”. Според представените и подкрепени с
документи на гл.асистент Ива Трифонова, дм, тя отговаря категорично на минималните
изисквания (400 точки) като ги надвишава почти двойно! със 795 точки за настоящия
конкурс.

1. Кариерно развитие и биографични данни

Просредил съм от близо мотивираното и възходящо кариерно развитие на
кандидатката, като завеждащ отдела по Микробиология и до преди две години, директор
на Центъра.

Придобива бакалавърска степен по молекулярна биология СУ „Св. Климент
Охридски“ през 2005 г., веднага след това придобива и научна степен магистър по
молекулярна вирусология в същия факултет през 2007 г. От 2008 до 2010 г. е редовен
докторант в НЦЗПБ, Отдел Микробиология, НРЛ „Кърлежово/векторно предавани
инфекции, лептоспири и листерии“ с научен ръководител Проф. Ива Христова на тема
„Оптимизиране на серологичната диагностика и проучвания върху патогенезата на
Лаймската борелиоза с рекомбинантни антигени от *Borrelia burgdorferi*“. През 2011 г. ѝ е
присъдена, след публична защита в НЦЗПБ Образователната и научна степен “Доктор по
микробиология”. Докторската ѝ работа впечатли научната общност със своята

иновативност и актуалност. От 2017 г. придобива специалност по Микробиология (Лабораторна микробиология) и от 2021 г. започва специализация по програмата за Лабораторна вирусология. Последователно работи като биолог (2010-2012) в НЦЗПБ, и главен асистент (2012-2023). Завеждащ лаборатория НРЛ „Кърлежово/векторно предавани инфекции, лептоспири и листерии“ на НЦЗПБ, Отдел микробиология, е от 2020 г. На всички колоквиуми за докторантски минимум и за придобиване на специалност е демонстрирала задълбочени познания, плод на системна самоподготовка. Научният ѝ ръководител и НЦЗПБ са ѝ предоставили прекрасни възможности за квалификация и самоосъвършенстване, свидетелство за което са и специализациите и курсовете в чужбина: Тя специализира в Aristotle University of Thessaloniki, в Солун, Гърция през 2010 г. и в Istituto Superiore di Sanita в Рим, Италия през 2017 г., както и взема участие в курсове, семинари и уебинари у нас и в чужбина, между тях в Швеция през 2016 г., в Италия през 2017 г., в Дания през 2018 г. и в три уебинари на Emerging Viral Diseases-Expert Laboratory Network (EVD-LabNet) през 2022 г.

2. Обекти на научноизследователската дейност

Голяма част от научната продукция на кандидатката са в актуална сфера на инфекциозните болести, която е от голямо епидемиологично, клинично и терапевтично значение за нашата страна и световната наука. Обект на научните изследвания са причинителите и векторите на вирусни и бактериални трансмисивни инфекции, както и някои други медицински значими бактерии и вируси.

Проучванията обхващат:

- вирусни причинители на трансмисивни инфекции като Западно Нилския (West Nile) вирус, вируса на Кримската-Конго хеморагична треска, вируса на жълтата треска,
- бактериални причинители на трансмисивни инфекции: *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia burgdorferi sensu lato complex*, *Anaplasma spp.*,
- реакция свързване на комплемента (РСК), имуноблот и ELISA за IgM и IgG антитела, серотипиране
- други вируси като *Dobrava-Belgrade hantavirus*, *Puumala hantavirus* и причинителя на COVID-19 пандемията SARS-CoV-2 и мн.др.
- други бактерии като *Leptospira* и *Listeria spp.*

Използвани са множество научноизследователски методи като:

- конвенционална PCR, nested PCR, PCR с обратна транскрипция, Real Time PCR,
- секвениране на PCR продуктите, филогенетичен анализ и целогеномно секвениране на вируса на Западнонилската треска.

Разработени са и са проучени за първи път у нас ELISA тестове с рекомбинантни OspC, FlaB, OspA и VlsE протеинни антигени на *B. burgdorferi* и са доказани техните високи специфичност и чувствителност и по-добра акуратност от тази на ELISA тестовете с цялоклетъчен борелиен антиген.

Апробирани са система за клониране и експресия на имунодоминантни протеини на *B. burgdorferi* и оригинални PCR техники за гените и плазмидите на бактериите.

Извършени са мащабни проучвания на птици и животни като резервоари на причинителите на Лаймската борелиоза и Човешката гранулоцитна анаплазмоза чрез PCR и ELISA за антитела, на *Dobrava* хантавируса (*DOBV*) и *Puumala* хантавируса с PCR, секвениране и клъстериране на изолатите и на лептоспирите с PCR. Изследвана е също така честотата във векторите преносители на инфекциите - на вируса на Кримската-Конго

хеморагична треска в кърлежите и на вируса на Западно-нилската треска в комарите.

