

До уважаемите членове на Научното жури,
определено със заповед № Р-109 –
342/29.05.2018 г. на Ректора на МУ-Варна

Рецензия

от доц. д-р Любомира Николаева-Гломб,
завеждащ Отдел „Вирусология” на НЦЗПБ, София

на дисертационен труд за присъждане на ОНС “доктор”
в област на висше образование 4. Природни науки, професионално направление
4.3. “Биологични науки” по научна специалност “Вирусология”

на д-р Живка Стойкова Демирева-Калчева,
на тема „Сероепидемиологични и молекулярно-генетични проучвания на
цитомегаловирусната инфекция при рискови групи”

представен за защита пред научно жури, утвърдено със заповед
№ Р- Р-109 –342/29.05.2018 г. на Ректора на МУ-Варна

Декларирам, че нямам конфликт на интереси по смисъла на чл. 4, ал. 4 от Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), както и по чл. 8 от Правилника за приложение на ЗРАСРБ на МУ-Варна. Нямам общи публикации с д-р Живка Стойкова Демирева-Калчева.

Представените ми материали по защитата на дисертационния труд отговарят на изискванията на ЗРАСРБ и на Правилника за прилагането му.

Актуалност на разработвания проблем

Човешкият цитомегаловирус, или човешкият бетахерпесвирус 5, както се нарича съгласно актуалната в момента таксономия на вирусите, е повсеместно разпространен вирус, който може да инфектира практически всеки. Веднъж навлязъл в организма на човека, този вирус остава пожизнено в латентно състояние и рядко се реактивира, което обикновено протича безсимптомно. Повечето хора дори не знаят, че са инфектирани с цитомегаловирус, защото той изключително рядко създава усложнения при клинично здрави индивиди. Но съществуват някои групи – бременни жени и техните новородени, хора с различни форми на имунодефицит или изкуствено предизвикана имуносупресия – при които първичната инфекция или реактивация на вече съществуваща такава – носят различни рискове от клинични усложнения, понякога и с фатални последици.

Херпесните вируси, в това число и човешките цитомегаловируси, от една страна, показват постоянна тенденция за увеличаване на честотата и тежестта на клиничната си манифестация. От друга страна, споменатите по-горе рискови групи, особено с бурното развитие на трансплантологията, стават все по-многобройни. Тези обстоятелства диктуват необходимост от детайлно проучване на наглед безобидната цитомегаловирусна инфекция, нужда от ясно разграничаване на първична от реактивирана инфекция, от определяне на давността на първичната инфекция, от изследване на влиянието ѝ върху рисковите групи, особено имайки предвид, че рисковете са различни при различните групи и съответно при първична и при реактивирана инфекция. Налице е нужда от прецизно дефиниране на степента на риска. Налице е и необходимост от въвеждане и утвърждаване в диагностичната практика на съвременните молекулярно-генетични и серологични методи наред с разработване и следване на ясни алгоритми за клинично-диагностично поведение.

Представената дисертация е посветена именно на тези актуални проблеми. Това не е първото проучване на цитомегаловирусната инфекция в нашата страна. Сероепидемиологичните и лабораторно-диагностичните проучвания сред населението в Североизточна България, включително и за цитомегаловирусната инфекция, са траен научен интерес на доц. Лилия Иванова. Тя е изследвала и рисковата група на новородените, а в частност и тези, родени недоносени, с вродени аномалии и протрахиран иктер. В последните години обаче все по-широко се прилагат молекулярно-генетичните диагностични методи. Все повече настъпва и трансплантологията, все повече се увеличава делът на имунонекомпетентните, имунокомпрометираните и имunosупресирани индивиди, които представляват рискова група за инфекция с *CMV*. Към настоящия момент липсват данни за актуалната динамика в серопревалентността, а проучванията, базирани на най-новите молекулярно-генетични методи са откъслечни и непълни, особено що се отнася до споменатите рискови групи. Представената дисертация прави напълно сполучлив опит за запълване на тези появили се празноти.

Литературна осведоменост, цел и задачи, методична страна

Литературният обзор (48 страници, около 1/4 от дисертацията) разглежда накратко класификацията на човешките херпесни вируси и се спира подробно на човешкия цитомегаловирус. Описана е негова структура и литичен репликативен цикъл. Обърнато е специално внимание на вертикалната, перинаталната и

хоризонталната трансмисия на вируса. Споменати са различни изследвания, проучващи риска от вертикално предаване при първична и при реактивирана майчина инфекция и зависимостта от социално-икономическия статус на семейството. Разгледани са особеностите на патогенезата и имунитета като е отделено специално внимание на патогенезата на конгениталната инфекция и тази при трансплантирани пациенти. Описани са прилаганите към момента диагностични подходи и практики като фокусът е насочен към съвременните възможности на диагностиката на цитомегаловирусната инфекция при рисковите групи – бременните и техните новородени, трансплантираните и имunosупресирани пациенти. Не липсва описание и на съществуващите към момента възможности за лечение на цитомегаловирусната инфекция, както и на все още експерименталните подходи за специфична профилактика.

