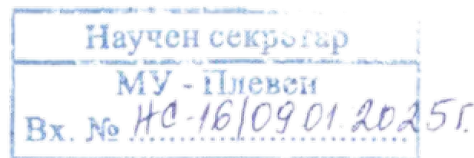




ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СТАРА ЗАГОРА



РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Борислава Георгиева Чакърова, дм
при Тракийски университет – Стара Загора,

Катедра „Хигиена, епидемиология, микробиология, паразитология и инфекциозни болести”

Член на Научно жури, назначено от Ректора на Медицински университет – Плевен
със Заповед №3762/17.12.2024

Относно: Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление: 7.1 Медицина

Докторска програма: Медицинска биология

Автор: Петя Василева Драгомирова

Форма на докторантурата: редовна форма на обучение

Катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“, сектор „Биология“

Тема: Криптоспоридиоза – диагностични, експериментални и епидемиологични проучвания

Научни ръководители: Проф. Даниела Клисарова, дб

Доц. Нина Цветкова, дб

Кратки данни от професионалната и академична биография на докторантката

Петя Василева Драгомирова е родена в град Плевен. През 1996 година завършва Висше образование в Педагогически университет „Паисий Хилендарски”, гр. Пловдив с квалификация „Учител по биология“ и „Учител по химия“. Допълнителни квалификации са: V Професионално-квалификационна степен в ДИУУ- гр. София (2002 г.), Инструктор по базови и специфични компютърни умения в Център за продължаващо обучение в Аграрен университет-Пловдив. През 2022 г. придобива специалност „Медицинска биология“. От 1996 г. до 2002 г. работи в сферата на средното образование, а от 2011 г. преминава на академична длъжност в МУ – Плевен. През 2020 година е зачислена в редовна форма на обучение по докторска програма „Медицинска биология“. Като асистент по биология, г-жа Драгомирова ръководи занятия по учебните дисциплини

„Биология на човека“ при студенти по медицина и фармация и участва в семинари и упражнения на студентите от ДЕСО на български език.

Актуалност на проблема

Криптоспоридиозата е чревна паразитоза, причинена от вътреклетъчен протозоен паразит от род *Cryptosporidium* (тип Apicomplexa). Гостоприемници са животни, намиращи се на различни еволюционни нива – риби, земноводни, влечуги, птици и бозайници, вкл. и човек. Въпреки, че видовете в род *Cryptosporidium* са определени преди повече от век, достоверна информация за тяхната идентификация, клинично значение, епидемиология и лечение е натрупана след 80-те години на XX век. Опаразитяването с *Cryptosporidium* sp. има фекално-орален механизъм на трансмисия: директен - при контакт със заразени гостоприемници и индиректен – чрез поглъщане на храна и вода, контаминирани с ооцистите на паразита. При имунокомпетентни лица инфекцията най-често е без- или олигосимптомно цистоносителство. Криптоспоридиозата придобива особена значимост след като се установява, че при лица с HIV/СПИН и други супресиращи имунната система състояния и заболявания, инфекцията протича с профузна диария с тежки дехидратация и интоксикация. Разпространението на тази зооноза е космополитно, като в икономически развитите страни *Cryptosporidium* sp. е един от най-често откриваните патогени при епидемични взривове, възникнали по воден път, протичащи с диаричен синдром. Криптоспоридиозата става социално значимо заболяване в райони със социално-икономически неблагоприятия и бедност, хронично недохранване, проблемно здравеопазване, с военни конфликти и неизбежните хуманитарни кризи и миграция. При животните, отглеждани със стопанска цел се установява, че *Cryptosporidium* sp. е един от основните ентеропатогени, участващи в етиологията на синдрома на неонатална диария, водещ до значителни икономически загуби, поради висока заболяемост, леталитет и изоставане в растежа. *Cryptosporidium* sp. е широко разпространен и сред животните в дивата природа и този факт е от особена значимост за поддържане на сиватичните резервоари. Спецификата в диагностиката на криптоспоридиозата довежда до значителен брой неоткрити случаи, а оттам – и нереална оценка на проблема “криптоспоридиоза”. При липсата на специфична профилактика, осъвременяването на методите за диагностиката е основа за успешния надзор и контрол на криптоспоридиозата. Тези проблеми, свързани с *Cryptosporidium* sp. и криптоспоридиозата са обстойно проучени и анализирани от дисертантката, под ръководството на научните си ръководители Проф. Даниела Клисарова, дб и доц. Нина Цветкова, дб. В настоящия дисертационен труд целесъобразно са проведени проучвания на някои диагностични методи, епидемиологични характеристики сред определени рискови групи лица, както и сред видове животни в Плевен и региона. Имайки предвид гореизложеното, темата на дисертационния труд е изключително актуална, компетентно избрана и с разностранни аспекти на получени резултати и изводи.

