

НА ВНИМАНИЕТО НА ЧЛЕНОВЕТЕ  
НА НАУЧНОТО ЖУРИ, ОПРЕДЕЛЕНО  
СЪС ЗАПОВЕД № Р-109-342/29.05.2018 г.  
НА РЕКТОРА НА МУ „ПРОФ. Д-Р П.  
СТОЯНОВ“, ГР. ВАРНА

## **СТ А Н О В И Щ Е**

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. Биологични науки  
по научна специалност „Вирусология“, шифър 01.06.13

Автор на дисертационния труд: д-р Живка Стойкова Демирева-Калчева -  
асистент, 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 молекулярно-генетични  
проучвания на цитомегаловирусната инфекция при рискови групи“

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

Становище 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-109-342/29.05.2018 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 на процедурата за  
придобиване на ОНС „доктор“.

### **II. Кратки биографични данни и кариерно развитие**

Живка Стойкова Демирева-Калчева е родена 24.11.1977 г. Завършила е като  
магистър по медицина в МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“, гр. Варна. Има диплома за  
придобита медицинска специалност по „вирусология“, издадена от МУ-Варна. Със  
Заповед на Ректора на МУ-Варна № Р-109-373/30.12.2015 г. е зачислена за докторант на  
самостоятелна подготовка в Катедра „Микробиология и вирусология“ на МУ „Проф.  
д-р Параскев Стоянов“, гр. Варна. Участвала е в 7 курса на следдипломна  
квалификация, организирани в Отдел „Вирусология“ на НЦЗПБ - София и в 4

теоретично-практични семинари в МБАЛ „Св. Марина“ и МУ - Варна. Дисертантката успешно е издържала докторантски минимум по вирусология през 2016 г. Професионалният си стаж започва през 2003 г. като лекар-ординатор в ЦСМП, гр. Добрич и ЦСМП, гр. Варна, а от 2007 г. до сега е назначена на длъжност „асистент“ в Катедра „Микробиология и вирусология“ на МУ-Варна.

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

Дисертационният труд на д-р Живка Демирева-Калчева е свързан със съвременен и актуален въпрос, както за клиничната вирусология, така и за медицинската практика, а именно човешкият цитомегаловирус и инфекциите, причинени от него както при клинично здрави пациенти, така и при рискови групи - имunosупресирани, имунокомпроментирани, бременни жени и новородени деца. Като типичен представител от семейството *Herpesviridae* за CMV е характерно продължителното персистиране в човешкия организъм след първична инфекция, с възможност за реактивация. При повечето хора инфекцията протича безсимптомно, но в някои случаи крие огромна заплаха, нерядко фатална, за плода по време на бременност, както и при имunosупресирани, напр. след органа или костно-мозъчна трансплантация. Реактивирането на латентната CMV инфекция и/или реинфекция и нейната връзка с отхвърляне на трансплантата, намаляване на преживяемостта на присадката и на пациента-реципиент, както и предразполагане към развитие на опортюнистични инфекции и малигнизации е от изключителна важност за съвременната трансплантология. Съществуващите до момента данни говорят за широко разпространение на тази инфекция, включително и у нас, но повишаващият се дял имunosупресирани и имунокомпроментирани пациенти налагат преразглеждане на лабораторно-диагностичните алгоритми и обогатяването им с нови техники, характеризиращи се с висока специфичност и чувствителност. Мониторирането на разпространението на CMV сред бременни жени е препоръчително и особено важно, с оглед на последиците свързани с риска от трансмисия на вируса към плода и уврежданията, които може да причини. В страната са малко сероепидемиологични данни за разпространението на CMV инфекцията в общата популация и особено сред рискови контингенти, което прави дисертацията особено актуална и съвременна, стъпвайки на досега известни факти от редица проучвания. Подробно са разгледани достойнствата и недостатъците на използване на известните маркери, особено с цел откриване на реактивация на инфекцията.

