

НА ВНИМАНИЕТО НА ЧЛЕНОВЕТЕ  
НА НАУЧНОТО ЖУРИ, ОПРЕДЕЛЕНО  
СЪС ЗАПОВЕД N P-109-342/29.05.2018 г. НА РЕКТОРА НА  
МЕДИЦИНСКИ  
УНИВЕСИТЕТ „ПРОФ.Д-Р ПАРАСКЕВ  
СТОЯНОВ“, г. ВАРНА

## СТАНОВИЩЕ

от Доц. д-р Лилия Иванова Иванова дм, доцент Катедра Микробиология и вирусология  
ФМ, МУ „Проф д-р П. Стоянов“ Варна

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'  
професионално направление 4. 'Биологични науки' в област на висшето образование  
*„Природни науки, математика и информатика“*

докторска програма *“Вирусология“*

Автор: Д-р Живка Стойкова Демирева-Калчева

**Форма на докторантурата: докторант на самостоятелна подготовка**

**Катедра: Микробиология и вирусология, ФМ, „Проф д-р П. Стоянов“ Варна**

**Тема: „Сероепидемиологични и молекулярно-генетични проучвания на цитомегаловирусната инфекция при рискови групи“**

**Научен ръководител:**

Доц. д-р Лилия Иванова Иванова от МУ-Варна

**Представеният комплект материали на електронен носител е в съответствие с Чл.41 и 42 (2) от Процедура за придобиване на ОНС „доктор“ в МУ – Варна, Правилник за развитие на академичния състав на МУ-Варна от 2016 г.**

Предоставените ми документи са напълно комплектовани и изрядно подредени.

### **Биографични данни:**

Д-р Живка Стойкова Демирева-Калчева е родена на 24.11.1977 г. в гр. Варна. Завършва средно образование в III Природо-математическа гимназия „Академик Методий Попов“- Варна (профил - биология и разширено изучаване на английски език) през 1996 г. Придобива магистърска степен по медицина в МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“- Варна през 2002 г. Работи като ординатор в ЦСМП (Спешните центрове) на гр. Добрич и гр. Варна до 2006 г., в Катедра „Хигиена и медицина на бедствените ситуации“ – МУ-Варна като хонорирован асистент – 2004 г., РИОКОЗ Варна, Отдел Микробиология и Вирусология като старши експерт – до 2007 г. От 19.03.2007 г. до сега е асистент в Катедра Микробиология и вирусология, ФМ, МУ-Варна. От 2009 г. до сега - и като лекар-асистент в УМБАЛ „Света Марина“ – Варна. През 2013 г. придобива специалност Вирусология. Д-р Стойкова има широк кръг научни интереси в областта на вирусологията. Има разработки относно разпространението на парентерално предаваемите вирусни инфекции при пациенти с остри и хронични хепатити, направи едно от първите проучвания в България относно разпространението на хепатит Е вирусната инфекция, HIV – свързаните клинични и

лабораторни отличителни черти, както и на разпространението и клиничната значимост на латентните вирусни инфекции като цитомегаловирус и Epstein-Barr вирус в обща популация и дефиниране на особено уязвимите рискови групи пациенти – бременни жени, новородени деца, пациенти с онкохематологични заболявания, пациенти под имunosупресия и след трансплантация. Въвежда и прилага най-съвременни методи в научната практика. Съавтор е на обзорец материал относно значимостта на латентните вирусни патогени при имunosупресирани и трансплантирани пациенти. Автор и съавтор на над 10 научни статии и има над 15 участия в научни форуми включително и в чужбина. Водещ изпълнител в научен проект към Фонд Наука на МУ-Варна 2016 г. Д-р Стойкова е с подчертани научни интереси, следи новостите във вирусологичната наука и практика и повишава квалификацията си на място и с посещения на курсове към Катедра Вирусология на НЦЗПБ. Израстна като добър и прецизен вирусолог. Членува в БАМ, Дружеството на вирусолозите и СУБ.

### **Актуалност и значимост на дисертационната тема**

Разработеният дисертационен труд е по изключително актуален проблем както за вирусологичната диагностика, така и за клиничната практика в научен и научно-приложен аспект. При направеното широкомащабно сероепидемиологично проучване е дефинирано разпространението на цитомегаловирусната инфекция, което се оказва с по-висока честота в сравнение с установената в предходни такива. Вероятно това се дължи на начините на предаване на инфекцията от безсимптомни и преболедували лица, които излъчват вируса продължително време след заразяването и поради приложението на съвременни тестове за изследване. При проучване на възрастово-свързаното разпространение на острата инфекция авторката установява, че заразяването с вируса започва в много ранно детство, вероятно в семейството, поради неосведоменост на родители, близки и обслужващ персонал на малките деца, и достига пик при децата във възрастов диапазон 2 г. – 5 г. Особен интерес в ретроспективното проучване представлява полово-свързаната характеристика в разпространението на инфекцията и нейното отражение върху бременните жени и техните новородени деца. При изследването на пациентите под имunosупресия поради друго основно заболяване и лица, живеещи с HIV инфекция е доказана по-висока честота на инфекциране и по-честа реактивация на тази латентна инфекция. В много от тези случаи CMV е причина за утежняване състоянието на тези пациенти и причина за смъртност поради тази опортюнистична инфекция.