Обзорът е подкрепен с цитиране на съвременни литературни източници (общо 352 източника като 1/4 от тях са публикувани след 2010 г.). Структуриран е така, а, че убеждава в необходимостта от изследване на разпространението на цитомегаловирусната инфекция сред населението поради особено й значение за определени групи индивиди, с право наричани рискови, а именно бременните жени и техните новородени, трансплантираните, имунокомпрометирани и имunosупресирани,

Дисертантката си поставя две **цели**:

- Ретроспективно проучване на цитомегаловирусната инфекция за изминал период от 13 години – разпространение сред общото население и сред рисковите групи и зависимост от пол и възраст.
- Проспективно проучване в последните 3 години, за да се установи относителният дял и клиничната значимост сред рисковите групи.

Произтичащите от целите **задачи** са ясно формулирани. Една от задачите, обещаваща интересна интерпретация, е сравняването на резултатите, получени в ретро- и проспективното проучване при съответните целеви групи. Отделна задача е посветена и на сравнителния анализ на особеностите на диагностичните възможности на различните методи, приложени за детекция на цитомегаловирусната инфекция.

В своето проучване авторката формулира *хипотеза* (допуска висока честота на реактивация/реинфекция в рисковите групи) и *антитеза* (подобряването на социално-икономическите фактори води до намаление на цитомегаловирусната инфекция/реактивация).

От **методична гледна точка** дисертацията е модерна, приложени са съвременни молекулярновирологични и имуноензимни методи, използвани са готови търговски

китове за *ELISA*, за екстракция на вирусна ДНК и за полимеразно-верижна реакция в реално време (*real time PCR*), което осигурява униформеност, проследимост и достоверност на резултатите. Всички резултати са статистически обработени.

Резултати, изводи и приноси на дисертационния труд

Извършена е внушителна по обем работа. Броят на изследваните проби е почти 8000 в ретроспективното проучване и над 300 в проспективното. Получените резултати са представени достатъчно подробно и прецизно, но в същото време стегнато и достъпно. Възприемането на информацията е улеснено от 44 таблици и 12 графики. След всяка изпълнена задача е направен сравнителен анализ и дискусия, като са изведени и съответни заключения. Този стил на представяне на резултатите значително улеснява възприемането на обемния фактологичен материал.

В широкомащабното ретроспективно проучване се установява, че относителният дял на инфетираните лица не само е висок (което е характерно за цитомегаловирусната инфекция), но е и с тенденция за повишаване. Въз основа на направените анализи авторката констатира нуждата от по-добра информираност на населението като цяло, и на специалистите, ангажирани с опазване на майчиното и детско здраве, в частност, за ролята на цитомегаловирусната инфекция в хода на бременността и на самото раждане. Главна роля за трансмисията на *CMV* към плода играе първичната инфекция на майката по време на бременността. Оказва се обаче, че дори сред специалисти осведомеността по отношение на опасностите, които може да крият цитомегаловирусите, е много ниска. Жените са значително по-информирани за конгениталния рубеолен синдром, за синдрома на Даун и други по-редки причини за увреда на плода, отколкото за много по-честата инфекция с *CMV*. Изхождайки от анализа на получените резултати в групата на бременните жени авторката препоръчва следването на диагностично-профилактичен алгоритъм при бременност, започващ с ранен серологичен скрийнинг, още в първия триместър на бременността, за търсене на антитела от клас *IgM* и/или *IgG* срещу цитомегаловируса.

Проспективните изследвания в рисковата група на новородените деца и малките кърмачета са не по-малко интригуващи. Те са илюстрирани чрез представянето на 11 изключително интересни клинични случая. Изпъква един от основните изводи, а именно: независимо че цитомегаловирусната инфекция е най-честата конгенитална инфекция в световен мащаб, тя се подценява и дори неглежира. Нито в Европа, нито у нас се провежда рутинно целенасочно търсене на инфекция с *CMV* при проблемни

новородени, независимо, че тя е по-често срещана от други заболявания и състояния, включени в задължителния скрийнинг на новородените деца в Европейския съюз. В дисертационния труд са изследвани и случайно подбрани клинично здрави новородени като за първи път у нас е приложена количествена полимеразно-верижна реакция в реално време в клиничен материал слюнка.