От представените резултати става ясно, че самостоятелното прилагане на ELISA метода не дава възможност за пълна и прецизна диагностика, както на конгенитална, така и на CMV инфекция при пациенти след трансплантация на солидни органи или хемопоеични стволови клетки. Това налага въвеждането на нови, по-съвременни техники като определяне на вирусния товар с помощта на полимеразно-верижна реакция (PCR). Използването на такива подходи дава възможност за адекватна профилактика и навременна етиологична терапия при пациенти във „висок риск“.

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 на дисертационния труд**

Дисертационният труд е представен на 190 страници. Структурата му съответства на необходимите изисквания и следва общоприетата схема: увод (1 стр.), литературен обзор (48 стр.), цели и задачи (2 стр.), материали и методи (12 стр.), резултати и обсъждане (102 стр.), изводи (2 стр.), приноси (2 стр.) и библиография (15 стр.). Включени са 352 литературни източника (голяма част са от последните 10 години). От тях 345 източника са на английски език, а 7 – са на кирилица.

#### **V. Литературна осведоменост и оценка на литературния материал**

Литературният обзор (около 1/4 от дисертацията) е изключително подробно развит, в който дисертантката много задълбочено и умело е представила основните литературни данни, отнасящи се до съвременната класификация на човешките херпесни вируси, морфология, антигенен строеж и репликативен цикъл. В подробности е представена информацията касаеща вертикалната, перинаталната и хоризонталната трансмисия на вируса, патогенезата на конгениталната инфекция и тази при трансплантирани пациенти. Особено място е отделено на лабораторната диагностика на CMV инфекцията, като е представен в детайли целия спектър от съвременни методи прилагани в случаи на първична CMV инфекция, реактивация, при бременни и техните новородени и при пациенти след органна трансплантация и на хемопоеични стволови клетки. Специално внимание е обърнато на съществуващите до момента възможности за лечение на цитомегаловирусната инфекция.

Докторантката си поставя две ясно формулирани цели: 1) е свързана с установяване на серопревалентността на населението на Североизточна България за 13 годишен период и 2) проучване на ролята и клиничната значимост на CMV инфекциите при рискови групи пациенти - бременни жени, новородени деца, имуносупресирани и имунокомпроментирани пациенти с различни видове лимфоми и след трансплантация и възможностите на различни лабораторни методи за дефиниране на реактивация.

В дисертацията д-р Ж. Демирева-Калчева формулира: *хипотеза* (допуска висока честота на реактивация/реинфекция с вируса при всички изследвани рискови групи) и *антитеза* (подобряването на социално-икономическите фактори е свързано с възможно намаляване на разпространението на CMV инфекцията/реактивацията).

Задачите на дисертационния труд са аргументирани, така че напълно да съответстват на поставените цели.

#### **VI. Методология**

Настоящият дисертационен труд е задълбочено проучване, което включва анализиране на серумни проби от пациенти изследвани за CMV инфекция в два етапа:

- *Ретроспективен анализ (в периода 2003 - 2015 г.)* – на серумни проби от 7879 пациента, изследвани в МБАЛ „Св. Марина“, гр. Варна
- *Проспективно проучване (в периода 2016 – 2018 г.)* – на серумни проби от 121 бременни жени, в различен срок на бременността, 50 суспектни деца до три месечна възраст, 63 клинично здрави новородени, 50 имунонекомпетентни пациенти с различни видове лимфоми и 42 трансплантирани пациенти.

В дисертацията докторантката е използвала съвременни молекулярно-генетични и имуноензимни методи, съобразени с изпълнението на поставените цели и задачи. Те включват готови търговски ELISA китове, 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.

## **VII. Резултати и обсъждане**

Получените резултати и тяхното обсъждане представляват съществен раздел от работата, добре онагледен с 12 графики, 43 таблици и 3 фигури. Стриктно следват задачите, които си поставя докторантката. След всяка изпълнена задача е направено задълбочено обсъждане на получените резултати и са формулирани изводи, което улеснява възприемането на обемния фактологичен материал. Подробно са обсъдени резултатите от машабното ретроспективно проучване, където в детайли са анализирани динамиката в CMV серопревалентността на населението в Североизточна България, направена е оценка на относителния дял на инфектираните лица (с тенденция на завишаване на броя им), възрастовото начало на първичната CMV инфекция, CMV серологичния статус на жени в детеродна възраст и деца до шест месеца.