В проспективното проучване, направено в общо три вида серологични тестове дисертантката е представила подробни данни от изследване на рисковите групи пациенти, с акцент бременни жени, новородени деца и имунонекомпетентни пациенти. Творческото прилагане на цитирани резултати от различни литературни източници позволява на д-р Стойкова да въведе и интерпретира теста за авидност на IgG антителата срещу цитомегаловируса, за определяне давността на инфекцията при бременните жени, което е от изключителна важност за прогнозиране отражението върху плода и новороденото дете. Предложеният алгоритъм за мониториране на цитомегаловирусната инфекция при бременните жени е изключително полезен за визитиращите лекари акушеро-гинеколози и педиатри. Проучването на случаите на конгениталната и ранна постнатална инфекция при суспектни деца до 3 месечна възраст с допълнително приложение на съвременния метод Real time PCR в плазмени проби, показва висока честота на инфекцията и необходимост от комплексно серологично и молекулярно-биологично изследване, тъй като 50% от изследваните деца с положителен вирусен товар не показват позитивен anti CMV IgM отговор. Представеният алгоритъм за проследяване на суспектни за вродена инфекция новородени е добре обмислен и правилно насочен към недоносените деца. Особен акцент в проспективното проучване и

неоценима ценност както за науката, така и за практиката е прилагането на Real time PCR в материал слюнка на новородени клинично здрави деца. Материалът слюнка е неинвазивен и както се оказва според литературата и настоящите данни – особено ефективен, информативен и високочувствителен. Според това изследване интраутеринна безсимптомна CMV инфекция се доказва в 1.58% от изследваните клинично здрави новородени деца и е в диапазона на установеното в световен мащаб. Този факт още веднъж потвърждава значението на слюнката и безсимптомното излъчване на цитомегаловируса с този екскрет за широкото разпространение на инфекцията. Изследването на пациенти с различни видове лимфоми за разпространение на CMV инфекцията и нейната реактивация в Real time PCR конкретизира значението на проблема и насочва към повишено внимание от страна на клиничните и лабораторни лекари.

Високата серопревалентност, установена в проучването, според авторката, може да има дълбок негативен ефект върху трансплантираните и имunosупресирани пациенти. Проследяването на пациенти след трансплантация на солидни органи (бъбреци) и след автоложна и алогенна трансплантация на ТХСК както със серологичен скрининг донор/реципиент, така и с помощта на молекулярно-биологичен метод Real time PCR след трансплантацията, потвърждават тази теза и също така необходимостта от текущо проследяване на тези пациенти в количествен PCR.

Прави впечатление, че докторантката познава в детайли състоянието на проблема и оценява творчески литературния материал, както и активно участва в изследването.

### **Структура на дисертационния труд**

Предложеният ми за становище дисертационен труд е написан на 190 стр., онагледен с 43 таблици, 3 фигури, 12 графики. Структурирането е направено съгласно общоприетите стандарти. Съдържа увод – 1 стр., литературен обзор – 48 стр., собствени изследвания – 119 стр., което включва цел, задачи, материал и методи, резултати и обсъждане, заключение, изводи, препоръки и приноси. Цитирани са 352 литературни източника, преимуществено от последните 10 години, от които 345 източника на английски език, а 7 – на кирилица. Целите на дисертационната разработка са ясно формулирани и задачите са изпълнени в съответствие с тези цели. Приложени са авторска справка за публикации и участия в научни прояви по темата на дисертационния труд – 3 пълнотекстови публикации на английски език в реферирани български списания и 4 участия в научни конгреси, от които 2 – в чужбина и 2 – в български научни форуми с международно участие. Д-р Стойкова е водещ изследовател в научен проект към фонд Наука на МУ-Варна за 2016 г.

### **Литературен обзор**

Литературният обзор е изключително подробен, много задълбочен с представяне на основните литературни данни относно историята, биологичните свойства, латенцията, реактивацията, патогенезата на заболяванията, епидемиологията, начините на заразяване, клиниката на конгениталната и неонатална инфекция, профилактиката и терапията при рисковни групи пациенти. Специално внимание е обърнато на съществуващите до момента възможности за лечение на цитомегаловирусната инфекция и перспективите за ваксинопрофилактика. Лабораторната диагностика е представена в детайли, като е включен целия спектър от съвременни методи прилагани в различните случаи на първична инфекция, реактивация, както и при рисковите групи лица – бременни жени, новородени деца, и при пациенти след органна и тъканна трансплантация.

