



НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

**Силвия Емилова Волева**

**СЕРОЛОГИЧНО И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНО  
ПРОУЧВАНЕ НА РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА  
ПАРВОВИРУС В19 СРЕД БРЕМЕННИ И ЖЕНИ В  
ДЕТЕРОДНА ВЪЗРАСТ В БЪЛГАРИЯ**

## **АВТОРЕФЕРАТ**

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

**За присъждане на образователна и научна степен „Доктор“**

Област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление:4.3. Биологически науки

Научна специалност: Вирусология

**Научен ръководител:**

**проф. д-р Стоян Шишков**

**доц. д-р Любомира Николаева- Гломб**

**Научен консултант**

**доц. Стефка Крумова, дб**

гр. София 2019 г

Дисертационният труд е представен на разширен колегиум на отдел „Вирусология“ на 26.11.2019 г. и е насочен за защита пред научно жури.

Дисертационният труд съдържа 175 страници, 22 фигури, 32 таблици и 1 приложение.

Библиографията включва 358 литературни източника. Лабораторните изпитвания са проведени в НРЛ „Морбили, паротит, рубеола“ на Отдел „Вирусология“ при НЦЗПБ. Единични изпитвания са проведени в Института по имунология, Люксембург (*Luxembourg Institute of Health, Department of Infection and Immunity, Clinical and Applied Virology, Infectious Diseases Research Unit*).

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на НЦЗПБ и се намират на разположение в библиотеката на НЦЗПБ, София

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на: ..... от .....ч. в аулата на НЦЗПБ, гр. София, бул. „Янко Сакъзов“ № 26 на открито заседание на научното жури, назначено от Директора на НЦЗПБ, съгласно ППЗРАСРБ на НЦЗПБ и ЗРАСРБ.

## Използвани съкращения

- Еднобуквен код за изписване на аминокиселините в аминокиселинните последователности:

Глицин – G  
Аланин – A  
Валин – V  
Изолевцин – I  
Левцин – L  
Пролин – P  
Серин – S  
Треонин – T  
Цистеин – C  
Метионин – M  
Аспарагинова киселина – D  
Аспарагин - N  
Глутаминова киселина – E  
Глутамин – Q  
Лизин – K  
Аргинин – R  
Хистидин – H  
Фенилаланин – F  
Тирозин – Y  
Триптофан - W

- ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина
- мРНК (иРНК) - матрична (информационна) рибонуклеинова киселина
- РНК – рибонуклеинова киселина
- тРНК – транспортна рибонуклеинова киселина
- УЗ мониторинг – ултразвуков мониторинг
- B19V – парвовирус B19
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention(Център по контрол и превенция на заболяванията)
- ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ензимно-свързан имуносорбентен тест)
- NLS – Nuclear Localization Signal (ядрен локализиращ сигнал)
- NS1- Nonstructural Protein 1(неструктурен белтък )
- ORF- Open Reading Frame (отворена рамка за четене)
- PCR – Polymerase Chain Reaction (верижно-полимеразна реакция)
- RIA- radioimmunoassay (радиоимуноанализ)
- TNF- Tumor Necrosis Factor (тумор некротизиращ фактор)
- VLP- Virus-Like Particle (вирусоподобни частици)
- VP1- Viral Protein 1 (структурен белтък)
- VP1u- Viral Protein 1 Unique Region (уникален VP1 регион)
- VP2- Viral Protein 2 (структурен белтък)

## Съдържание

I. ВЪВЕДЕНИЕ .....	5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....	8
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....	9
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ .....	10
1. Серопревалиране на B19V-IgG по възрастов профил при жени в детеродна възраст (18 - 41 г), в т.ч. бременни.....	13
2. Серопревалиране на B19V-IgG по възрастов профил и гестационна възраст от бременността.....	14
3. Разпределение на изследваните клинични проби по години за периода 2015 – 10.2019 (n=305).....	16
4. Етиологично доказване на B19V сред бременни жени с различни клинични манифестации/прояви на патологична бременност (n=82).....	19
4.1. Бременни пациентки с анемичен синдром (n=61).....	19
<i>Клиничен случай – бременна жена с <math>\beta</math>-таласемия и доказана B19V инфекция.....</i>	<i>23</i>
4.2. Бременни пациентки с неимунен хидропс феталис (n=4).....	28
4.3. Бременни пациентки с фетален асцит (n=7).....	29
4.4. Бременни пациентки с фебрилно-обривен синдром (n=10).....	31
5. Бременни пациентки, претърпели спонтанен аборт (n=19).....	32
6. Етиологично доказване на B19V сред жени с репродуктивни проблеми, подложени на инвитро процедури (n=25).....	33
7. Доказване на B19V сред здрави бременни жени (n=168).....	34
8. Етиологично доказване на B19V сред новородени с възможна майчино-фетална инфекция с B19V (n=11).....	37
9. Секвениране и филогенетичен анализ на изолати на B19V от доказано положителни бременни жени и такива, претърпели спонтанен аборт.....	38
10. Нуклеотидна/аминокиселинна идентичност на българските B19 парвовирусни секвенции от доказано положителни пациентки с патологична бременност и такива, претърпели спонтанен аборт.....	40

<b>11. Аминокиселинен анализ на българските В19 парвовирусни секвенции от доказано положителни пациентки с патологична бременност и такива претърпели спонтанен аборт.....</b>	<b>41</b>
<b>12. Алгоритъм за скриниране и проследяване на инфекция с В19V по време на бременност.....</b>	<b>42</b>
V. ИЗВОДИ .....	45
VI. ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ (НАУЧНИ ПРИНОСИ).....	47
VII. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА	
47	
VIII. УЧАСТИЯ В МЕЖДУНАРОДНИ И НАЦИОНАЛНИ НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	49
IX. НАУЧНИ ПРОЕКТИ.....	51

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

Вирусните инфекции по време на бременност в световен мащаб са една от основните причини за тежки усложнения и смъртност на майката и плода. Проучването на ролята на вирусните патогени по време на бременността придобива все по-голямо значение с оглед на това, че в съвременното общество рискът от епидемични взривове, които могат да повлияят на майката и фетуса е все по-голям и реален (Gervasi и съавт., 2012). Редица клинични проучвания свидетелстват, че бременните жени са по-уязвими и с по-голяма честота на развитие на тежки усложнения, водещи до хронифициране и дори летален изход в следствие на прекарани вирусни инфекции, първенци сред които са циркулиращите повсеместно грипни и херпесни вируси, както и вируси като зика и други (Jamieson D.J. и съавт., 2014). Известно е, че вирусните инфекции при бременни могат да доведат до редица усложнения, включително спонтанен аборт, преждевременно раждане или коинфектиране с други патогенни микроорганизми. Разбирането на факта, че бъдещите майки са изложени на риск от широк спектър инфекции, е от основно значение при разработването на ефективни подходи за превенция, диагностициране и лечение по време на бременността. Водещо е правилото, че бременността не може да окаже влияние върху хода на инфекцията, но инфекцията може да е фактор в отделните етапи от развитието и изхода на бременността (Alger L.S., 1997). Патогените могат да атакуват ембриона трансплацентарно, перинатално (от вагинален секрет или кръв) или новороденото след раждането. Клиничните прояви на неонаталните инфекции варират в зависимост от вирусния агент и гестационната възраст на плода по време на придобиване на инфекцията. Данните показват, че рискът от инфекции най-често е обратно пропорционален на гестационната възраст на инфектиране и може да се асоциира с развитие на вродени малформационни изменения.

Един от важните вирусни агенти, ангажирани в развитието на рисковата бременност, но и често пренебрегван поради липсата на

достатъчно проучвания в тази насока, е парвовирус В19 (В19V). Вирусът има типична клинична изява на обривно-фибрилен синдром, Erythema infectiosum, поради което в миналото често е диагностициран като "рубеола". Макар, че често при възрастни пациенти инфекцията протича безсимптомно или с нетипична клинична картина, последиците от инфекция с В19V, настъпила по време на бременност, могат да бъдат тежки: фетална анемия, хидропс феталис, миокардит и/или втрематочна смърт и спонтанен аборт. Известно е, че от 50% до 65% от жените в репродуктивна възраст придобиват траен имунитет след прекарана инфекция с парвовирус В19 (Dijkmans. и съавт., 2012, Cohen и съавт., 1988 Lamont и съавт., 2011). Въпреки това, при 1% до 3% от серонегативните бременни жени се уснавяват серологични доказателства за развила се инфекция по време на бременността (Valeur-Jensen А.К. и съавт., 1999; CDC, 1989). Данни на CDC сочат, че между 20% и 30% от серонегативните жени в риск, развиват инфекция с В19V след контакт с вируса (CDC), 1989; Gillespie SM и съавт., 1990). В тази връзка е установена сероконверсия с годишен темп от 1.5% при жените в детеродна възраст (Koch W. С. and Adler S. P., 1989). Понастоящем, В19V не се счита за тератогенен агент, поради което инфекцията не е индикация за прекъсване на бременността. Честотата на вертикална трансмисия при майчина инфекция се движи в диапазона 17 до 33% (Harger J.H. и съавт., 1998). Според литературни източници 85% от случаите на инфектиране на серонегативна бременна завършват благоприятно за плода. (Levy R. и съавт., 1997). Парвовирусната инфекция протича безсимптомно в значителен процент от случаите (20% при деца и 30-40% при възрастни) или с нетежки клинични изяви, поради което тя не подлежи на регистрация. В19V не е включен като задължителен за наблюдение в реда на изпълнение на Наредба №21/18.07.2005. Въпреки това при ограничен брой бременни жени прогресията на инфекциозния процес води до редица фетални усложнения, включително хидропс феталис. Вероятността за развитие на неблагоприятни последици в следствие на вирусната инфекция с В19V след 20-та гестационна седмица възлиза на приблизително 2.3%

(Enders M. и съавт., 2004). Установено е, че между 8% до 10% от случаите на неимунен хидропс се дължат на инфекция именно с В19V (Levy R. и съавт., 1997; Markenson G.R., Yancey M.K., 1998). Редица автори се фокусират върху ефекта на В19V върху фетусите на заразени серонегативни майки (Adler S., Koch W.C., 2010; Rodis J.F., 1999; de Jong E.P. и съавт., 2011; Dijkmans A.C. и съавт., 2012). Друг вид докладвани фетални усложнения след прекарана от майката В19V инфекция включват чернодробна недостатъчност (Cohen B., 1995.; Metzman R. и съавт., 1989; Yoto Y. и съавт., 1994), миокардит (Adler S., Koch W.C., 2010) и трансфузионно зависима анемия (Markenson G.R., Yancey M.K., 1998; Levy R. и съавт., 1997). Вътремоточна фетална смърт преди 19 до 20 гестационна седмица (Miller E. и съавт., 1998; Rodis J.F. и съавт., 1990) е регистрирана при 3 до 14.8% от серонегативните заразени с В19V бременни жени. Причината не е изяснена, но най-вероятно се дължи на мултиорганно увреждане (Dijkmans A.C. и съавт., 2012).