Освен гореизложеното други важни проучвания са и комплексните изследвания на материали от пациенти със Западнонилска треска и Кримска-Конго хеморагична треска, на хантавирусните инфекции при пациенти с хеморагичната треска с бъбречен синдром (ХТБС) и на бактериални и вирусни инфекции при болни с неясни фебрилни състояния, които етиологично осветяват клиничния аспект на тези животозастрашаващи инфекции с голямо значение за общественото здраве и сигурността на обществото.

3. Научна продукция

Кандидатката в конкурса гл.асистент Ива Трифонова, дм участва в настоящия конкурс с общо 48 научни труда, като журнални статии в рецензирани научни издания с академична редколегия както следва:

- 22 публикации в научни списания с международно признат и индексирани по години импакт фактор. Почти всички (21 броя) са след защитата на дисертацията и не са рецензирани;
- има участие в написването на глава от книга с научен характер през 2022;
- 25 публикации в наши рецензирани научни издания с академична редколегия, от тези журнални статии 15 са след защитата на дисертацията.

От всички представени научни трудове, общо 37 са публикувани след дисертацията. Проучени са голям брой трудно култивирани микроорганизми като напр. причинителите на Лаймска борелиоза, Човешка гранулоцитна анаплазма, хантавирусите и множеството причинители на други, не добре още проучени в света вирусни трансмисивни инфекции. Проучвания има и на причинителя на COVID-19, което показва бърза реакция към нововъзникнали етиологични фактори. В публикациите на Ива Трифонова прави впечатление както методологичното разнообразие, така и точното определяне на тематиката, касаещо най-новата научна проблематика.

Впечатляващ е фактът, че всички представени 21 публикации след дисертацията, са публикации в списания с импакт фактор, преобладаващото болшинство от които са международни. Кандидатът е първи автор на 6 от представените публикации, а във всички останали личи методичното му присъствие. Участва като съавтор на глава от книгата за ковид-19: „Вирусен товар, динамика на специфичните антитела и нива на основните цитокини в зависимост от тежестта на COVID-19“.

Документираното участие на гл.асистент Ива Трифонова, дм в международни научни конгреси и научни конференции е общо 27 броя, от тях 19 са след защитата на дисертацията, което е удостоверено в издадените сборници с академична редколегия. През годините на научната си кариера в НЦЗПБ тя взема участие в почти всички конгреси и конференции по инфекции у нас (общо 80, от тях 63 след защитата на дисертацията). Представените доказателства са също така безспорен показател за нейната научноизследователска активност и спечелен авторитет сред научната общност.

Гл.асистент Ива Трифонова, дм взема активно участие в научно-изследователски проекти/програми, от които 4 с международно финансиране, а 5 са финансирани от Националния фонд за научни изследвания и една национална програма. Общо 10 научни участия, което е важно за създаване на ползотворни научни контакти и повишаване експертизата на кандидатката. В публикационната активност личи методическото ръководство и подкрепа на проф. Ива Христова, дмн.

4. Наукометрични показатели на научната продукция

Изчисленият по години на публикация общ импакт фактор (ИФ) на журналните статии на гл. асистент Ива Трифонова, дм е над 35, това категорично потвърждава

приносният им характер и интереса на международната академична общественост към тях.

Статията с най-висок ИФ е в изданието на CDC - Emerging Infectious Diseases през 2016 г с импакт фактор 6,751. Другите списания приели нейни статии са както следва: Vector-Borne and Zoonotic Diseases през 2013 г., Journal of Medical Virology, две статии през 2015 и 2022 г., Ticks and Tick-borne Diseases през 2016 г., Infection, Genetics and Evolution през 2019 г., Journal of Infection and Public Health през 2020 г. и Journal of Clinical Virology, през 2020 г.

Цитациите на статиите надхвърлят около три пъти (146) минимално изискваните точки (50) в конкурса за доцент, според приетите официално наукометрични критерии. Част от цитиранията са в много авторитетни списания с много висок ИФ (Frontiers in immunology, Eurosurveillance, Frontiers in Microbiology, Emerging Microbes & Infections). Това е едно от най-красноречивите доказателства за високата научна стойност на продукцията на кандидатката.