Пациентите с различни форми на лимфоми са друга изследвана група. Тези хора са с повишен риск от реактивация на цитомегаловирусната инфекция или пък ако са наивни по отношение на вируса, те са заплашени от по-тежко протичане в случай на инфектиране на фона на увредения клетъчно-медиран имунитет. Проучването доказва, че най-висок вирусен товар се наблюдава при пациентите, които в момента на изследването са провеждали курсове на антинеопластична терапия.

С най-висок риск от първично инфектиране или реактивация обаче са пациентите след трансплантация. Изследвани са бъбречно трансплантирани пациенти и такива с трансплантация на хемопоеични стволови клетки. На практика трансплантираните пациенти са имunosупресирани индивиди, при които цитомегаловирусната инфекция в повечето случаи се проявява клинично и може да доведе и до други нежелани ефекти като отхвърляне на присадката, миелосупресия и др. Високата серопревалентност сред общото население оказва своя ефект върху заболяемостта и инвазивността на цитомегаловирусната инфекция при трансплантирани на фона на тежката имunosупресивна терапия. И тук дисертантката описва интересни клинични случаи. Установява се, че честотата на реактивация след алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки е много по-висока отколкото след автоложна трансплантация. Проучването доказва, че редовното мониториране на цитомегаловирусната инфекция и по-конкретно, определянето на вирусния товар, е от изключително значение за вземане на навременно и компетентно решение за започване на етиологично насочена антивирусна терапия при високорисковите пациенти с цел избягване на цитомегаловирусно заболяване и развитие на преки или непреки усложнения.

Въз основа на получените резултати са формулирани и **изводите**, с които съм съгласна и които в концентриран вид всъщност обобщават дисертационния труд. Приемам и справката с **приносите**, описани като такива с оригинален, с потвърдителен и с приложен характер. Сред **оригиналните приноси** изпъква широкомащабното сероепидемиологично проучване върху разпространението на инфекцията с *CMV* и зависимостта от възраст и пол и определянето на относителния

дъл на цитомегловирусната инфекция в неонаталната и ранната кърмаческа патология. За първи път в страната е направено изследване на слюнка като вид клиничен материал, в който да се търси цитомегаловирусна ДНК чрез прилагане количествена полимеразно-верижна реакция в реално време. Приносите с **потвърдителен характер** допълват и обогатяват досегашните познания в областта. Приносите с **приложен характер** са значими. Сравнително са оценени различните лабораторно-диагностични методи, като някои от методите са въведени в практиката от дисертантката. Предложени са алгоритми за скрийнинг на бременни жени и за наблюдение на рисковите бременности, както и за изследване на новородени деца с данни за фетално страдание или перинатална инфекция.

Оформяне на дисертационния труд

Представеният ръкопис се състои от 190 страници и следва традиционната схема на изложение: увод – 1 стр., литературен обзор – 48 стр. собствени изследвания – 119 стр, състоящи се от: цел и задачи – 2 стр., материали и методи – 12 стр., резултати и обсъждане – 102 стр., изводи – 2 стр. и приноси – 2 стр. Собствените изследвания са подкрепени от 12 графики, 3 фигури и 43 таблици. Списъкът на цитираната литература обхваща 352 източника. Дисертационният труд е изготвен в пълно съответствие с изискванията на Правилника на МУ-Варна.

Оформяне на автореферата

Авторефератът също съответства на изискванията и отразява коректно в съкратена форма съдържанието и основните постижения и приноси на дисертацията.

Публикации във връзка с дисертацията

Публикационната активност на докторантката отговаря на изискванията на Правилника за приложение на ЗРАСРБ в МУ-Варна. **Три** от общо 9-те ѝ публикации са свързани с темата на дисертацията. Те са в български научни списания, издавани на английски език. Обхващат значителна част от резултатите в дисертацията, като и в 3-те статии Живка Стойкова е първи автор. Резултати от дисертацията са представени и на 4 научни форума, 2 от които са извън България.

Заклучение

Представената дисертация е напълно достатъчна по обем, методични подходи, получени резултати и извлечени приноси и представлява завършен научен труд, отговарящ на изискванията за придобиване на образователната и научна степен „доктор” според Закона за развитие на академичния състав в Република България и на Правилника за прилагането му в МУ-Варна. Налице са научни и научно-приложни резултати, представляващи оригинален принос в науката. Дисертационният труд показва, че докторантката притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения, както и способност за самостоятелни научни изследвания.

Убедено давам своята **положителна оценка** и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен “доктор” на Живка Стойкова Демирева-Калчева в област на висше образование 4. Природни науки, професионално направление 4.3. “Биологични науки” по научна специалност “Вирусология”.

София, 4 юли 2018 г.

Рецензент:



доц. д-р Любомира Николаева-Гломб