Лабораторното доказване на В19V се основава на комбинация от имуноензимни (ELISA) и молекулярни (PCR) методи. Тестирането за наличие на специфични В19V IgM антитела в комбинация с наличие на вирусна ДНК е доказателство за прясна инфекция, което е от особено значение при мониториране на случаите с патологична бременност. На пациентките с наличие на маркер за остра вирусна инфекция (IgM и/или вирусна ДНК) се препоръчва мониториране на бременността (ултразвуков мониторинг на плода и Doppler скрининг) и лабораторно изследване с проследяващи серумни проби (1-3-6 месеца) (Crane J., 2002)

Разнообразната трансмисия на В19V, трансплацентарният път на предаване на инфекцията и индикативните показатели за връзка с тежки фетални ефекти при високорискови серонегативни жени във всеки триместър от бременността, обуславя необходимостта от въвеждане и популяризиране на интензивни скринингови програми и разработване на методи за бърза и надеждна диагностика на инфектите с този патоген.



Дисертационният труд цели да анализира наличните данни за интензитета, разпространението и клиничния аспект на инфекцията с В19V при жени с патологична бременност. Извършен е серологичен и молекулярно-биологичен анализ, като надежден диагностичен подход в помощ на добрите лечебни практики при високорискови пациентки в различен триместър от бременността.

## **II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

### **1. Цел**

Да се извърши молекулярно-генетично и серологично проучване чрез комбинация от съвременни лабораторни методи върху разпространението на В19V сред бременни и жени в детеродна възраст в България.

### **2. Задачи**

2.1. Да се докаже настояща инфекция с В19V в серумни проби от бременни жени с рискова и патологична бременност, както и при здрави бременни чрез имуноензимен анализ (ELISA IgM/IgG) по възрастов профил, клинична манифестация и гестационна възраст на бременността.

2.2. Да се докаже нуклеинова киселина на В19V в серумни проби от бременни жени с рискова и патологична бременност, както и при здрави бременни и да се определи етиологичната роля на В19V в развитието на определени клинични синдроми по време на бременност.

2.3. Да се направи сравнителен анализ на получените резултати от извършените молекулярно-генетични и имуноензимни изследвания.

2.4. Да се разработи алгоритъм за откриване на специфични маркери на инфекцията с В19V при жени с патологична бременност.

2.5. Да се извърши генетичен анализ на секвенции на В19V, получени от бременни и от жени с репродуктивни проблеми.

### III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 1. Материали

Чрез прилагане на комплекс от лабораторни диагностични методи са изследвани общ брой **305 серумни проби**, от които: **250 бременни пациентки** (с данни за анемия, неимунен хидропс феталис, фетален асцит, здрави бременни); **19 жени, претърпели аборт до 20 гестационна седмица**, **25 жени с репродуктивни проблеми** и **11 новородени деца** (с данни за конгенитална анемия и конгестивни сърдечни прояви).

#### 2. Методи

##### 2.1. Имуноензимни методи

Индиректен имуноензимен полуколичествен анализ за диагностика на IgG/IgM антитела срещу B19V в човешки серум (anti-parvovirus B19 ELISA IgG/IgM, Euroimmun, Germany)

##### 2.2. Молекулярно-биологични методи

- 2.2.1. Екстракция на ДНК. Екстракцията на вирусната нуклеинова киселина бе осъществена чрез: *Invitrogen kit (PureLink® Genomic DNA Mini Kit, UK)*
- *автоматична сисутема ExiPrep™ 16 Dx* (кит **ExiPrep™ Dx Viral DNA/RNA Kit**)

##### 2.2.2. Амплификационни методи (PCR)

- Стандартен PCR метод за доказване на B19V
- Въмъкнат (Nested) PCR метод за амплифициране и последващо секвениране на B19V

##### 2.2.3. Детекция на амплифицираните продукти.

##### 2.2.4. Секвенционен анализ на амплифицирани NS1/VP1u продукти.

##### 2.2.5. Субгенотипиране – филогенетичен анализ

- Секвенционен PCR метод

- Пост-секвенционно пречистване на секвенционните PCR продукти и преципитация

2.2.6. Капилярна електрофореза

2.2.7. Секвенционен анализ

2.2.8. Филогенетичен анализ

2.3. Статистически анализ

#### **IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**

В настоящата дисертационна работа са изследвани общ брой 305 клинични проби (серумни проби) събрани в периода 2015 – 2019 год. Включените за изследване лица са както следва: 294 жени, от които 250 бременни, 19 претърпели спонтанен аборт и 25 жени с репродуктивни проблеми, както и 11 новородени деца. Бременните жени са на възраст от 16 до 44 години. По отношение на клиничната манифестация изследваните бременни са разделени на четири групи, като с най-голям процент сред тях са лицата с нарушение в кръвната картина, намалени нива на серумно желязо и стойности на хемоглобин и хематокрит и в частност развитие на анемичен синдром. (Таблица 1).

**Таблица 1.** Изследвани таргетни групи

Клинични характеристики		Брой
<b>Патология на бременността</b>	Фетален хидропс	4
	Фетален асцит	7
	Фебрилно- обривен синдром	10
	Анемичен синдром	61
<b>Жени претърпели спонтанен аборт</b>		<b>19</b>
<b>Жени с репродуктивни проблеми</b>		<b>25</b>
<b>Новородени деца</b>		<b>11</b>
<b>Здрави бременни</b>		<b>168</b>
<b>Общ брой</b>		<b>305</b>

В зависимост от срока на бременността проучените жени са разделени в три групи. Най-голям е делът на изследваните през трети триместър от бременността 149/250 (59,6%), 95% ДИ 51,5- 67,5, което е обяснимо с оглед напредването на бременността, засиления мониторинг и политиката на увеличен брой женски консултации, съгласно доболничната програма на НЗОК (Таблица 2).

**Таблица 2.** Разпределение на пациентките според гестационна възраст на бременността

Клинични характеристики		Брой
<b>Бременни жени</b>		<b>250</b>
<b>Патология на бременността</b>	Фетален хидропс	4
	Фетален асцит	7
	Фебрилно- обривен синдром	10
	Анемичен синдром	61
<b>Здрави бременни</b>		<b>168</b>
<b>Жени претърпели спонтанен аборт</b>		<b>19</b>
<b>Жени с репродуктивни проблеми</b>		<b>25</b>
<b>Новородени деца</b>		<b>11</b>
<b>Общ брой</b>		<b>305</b>

Друга групи изследвани лица в нашето проучване са жените, претърпели спонтанен аборт преди 20 гестационна седмица (n=19), и пациентки с репродуктивни проблеми, подложени на инвитро процедури (n=25). Те са изследвани с оглед на възможната етиологична роля на В19V като TORCH агент в развитие на тяхното

състояние. Въпреки че не се откриват литературни данни за вероятна роля на В19Vв проявата на репродуктивни проблеми, персистирането на вируса в организма може да доведе до поява на клинични усложнения, възпрепятстващи нормалното протичане на бременността.

Дисертационната разработка включва и изследване на единадесет новородени деца, тествани по повод възможна майчино-фетална инфекция и нарушения във феталната хемопоеза и/или сърдечно-сърдова система (Таблица 3).

**Таблица 3.** Изследвани новородени деца, групирани по клинични усложнения/манифестация.

Клиничната манифестация на изследваните новородени деца	Брой пациенти
С тромбоцитопения	1
Вродена инфекция	5
Анемия	1
Перикарден излив	1
Хидропс	3
Общ брой	11

При проучване на новородените е приложено паралелно изследване и на майчин серум, което дава възможност за определяне на майчиния имунитет и възможността за преминаване на антитела от майката към плода. Анализът обаче предоставя данни за послеродовия имунитет на пациентите, а данните за вероятно преболедуване по време на бременността се базират на снета клинична анамнеза от майките. Това отново насочва вниманието към важността от скринирането на жени в репродуктивна възраст за разширен набор от патогени, в т.ч. В19V.

Всички включени в изследването пациенти са тествано негативни за рубеолен вирус, инфекциозен агент с подчертано патологично влияние върху майката и плода по време на бременността.

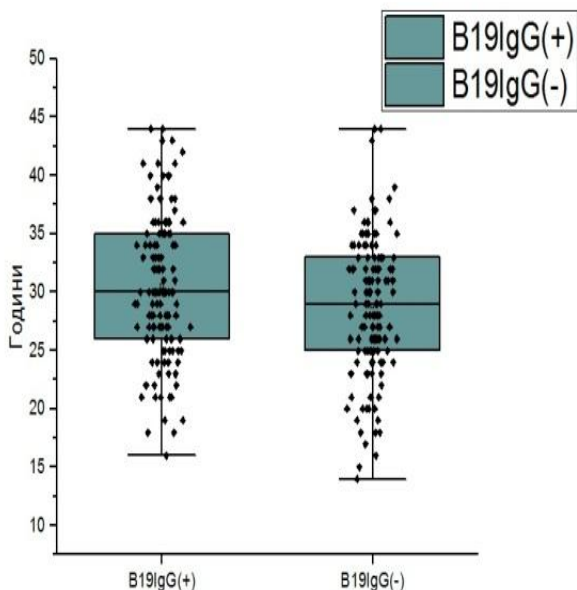
## **1. Серопревалиране на В19V-IgG по възрастов профил при жени в детеродна възраст (18 - 41 г), в т.ч. бременни**

Важен фактор при проследяване на циркулацията на В19V сред българското население и в частност сред групата на жените в детеродна възраст, която е обект на настоящата дисертационна разработка, е определяне на имунния им статус – наличие на В19V IgG антитела. Тъй като срещу този вирусен агент не е разработена и утвърдена ваксина, наличието на имунитет, в повечето случаи пожизнен, е единствено в следствие на инфектиране с вирус. Поради тази причина всички включени в изследването пациентки са тествани по повод наличие на протективен имунитет за В19V. Проучените жени в детеродна възраст (18 - 44 години) бяха разпределени в четири възрастови групи: под 20 години, 21 - 30 години, 31 - 40 години и > 40 г.

В проучването са включени 250 бременни жени в различна гестационна възраст от общо 294 жени в детеродна възраст, представляващи 85,0 % от общия брой изследвани. Най-голям брой проби са изследвани във възрастовата група 21 - 30 г., 131/294 (45,0 %), следвана от възрастовата група 31 - 41 г., 126/294 (43,7 %), респективно, които групи определят и по-активната репродуктивна възраст на населението.

Наличие на защитни В19-IgG антитела, е отчетено при 128/294 (43.5 %, 95% ДИ 37,8-49,2) ( Фигура 1).

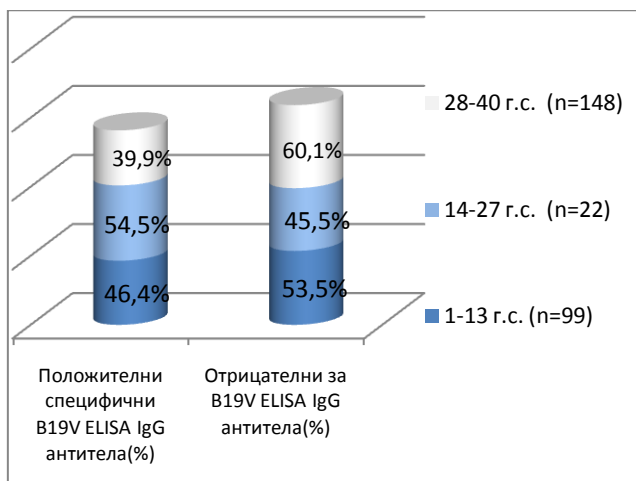
Получените данни съответстват на увеличения процент на защитеност, който нараства пропорционално с възрастта, тенденция отчитана и в общата популация.