5. Научни приноси

В научните трудове на гл.асистент Ива Трифонова, дм са отразени резултатите от дългогодишни систематични проучвания на етиологията, векторите и резервоарите на основни векторно-трансмисивни бактериални и вирусни зоонози в нашата страна, които са със значение за общественото здраве. Почти всички са пионерни за страната и са свързани с въвеждането на редица нови методи за изследване - различни варианти на Полимеразно-верижна реакция (Real time RT-PCR, nested PCR), както и секвениране на генома на някои вируси.

Приносите са групирани в следните основни направления:

Еколого-епидемиологични проучвания

Проучвания върху гризачи (статии №№ 2, 5, 6, 14, 20, 30, 43).

1. За първи път чрез PCR метод е установена заразеност с *Dobrava* хантавирус (DOBV) в различни видове мишки – *Apodemus flavicollis* (7.7%) и *Apodemus agrarius* (1.43 %) в три района на страната – Пазарджик, Сливен и Смолян. Частично са секвенирани S- и L- сегментите от генома на вируса и е направено клъстериране на българските изолати. Друго проучване на гризачи от видовете *Apodemus agrarius*, *Apodemus sylvaticus*, *Apodemus flavicollis*, *Mus musculus*, *Microtus arvalis*, *Rattus rattus* и *Crocidura suaveolens* от региони от всички области в Южна България с разработен TaqMan Real time RT-PCR за доказване на хантавируси в гризачи установява, че хантавирусите се доказват предимно в далак и бъбрек и в по-ниска степен в кръв и бял дроб на гризачите. Общо при 9 броя гризачи е установена специфична хантавирусна РНК. Осем от тях са установени в района на гр. Пещера, област Пазарджик. Един заразен екземпляр е доказан в района на гр. Сливен.

2. Установяване на ареала на чувствителни резервоари за причинителите на кърлежово-предаваните инфекции Лаймска борелиоза и Човешка гранулоцитна анаплазмоза. Чрез прилагането на полимеразно-верижна реакция за първи път в тези ареали е установено наличие на причинителите на Лаймската борелиоза във видовете *Apodemus flavicollis*, *Apodemus agrarius* и *Apodemus sylvaticus*. Като най-висок процент заразеност се открива при *A. flavicollis*. Откриване наличието и на специфични антитела с ELISA метод. Чрез PCR изследване се открива наличие на ДНК на *A. phagocytophilum* във *A. flavicollis*, *A. agrarius* и *A. sylvaticus*, като най-висока заразеност се открива при *A. agrarius*.

3. За първи път с молекулярно-генетични методи е доказана циркулацията на Puumala хантавирус (PUUV) в страната. Вирусът е установен в *Myodes glareolus* (горска полевка) в

три района на страната – Смолян, Батак и Велинград. Направен е филогенетичен анализ на шест секвенции на L-сегмента на генома на вируса. Установена е принадлежност към Алпийско-адриатическата генетична линия на PUUV.

4. Проведено е първо за географския ареал проучване на гризачи за заразеност с патогенни лептоспири. Чрез nested PCR метод *Leptospira spp.* DNA е установена в 28.44% (31/109) от изследваните проби от гризачи от видовете *Apodemus spp.*, *Myodes glareolus*, *Microtus arvalis*, *Microtus spp.* (order *Rodentia*) и *Sorex minutus* (order *Soricomorpha*) от три области на страната Пазарджик, Смолян и Пловдив.

Пионерни за страната проучвания върху вектори на вирусни и бактериални трансмисивни инфекции (статии №№ 7, 9, 17)

5. Доказано е наличието на вируса на Западно-нилската треска в комари *Culex pipiens* от областите Плевен и Русе. Проведено е цялогеномно секвениране и е потвърдена принадлежност към унгарската група на генетична линия 2 на WNV. Сравнителният анализ на секвенията от пациент и от векторите показва, че те принадлежат към различни клъстери.

6. Направено е PCR проучване на кърлежи от видовете *Hyalomma marginatum* и *Rhipicephalus sanguineus* за наличие на заразеност с вируса на Кримската-Конго хеморагична треска (ККХТ). Сравнително висок процент (6.3%) на заразеност се открива при *H. marginatum*, събрани в района на Бургас и Кърджали. Установена е принадлежност към генетична линия Европа 1. При кърлежите от вида *R. sanguineus* s.l. (при 11.8% от изследваните кърлежи), за първи път е установено наличието на шам AP92, генетична линия 2 в България, като най-висок процент на заразеност е открит в районите на Кърджали и Хасково.

