

**НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР
ПО ЗАРАЗНИ И
ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ**

Изх. № 20.... г.
Вх. № 170/20.01.2020 г.
бул. "Янко Сакъзов" № 26
София 1504, тел: 9446999

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Нели Стоянова Корсун, д.м.н.

член на научно жури, определено със заповед № 510/16.12.2019 г. на Директора на НЦЗПБ

относно дисертационния труд на **Силвия Емилова Волева** -
докторант на самостоятелна подготовка в Отдел Вирусология, НЦЗПБ, София
на тема „**Серологично и молекуларно-генетично проучване на разпространението на
парвовирус B19 сред бременни и жени в детеродна възраст в България**“
за получаване на образователна и научна степен „**ДОКТОР**“ в област на висшето
образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, професионалио
направление 4.3. „Биологични науки“, научна специалност „**Вирусология**“

Декларирам, че нямам с докторантката общи публикации и участия в научни форуми и
проекти, свързани с темата на дисертацията.

Кариерно развитие на докторантката

Силвия Волева завършила средно си образование през 1995 г. в СОУ „Алеко Константинов“, гр. София с профил биология и химия. От октомври 2001 г. до юли 2006 г. тя е студентка в Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, където придобива бакалавърска степен по биология, а през периода октомври 2006 г. – юли 2008 г. учи магистратура в същия факултет и придобива квалификацията магистър по вирусология. От 01.02.2013 г до настоящия момент тя работи като биолог в клиническата лаборатория на ИМБАЛ, София, а от 01.11.2016 г. до момента работи като биолог на ½ работен ден в Националната референтна лаборатория „Грип и ОРЗ“ към НЦЗНБ.

Актуалност на темата на дисертационния труд

Сред агентите, причиняващи фетална инфекция, парвовирус B19 е сравнително по-слабо проучен, въпреки че може да предизвика сериозни увреди на фетуса/плода, които да доведат до хидроцес феталис, спонтанен аборт или смърт на плода. В своя дисертационен труд Силвия Волева проучва инфекцията с парвовирус B19 при бременни жени и жени с репродуктивни проблеми. Темата на дисертацията е актуална и значима предвид възможните тежки форми на фетална инфекция с парвовирус B19 и трудностите в диагностиката на инфекциите и интерпретацията на лабораторните резултати, породени от продължителната персистенция на вируса в човешкия организъм. Темата е в съзвучие с „Националната програма за подобряване на майчиното и детско здраве 2014-2020 г.“, един от акцентите на която е превенция и профилактика на болестите.

Обща характеристика на дисертационния труд

Дисертационният труд е структуриран съгласно изискванията на Правилника за прилагане на „Закона за развитието на академичния състав в Република България“. Той е с обем от 173 стр. Съдържа заглавна страница; използвани съкращения (1 стр.); списък на таблици и фигури (3 стр.); съдържание (2 стр.); введение (3 стр.); литературен обзор (36

стр.); цели и задачи (1 стр.); материали и методи (21 стр.); резултати и обсъждане (41 стр.); обща дискусия (13 стр.); изводи (2 стр.); декларация за оригиналност (научни приноси) (1 стр.); библиография (36 стр.); приложение (8 стр.); публикации, свързани с темата на дисертацията (2 стр.); участия в международни и национални научни форуми във връзка с дисертационния труд (2 стр.); научни проекти, свързани с дисертационния труд (1 стр.). Съдъщошението между отделните раздели на дисертационния труд отговаря на приетите изисквания. Изложението е онагледено от 32 таблици и 22 фигури.

Преглед и оценка на дисертационния труд

Литературният обзор е подробен, информативен, написан на много добър език. Разгледани са историята на откриването на парвовирус B19, класификацията на парвовирусите, основните характеристики на парвовирус B19: структура на вириона, устойчивост във външната среда, организацията на вирусния геном, генетично разнообразие, вирусни протеини, вирусен репродуктивен цикъл, лабораторни модели; патогенеза на инфекциите и имунен отговор, епидемиология, клинични прояви, терапия и превенция. Значително място е отделено на инфекцията с парвовирус B19 по време на бременност: клиничните манифестации, необходимостта от скрининг и проследяване на инфицираните с парвовирус B19 по време на бременност, диагностика на вирусната инфекция на плода. Посочено е, че дисертационният труд е продължение на предишни проучванията на инфекцията с парвовирус B19 в нашата страна. В литературния обзор дисертантката се позовава на множество източници от световната научна литература. От обзора проличава нейната отлична литературна осведоменост, умението ѝ да систематизира, обобщава и интерпретира съществуващата научна информация по проблема.

Целта на дисертационния труд е провеждане на «молекуларно-генетично и серосидемиологично проучване чрез комбинация от съвременни лабораторни методи върху разпространението на парвовирус B19 сред жени с патологична бременност в България». Формулирани са 6 задачи, които включват основните направления в изследователския процес. Целта и задачите са точно и ясно формулирани.