*Фигура 1. Разпределение на изследваните лица по възрастови групи и наличие на B19-IgG вирусен маркер*

## **2. Серопревалиране на B19V-IgG по възрастов профил и гестационна възраст от бременността**

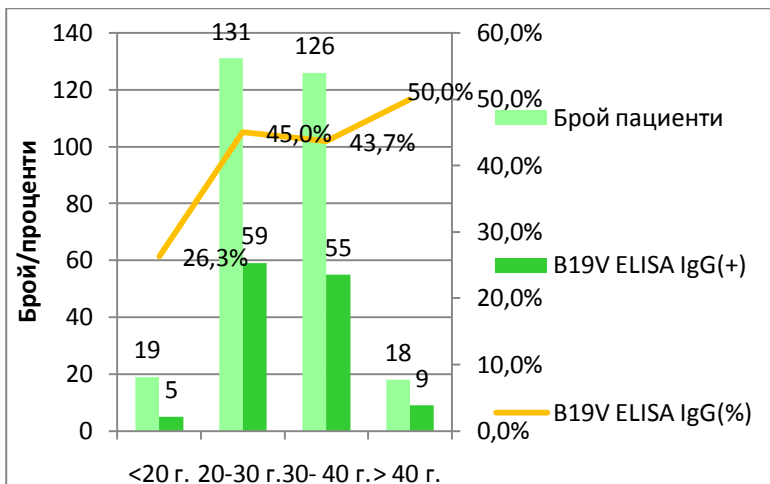
Интерес представлява информацията за серонегативните бременни жени, разпределени по гестационна възраст и наличието на имунитет срещу B19V (Фигура 2). Вижда се, че делът на серонегативните, т.е. с потенциална опасност от инфектиране в бъдеще, преобладава 59,31% серонегативни срещу 40,69 % серопозитивни лица.



**Фигура 2.** Разпределение на B19V-IgG серонегативни и серопозитивни изследвани жени според гестационната възраст на бременността.

По отношение на защитеността на изследваната група жени спрямо B19V (наличие на специфични B19V-IgG антитела) серопозитивност е доказана при 40,69 %. Тези резултати кореспондират с проучвания в наши и чужди списания (Kelly, и съвт., 2000; и Ivanova, 2016). Процентно най-висок е дялът на положителни B19V-IgG антитела сред групата на жените на възраст между 21-30 г., следвана от тази между 31-40 г., като това са и групите с най-много пациентки (Фигура 3). Наблюдавано е пропорционално повишаване на B19V серопозитивните, от една страна, с увеличаване на възрастта на изследваните, а от друга, със семейния им статус и наличието на контакт с деца в семейството. И двата фактора повишават вероятността за среща с този инфекциозен агент, който доказано циркулира в популацията.





**Фигура 3.** *Разпределение на изследваните бременни жени по възрастови групи и наличие на B19V-IgG.*

### **3. Разпределение на изследваните клинични проби по години за периода 2015 – 10.2019 (n=305)**

За период от пет години (2015 г. – 10.2019 г.) са изследвани общо 305 серумни проби. Проведеното изследване е проспективно като клиничните проби са набирани в гинекологични клиники в страната или женските консултации, а съобразно получените лабораторни резултати е насочвано и лечението на пациентките чрез комуникация с лекуващите лекари. Целта на проведеното проучване е да установим честотата на доказване на B19V за петгодишен период в избраната от нас таргетна група, имайки предвид неговата 4-5 годишна цикличност на разпространение с потенциал за възникване на епидемични взривове.

#### *3.1. Зависимост между броя на изследваните лица и броя на тези с доказано положителен именоензимен B19V IgM.*

Сред всички изследвани проби, положителен резултат за остра вирусна инфекция дадоха 60/305 (19,7%). Разпределението на

пациентите по изследван и доказан положителен имуноензимен В19V IgM маркер за целия период на проучването е представен на Табл. 4.

**Таблица 4.** Разпределение на изследваните лица по години и доказан В19V IgM маркер.

Години	Брой изследвания	Брой В19V IgM (+)	Относителен дял (%)
2015	42	9	21,4%
2016	43	12	27,9%
2017	171	31	18,1%
2018	32	5	15,6%
2019	17	3	17,6%
Общо	305	60	19,7%

Резултатите от проучването показват, че най-висок процент случаи с положителен имуноензимен В19V IgM маркер е отчетен през годините 2015 - 2016 г. със среден относителен дял 24,7%. През посочения период е открит най-голям брой пациентки със клинична характеристика, суспектна за В19V инфекция. Получените данни са подложени на статистически анализ с цел определяне статистическата значимост на резултатите.

Извършена е обработка с програмата SPSS чрез прилагане на дисперсионен анализ. На базата на квадратите на регресионната връзка е 472,91 спрямо 9,03 за необясненото въздействие на случайния фактор и това позволява да получим за F емпирично 52,369, което е повече от теоретичната стойност, защото имаме сигнификантен модел или между двата фактора съществува регресионна връзка.

За потвърждаване на тези изводи е проведен и корелационен анализ.

При дисперсионния анализ се установява, че моделът е сигнификантен /Sig.=0.005<0.05/, а от стойността на коефициентите и тяхната сигнификантност се моделира следната връзка:

**Брой на пациенти с B19V IgM антитела =  $-36,784 + 12,879 * \ln(\text{Брой изследвания})$**

Или при 50% ръст на изследваната група би се очаквало 19,35% серопозитивност.

### *3.2. Зависимост между броя на изследваните лица и броя на тези с положителен B19V ДНК маркер.*

За периода от 2015-10.2019 г са изследвани общо 305 клинични проби. Всички проби са тествани и с помощта на молекулярно-генетичен метод - конвенционален PCR тест с цел за доказване на консервативния NS1 регион от вирусния геном. Целта е да установим честотата на доказване на втория маркер, потвърждаващ остра B19V инфекция (B19VDНК) през изследвания период в избраната от нас група. Двата метода на потвърждаване обогатяват диагностичния алгоритъм и създават възможност за прецизиране на лабораторния протокол, така че да бъдат избегнати фалшиво положителни или отрицателни резултати.

Данните през периода 2015 г. до 10.2019 г. могат да бъдат представени в следния табличен вид (Таблица 5):

**Таблица 5.** Разпределение на изследваните лица по години и изследван B19V ДНК маркер.

Години	Брой изследвания	B19VDНК(+)	Относителен дял (%)
2015	42	13	31,0%
2016	43	13	30,2%
2017	171	18	10,5%
2018	32	5	15,6%
2019	17	3	17,6%
Общо	305	52	17,0%

Отново най-висок относителен дял в проценти е намерен сред пробите, взети през 2015 и 2016 г. - 31,0% и 30,2%, съответно. Най-нисък е процентът на доказано положителните проби по отношение на В19VДНК през 2017 година. През тази година е изледван най-голям брой серумни проби, основен процент от които са на здравите бременни жени, използвани като контролна група (137/171, 80,1%). Наличието на В19VДНК при здрави бременни показва възможна персистираща В19V инфекция.

След въвеждане на данните от положителните по отношение на В19V-ДНК маркер проби в SPSS и прилагане на дисперсионен анализ се установява, че квадратите на регресионната връзка е 1,976 спрямо 0,105 за необясненото въздействие на случайния фактор и това позволява да получим за F емпирично 18,902, което е повече от теоретичната стойност и между двата фактора съществува регресионна връзка.

От данните за дисперсионния анализ се установи, че моделът е сигнификантен /Sig. = 0.02<0.05/ и от стойността на коефициентите и тяхната сигнификантност и можем да моделираме следната връзка:

***Брой на пациенти В19V антитела = 2,718281828459045 (3,187-(36,424/Брой изследвания))***

При 50% ръст на изследваната група би се очаквало 5% доказано положителни пациенти по отношение на изследвания В19V ДНК маркер, или това е ръст със забавен растеж.

#### **4. Етиологично доказване на В19V сред бременни жени с различни клинични манифестации/прояви на патологична бременност (n=82)**

##### **4.1. Бременни пациентки с анемичен синдром (n=61)**

Основният критерий за диагностициране на анемичен синдром при бременни е концентрацията на Hb (хемоглобин) и в частност спадането му под <100 g/l. Състоянието на бременност, както и някои утежняващи фактори, като индивидуална физиология или среща с инфекциозни агенти, могат да доведат до промяна и отклонения в нормалната кръвна картина. Последното заедно с гестационния

диабет са едни от основните проблеми за нормалното протичане на бременността. Въпреки прилагането на редица медикаменти, в повечето случаи те са трудно овладяеми и персистиращи до края на бременността. Сред включените в настоящото изследване групи пациентки с патологична бременност, най-голям е дялът на тези с проявен анемичен синдром по време на бременността 61/82 (74,4%).

*4.1.1. Разпределение на бременните пациентки с анемичен синдром по възрастови групи, гестационна възраст и изследван диагностичен B19V маркер*

Сред общия брой изследвани жени с анемичен синдром серологично доказателство за остра инфекция с B19V (наличие на специфични имуноглобулини от клас IgM) се открива при 13/61 (21,3%) (Таблица 6). Лабораторните маркери в комбинация със снетите анамнестични данни, в т.ч. контакт на инфектираните с деца с фебрилно-обривен синдром, навеждат към възможната етиологична роля на B19V.

**Таблица 6.** Разпределение на изследваните пациентки с анемичен синдром по гестационна възраст и изследвани имуноензимни B19V маркери (B19V ELISA IgM/ IgG)

Гестационна възраст	B19V ELISA IgM	B19V ELISA IgG
	Брой (%)	Брой (%)
1-13 г.с. (n=12)	4 (33,3%)	7 (58,3%)
14-27 г.с. (n=10)	1 (10,0%)	4 (40,0%)
28-40 г.с. (n=39)	8 (20,5%)	21 (53,8%)
<b>Общ брой (n=61)</b>	<b>13 (21,3%)</b>	<b>32 (52,5%)</b>

При 32/61 (52.5% (95% ДИ 39,9- 65,0) от изследваната група пациенти се доказва серопозитивност и наличие на протективен имунитет срещу В19V. Въпреки че при тях не може да бъде фиксиран периодът на инфектиране и не се откриват маркери за остра вирусна инфекция, наличието на имунитет при тези бременни може да бъде индикатор за скорошно преболеждане и развитие на поствирусни усложнения.

С оглед на това важен подход при проучването на лица, инфектирани с В19V, е доказването на вирусна ДНК и в частност на консервативния В19V NS1 регион. Спецификата на имунната система на пациентите, възможността за кръстосана реактивност между образуваните IgM антитела в отговор на инфекциозен причинител, както и съществуването на В19V в латентна форма в организма, определят значението на молекулярно-биологичния подход при проучването на възможните случаи. При 15/61 (24.6%, 95% ДИ 13,8-35,4) от лицата с анемичен синдром се доказва наличие на В19V ДНК, т.е. при 2/61 (3,3%) потвърждаването на В19V инфекция става на базата на PCR анализ (Таблица 7).