Обща характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е структуриран, съгласно ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение в Медицински университет – Плевен. Включените в дисертационния труд лабораторни анализи са извършени в Катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“, сектор „Биология“, факултет „Медицина“ при МУ-Плевен и Националната референтна лаборатория „Диагностика на паразитите – местни и тропически“, ОПТМ на

НЦПБ – София. Обсъден е и е насочен за защита на Разширен катедрен съвет на Катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология” при МУ-Плевен през 2024 година.

Дисертационният труд е представен в 199 страници и е структуриран според изискванията на формата за дисертационен труд. Илюстриран е с 26 таблици, 59 фигури. Библиографският списък съдържа 397 литературни източника.

Във *въведението* дисертантката систематизирано актуализира проблемите и причините за избора им като тема за разработване на дисертационния труд. *Литературният преглед* е представен в 48 страници и в големия си обем той отразява добрата информираност на докторантката. В обзора акцентирано се представят постиженията в световната наука и научните разработки у нас по определените аспекти на дисертацията. Значимо място заемат подтемите, свързани с етиологията, таксономията, морфологията и видовото разнообразие на род *Cryptosporidium*, епидемиологичните особености и разпространението на криптоспоридиозата сред хора и животни в световен мащаб и на регионално ниво. Детайлно са описани възможностите за идентификация и етиологична диагноза на *Cryptosporidium* sp. в изолати от биологичен произход. Впечатляващ е умело подобреният илюстративен материал, който подсилва възлови части от изложеното в обзора. Добрата осведоменост по темата на дисертационния труд, дисертантката регистрира с ползването на актуална научна литература, като 30% от заглавията и информацията в библиографската справка са публикувани в последните 10 години.

В частта „*Собствени проучвания*“, поставената в дисертацията *цел* е добре формулирана: да се проучат биологията, разпространението, диагностиката и епидемиологията на криптоспоридиозата сред рискови контингенти от населението в Плевенска област и близки региони, и сред животни, чрез прилагане на съвременни диагностични методи. *Задачите*, които са планирани и реализирани за постигане на целите са 7 и детайлно маркират научните аспекти на изследователския процес.

В „*Материал и методи*“, подробно са характеризирани проучванията за 7-годишен период от 2016 до 2023 година *таргетни групи*, наброяващи общо 1258 лица. От тях, 1078 са имунокомпетентни и 55 имунокомпроментирани и 125 клинично здрави деца и възрастни – контролна група. Възрастта им е между 4 месеца и 70 години. Проучена е и животинска популация по вид и възраст на животните. Изследвани са общо 107 проби от различни видове стопански животни (крави, кози, овце). От тях, 96 са от животни с диаричен синдром и 11 - от животни без симптоматика, характерна за чревни опаразитявания – контролна група. Използваните *методи* са детайлно описани: (1) Морфологични; (2) Имунологични - за откриване на копроантигени в човешки и животински проби; имунохроматографски; ензимносвързан имуносорбентен анализ; (3) Молекулярно-биологични - изолиране на ДНК на *Cryptosporidium* sp. от фекални проби на хора и животни; изолиране на ДНК с търговски кит GeneAll® Exgene™ Stool DNA kit (GeneAll Biotechnology, Seoul, South Korea); изолиране на ДНК с търговски кит PureLink® Genomic DNA Kit, (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA); изолиране на ДНК с хелатен агент Chelex® 100 (Bio-Rad Laboratories, California, USA); Полимеразна верижна реакция (Polymerase Chain Reaction, PCR), използвани праймери и условия на амплификация; Nested PCR (nPCR) на участък от гена за 18S рРНК на *Cryptosporidium* sp.; Nested PCR на участък от гена за COWP (nCOWP-PCR) на *Cryptosporidium* sp.; Real time

Polymerase Chain Reaction за доказване на *Cryptosporidium* sp.; видова идентификация на *Cryptosporidium* sp. чрез Restriction fragment length polymorphism, (RFLP); (4) Епидемиологични; (5) Социологически – документален и анкетно проучване; (6) Статистически – използвани са софтуерните продукти MS Excel Office 365 Pro Plus/2016 и Adobe Illustrator CC и ArcGIS Pro 3.3/2024; (7) Графичен анализ – с прецизно цветно картиране на разпространението на *Cryptosporidium* sp.-инфекцията сред хора и животни в Плевенска област по общини, което допринася за обогатяване представите за разпространението и дава нови насоки за предприемане на локални диференцирани противоепитемични мерки. Съвременните молекулярно-биологични техники са разработени и проведени в екип под ръководството на научния ръководител на докторантката – доцент д-р Нина Цветкова, дб в Националната референтна лаборатория „Диагностика на паразитозите“ в НЦЗПБ, което ясно показва прецизността на работа и качеството на получените резултати.