Проучвания върху вирусни трансмисивни инфекции (статии №№ 8, 15, 17, 40, 39)

7. Доказана е циркулацията на генетична линия 2 на вирусът на Западно-нилската треска в страната. Молекулярно-генетично е потвърден случай на невроинвазивна ЗНТ. За първи път е секвениран геномът на вируса и е определена принадлежност към централния/южния клон на генетична линия 2.

8. За първи път в страната са въведени конвенционални и Real-time RT-PCR системи за детекция на вирусите на Западно-нилската треска (lineages 1 и 2) (ЗНТ), Кърлежов енцефалит (КЕ), Зика вирус, Вирусна треска Денга, Жълта треска, Тоскана вирус, Усуту вирус и Чикунгуя. Избрани са следните таргети за детекция: WNV - 5'-UTR (untranslated region) и част от капсидния ген; ZIKV- envelope gene; TBEV - 3' noncoding region; DENV - 5'-UTR (untranslated region); YFV - 5'-UTR (untranslated region); TOSV - N-гена (S-сегмента); USUV - NS5 гена; CHIKV - nSP1 гена

Проучвания върху вирусни хеморагични трески (статии №№ 10, 25, 26, 31)

9. Проучена е етиологията на остри неясни фебрилни състояния за уточняване ролята на хантавирусите и вируса на ККХТ. Установени са специфични ИгМ антители срещу Хантавируси при 2.8% от проучваната група. Най-висок дял на хантавирусни инфекции е установен в областите Бургас и Пловдив. Малко по-висок е дялът (3.8%) на ККХТ. Областите с най-голям брой положителни проби са Бургас и Сливен, следвани от Пловдив и Русе.

10. Проучени са диагностичните възможности на различни серологични тестове за откриване на антители срещу хантавируси - ELISA, реакция свързване на комплемента

(РСК) и имуноблот. Потвърдена е по-високата чувствителност и специфичност на ELISA и имуноблот метода в сравнение с комплемент фиксацията.

11. Описани са ареалите на разширяване на разпространението на вируса на ХТБС в България. За пръв път е потвърдено участието на *PUUV* Хантавирус като причинител на заболявания в страната и е направено сравнение на епидемиологичните особености и клиничната манифестация при пациенти с *DOBV* и *PUUV* инфекция.

Пионерни за страната сероепидемиологични проучвания върху разпространението на вирусни хеморагични трески и векторно-трансмисивни инфекции в страната (статии №№ 9, 11, 12, 13, 16, 22, 38, 41, 44)

12. Направени са няколко широкомащабни сероепидемиологични проучвания за разпространението на ККХТ, ХТБС, ЗНТ и КЕ, обхващащи всички области на страната. Изследвани са както хора, така и домашни животни – говеда, кози и овце. Изяснени са основните области на разпространение (най-висока серопревалентност) на съответните инфекции.

13. Най-висока серопревалентност е установена за *CCHFV* в областите Хасково и Ямбол.

14. Най-високи нива на серопревалиране на *WNV* са установени в София-област (10%) и областите Видин (7.5%), следвани от Русе и Силистра с по 6%. Общо за страната серопревалентността е сравнително ниска (1,2%) и се запазва през следващите години (1,5%). Установени са много ниски нива на серопревалиране на *TBEV*.

15. Установяват се нива на серопревалентност от 24,4% на специфични антитела срещу Тоскана вирус, причинител на папатадиева треска, което за първи път потвърждава циркулацията на вируса в страната. Като рискови за възникване на инфекция с най-висока серопревалентност са установени областите Благоевград, Кърджали, Ямбол, Варна и Плевен.

16. Установена е висока серопревалентност (72%) на специфични антитела срещу вируса на ККХТ в домашни преживни животни. Най-висока серопревалентност се установява в област Кърджали (86.7% от изследваните домашни животни), следвана от областите Благоевград, Бургас, Ямбол и Хасково.

17. За първи път в страната е проведено серологично проучване на местни и прелетни диви птици за причинители на Лаймска борелиоза и Западно-нилска треска. Потвърдено е значението на видовете *Turdus merula* и *Parus major* като резервоари на инфекциите.

18. Установена е обща ниска серопревалентност на КЕ в страната (0.42%) сред домашните преживни животни. Специфични ИгГ антитела са установени в 4 животни (говеда) от две области на страната Перник (6.67%) и Разград (6.25%).

Проучвания върху лептоспирозата в България (статии №№ 27,32, 35, 36)

19. Сравнени са възможностите на референтния микроскопски аглутинационен тест (МАТ) и на ELISA тест за диагностика на лептоспирозата. Получените резултати показват, че ELISA тестът е добре приложим за изследване на проби, взети в началото на заболяването. При серуми, взети през рековалесцентния период чувствителността на теста се понижава. Направен е анализ на потвърдените случаи на лептоспироза. Най-висок е дялът на случаите в областите Пазарджик, София, Монтана, Шумен и Бургас. Установено е, че водещите серогрупи, причиняващи лептоспироза в страната са *Leptospira icterohaemorrhagiae* (66,07%) и *Leptospira pomona* (19,64%).