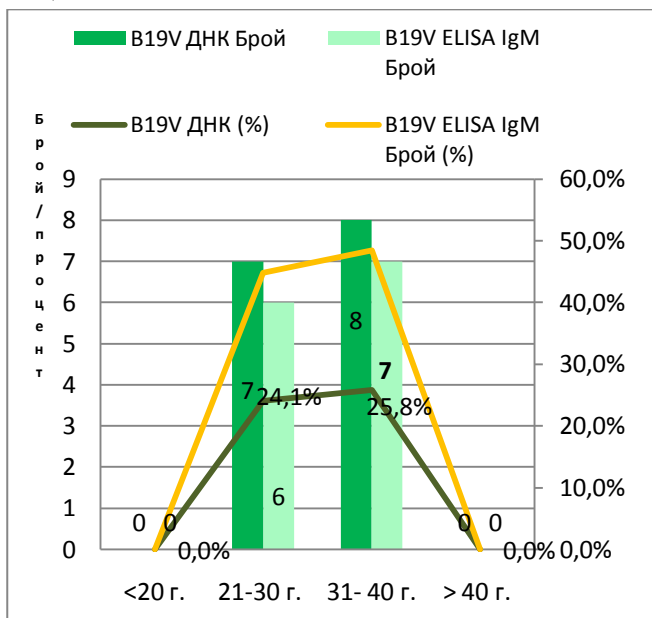
**Таблица 7.** Разпределение на изследваните бременни пациентки с анемичен синдром по гестационна възраст и изследван В19V ДНК маркер

Гестационна възраст	В19V ДНК Брой (%)	95% ДИ
1-13 г.с. (n=12)	3 (25,0%)	0,5-49,5
14-27 г.с. (n=10)	4 (40,0%)	9,6-70,4
28-40 г.с. (n=39)	8 (20,5%)	7,8-33,2
<b>Общ брой (n=61)</b>	<b>15 (24,6%)</b>	<b>13,8-35,4</b>

*4.1.2. Разпределение на инфектираните с В19V бременни пациентки с анемичен синдром по възрастови групи в комбинация с изпозваните В19V диагностични методи.*

Включените в изследването лица са жени в детородна възраст като най-голям е дялът на бременните във възрастовата група 31-40 год. (n=31) и дялът на инфектираните в тази възрастова група преобладава (8/31, 25,8%), следвана от групата на жените 21–30 години (n=29) (Фигура 4).

Най-малък е процентът на В19V положителните сред лицата над 40 години. Последното е в съответствие на общата тенденция на серопревалиране на вируса, предимно сред подрастващи и лица до 40 години, както и с докладваната в т. 3.2. повишена защитеност при по-възрастните лица.



**Фигура 4.** Разпределение на инфектираните с В19V бременни пациентки с анемичен синдром по възрастови групи в комбинация с използваните В19V диагностични методи.

Внимание заслужава и групата на серонегативните жени (29/61, 47,54%), които в бъдеще са в потенциално опасност от вирусно инфектиране и усложняване на анемичното състояние.

#### *4.1.3. Клиничен случай – бременна жена с $\beta$ -таласемия и доказана B19V инфекция*

Във връзка възможната роля на B19V в развитието на патологична бременност и нарушения в нормалната кръвна картина, в настоящият дисертационен беше обстойно проучена като клиничен случай 30 годишна бременна жена, диагностицирана с  $\beta$ -таласемия. Таласемичните синдроми са хетерогенна група наследствени заболявания. При тях има липса или намален синтез на една или повече структурно нормални полипептидни вериги на хемоглибиновата молекула. Генетично таласемииите се класифицират въз основа на типа засегната глобинова верига. Най-честите форми са  $\alpha$ -таласемия, при която се засяга нормалният синтез на  $\alpha$ -веригите на хемоглобина, и  $\beta$ -таласемия – с нарушен синтез на  $\beta$ -глобиновите вериги на хемоглобина. Тези състояния са последица от мутации в гените за глобиновите вериги, които се унаследяват най-често автозомно - рецесивно.

Разпространението на различните форми на таласемия зависи от множество фактори, сред които най-голямо значение имат миграцията на населението и разпространението на маларията. Мутантните гени за  $\alpha$ -таласемия са най-чести сред населението на Западна Африка и Южното тихоокеанско крайбрежие.  $\beta$ -таласемията се среща по-често в държавите от Средиземноморския басейн, Гърция, Кипър, включително и у нас. Носителство на гена за заболяването се открива в приблизително 2.5% от българското население (Калева В. и съвт., 2011). Това означава, че повече от 200 000 души в страната са носители на гена за  $\beta$ -таласемия.

Проучената пациентка е постъпила за проследяване и предстоящо второ раждане в СБАЛАГ „Майчин дом“, София. Раждането е извършено чрез секцио в 34 гестационна седмица от бременността. Проби за изследване са взети след проведеното раждане. При направен лабораторен скрининг се установява:

- анемичен синдром със стойности на хемоглобин - Hb 98 g/L.



- кръвната картина е с данни за лекостепенна микроцитна хипохромна анемия: RBC  $5.15 \times 10^{12}/L$ , HGB 98 g/L, MCV 65.8 fL, MCH 19.4 pg, MCHC 295 g/L.

- кръвната натривка показва анизомacro-микроцитоза с наличието на единични таргетни клетки. Еритроцитите са хипохромни. Количеството на ретикулоцитите е 19%. Ниво на серумно желязо  $12.9 \mu\text{mol}/L$ , феритин  $17.5 \mu\text{g}/L$ .

- електролитите (натрий, калий, калций, фосфати и магнезий) са в границите на нормата.

- стойността на общия билирубин не е увеличена ( $15.0 \mu\text{mol}/L$ ), но повече от половината е директен ( $7.4 \mu\text{mol}/L$ ), LDI е леко увеличена ( $321 U/L$ ), което е указание за хронична хемолiza.

- кръвна захар е в норма,  $5.1 \text{mmol}/L$ .

- нормални показатели за чернодробна и бъбречна функция.

След раждането пациентката е преведена в реанимация и се възстановява нормално. Два дни след проведената хирургична интервенция жената съобщава за обрив в областта на лицето, ръцете и гърдите. С оглед на възможно инфекциозно заболяване, тя е изолирана и насочена за консултация с инфекционист. Поради спецификата на възникналия обрив е предположена B19V инфекция.

При направеното серологично изследване (търговски тест за индиректен имуноензимен анализ Euroimmun Parvovirus B19 IgM/IgG) се доказаха специфични антитела клас IgM/IgG срещу B19V. Направен бе и молекулярно-биологичен скрининг PCR тест (КАРА Taq PCR Kits) с консенсусни праймери (концентрация  $20 \text{p}/\text{mol}$ ).

Доказано бе наличие на вирусна нуклеинова киселина и успешно амплифициран NS1 ген.

На петия ден от появата на обрива бе взета втора проба. Проведените лабораторни изследвания отново потвърждават специфични антитела клас IgM/IgG срещу B19V, както и наличие на вирусна ДНК, което потвърждава етиологичната роля на B19V в развитата се клинична манифестация.

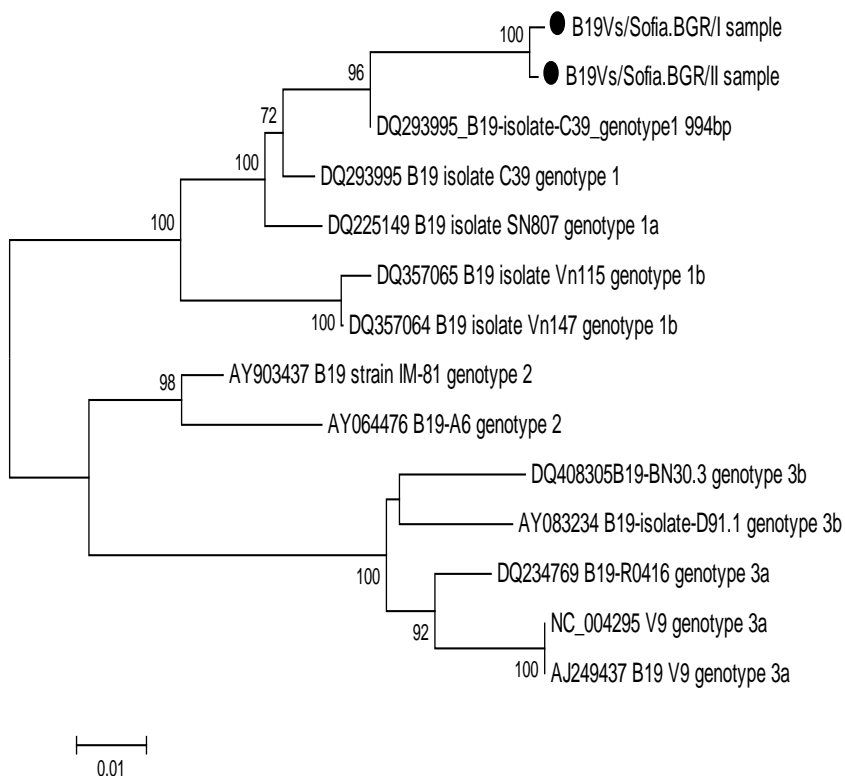
Въпреки наличието на перинатална майчина инфекция с B19V, при новороденото липсват данни за такава, което се

потвърждава от направените му серологични и молекулярно-вирусологични изследвания. Открити са само майчините антитела срещу B19V от клас IgG. Това потвърждава тезата, че B19V не е считан за тератогенен агент, въздействащ върху ембриогенезата (8-10 г.с.) и инфекцията с него не е индикация за прекъсване на бременността (Craze J. и съавт., 2002). Доказателство за това е предимно благоприятният изход за плода при инфектиране на серонегативна майка в 85% от случаите (Levy R и съавт., 1997).

Направен е и секвенционен анализ на положително амплифицирани NS1/VP1u продукти. На нуклеотидно секвениране бяха подложени PCR продукти, успешно амплифицирани от взетите две проследяващи проби на пациентката. На секвенционен анализ бяха подложени PCR продуктите (от NS1/VP1u “junction” региона) от втори рунд на двустъпковия вмъкнат PCR (nested PCR), с големина около 994 b.p. Използвани бяха специфични за NS1/VP1u генетичен регион две двойки консенсусни праймери e1855f / e2960r и e1863f / e2953r (Servant и съавт., 2002)

Цялата секвенционна техника включваше поредица от последователни работни протоколи провеждани съгласно стандартна оперативна процедура на работа с “LNS-II-SOP052\_Sequencing ABI Capillary sequencer”.

Секвенцията на доказано положителният NS1/VP1u PCR продукт е отбелязана със символ кръг (фигура 5) и беше съотнесена към B19V генотип 1a. Детектираният B19V 1a генотип е доказано циркулиращ в редица европейски страни, в т.ч. и България за период от близо 10 години (Ivanova и съавт., 2016). Проведеният BLAST анализ в Genbank показва сходства над 90% със секвенции от Швейцария, Германия, Люксембург, Холандия, Албания, Италия, Беларус и Грузия.



**Фигура 5.** Филогенетичен анализ на B19V секвенции: 14 секвенции (2 включени в изследването и 12 от GenBank). Положителният NS1/VP1u секвенционен продукт е отбелязан с черен кръг и съответства на B19V генотип 1a. Филогенетичният анализ е извършен чрез Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) версия 5.0.5 software. Използвани са Kimura 2-parameter модел и neighbour-joining алгоритъм от MEGA 5 и бяха приложени само стойности  $\geq 70\%$  (1000 повторения), които се считат за значими и се показват в дърветата.

След проведените изследвания, на майката е назначена терапия с имуностимулатори по схема.

B19V освен цитолитична притежава и апоптотична активност. Вирусът има способност да възпира клетъчния цикъл, което може да

доведе до масово загиване на еритроидни прогениторни клетки и да отключи анемичен синдром (Chisaka, H. и съавт., 2003). С оглед на съпътстващото заболяване на пациентката, а именно  $\beta$ -таласемия, острата вирусна инфекция би могла да предизвика апластична криза. Поради тази причина е назначена консултация с хематолог, който препоръчва определяне нивото на серумния хепсидин – хормона, регулащ обмяната на желязо в организма.