Материал и методи. За постигане на набелязаната цел са използвани имуноензимни методи (ELISA) за доказване на IgG и IgM антитела в серуми, молекуларно-биологични техники (стандартен PCR, nested PCR, секвениране), съвременни биоинформационни програми и статистически анализ. Праймерите за скриниращия PCR и за секвенирането са подбрани отrenomирани литературни източници. Скринингът на клинични преби за доказване парвовирус B19 ДНК се извършва с праймери от консервативния регион NS1, което позволява идентифицирането на 3-те генотипа на вирус B19. Вирусната ДНК е подгответа за секвениране чрез nested PCR амплификация на голям регион от 1100 бр. включващ вариабилния регион NS1-VPu.

В раздела „Резултати и обсъждане“ са представени резултатите от проспективно изследване по отношение на инфекция с парвовирус B19 на общо 305 серумни преби, постъпили от акушеро-гинекологични клиники и отделения, както и от женски

консултации в София, Пловдив, Пазарджик и Бургас през периода 2015-2019 г. Това са преби на 250 бременни жени (от тях 82 с патология на бременността и 168 здрави бременни); 19 жени, претърпели спонтанен аборт до 20 гестационна седмица; 25 жени с репродуктивни проблеми и 11 новородени деца. В началото дисертантката изследва серопревалирането на парвовирус B19 IgG по възрастов профил при жени в детеродна възраст (18 - 44 год.), в т.ч. бременни и установява, че 43.5% от изследваните 294 жени съдържат защитни IgG антитела срещу този вирус, като серопозитивността се повишава с възрастта. Сред бременните жени серопозитивните са 40.7%. Дисертантката правилно посочва потенциалната опасност от инфициране с парвовирус B19 при общо 59.3% серонегативни бременни, като процентът на серонегативните жени в първия (най-рисков) тримесец на бременността е 43.5%. Изследвано е наличието на IgM антитела като маркер на настояща инфекция, които са открити в 60 (19.7%) от всички 305 преби. Всички преби са тествани и чрез молекулярен метод (PCR), чрез който е доказано наличие на ДНК на парвовирус B19 в 52 (17%) от пребите. Проведен е дисперсионен и корелационен анализ на разпределението на изследваните пациенти по години и на тези с доказани B19 IgM и ДНК маркер.

Авторката проучва участието на парвовирус B19 в развитието на определени клинични прояви по време на бременност, които са съспектни за инфекция с парвовирус B19: анемичен синдром, фетален хидронефроз, фетален асцит, фебрилно обривен синдром и спонтанен аборт. Най-голяма е групата жени с анемичен синдром – 61, от тях 13 (21,3%) са серопозитивни за IgM антитела и 15 (24,6%) са с доказана B19 ДНК, т.е. имат остра инфекция с парвовирус B19. Подробно е проучен клиничен случай на бременна с В-талаsemia и доказана B19 вирусна инфекция (наличие на IgM/ IgG антитела и парвовирус B19 ДНК), като вирусът успешно е секвениран и генотипиран. При бременните с други клинични синдроми също се доказват маркери за настояща инфекция с парвовирус B19 в значителна част от изследваните случаи. Сред изследваните 4 бременни с неимунен хидронефроз феталис в 3 са открити IgM/IgG антитела и парвовирус B19 ДНК. Сред изследваните 7 бременни с фетален асцит IgM антитела и парвовирус B19 ДНК са доказани в 2 (28,6%) и 1 (14,3%) жени, съответно, а сред бременните с фебрилно-обривен синдром тези пропорции са 4/10 (40%) и 4/10 (40%), съответно. Изследвани са 19 бременни жени, претърпели спонтанен аборт – при 5 (26.3%) и 6 (31.6%) от тях са доказани IgM антитела и парвовирус B19 ДНК. Броят на изследваните пациентки в отделните клинични групи е малък, но това са много редки състояния. Проучвания на чужди автори също включват малък брой пациентки с указаните клинични прояви. Сред изследваните 25 жени с репродуктивни проблеми, подложени на *in vitro* процедури, не са открити серологични и молекулярни маркери за остра инфекция с парвовирус B19. Изследвана е и голяма контролна група здрави бременни, при част от които са доказани серологични и молекулярни маркери на остра инфекция с парвовирус B19 – наличие на IgM антитела в 31 (18,5%) и парвовирус B19 ДНК в 20 (11,9%) от изследваните 168 жени. Авторката намира статистически значими разлики в честотата на доказване на B19 вирусна ДНК и IgM антитела между бременните с определени клинични синдроми и

здравите бременни. Изследвани са серумни преби на 11 новородени деца със съспектна фетална инфекция с парвовирус B19 (тромбоцитопения, анемия, хидроне и анемия, перикарден излив, вродена инфекция). При 2 (18,2%) от тези деца са доказани IgM антитела, а при 3 (27,3%) - парвовирус B19 ДНК.

