

НА ВНИМАНИЕТО НА ЧЛЕНОВЕТЕ
НА НАУЧНОТО ЖУРИ, ОПРЕДЕЛЕНО
СЪС ЗАПОВЕД № Р-109-417/27.11.2017 г.
НА РЕКТОРА НА МУ „ПРОФ. Д-Р П.
СТОЯНОВ“, ГР. ВАРНА

РЕЦЕНЗИЯ

**на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“
по област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика,
професионално направление 4.3. Биологически науки
по научна специалност „Вирусология“, шифър 01.06.13**

Автор на дисертационния труд: д-р Цветелина Костадинова Попова, докторант на самостоятелна подготовка към МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“, гр. Варна, Медицински факултет, Катедра „Микробиология и вирусология“

Тема на дисертационния труд: „Сероепидемиологични и лабораторно диагностични проучвания върху разпространението и клиничната значимост на Epstein-Barr вирусната инфекция“

Научен ръководител: доц. д-р Лилия Иванова, дм, МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“, гр. Варна, Медицински факултет, Катедра „Микробиология и вирусология“

Рецензия от: доц. Петя Динкова Генова-Калу, дб, Зав. Лаб. „Рикетсии и клетъчни култури“, Отдел „Вирусология“, Национален Център по Заразни и Паразитни Болести (НЦЗПБ), гр. София, Член на Научното жури със Заповед № Р-109-417/27.11.2017 г. на Ректора на МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“, гр. Варна, проф. д-р Красимир Иванов, дмн

I. Общо представяне на процедурата

Рецензията е изготвена според Закона за развитие на академичния състав (ЗРАС), Правилника за приложение на ЗРАС (ПРЗРАС) и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности (ПУРПНСЗАД) в МУ-Варна.

Представеният комплект материали на хартиен и електронен носител е в съответствие с всички изисквания и процедура за придобиване на ОНС „доктор“ и правилника на МУ – Варна.

Нямам общи публикации с д-р Цветелина Костадинова Попова и декларирам, че нямам конфликт на интереси по смисъла на чл.4, ал. 4 от ЗРАС.

II. Кратки биографични данни за дисертантката

Цветелина Костадинова Попова е родена 18.03.1972г. Завършила е като магистър по медицина в МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“, гр. Варна, също така и като

магистър по здравен мениджмънт. Има диплома за придобита медицинска специалност по вирусология издадена от МУ-Варна. Участвала е в 12 курса на следдипломна квалификация, организирани в Отдел „Вирусология“ на НЦЗПБ, гр. София. Дисертантката успешно е издържала докторантски минимум по вирусология през 2016 г. От 2013 г. постъпва на работа в МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“, гр. Варна като лекар - асистент, ръководител УС „медицински лаборант“, а от 30.12.2015 г. е зачислена като докторант на самостоятелна подготовка в Катедра „Микробиология и вирусология“ на МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“, гр. Варна.

III. Актуалност и значимост на дисертационната тема

Въпреки съществуващия в световен мащаб значителен изследователски интерес към Ебщайн-Бар вируса (EBV), все още не са напълно изяснени редица въпроси, свързани с неговата биологична характеристика, епидемиология, лабораторна диагностика, както и ролята му като човешки патоген, асоцииран с редица онкогенни заболявания. Медицинската и социалната значимост на EBV се обуславят от широкото му разпространение и разнообразна клинична картина - от безсимптомни инфекции до тежки заболявания, в това число и малигнени. Някои от тях са със съпътстваща генетична генеза и географски рестриктирани (назофарингеален карцином и ендемичния лимфом на Бъркит), а други (лимфом на Ходжкин и неходжкинови лимфоми) се срещат повсеместно, с по-голяма честота в Европа и Америка. Като типичен представител от семейството *Herpesviridae* за EBV е характерно персистирането в човешкия организъм след първична инфекция, с възможност за реактивация особено при имунокомпрометирани и имunosупресирани пациенти. Именно вирусната реактивация е едно от основните предизвикателствата за извършване на ранна и надеждна лабораторна диагностика. До момента основно диагностиката на EBV се базира на използването на серологични методи за детекция на вирус специфични антитела. В много от случаите обаче, невинаги серологичните маркери са достатъчни за дефиниране на реактивация на вируса. Това налага въвеждането в медицинската практика на нови, по-ефективни молекулярно-биологични методи (напр. PCR методи), основаващи се на доказване на вирусна ДНК в клинични проби, особено при имунокомпрометирани и трансплантирани пациенти, при които инфекцията с този вирус може да доведе до сериозни животозастрашаващи състояния. Използването на PCR техниката в рутинната диагностика би могла да даде добра информация, подпомагаща клиничната диагноза, както и да покаже участието на вируса в развитието на редица лимфопролиферативни заболявания. Предвид разширяване на обхвата и напредъка в развитието на трансплантационната медицина, с използване на несвързани и несъответстващи донори, както и последиците от първична инфекция и/или реинфекция, чрез серологичните и молекулярно-генетичните методи биха могли да се идентифицират рисковите пациенти и да се прогнозира и предотврати развитието на лимфопролиферативни заболявания.