Серумното ниво на хепсидин е статистически значимо понижено при желязо- дефицитна анемия и  $\beta$ -таласемия (0,65- 1,23  $\mu\text{g/L}$ ;  $p < 0,001$ ). Синтезът на хепсидин при  $\beta$ -таласемия най-вероятно е намален в резултат на свръхобременяването с желязо и неефективната еритропоеза. При това заболяване се наблюдават екстремно високи стойности на феритин поради отлагането на желязо в хепатоцитите и ултраниски нива на серумен хепсидин. Това предполага по-голямо влияние на активността на еритропоезата върху серумните концентрации на хепсидин в сравнение със тежестта на свръхобременяването с желязо (отчетена с нивата на серумния феритин). Установеното серумно ниво на хепсидин е 19.4  $\mu\text{g/L}$ . Отчетената стойност на серумен хепсидин е значително повишена, спрямо очакваната (прагова стойност  $\leq 1,385$ ) предвид заболяването на пациентката. Това вероятно се дължи на вирусната инфекция и настъпилото възпаление.

При инфекция възпалителните цитокини водят до повишения му синтез, който е причина за акумулиране на желязо в ендотелиалната макрофагиална система и до недоимък на желязо за нуждите на еритропоезата (Cherian S и съавт., 2008; De Mast Q и съавт., 2009; De Mast Q и съавт., 2010 Nweneka CV и съавт., 2010). Вероятно повишеният хепсидин играе протективна роля срещу растежа на микроорганизми като намалява екстрацелуларното желязо. От друга страна повишеният хепсидин може да доведе до дефицит на желязо и до невъзможност за ефективно компенсиране при орално суплементиране, защото подтиска абсорбцията на желязо през чревната лигавица. Нецелесъобразното суплементиране с желязо без дефицит в депата може да доведе до тежки странични ефекти поради

стимулирана пролиферация на латентни патогени (Kemna EH и съавт., 2007; Nemeth E и съавт., 2004; Wrighting DM и съавт., 2006).

#### **4.2. Бременни пациентки с неимунен хидропс феталис (n=4)**

Сред общият брой изследвани бременни жени (n=250), клинична манифестация на неимунен хидропс е докладван при 4, като при 3/4 (75%) бе доказан B19V инфекциозен агент. Възможните механизми, чрез които B19V може да предизвика хидропс на плода, включват анемия, дължаща се на вирусните частици, които преминават през плацентата, инхибират феталната еритропоеза, в следствие на което се развива апластична криза и конгестивна анемия, хипоксия и сърдечна недостатъчност. Литературните данни сочат, че 8% до 10% от случаите на неимунния хидропс се дължат на инфекция с B19V на серонегативни майки (Levy R. и съавт., 1997;), въпреки че в някои проучвания е намерено молекулно доказателства за парвовирус B19 в 18% до 27% (Markenson G.R., Yancey M.K., 1998).

В хода на настоящото изследване са проучени четири бременни пациентки с диагноза хидропс феталис по време на бременността. Три от тях са доказано положителни серологично (наличие на специфични B19V IgM/IgG антитела) и молекулярно (наличие на B19V ДНК) за остра B19V инфекция (Таблица 8). По време на клиничното развитие на хидропс феталис, B19V IgM антителата остават в ниски до неопределими стойности поради постоянния антигенен стимул. В тези случаи PCR анализът на кръвната проба може да бъде високоинформативен.

3/4 от пациентките с хидропс феталис са положителни по отношение на двата маркера за остра B19V инфекция. Трите пациентки са във възрастовият диапазон от 31-40 г. Четвъртата пациентка е от групата на жените от 21-30 г., като при нея не се доказва B19V инфекция.

**Таблица 8.** Пациентки с хидропс феталис разпределени по гестационна възраст и изследвани за откриване на имуноензимни и молекулярни В19V маркери.

Гестационна възраст	Брой бременни жени с доказани		
	В19V IgM	В19V IgG	В19V ДНК
1-13 г.с. (n=0)	0	0	0
14-27 г.с. (n=0)	0	0	0
28-40 г.с. (n=4)	3	3	3
<b>Общ брой (n=4)</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>

#### 4.3. Бременни пациентки с фетален асцит (n=7)

Трета група изследвани бременни жени са тези с проявен фетален асцит по време на бременността.

При развитие на В19V инфекция по време на бременност, времето между началото на проявите при майката и плода варира от три до петнадесет седмици (Bonvicini, F., и съавт.2011). Инфекцията по време на бременност може да има различни прояви, вариращи от липса на симптоми при майката и фетуса до преходна фетална анемия, фетален асцит, спонтанен аборт и втрематочна смърт на плода и т.н. В периода от 17 до 24 гестационна седмица плацентарните трофобласти съдържат повишени концентрации на Р антиген, специфичния В19 клетъчен рецептор на В19V и в същото време има интензивна хематопоеза. Поради това плодът е уязвим за увреждане, индуцирано от В19V (Enders M., и съавт. 2010).

Повечето проучвания се фокусират върху феталните ефекти на инфекцията с В19V, съвсем малко обаче се знае за вирусологичните параметри, които могат да предскажат риска от усложнения за плода.

Седем от изследваните 250 бременни (2.80%) имат клинична манифестация на фетален асцит. Проучените пациентки са във втори и трети триместър от бременността, като три от тях са във възрастовата група 21-30 г., а четири в групата на жените от 31-40 г. При 2/7 (28,6%) се доказва В19V инфекция.

В частност, сред изследваните бременни с фетален асцит при 1/7 (14.29 %) се доказва наличие на В19V инфекция, тройно позитивен резултат за В19V IgM/ IgG и ДНК. При другата пациентка се диагностицираха само В19V IgM/ IgG, но не се доказа наличие на вирусна ДНК (Таблица 9).

**Таблица 9.** Пациентки с фетален асцит, разпределени по гестационна възраст и изследван имуноензимен В19V маркер

Гестационна възраст	Брой (%) бременни жени с доказани		
	В19V IgM	В19V IgG	В19V ДНК
1-13 г.с. (n=0)	0	0	0
14-27 г.с. (n=5)	0	4	0
28-40 г.с. (n=2)	2	2	1
<b>Общ брой (n=7)</b>	<b>2 (28,6%)</b>	<b>6 (85,7%)</b>	<b>1 (14,3%)</b>

И за двете пациентки с лабораторно доказаната В19 вирусна инфекция е съобщено своевременно на изпращащия лекар с цел адекватно лечение.

#### **4.4. Бременни пациентки с фебрилно-обривен синдром (n=10)**

B19V клинично се манифестира основно като фебрилно - обривен синдром - erythema infectiosum, т.нар. пета болест. B19V в миналото, а и в настоящия момент, често се диагностицира като рубеола, вероятно поради сходната клинична симптоматика. Именно такава е и групата на бременните пациентки с фебрилно-обривен синдром, диагностицирани и първично отхвърлени за рубеолна инфекция. Десет жени с развитие на фебрилитет и обрив в първи (n=3), втори (n=2) и трети (n=5) триместър от бременността са изследвани посредством ELISA и PCR за определяне на етиологична роля на B19V. При три (3/10, 30.00%) се потвърждава прясна вирусна инфекция и положителен резултат и за трите B19V диагностични маркера (IgM, IgG и ДНК). При една пациентка във втори триместър от бременността се доказва наличие на вирусен имунитет, но и вирусна ДНК, което може да бъде обяснено с бързопреходен IgM сигнал или продължително вирусно персистиране. При четвърта пациента се доказаха единствено и само антитела от клас IgM (B19VIgM), не се доказва наличие на протективни антитела от клас IgG (B19VIgG) и вирусна нуклеинова киселина (Таблица 10). Именно фебрилно-обривният синдром е най-честата клинична проява на B19V инфекция, който въпреки сравнително леката си изява, особено при възрастни, може да прогресира и доведе до последващи усложнения, в следствие на персистиране на вируса в организма. Основен процент от заболелите са във възрастовия диапазон от 21 до 30 г. (6/10, 60,0%).



**Таблица 10.** Разпределение на изследвани пациентки с фебрилно-обривен синдром по гестационна възраст и изследвани B19V маркери.

Гестационна възраст	Брой (%) бременни жени с доказани		
	B19V IgM	B19V IgG	B19V ДНК
1-13 г.с. (n=3)	2	1	1
14-27 г.с. (n=2)	0	1	1
28-40 г.с. (n=5)	2	1	2
<b>Общ брой (n=10)</b>	<b>4 (40,0%)</b>	<b>3 (30,0%)</b>	<b>4 (40,0%)</b>

### **5. Бременни пациентки, претърпели спонтанен аборт (n=19)**

Въпреки че в голям процент при възрастни инфекцията с B19V протича безсимптомно или с нетипична клинична картина, включваща грипо-подобни заболявания, артралгии и артропатии, токсо-инфекциозен синдром, анемия и др., последиците при инфектиране по време на бременност могат да доведат до спонтанен аборт с честота 14.8% преди 20 г.с. и около 2.8% след тази седмица. Спонтанният аборт (загуба на бременност) е неиндуцирана ембрионална или фетална смърт преди 20-та гестационна седмица, която може да бъде ранна (преди 12 гестационна седмица) или късна (от 12 до 20 гестационна седмица). Клиничната диагноза се основава главно на клинични критерии (липсата на фетална активност и на сърдечна активност на плода) или бременността не се наблюдава на ултразвук.

В хода на разработване на настоящия дисертационен труд са изследвани 19 жени (19/294, 6.5%), претърпели спонтанен аборт, като при основна част от тях абортът настъпва през първия триместър от бременността (18/19, 94.7%). Серологично доказателство за възможен

B19V причинител се открива при 5 от изследваните жени (5/19, 26.3%). Позитивиране на два от диагностичните маркери (IgG и ДНК) без отчетено наличие на серологичен маркер за остра инфекция се открива при една жена, загубила плода през първи триместър на бременността. Молекулярно доказателство за остра инфекция с B19V, е отчетено в 6/19 (31,6%) от изследваните пациентки, като само една от тях е във втори триместър на бременността, т.н. късен аборт (Таблица 11).

**Таблица 11.** Разпределение на пациентките, претърпели спонтанен аборт по гестационна възраст и изследвани B19V маркери.

Гестационна възраст	Брой (%) жени, претърпели спонтанен аборт с доказани		
	B19V IgM	B19V IgG	B19V ДНК
1-13 г.с. (n=18)	4	10	5
14-27 г.с. (n=1)	1	1	1
28-40 г.с. (n=0)	0	0	0
<b>Общ брой (n=19)</b>	<b>5 (26,3%)</b>	<b>11 (57,9%)</b>	<b>6 (31,6%)</b>

Проучените пациентки са в три от споменатите по-горе възрастови групи, отново с превес на групата 31-40 год. (8/19, 42.1%).

## **6. Етиологично доказване на B19V сред жени с репродуктивни проблеми, подложени на инвитро процедури (n=25)**

Репродуктивните проблеми могат да бъдат следствие от увреждания при един от двата партньора или и при двата едновременно. При жената най-често са свързани с прекарани операции, възпалителни заболявания, някои генетични фактори, наличие на ендометриоза, миома на матката и др. Въпреки че не се откриват конкретни проучвания и не е доказана ролята на B19V при

жени с репродуктивни проблеми, последният би могъл да доведе до нарушения в нанормалното протичане на бременността, особено когато става въпрос за персистираща инфекция. Въпреки че не се откриват конкретни проучвания и не е доказана ролята на В19V при жени с репродуктивни проблеми, последният би могъл да доведе до нарушения в нанормалното протичане на бременността, особено когато става въпрос за персистираща инфекция.