Особено ценна част от дисертационния труд представляват резултатите от проспективното изследване на потенциално рискови пациенти, извършено с широк набор от серологични методи и интерпретацията на резултатите. На база на тези резултати докторантката предлага реално приложим диагностично-профилактичен алгоритъм при бременност за търсене на anti-CMV IgM и anti-CMV IgG антитела, за отдиференциране на остра инфекция от реактивация/реинфекция. В този раздел много ясно се откроява тезата, че цитомегаловирусната инфекция е най-широко разпространената конгенитална инфекция по света, която се подценява и negliжира. В нито една страна от ЕС, не се провежда задължителен пренатален скрининг на бременни жени, както и постнатален CMV скрининг на всички деца, родени с данни за фетално страдание и в послеродовия период. Тези въпроси са от изключителна важност за определяне на давността на инфекцията при бременни жени, тъй като първична и реактивирана CMV инфекция са свързани с различни рискове за плода.

В хода на експериментите ясно е отразена нуждата от използване на други специфични методи за дефиниране на реактивацията на вируса. В този случай на преден план излизат молекулярно-биологичните методи за доказване на вирусна ДНК.

В дисертационния труд са изследвани пациенти с различни форми на лимфоми (НХЛ и БЛ) и е проследена честотата на реактивация на CMV инфекцията със съвременни лабораторни методи. Резултатите сочат, че висок вирусен товар се среща при пациенти, които към момента на изследване са на антинеопластична терапия.

Безспорно най-високо рискови от първична CMV инфекция и/или реактивация са пациентите след трансплантация. В дисертационния труд са разгледани интересни клинични случаи на бъбречно трансплантирани пациенти и такива с трансплантация на хемопоеични стволови клетки. Направен е критичен анализ на диагностичните възможности на серологичните методи при тази група пациенти и са формулирани заключения в полза на RT PCR, като метод на избор при установяване на вирусна реактивация при пациенти под имunosупресия след трансплантация на солидни органи

и хемопоеични стволови клетки и предотвратяване на последващо развитие на преки или непреки усложнения.

### **VIII. Изводи и приноси**

На базата на получените резултати са направени 7 извода от ретроспективното и 10 - от проспективното проучване. Приемам формулировката на изводите от дисертационния труд и смятам, че те отразяват правилно същността на получените резултати. Въз основа на резултатите от проучванията са формулирани общо 12 приноса (7 с оригинален, 2 с потвърдителен и 5 с приложен характер), които приемам.

### **IX. Публикации и научна дейност**

В дисертационния труд на д-р Живка Демирева-Калчева са включени резултатите от 3 научни публикации, от общо 9. Те са в български научни списания, издавани на английски език. Тя е първи автор в 3-те публикации, които са от 2016 г. и 2017 г. и отразяват актуалността на тематиката. Резултатите са представени на 4 научни форума, 2 у нас и 4 в чужбина. Всички научни трудове на дисертантката са в съавторство с научния ѝ ръководител - доц. д-р Лилия Иванова. Дисертантката е участвала в авторския колектив на научен проект № 16004/2016 г., по темата на дисертацията, финансиран от Фонд Наука на МУ-Варна.

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

### **X. Заключение**

Дисертационният труд на д-р Ж. Демирева-Калчева на тема: „Сероепидемиологични и молекулярно-генетични проучвания на цитомегаловирусната инфекция при рискови групи“ 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 и компетентностите да решава самостоятелно научни проблеми в областта на вирусологията. Д-р Ж. Демирева-Калчева изпълнява критериите на Закона за развитието на академичния състав в Р. България, Правилника за прилагане на Закона за развитието на академичния състав в Р. България и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени в МУ - Варна.

Всичко това ми дава основание да препоръчам на научното жури да присъди на д-р Живка Стойкова Демирева-Калчева образователната и научна степен „Доктор“ в професионално направление 4.3. Биологически науки по научна специалност „Вирусология“, шифър 01.06.13.

10.07.2018 г.  
Гр. София

Изготвил становището:

  
(доц. Петя Генева-Калу, д-р)