До момента в страната липсват категорични данни за ролята на EBV реактивация при т.нар. „рискови пациенти“ (имunosупресирани и пациенти с различни видове лимфоми). Всичко изложено до тук ми дава основание да определя тематиката

на предоставения ми за рецензиране дисертационен труд като актуална и значима с широко практическо приложение в съвременната медицина.

IV. Структура, цел и специфични задачи на дисертацията

Дисертационният труд е представен на 194 страници и е онагледен с 42 фигури и 31 таблици. Структурата му съответства на необходимите изисквания и включва 4 главни раздела, като основните от тях следват общоприетата схема: често използвани съкращения, увод (2 стр.), литературен обзор (44 стр.), цел и задачи (1 стр.), материали, методи и хипотези (8 стр.), резултати и обсъждане (87 стр.), изводи, препоръки и приноси (8 стр.) и използвана литература (29 стр.).

Заглавието на дисертацията ясно дефинира основните цели и периметри на проведените изследвания. Следвайки поставените задачи, би било удачно и в ясна логическа връзка ако дисертантката раздели целта като две отделни направления, а именно: 1) определяне на сероепидемиологичния статус на населението в Североизточна България по отношение на EBV вирусна инфекция и възрастово свързаното разпространение на първична EBV вирусна инфекция и 2) дефиниране на диагностичните възможности за доказване на ролята на EBV инфекцията при имunosупресирани, при пациенти с различни видове лимфоми, както и в случаи на реактивация на инфекцията при рискови групи пациенти. Задачите на дисертационния труд са изчерпателно формулирани и аргументирани като напълно съответстват на поставените цели, въпреки че би могло да бъдат по синтезирано написани.

V. Литературна осведоменост на дисертантката

Литературният обзор е структуриран в 10 раздела (44 страници, около 1/4 от дисертационния труд) и представлява компетентен преглед на съществуващите литературни данни за човешкия херпесен вирус 4 и инфекциите, които причинява. Осветлява постигнатото до днес в изучаване на разпространението, класификацията, вирусологичната характеристика, репликацията, патогенезата и клиничните прояви на EBV вируса, асоциираните с EBV неопластични заболявания, имунобиологията, съвременната лабораторна диагностика при EBV инфекцията, както и възможностите и подходите за профилактика и терапия. Построен е логично, написан в добър стил и показва, че д-р Ц. Попова е добре запозната със състоянието на проблемите, по които работи и компетентно борави с наличната научна литература. Библиографията включва 503 литературни източника, голяма част от които са публикувани през последните 10 години. От тях 497 източника са на английски език, а 6 – са на кирилица.

Особено внимание е отделено на предизвикателствата и методологичните трудности в лабораторната диагностика на остра EBV инфекция и/или реактивиране на латентна такава при трансплантирани пациенти, което от своя страна е силен индикатор за развитие на лимфопролиферативно заболяване. Като пропуск в този раздел бих посочила липсата на по-подробно описание на използването на молекулярно-генетични методи при диагностиката на остра EBV инфекция и/или реактивиране на инфекцията при рискови групи пациенти, подбор на подходящ клиничен материал, специфични праймерни двойки, оптимални методологични подходи и др.