Сред изследваните 25 жени с репродуктивни проблеми, серологично или молекулярно-генетично доказателство за остра инфекция с В19V не е намерено. При 11/25 (44,0%) се доказват антитела от клас IgG и наличие на протективен имунитет. Основна част от пациентките са във възрастовия диапазон 31-40 г. (Таблица 12).

**Таблица 12.** Разпределение на пациентките с репродуктивни проблеми по възраст и изследван имуноензимен В19V маркер.

Възрастови групи	Брой (%) жени с доказани	
	В19V IgM	В19V IgG
≤ 20 г. (n=0)	0	0
21 – 30 г. (n=1)	0	1
31 – 40 г. (n=17)	0	8
> 40 г. (n=7)	0	2
<b>Общ брой (n=25)</b>	<b>0</b>	<b>11 (44,0%)</b>

### **7. Доказване на В19V сред здрави бременни жени (n=168)**

В настоящото изследване е включено проучване на здрави бременни жени (n=168) с цел определяне на честотата на доказване на В19V. Серумните проби са осигурени от Столична РЗИ по линия на програма за скриниране на бременни за сексуално-преносими инфекции.

7.1. *Разпределение на тестираните здрави бременни жени по комбинация от използвани В19V диагностични методи.*

Честотата на доказване на В19V по серологични маркери сред изследваните здрави бременни е представена на Таблица 26. Най-голям е дялът на проучените в трети триместър от бременността (99/168, 58.9%, ДИ 51.5- 66,3). При 65/168 (38,7%) се доказва маркер за отминала вирусна инфекция и наличие на протективен имунитет (Таблица 13). Интерес представлява групата на доказано положителните и остроинфектираните бременни 31/168 (18.45 %), които са с поенциален риск от развитие на различни клинични усложнения и/или майчино фетална инфекция. Предимно безсимптомното носителство на вируса определя възможността от инфектиране при липса на определени патологични прояви. Това определя и значението за включване на мониториращи тестове за серопозитивност на бременни и жени в детеродна възраст.

**Таблица 13.** Разпределение на здравите бременни жени по гестационна възраст и изследван имуноензимен В19V маркер.

Гестационна възраст	Брой (%) жени с доказани	
	В19V IgM	В19V IgG
1-13 г.с. (n=67)	12 (17,9%)	31 (46,3%)
14-27 г.с. (n=2)	0	1
28-40 г.с. (n=99)	19 (19,2%)	33 (33,3%)
<b>Общ брой (n=168)</b>	<b>31 (18,5%)</b>	<b>65 (38,7%)</b>

Всички клинични материали са изследвани с молекулярно-генетичен метод (PCR). Сред доказано ELISA положителните проби за прясна инфекция с В19V, положителен PCR сигнал се открива при повече от половината 20/31, 64,5% или при 20/168 (11,9%) от общия брой изследвани здрави бременни (Таблица 14), което доказва

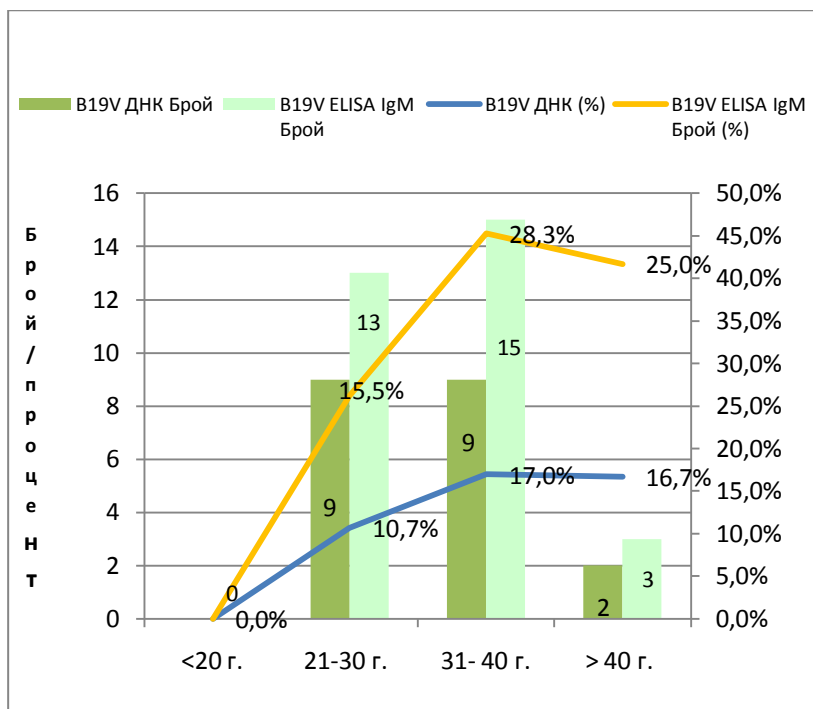
наличието на този вирусен агент в проучените серумни пациентски проби.

**Таблица 14.** Разпределение на здравите бременни жени по гестационна възраст и изследван В19V ДНК маркер

Гестационна възраст	В19V ДНК Брой (%)	95% ДИ
1-13 г.с. (n=67)	10 (14,9%)	6,4-23,4
14-27 г.с. (n=2)	0	
28-40 г.с. (n=99)	10 (10,1%)	4,2-16,0
<b>Общ брой (n=168)</b>	<b>20 (11,9%)</b>	<b>7,01-16,79</b>

*7.2. Разпределение на инфектираните с В19V здрави бременни жени по възрастови групи в комбинация с изпозваните В19V диагностични методи*

Най-голям е делът на изследваните във възрастовия диапазон 21-30 г.(n=84), като при 9/84 (10,7%) е доказано инфектиране В19V. Те са последвани от групата на жените във възрастовия диапазон от 31-40 г., (n=53), като 9/53 (17,0%%) от тях са В19V положителни. Паралелно с това именно в тази група е най-висок процентът на двойно положителните за остра инфекция диагностични маркери В19V IgM и В19V ДНК (фигура 6).



**Фигура 6.** Възрастово разпределение на инфектираните с B19V здрави бременни жени.

### 8. Етиологично доказване на B19V сред новородени с възможна майчино-фетална инфекция с B19V (n=11)

В настоящата разработка са включени единадесет новородени, проучени за възможна майчино-фетална инфекция. При две от тях (2/11, 18.18%), се доказва инфекция с B19V чрез имуноензимен и молекулярен анализ, а при едно с диагноза тромбоцитопения, само посредством PCR тест (Таблица 15). Нашите резултати потвърждават литературните данни за ролята на B19V в развитието на хидропс, анемия и кардиологични заболявания на плода и новороденото.

**Таблица 15.** Изследвани новородени по комбинация от използвани В19V диагностични методи и клинична манифестация.

Новородени	В19V ELISA IgM Брой (%)	В19V ДНК Брой (%)
С тромбоцитопения (n=1)	0	1
С вродена инфекция (n=6)	0	0
С анемия (n=1)	0	0
С перикарден излив (n=1)	1	1
С хидропс и анемия (n=2)	1	1
<b>Общ брой (n=11)</b>	<b>2 (18,2%)</b>	<b>3 (27,3%)</b>

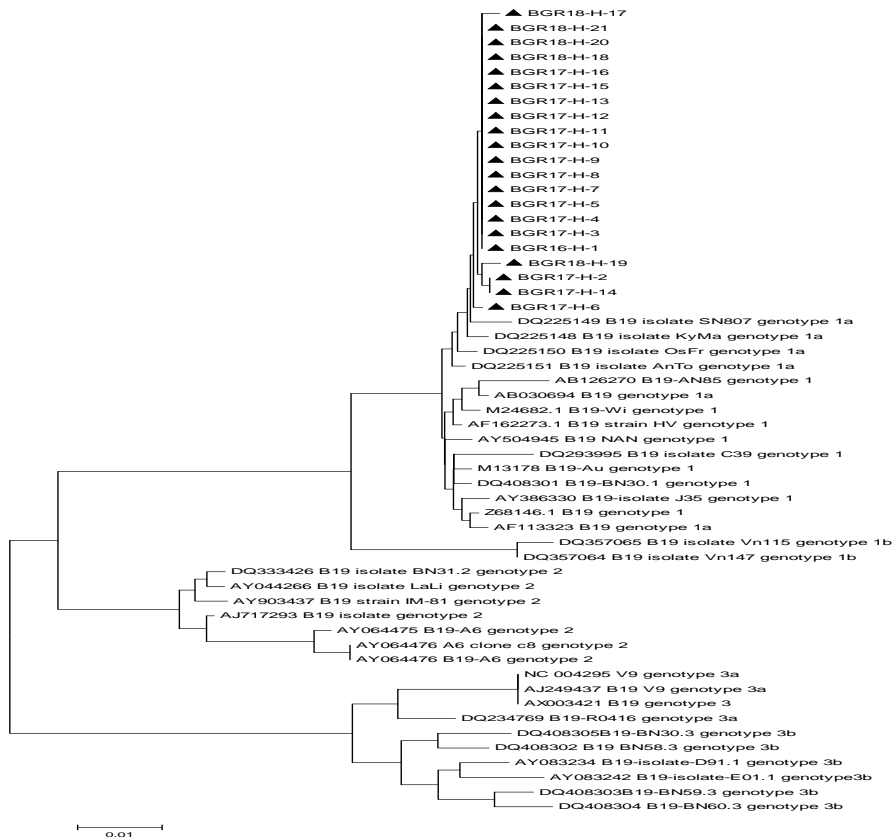
### **9. Секвениране и филогенетичен анализ на изолати на В19V от доказано положителни бременни жени и такива, претърпели спонтанен аборт**

В резултат на проведения молекулярно-биологичен анализ изолати на В19V за периода 2015-2019 г. бяха доказани два региона от вирусния геном – NS1 (103 bp) и NS1/VP1u (994 bp). Съгласно литературните данни подходящ за последващ секвенционен анализ поради по-големите си размери и локализация е вторият от тях. В настоящата дисертационна работа подходящи данни за генотипиране бяха получени за 21 от доказано положителните NS1/VP1u PCR продукта. Всички предоставени секвенции бяха от София, една от 2016 г., петнадесет от 2017 г., пет от 2018 г. и съотнесени към В19V генотип 1a.

Нуклеотидното секвениране е проведено в Института по имунология, Люксембург (Luxembourg Institute of Health, Department of Infection and Immunity, Clinical and Applied Virology, Infectious Diseases Research Unit).

Проведеният секвенционен анализ цели определяне на генетичното сходство на българските секвенции не само с наличните референтни, но и с изолираните през последните години В19V. Всички налични секвенции са сравнени с изолати публикувани в GenBank, посредством програма BioEdit и база данни за сравнение на нуклеотидни последователности BLAST-NCBI.

Построеното филогенетично дърво показва сходство >80% на българските изолати от 2016, 2017 и 2018 година с тези свалени от GenBank от Швейцария, Германия, Люксембург, Холандия, Албания, Италия, Беларус и Грузия(Фигура 21). Тези данни свидетелстват за евентуален внос/износ от/към тези държави на сходни B19V щамове. Детектираният B19V 1a генотип е доказано циркулиращ в редица европейски страни, в т.ч. и България за период от близо 10 години.