Важна част от дисертационния труд е извършеният филогенетичен и аминокиселинен анализ на 21 секвенции на парвовирус B19, доказан при жени с рискова и патологична бременност и здрави бременни жени. Секвенциите са от вируси, идентифицирани през различни години и при жени с различни клинични синдроми, което дава възможност да се проследят евентуалните времеви промени в циркулиращите вируси и да се сравнят вирусите, доказани при здрави бременни жени и при такива с различни клинични прояви. Размерът на секвенциите е 994 nt и те включват част от гена NS1, гена на 7,5 kDa протеин и уникалния регион VP1 на капсидния протеин VP1. Всички анализирани секвенции се отнасят към геногрупа 1а, която е най-разпространена по света. Дисертантката открива висока степен на идентичност на нуклеотидно и аминокиселинно ниво както между българските секвенции, така и между българските секвенции от една страна и секвенции от геногрупа 1а, доказани в други страни. Аминокиселинният анализ на фрагменти от три вирусни протеина показва малък брой аминокиселинни замени в сравнение с прототипния B19 щам, доказан през 1975 г., което потвърждава ниската степен на генетична изменчивост при този вирус. Не са открити различия в състава на аминокиселинните секвенции от здрави бременни и от такива с анализираните клинични синдроми.

Логичен завършек на представените резултати е предложението на диагностичен алгоритъм за скриниране и проследяване на инфекцията с парвовирус B19 по време на бременност. Препоръчва се определяне на имунния статус по отношение на инфекция с парвовирус B19 в началото на бременността и активно наблюдение и проследяване на серонегативните жени. Този алгоритъм би имал важно практическо приложение в акушерската практика. Авторката формулира и препоръки, имащи за цел ограничаване на разпространението на инфекцията сред неимунните бременни и предпазване от инфициране.

Резултатите от изследванията са нагледно документирани в 26 таблици и 10 фигури.

В раздела „Обща дискусия“ е извършен обобщен анализ на получените резултати, като дисертантката сравнява собствените резултати с тези на други изследователи. Анализът на резултатите от доказването на парвовирус B19 инфекция при пациенти с определени клинични синдроми е съпроводен с обяснение на възможните патогенетични механизми, водещи до тези състояния. В този раздел дисертантката се представя като изграден научен работник, способен към обично да анализира и интерпретира научните данни.

Използваните *литературни източници* са 358, като 35,5% са от последните 10 год. (2010-2019 г.), а 9,5% са от последните 5 години (2015-2019 г.). Има цитирани 2 публикации на български автори - една на български и една на английски език. Считам, че не са отразени напълно предишни изследвания на български автори върху инфекцията с парвовирус B19.

Изводите съответстват на поставените задачи. Те са добре формулирани и логически следват от постигнатите резултати.

Приемам посочените от дисертантката три *приноса* с оригинален характер. С особена значимост според мен се откроява предложението за диагностичен алгоритъм за скриниране и проследяване на инфекцията с парвовирус B19 по време на бременност, който би имал практическа насоченост за лекарите акушер-гинеколози, а също провежданият филогенетичен и аминокиселинен анализ на доказаните парвовируси B19.

Оценка на автореферата

Авторефератът е с обем 51 стр. Съдържанието му съответства на изложението в дисертационния труд.

Публикационна активност и съответствие с минималните национални изисквания

Във връзка с темата на дисертацията има отпечатани 10 научни публикации: 3 в чуждестранни списания и 7 – в български. Две от публикациите са в чуждестранни издания с импакт фактор - Clinical practice (IF 2,4) и Clinical Laboratory (IF 0,848). Общийт импакт фактор е 3,248. Една от публикациите е в списание с квартил Q3 (Clinical Laboratory), а 5 са в списания с Q4 (Clinical Practice – 1; Акушерство и гинекология – 3, Probl. Infect Par. Dis-1). Постигнатият общ брой точки по група показатели „Г“ от минималните национални изисквания за ОНС „Доктор“ е 75 (15 + 5 x 12) при изискуем минимум за ОНС „Доктор“ 30 точки (ДВ, бр. 15 от 19.02.2019). Така че дисертантката покрива и надхвърля минималните национални изисквания за тази степен. Има участия с научни съобщения в 3 научни форума в чужбина и в 9 национални научни прояви, както и в два научни проекта, финансиирани от Медицински Университет, София. В 8 от публикациите и във всички участия Силвия Водева е първи автор, което говори за воленцата ѝ роля в изследванията и в подготовката на публикациите.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Силвия Водева е актуален, компетентно изпълнен и оформен и съдържа важни научни разработки. Той показва, че докторантката притежава задълбочени теоретични знания по темата на дисертацията и способности за самостоятелни научни изследвания. Дисертационният труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ (изм. и доп. ДВ, бр.15 от 19 февруари 2019 г.), на Правилника за прилагането му и на Правилника на НЦЗПБ. давам положителна оценка и предлагам на уважаемото научно жури да присъди на Силвия Емилова Водева образователната и научна степен „Доктор“ в област на висшето образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, професионално направление 4.3. „Биологични науки“, научна специалност „Вирусология“.

.....


/проф.д-р Н.Корсун, дмн/