VI. Методология

Настоящият дисертационен труд включва анализиране на серумни проби от пациенти изследвани за EBV инфекция в два етапа:

- *Ретроспективно изследване* - общо 5957 серумни проби от гр. Варна и областта са изследвани за наличие на anti-EBV-CA IgG и 5961 – за наличие на anti-EBV-CA IgM в периода 2010-2016 г.

- *Проспективно изследване* – изследвани са общо 126 серумни/плазмени проби на пациенти с вероятна първична инфекция, вирусна реактивация или заболявания асоциирани с EBV чрез серологични методи, а 169 плазмени проби са диагностицирани чрез Real-time PCR. От тях 17 проби от пациенти с диагноза болест на Ходжкин, 52 - с неходжкинови лимфоми, 33 имуносупресирани и 17 бъбречно трансплантирани пациенти на имуносупресивна терапия.

В дисертацията докторантката е използвала съвременни молекулярни и имуноензимни методи, съобразени с изпълнението на поставените цели и задачи. Те включват готови търговски ELISA китове и имуноблот, екстракция на ДНК от серум и/или плазма и полимеразно-верижна реакция в реално време (real-time PCR). Използваните методи са описани ясно и подробно до степен, позволяваща възпроизводимост на резултатите и оставят впечатление за много добра професионална подготовка на докторантката. Разделът вдъхва надеждност и достоверност по отношение на получените резултати.

VII. Резултати и обсъждане

Извършена е голяма по обем лабораторна работа, с изследване на повече от 6000 клинични проби. Получените резултати стриктно следват специфичните задачи, които си поставя докторантката. Много умело дисертантката използва и интерпретира резултатите, получени от имуноензимните тестове за определяне на специфични антитела, които се образуват в хода на имунния отговор срещу различни вирусни антигени - наличие или липса на антитела срещу вирусния капсиден антиген (VCA IgM и VCA IgG), срещу ранния D антиген (EA IgM и EA IgG), както и срещу нуклеарния антиген (EBNA IgG), които са добър прогностичен маркер за разграничаване на острата от вече преминала и/или реактивирана инфекция.

Първоначално докторантката определя EBV-серопревалентността на населението в Североизточна България, проследявайки наличието на anti-VCA IgG антитела чрез ELISA метод. Анализът на данни в Североизточна България показва, че първичната среща с EBV е в ранното детство, предучилищния и училищен периоди, а основният механизъм е хоризонталния. Само около 1/3 от децата се заразяват до 5 годишна възраст с неспецифични клинични признаци, което корелира с данните събрани от други Европейски държави. Въпреки това обаче най-високият относителен дял на лабораторно потвърдените случаи на инфекциозна мононуклеоза се наблюдават във възрастта 16 – 20 г., следвано от предходната възрастова група – 11-15 годишните, в това число и лабораторно потвърдените случаи на инфекциозна мононуклеоза при жените са повече от тези при мъжете. От получените резултати, твърдо може да се заключи, че серологичните методи са достатъчно достоверен критерий за диагностициране на първична EBV инфекция. В хода на излагането на резултатите,

докторантката много умело вмъква използването на комбинация от допълнителни серологични методи, като Western blot и авидност, чието приложение е от изключителна важност за определяне на вирусната реактивация и за изключване на фалшиво положителни IgM антитела при високо авидни пациенти. Прави добро впечатление, че изследването за доказване на специфични антитела срещу ранния D EBV вирусен антиген EA(D) самостоятелно или в комбинация с антитела срещу повърхностния капсиден антиген VCA се прави за първи път в нашата страна.

В хода на експериментите ясно е отразена нуждата от използване на други по-специфични и надеждни методи за дефиниране на реактивацията на вируса. В този случай на преден план излизат молекулярно-биологичните методи за доказване на вирусна ДНК. С количествен PCR е изследвана връзката между вирусното натоварване и времето на поява на EBV ДНК, връзката с възрастта, клиничните и лабораторни данни. Безспорно е доказано взаимодействието между количеството EBV ДНК, клиничните прояви и лабораторните данни за лимфоцитоза и повишените стойности на АсАТ, АлАТ при пациенти с вирусна реактивация. От получените резултати може да се заключи, че Real-time PCR техниката е неинвазивен и бърз метод и може да се използва както за първичен скрининг при пациенти с различни видове лимфоми, така и за мониториране на заболяването и терапията. В интерпретиране на резултатите от PCR основен проблем са таргетите, които се използват от различните производители. Спорни остават въпросите свързани с типа на клиничния материал за изследване, количествата вирусна ДНК, както и въпросите свързани с началото и продължителността на терапията.