### **Резултати и обсъждане**

Резултатите от изследването, които са съществена част от работата са в съответствие със структурирането на дисертационния труд.

В ретроспективното проучване е приложен статистически анализ, който позволява сравняване на резултатите в групите изследвани по възраст и пол. Дефинирано е възрастовото начало на първичната CMV инфекция. Направен е сравнителен анализ на резултатите от приложението на anti CMV IgM и anti CMV IgG антителата и сравнителен анализ на серопревалентността при жени в детородна възраст и деца до 6 месечна възраст. Направено е проучване на влиянието на CMV инфекцията при пациенти с онкохематологични заболявания и вероятна имunosупресия и при лица, живеещи с HIV инфекция. След всяка подглава е направен подробен анализ и заключение.

В проспективното проучване на инфектираността и давността на CMV инфекцията при бременни жени е установен относителния дял на серонегативните бременни жени с опасност от първична инфекция и сериозна заплаха за новородените деца при заразяване в хода на бременността, както и на тези с данни за активна CMV инфекция. Давността на инфекцията е определяна в тест за anti CMV IgG авидност. Давността на инфекцията е важен критерий, уточняващ различните рискове за развиващия се плод и бъдещото новородено дете. Проучването на деца, суспектни за конгенитална и неонатална CMV инфекция до 3 месечна възраст в серологичен и молекулярно-биологичен анализ потвърждава високата заплаха за новородените деца поради конгенитална и ранна постанатална инфекция (24%). Безсимптомната конгенитална CMV инфекция е критерий за отражението на високата серопревалентност на популацията върху новородените деца. Установената честота при изследване в количествен PCR на материал слюнка е показала честота 1.58%. Установена е реактивация на CMV инфекцията при над 10% от пациентите с различни видове лимфоми. Проспективното проучване на пациентите след трансплантация на солидни органи (бъбреци) показва реактивация с доказване на вирусен товар в близо 17% от случаите. Установена е обратна зависимост на случаите на реактивация на CMV инфекцията след автоложна и алогенна трансплантация на стволови клетки поради предимно реактивация на собствената инфекция в първия случай, и допълнителна реинфекция от донора – във втория случай.

### **Изводи и приноси на дисертационния труд**

От ретроспективното проучване са направени 7 общи заключения и извода и 10 – от проспективното проучване, които отразяват получените резултати..

**Приносите с оригинален характер (7)** включват тенденциите в разпространението на CMV инфекцията, дефиниране влиянието на възрастта и пола върху началото на първичната инфекция, дефиниране разпространението в зависимост от пола и отражението върху бременните жени и новородените деца, при рискови групи пациенти с вероятна имunosупресия и лица, живеещи с HIV инфекция.

**Приносите с потвърдителен характер (2)** включват дефиниране значението на серологичните методи за определяне на заразеност, първична инфекция и давност на инфекцията. Потвърдена е необходимостта от приложение на Real time PCR за дефиниране реактивацията на инфекцията при различните рискови групи пациенти – бременни жени, новородени деца и при пациенти с различни видове лимфоми и други имunosупресирани пациенти и пациенти след трансплантация.

**Приносите с приложен характер (5)** включват оценка на възможностите на различните серологични и молекулярно-биологични методи в лабораторната диагностика при различните групи изследвани пациенти. Въведен е в практиката неинвазивен и високочувствителен метод за скрининг и диагностика на новородени деца в материал

слонка. Разработени са алгоритми за скрининг на бременни жени и за изследване на новородени деца с данни за фетално страдание.

Направените изводи и препоръки осигуряват перспективи за развитие и обогатяване както на знанията, така и на възможностите за диагностика и научни дирения в тази насока.

Получените резултати и формулираните приноси основно са лична заслуга на д-р Стойкова.

Предоставеният **автореферат** е направен според изискванията и отразява основните резултати, постигнати в дисертацията.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационният труд на тема „**Сероепидемиологични и молекулярно-генетични проучвания на цитомегаловирусната инфекция при рискови групи**“ *съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката* и отговарят на **всички** изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на МУ - Варна.

Дисертационният труд показва, че докторантката Д-р Живка Стойкова Демирева-Калчева **притежава** задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност Вирусология като **демонстрира** качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от визираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен ‘доктор’** на Д-р Живка Стойкова Демирева-Калчева в докторска програма по Вирусология, както и аз ще направя.

16.07. 2018 г.

**Изготвил становището:** .....

Доц. Д-р Лилия Иванова Иванова дм.