**Фигура 7.** Филогенетичен анализ на B19V секвенции: 55секвенции (21 включени в изследването и 34 от GenBank).

Филогенетичният анализ се базира на NS1/VP1u регион (994 nt), Neighbor-joining algorithm, Kimura two-parameter model и праг на нуклеотидна дистанция 70% (1000 репликации). Номенклатурата на



секвенциите показват тяхната година на събиране. Българският изолат е отбелязан със символ триъгълник. Секвенциите показват един вариант на генотип 1a. Еволюционният анализ е проведен чрез софтуерна програма MEGA5.

### **10. Нуклеотидна/аминокиселинна идентичност на българските B19 парвовирусни секвенции от доказано положителни пациентки с патологична бременност и такива, претърпели спонтанен аборт**

Българските B19V нуклеотидни секвенции имат дължина 994 nt (nt позиции 2121-3115) и обхващат фрагменти от гените NS и VP1 (ORF1, ORF2 и ORF3). С помощта на програмата BioEdit е определена нуклеотидната / аминокиселинна идентичност на българските секвенции при сравняване с представителите на генотип 1a. Установена е висока степен на идентичност между българските B19V. Секвенциите на NS1/VP1u гена/протеина показваха висока - 99,7%-100% (средно 99,92%) идентичност на нуклеотидно и 94,41% - 94,8% (средно 99,78%) идентичност на аминокиселинно ниво. В сравнение със секвенцията на прототипния вирус B19-Au българските секвенции показват 95,6%-95,9% (средно 95,9%) нуклеотидна идентичност и 99,3-100 % (средно 94,41%) аминокиселинна идентичност. Съпоставени със секвенции от генотип 2 нашите секвенции проявяват идентичност от 89%- 99,5% (средно 92,8%) на нуклеотидно и 77,9%-86,1% (средно 84,48%) на аминокиселинно ниво. Нуклеотидната идентичност между българските секвенции и тези от генотипове 3a и 3b са съответно от 86,4% - 99,5% (средно 89,6%) за 3a и от 85,9%-98,8% (средно 89,3%) за 3b. В сравнение с секвенции от генотипове 3a и 3b българските секвенции показват аминокиселинна идентичност съответно 76,2%- 80,1% (средно 79,71%) и 76,2%- 80,7% (средно 79,9%), съответно.

Средната нуклеотидна идентичност в рамките на всички анализирани вируси от генотип 1a е  $\geq 99,9\%$ .

## **11. Аминокиселинен анализ на българските В19 парвовирусни секвенции от доказано положителни пациентки с патологична бременност и такива претърпели спонтанен аборт**

- Аминокиселинен анализ на NS1 и VP1 протеини на българските В19V

С помощта на програмата BioEdit е извършен аминокиселинен анализ на продуктите на тези гени: протеин NS1, 7,5 kDa протеин и протеин VP1, като българските аминокиселинни секвенции са сравнени с тези на прототипния щам В19-Au (Pvbaau) (идентификационен номер M13178 в GenBank), изолиран от серум на дете със сърповидноклетъчна анемия и апластична криза в Канада през 1975 г. от Cosart и сътрудници и клониран в плазмиден вектор (Shade, 1986). Публикуваната в GenBank секвенция на парвовирус В19-Au съдържа почти пълната дължина на вирусния геном (5112 bp). В анализа е включена и аминокиселинната секвенция на щама J35, при който който е секвениран целият геном (5596 bp) след успешно клониране и получаване на инфекциозен клон (Zhi, 2004). Протеинът NS1 на прототипния щам В19-Au е с дължина 671 а.к., а българските секвенции включват фрагмент с дължина 169 а.к. (а.к. позиции 502 - 671), т.е. 25.2% от целия протеин. В рамките на този фрагмент е идентифицирана една аминокиселинна замяна F554S в три от българските секвенции. Останалите български секвенции са идентични с тази на прототипния щам. В българските секвенции е открит един N-гликозилиран участък в позиция 606 (NNS), а в останалите участъци на протеина NS1 в прототипния щам и в щама J35 са открити още четири N-гликозилирани участъка в позиции: 95 (NLT), 425 (NTT), 443 (NFT) и 481 (NYT).

В рамките на гена NS има втора отворена рамка за четене (ORF2) (nt позиции 2084-2308 в прототипния щам), която кодира малък 7,5 kDa протеин. Българските секвенции включват 85% от този протеин (а.к. позиции 12-75) и са напълно идентични със секвенциите на прототипния щам.

Генът VP1 на прототипния щам B19-Au включва nt позиции 2624-4969 и кодира капсидния протеин VP1 с дължина 781 а.к. Българските аминокиселинни секвенции обхващат фрагмент с а.к. позиции 1-153, т.е. 19.6% от протеина VP1 на прототипния щам B19-Au. В рамките на този регион всички български секвенции съдържат три аминокиселинни замени: K4E, V30L и S98N. Една българска секвенция носи допълнителна замяна S73F. Българските аминокиселинни секвенции съдържат един N-гликозилиран участък в позиция 46 (NIS). Прототипният вирус и вирусът J35 съдържат още три N-гликозилирани участъка в позиции: 184 (NET), 220 (NAS) и 293 (NAS).

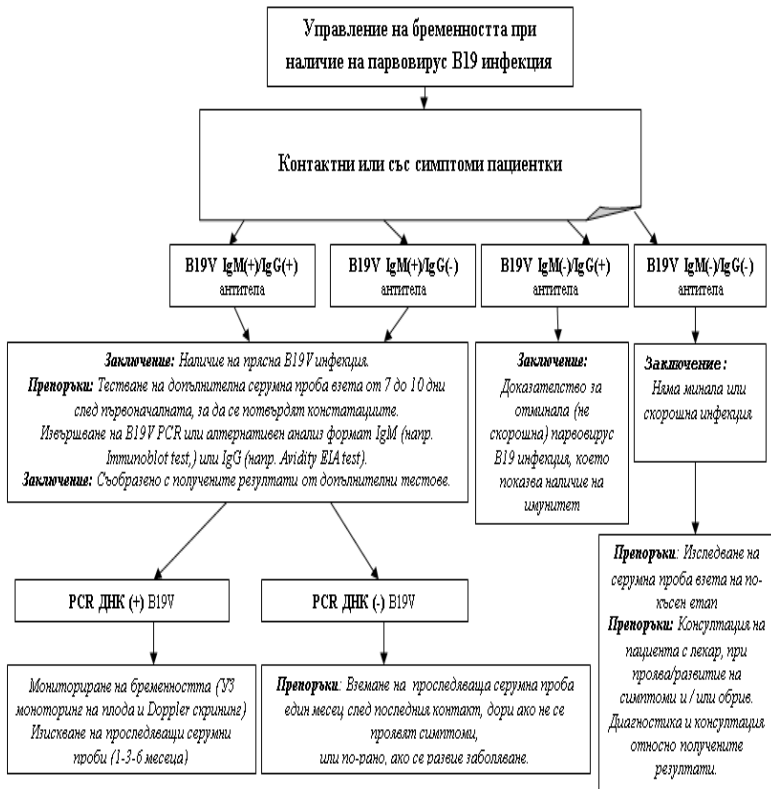
## **12. Алгоритъм за скриниране и проследяване на инфекция с B19V по време на бременност**

Настоящият дисертационен труд има за цел не само да докаже честотата на разпространение на B19V сред определена рискова група пациенти - бременни жени, но и да предложи диагностичен алгоритъм за проследяване на бременността, който да има практическа насоченост към специалистите акушер-гинеколози. B19V е инфекциозен агент включен към групата на TORCH-инфекциите с доказано влияние за развитие на патологична бременност, но не е включен към панела от инфекции със задължително изследване по време на бременността или преди забременяване. Настоящото изследване насочва вниманието на специалистите към тестиране и определяне на имунния статус срещу B19V в началото на бременността. Като препоръчителни мерки изтъкваме, че при доказан контакт или проявявани симптоми на инфекция с B19V бременната жена трябва да бъде насочена към съответните медицински звена за своевременно определяне на имунния ѝ статус и ниво на протективен имунитет (Crane JMG., 1998) чрез тестове за наличие на IgG/IgM B19V антитела. Антитела от клас IgM срещу B19V обикновено се появяват в рамките на 2 до 3 дни от острата фаза на инфекцията и могат да персистират до 6 месеца. Антитела от клас IgG се появяват

няколко дни след появата на IgM и остават в организма пожизнено (Rodis J.F. и съавт., 1999).

- Наличието на IgG и отсъствието на IgM антитела показва наличие на имунитет. Пациентката е имунна, т.е. има изграден имунитет и не се предполага опасност от клинична проява на инфекция с B19V.
- Наличие на B19V IgM антитела при отсъствие на IgG антитела предполага прясна инфекция. В тази ситуация се препоръчва повторен тест след 1 до 2 седмици с цел определяне на вероятна сероконверсия и вероятно позитивирене на B19 IgG маркер (Rodis J.F. и съавт., 1999) .
- В случай на двойно отрицателни B19V антитела от клас IgG и IgM, пациентката се определя като неимунна и потенциално податлива на инфектиране (Rodis J.F. и съавт., 1999; Crane и съавт., 2014). При възможен риск от контакт с вируса, серологичните тестове трябва да бъдат двукратно повторени в период от 2 до 4 седмици с цел преодоляване на прозоречния период на инфекцията.
- Ако проведените тестове показват наличието и на двата типа специфични B19V антитела, това свидетелства за прекарана скорозна инфекция (Rodis J.F. и съавт., 1999).

На Фигура 8 е показан алгоритъм за проследяване на бременността при наличие на B19V инфекция. Подобен алгоритъм е апробиран при някои от включените в изследването пациентки, с любезното съдействие на колегите от акушеро-гинекологичните клиники в СБАЛАГ “Майчин Дом”, София.



**Фигура 8.** Мониторирани на бременността при парвовирус В19 инфекция

Специално внимание би следвало да се обърне на жените, при които липсва анти-вирусен имунитет за В19V. Те трябва да бъдат активно наблюдавани във връзка с възможна рискова експозиция при съобразяване с фактори като професия, наличие на деца в семейството и други, дискутирани по-подробно в глава Литературен обзор проблеми. Поддържане на добра лична хигиена и често миене на ръцете е било предложено като мярка за намаляване разпространението на инфекцията (Centers for Disease Control, 1989), но ефектът от тази превенция не е доказан. По време на епидемия родители на деца в предучилищна и училищна възраст, както и служителите трябва своевременно да бъдат информирани за риска от

разпространение на инфекцията и да бъдат запознати с мерките за превенция и управление на риска. С оглед лесното въздушно-капково разпространение на вируса, е необходимо всяка неимунна бременна жена да бъде запозната с индивидуалния риск въз основа на гестационна възраст на бременността и други акушеро-гинекологични съображения, характерни за нея. Ако бременната жена е развила скорошна инфекция, вирусът може трансплацентарно да премине в плода и да предизвика неимунен хидропс. Ето защо се препоръчва тези жени да бъдат активно мониторираны от лекар-специалист чрез провеждане на ултразвукови изследвания за наличието на хидропс на плода от 8 до 12 седмици след инфекцията, като се има предвид възможното забавено развитие на фетален хидропс (Katz V.L., Cheschier N.C., Bethea M., 1990; Miller E. и съавт., 1998; Markenson G.R., Yancey M.K., 1998; Rodis J.F. и съавт., 1999). Повечето специалисти извършват регулярни ултразвукови изследвания - ежеседмични или на всеки две седмици (Rodis J.F. и съавт., 1999). Всеко следващо изследване с ултразвук може да се ограничи до оценка на обема на околоплодната течност и търсене на доказателства за хидропс. Тъй като фетуси със хидропс са склонни да се движат по-малко, жените също трябва да бъдат инструктирани да следят движението на плода (Rodis J.F. и съавт., 1999).