При имунокомпрометираните и имunosупресирани пациенти, несъмнено серологичните методи не са решаващи в диагностиката на EBV инфекция поради спецификата и динамиката на състоянието и навременната терапия. Мониторирането за наличие на вирусна ДНК, особено при пациенти след трансплантация би могло да подпомогне ранното идентифициране на рисковите пациенти и да предотврати посттрансплантационните усложнения.

Изключително прецизно и надлежно всички получени резултати са подложени на статистическа обработка с помощта на статистически пакет SPSS vs23. Използван е богат набор от статистически показатели: относителен дял (%); средна възраст ($SD \pm$); интервали на доверителност (95%CI); средна аритметична стойност на изследваните величини (mean) и стандартно отклонение (SD).

След всяка изпълнена задача е направено задълбочено обсъждане на получените резултати, което улеснява възприемането на обемния фактологичен материал. Бих искала да посоча като пропуск, липсата на обобщаваща дискусия на получените резултати, както и на по-подробен анализ на състоянието на проблема в България относно лабораторната диагностика на EBV инфекция при имunosупресирани, трансплантирани и имунокомпрометирани пациенти. Не личат добре очертани насоките за бъдещи проучвания по проблема, както и обобщаване на данните с цел публикуване на резултатите в реномирани национални и международни списания.

Оценявам високо, изработването на диагностичен алгоритъм от серологични възможности за установяване и потвърждаване на първична инфекция с EBV и

реактивация на вируса, който би могъл да се използва от всички лаборатории в страната.

VIII. Изводи и препоръки

Приемам формулировката на изводите от дисертационния труд и смятам, че те отразяват правилно същността на получените резултати. Въпреки това, считам, че биха могли да се напишат по-синтезирано и да се намали броят им. Съгласна съм със справката за приносите с оригинален и приложен характер, които авторката е представила. Смятам, че някои от тях имат потвърдителен характер, а не толкова като принос.

IX. Публикации и научна дейност

В дисертационния труд на д-р Ц. Попова са включени резултатите от общо 4 научни публикации и 3 научни съобщения, изнесени у нас и в чужбина на престижни конгреси и конференции. Тя е единствен автор в една статия и първи автор в останалите 3 публикации, което свидетелства за водещата ѝ роля при провеждането на изследванията, подготовката на публикациите и докладването на научните резултати пред реномирани медицински форуми. Всички научни трудове на дисертантката са в съавторство с научния ѝ ръководител - доц. д-р Лилия Иванова. Публикациите са от 2015 г. и 2016 г. и отразяват актуалността на тематиката на дисертационния труд.

Авторефератът отразява обективно получените резултати и е изготвен в съответствие с общоприетите изисквания.

X. Заключение

Дисертационният труд на д-р Ц. Попова на тема: „Сероепидемиологични и лабораторно диагностични проучвания върху разпространението и клиничната значимост на Epstein-Barr вирусната инфекция” е посветен на важен за медицинската наука и практика проблем. Представени са резултати със съществен научно-приложен принос в изследването на тази вирусна инфекция. Дисертационният труд е изработен на високо методично ниво и характеризира автора си като висококвалифициран изследовател, който има знанията, уменията и компетентностите да решава самостоятелно научни проблеми в областта на вирусологията. Д-р Ц. Попова изпълнява критериите на Закона за развитието на академичния състав в Република България, Правилника за прилагане на Закона за развитието на академичния състав в Република България и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов”, гр. Варна.

Всичко това ми дава основание да препоръчам на научното жури да присъди на Цветелина Костадинова Попова образователната и научна степен „Доктор“ в професионално направление 4.3. Биологически науки по научна специалност „Вирусология“, шифър 01.06.13.

19.12.2017 г.

Гр. София

Рецензент:

(доц. Петя Генова-Калу, дб)