Серотипиране на листериоза (46)

20. Направено е серотипиране на изолати *Listeria monocytogenes* от клинични материали. Установени са 2 серотипа причиняващи инфекции в страната - *Listeria monocytogenes* I серогрупа 1/2a и *Listeria monocytogenes* II серогрупа 4b.

Първи в страната проучвания върху анти тяло отговора срещу синтетични пептиди при Лаймската борелиоза (3)

21. Проучен е анти тяло отговора при пациенти с различни прояви на Лаймска болест към четири синтетични С6 пептидни антигена (имунодоминантни райони IR6 на VlsE повърхностния протеин на *B. burgdorferis*.s. щамове B31 и 297, *B. afzelii* (щам PT7) и *B. garinii* (IP90) чрез прилагането им като антиген в ELISA.

22. Установено е, че С6 пептидите от *B. burgdorferi sensu stricto* имат по-висока реактивност от *B. afzelii* и *B. garinii* при пациенти с ранна проява на Лаймска борелиоза (Еритема мигранс, както и при Лайм артрит (дисеминирана Лаймска борелиоза). С6 пептидът от *B. garinii* има по-висока реактивност при невроборелиоза.

Пионерни за страната проучвания върху вирусния товар при пациенти с COVID-19 инфекция (19, 21, 23)

23. Установено е, че вирусният товар е в обратна зависимост от серумния анти тяло отговор. Пикът на вирусния товар се достига в първите дни от клиничната изява на COVID-19. При пациентите с по-тежко протичане на болестта вирусният товар показва по-бавно понижение и се открива по-продължително време в сравнение с болните с по-леки форми на болестта. По подобен начин специфичните антитела достигат по-високи нива и се задържат по-продължително време при пациенти с по-тежки клинични форми. Тежките клинични форми корелират с напреднала възраст, по-висок вирусен товар, по-високи нива на IgA-антителата и на цитокините IL-6 IL-10 и IL-18.

Изследвания на пациенти с неясни фебрилни състояния и неуточнени менингити (37)

24. Направено е проучване върху серумни проби от пациенти с неуточнени вирусни менингити, енцефалити и менгоенцефалити за изясняване етиологичната структура на причинителите на остри инфекции на ЦНС. От изследваните проби 19.1% показват ИгМ реактивност. Като най-чести причинители се откриват *EBV*, *Coxsackie B* вируси и грипни вируси (10%) следвани от *HSV-2*, *TBEV*, *VZV*, и парагрипни вируси (5.5%).

Приноси от дисертационен труд (28, 29, 33).

Приноси с научно-теоретичен характер: За първи път у нас са разработени системи за ефективно клониране и експресия на основните имунодоминантни протеини на *B. burgdorferi* – OspC, FlaB, OspA и VlsE;

Приноси с приложен характер: Разработени са оригинални полимеразно-верижни системи за амплифициране на целите гени, кодиращи OspC, FlaB, OspA и VlsE протеините, които могат да се прилагат за доказване на генома на *B. Burgdorferi*;

Приноси с научно-приложен характер: Разработени са първите в България ELISA тестове с рекомбинантните OspC, FlaB, OspA и VlsE протеинни антигени.

6. Учебно-преподавателска дейност

Гл.асистент Ива Трифонова, дм взема активно участие и в учебно-преподавателската дейност на отдел Микробиология на НЦЗПБ. Тя е търсен преподавател

в разнообразните курсове вкл. в курсове за следдипломно обучение. Отзивчиво се представя като консултант в студентското обучение и в специализираните курсове.

7. Заключение

Научните приноси и високите наукометрични показатели на гл.асистент Ива Трифонова, дм напълно удовлетворяват количествените и качествени критерии на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и критериите на НЦЗПБ за заемане на академичната длъжност „доцент“. Преподавателските умения и високите личностни качества на кандидатката ми дават основание да подкрепя заемането на академична длъжност ДОЦЕНТ по Микробиология на гл.асистент Ива Трифонова, дм, Ръководител НРЛ „Кърлежово-векторно предавани инфекции, лептоснири и листерии“ на НЦЗПБ и да препоръчам същото на членовете на уважаемото Научно жури.

Проф. Д-р Т.Кантарджиев, дм, дмн