Посочените препоръки би трябвало да се следват не само при доказана инфекция с B19V по време на бременността, но и при проява на някои от обсъжданите по-горе клинични симптоми (фетален асцит, неимунен хидропс, анемия преди 20 гестационна седмица, спонтанен аборт) с недоказан причинител.

## **V. ИЗВОДИ**

1. Проучването на имунния статус на 294 жени в детеродна възраст показва висока степен (43.5%) на B19V-IgG серопревалиране.
2. Чрез набор от имуоензимни (ELISA IgM/IgG) и молекулярно-биологични (B19V PCR) методи е доказана етиологичната роля на B19V в развитието на патологична бременност при жени с:

- анемичен синдром (14,85%),
- неимунен хидропс феталис (30%),
- фетален асцит (1,98%),
- фебрилно-обривен синдром (3,96%) и
- жени претърпели спонтанен аборт (5,94%).

3. Доказано е наличието на инфекция/персистираща с В19V (ELISA IgM/IgG и/или вирусна нуклеинова киселина) при 18,5% от изследваните здрави бременни жени.

4. Доказана е инфекция с В19V при 27,3% новородени с клинична манифестация на хидропс и анемия, перикарден излив и тромбоцитопения чрез детекция на В19V-IgM, В19V-IgG.

5. Проведеният филогенетичен анализ на секвенции на В19V от здрави бременни, от жени с патологична бременност и от такива, претърпели спонтанен аборт, базиращ се на NS1/VP1u регион, показва, че всички секвенции принадлежат към генотип 1a, доминантно циркулиращ в Европа. Не е установена зависимост между доказани вирусен генотип и тежестта на усложненията по време на бременност.

6. Анализът на аминокиселинните секвенции на 21 български В19 парвовируси, доказани при бременни жени, показва малък брой аминокиселинни замени в сравнение с прототипния щам В19-Au (Pvbaaa). Замените са както следва:

- една аминокиселинна замяна в областта на протеина NS1 в три от българските секвенции.
- три аминокиселинни замени при всичките български секвенции и една допълнителна замяна в една от секвенциите в областта на VP1 протеина.

7. Молекулярният анализ показва висока степен на идентичност между българските секвенции на В19V и значително сходство с прототипния вирус.

8. Представен е диагностичен алгоритъм за проследяване на бременността при доказана инфекция с В19V с практическа насоченост към специалистите акушер-гинеколози.

## **VI. ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ (НАУЧНИ ПРИНОСИ)**

1. Разработен е диагностичен алгоритъм за проследяване на бременността при наличие на инфекция с В19V. Алгоритъмът е насочен към специалистите за определяне на имунния статус срещу В19V на бременните в началото на бременността и последващо мониториране на бременността.

2. Анализирана е аминокиселинната последователност в три протеина на В19V, доказан при здрави бременни жени, бременни с различни клинични прояви и жени, претърпели спонтанен аборт.

3. Проведеното изследване включва 5 годишен период и има проспективен характер, чрез случай-базирано тестване на включените пациентки и своевременно предоставяне на получените лабораторни резултати на лекуващите лекари. Последното практически определя посоката на лечение и наблюдение на бременността.

## **VII. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА**

### **ЖУРНАЛНИ СТАТИИ:**

1. Ivanova S., Genova-Kalou P., **Voleva S.**, Angelova S., Marinov B., Manolov V., Shishkov S. 2016. Infectious Agents and Miscarriage in Bulgaria. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS)*, **25**(1), 1-10.



2. **Волева С.**, Иванова С., Маринов Б., Генова-Калу П., Манолов В., Василев В. 2016. Нов подход в диагностичния алгоритъм на инфекциозните агенти (Парвовирус В19и *Chlamydia trachomatis*) ангажирани в развитието на патологична бременност. *Akusherstvo i ginecologiya*, **55**(3), 3-10.
3. **Voleva S.**, Pavlova A., Genova-Kalou P., Manolov V., Marinov B., Shishkov St. 2017. Infectious agents during pregnancy – preliminary study. *Problems of Infectious and Parasitic Diseases*, vol. 45 (2), 42-46.
4. **Voleva S.**, Ivanova St., Manolov V., Marinov B., Angelova S., Vasilev V., Shishkov S. 2017. Anemic syndrome associated to parvovirus B19 infection in pathology pregnancy women. *Science and Technologies*, **VII**, 34-40.
5. **Волева С.**, Иванова С., Манолов В., Маринов Б., Ангелова С., Василев В., Шишков Ст. (2017): Парвовирус В19 инфекция, асоциирана с анемичен синдром, при пациентки с рискова бременност. *Медицински преглед*, **53**, 5-11.
6. **Волева С.**, Ст. Крумова, Б. Маринов. (2017): Парвовирус В19 и цитомегаловирус, асоциирани с патологична бременност. *Medical Magazine*, **38**, 44-48.
7. Pavlova A., Genova-Kalou P., Ivanova S., **Voleva S.**, Marinov B. 2017. Advisable protocol for laboratory diagnosis and monitoring of pregnant women exposed to infection with some febrile-rash pathogens. *Akusherstvo i ginecologiya*, **9**, 32-38.
8. **Voleva S.**, Manolov V., Ivanova S., Marinov B., Vasilev V., Angelova S., Shishkov S. 2017. Investigation role of parvovirus B19 in development of anemic syndrome and determination of serum hepsidine in women with pathological and risk pregnancy. *Akusherstvo i ginecologiya*, **9**, 10-15.
9. **Voleva S.**, Manolov V., Angelova S., Vasilev V., Gramatikova Z., Bogov I., Marinov B., Shishkov S. 2018. Parvovirus B19 changes iron homeostasis during pathological pregnancy. *Clinical Practice*, **15**(1), 481-487.

10. **Voleva S.**, Manolov V., Krumova S., Marinov B., Vasilev V., Shishkov S., & Nikolaeva-Glomb, L. 2019. Clinical Case of Parvovirus B19 Infection in Pregnant Woman with B-Thalassemia in Bulgaria. *Clinical Laboratory*, **65**(5), 877-879.

ПУБЛИКУВАНИ РЕЗЮМЕТА В СПИСАНИЯ С ИМПАКТ ФАКТОР (IF)

1. **Voleva S.**, Manolov V., Ivanova S., Marinov B., Angelova S., Vasilev V., & Shishkov S. 2017. Role Of Parvovirus B19 In Anemic Syndrome During Abnormal Pregnancy: T049: Metabolomics and biomarkers. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **55**, S1505.

## **VIII. УЧАСТИЯ В МЕЖДУНАРОДНИ И НАЦИОНАЛНИ НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

1. **Волева С.**, Иванова С., Манолов В., Маринов Б., Василев В. Парвовирус В19 инфекция и нейното значение по време на бременност. XIX Национална гинекологична конференция, Боровец, 17-19 март 2016 г.

2. **Волева С.**, Иванова С., Маринов Б., Шишков С. Algorithm for investigation of pregnant women exposed to the viruses that cause non-vesicular (maculopapular) rash. Седма Работна среща „Експериментални модели и методи в биомедицинските проучвания”, 16-18 май 2016 г., Proceedings of the Seven Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research, ISSN 1314-9091, 2016, in press.

3. **Волева С.**, Ангелова С., Иванова С., Генова-Калу П., Маринов Б. Инфекциозни агенти (Парвовирус В19, рубеола, аденовируси, Chlamydia trachomatis) ангажирани в патогенезата на спонтанен аборт. X-ти Национален конгрес по Инфекциозни болести. 06 – 08 октомври 2016, НДК, София.

4. **Волева С.**, Иванова С., Манолов В., Маринов Б., Ангелова С., Василев В., Шишков С. Анемия по време на бременност, асоциирана с инфекции с парвовирус В19. 20-та Юбилейна гинекологична конференция. 16.03.-18.03.2017, Боровец.

5. **Voleva S.**, Ivanova S., Manolov V., Angelova S., Vasilev V., Marinov B., Shishkov S. Parvovirus B19 as a causative pathogene in a pathological pregnancy during 2015-2016 year in Bulgaria. ICMS. 11.05.-14.05.2017, Sofia, Bulgaria

6. **Волева С.**, Иванова С., Ангелова С., Маринов Б., Шишков С. Серопревалентност на парвовирус В19 при жени с патологична бременостт. XV Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, Българската асоциация на микробиолозите, 17-19.05.2017, Парк хотел Москва, София, България.

7. **Voleva S.**, Ivanova S., Manolov., Marinov B., Angelova S., Vasilev V., Shishkov S. Anemic syndrome associated to parvovirus B19 in pathology pregnancy women. 28th International Conference 01.06.-02.06.2017, St. Zagora, Bulgaria

8. **Voleva S.**, Manolov V., Vasilev V., Ivanova S., Marinov B., Angelova S., Shishkov S. Hepcidin in pregnant women with parvovirus B19 infection. Xth National Congress for Clinical Laboratory. 07.09.-09.09.2017, Borovetz, Bulgaria

9. **Voleva S.**, Manolov V., Ivanova S., Marinov B., Angelova S., Vasilev V., Shishkov S. Engagment of parvovirus B19 in the development of anemic syndrome in women with abnormal pregnancy. 20th ESCV 2017 Conference, 13-16 September 2017, Stresa, Lake Maggiore, Italy.

10. **Voleva S.**, Manolov V., Ivanova S., Marinov B., Angelova S., Vasilev V., Shishkov S. Role of Parvovirus B19 in anemic syndrome during abnormal pregnancy. IFCC WorldLab 2017– Durban, South Africa, 22-25 October 2017.

11. **Волева С.**, Манолов В., Крумова Ст., Маринов Б., Василев В., Шишков С., Николаева- Гломб Л. Клиничен случай на инфекция с парвовирус В19 при бременна жена с  $\beta$ -таласемия. XVI Национален конгрес по клинична микробиология и инфектология на българската асоциация на микробиолозите Парк-хотел МОСКВА, София - 10-12 Май 2018 година

12. **Voleva S.**, Krumova S., Manolov V., Marinov B., Shishkov S., Nikolaeva-Glomb L. Parvovirus B19 and anemic syndrome in pregnancy. VI Congress of Macedonian microbiologists with international participation, 30.05-02.06.2018

## **IX. НАУЧНИ ПРОЕКТИ**

1. Научно изследователски проект на тема: „Нови акценти в диагностичния алгоритъм, спектъра и честотата на вирусологичните агенти (парвовирус В19, аденовируси и *Chlamidia trachomatis*) ангажирани в развитието на патологична бременност”

МУ-София, Конкурс „ГРАНТ-2016”, Договор №93/2016 г.

Сума на проекта: 2 500 лв.

2. Научно изследователски проект на тема: „Парвовирус В19 инфекция, асоциирана с анемичен синдром при пациентки с рискова бременност”

МУ-София, Конкурс „ГРАНТ-2017”, Договор №Д 124/2017 г.

Сума на проекта: 5500 лв.