Проведни са анкетни проучвания сред деца и възрастни – лица, работещи или пребиваващи в детски заведения – градини и ясли, както и работещи в лечебни заведения. Целта е да се получи информация за здравните познания, относно чревните опаразитявания, вкл. с *Cryptosporidium* sp. Паралелно с анкетното проучване, е разпространена брошура със здравно-образователна цел. Съставянето на анкетите и информационната брошура са в екип с научния ръководител на дисертантката – професор д-р Даниела Клисарова, дб, което гарантира подаване на точна информация към анкетираните относно чревните опаразитявания и постигане на достоверни резултати от проучването. Пробонабирането от децата и възрастните е доброволно и се съпътства с попълване на формуляр за информирано съгласие.

В един раздел са получените *резултати* и тяхното *обсъждане*. Съпоставката им с тези, в откритите литературни източници показват добрия аналитичен подход на дисертантката към проблематиката и адекватното ѝ боравене с научната литература. Онагледяването на резултатите в таблици, диаграми, карти, снимки и други образни представяния е синтезирано и информативно, а оформлението им е в много добър естетически вид. Като резултат от извършеното, са постигнати и научноизследователските цели:

- Установява се екстензитет на *Cryptosporidium* sp.-инвазията от 7,6% сред определени групи от населението на гр. Плевен и Плевенска област. Най-голям е относителният дял на цистоотделителите във възрастовия диапазон между 3 и 7 години.
- Въз основа на демографските показатели – възраст, пол, населено място, етническа принадлежност сред определен контингент лица в Плевенска област се прави оценка на честотата на опаразитяване с *Cryptosporidium* sp. – преобладават българи, градски жители.
- Констатира се, че честотата на опаразитяване с *Cryptosporidium* sp. корелира с видовата принадлежност и възрастта на изследваните селскостопански животни.
- Потвърждава се, че високата степен на полиморфизъм в сегментите на използваните в анализите два гена е подходящ маркер за видова идентификация на криптоспоридиите.
- Приложените молекулярни методи показват, че *Cryptosporidium parvum* е основният причинител на криптоспоридиоза при хората и преживните животни в Плевенска област.

- Доказва се, че прилагането на морфологични, имунологични и молекулярно-биологични методи за диагностика на *Cryptosporidium* sp. са основа за разкриването на скрита опаразитеност сред изследваните таргетни групи лица.
- Въз основа на анализ, базиран на Географска информационна система са установени ареалите на разпространение на криптоспоридиозата през периода 2016 – 2023 година.
- Чрез прилагане на анкетен метод е установено, че образованието, професията, местоработата в град/село, оказват влияние върху познанията на анкетираните лица за чревните паразитни инвазии, в частност за криптоспоридиозата. С най-добри познания са работещите в болнични лечебни заведения, лицата с по-висока степен на образование и квалификация, както и тези, с месторабота в градовете.
- Потвърждава се ползата от здравна просвета сред определени рискови групи и работещите в сферата на здравеопазването лица.

Приноси и значимост на дисертационния труд за науката и практиката

В *заключението* си дисертантката обвързва получените резултати с глобалните процеси на миграция на големи групи от хора и животни, климатичните промени, финансовата обезпеченост на паразитологичните изследвания, терапия и превенция, с което показва широта на познания по темата и ерудиция на учен.

Направените 11 *извода*, са правилно формулирани и са в съответствие с поставените цели и решени задачи и коректно отразяват получените резултати.

Самооценката за *приносите* в дисертационния труд, дисертантката дефинира с оригинален характер 6 (шест), а с приложен и потвърдителен – 4 (четири), което потвърждава правилния избор на тема и значимостта на труда за биологичната наука и епидемиологична практика.

Оценка на публикациите по дисертационния труд

Авторската справка на дисертантката представя заглавията на 3 (три) научни публикации във връзка с дисертацията: 1 (една) научна публикация в реферирани и индексирани списания (Web of Science), 2 (две) – в реферирани и индексирани списания в други световни вторични литературни източници и 4 (четири) участия в научни форуми с доклади. Участва и в 2 (два) научни проекта по темата на дисертацията, финансирани от Медицински университет – Плевен. Тази справка посочва съответствие и изпълнение на минималните национални изисквания за ОНС „Доктор“, съгласно ПРАС на МУ – Плевен.

Авторефератът към дисертацията е в обем от 52 страници, онагледен с 10 таблици, 31 фигури и коректно отразява основните раздели в дисертационния труд.

Заключение

Дисертационният труд показва, че докторанката Петя Василева Драгомирова притежава научни познания и практически умения в областта протозоологията, в частност съвременна диагностика, молекулярната и експериментална биология, теоретична епидемиология. В процеса на формиране на научноизследователски умения, дисертантката е събрала и създала значим набор от компетентости и демонстрира умения и организаторски качества за самостоятелно провеждане на научно изследване. Явна е и способността ѝ за провеждане на екипни научни изследвания.

Предвид гореизложеното давам своята **ПОЛОЖИТЕЛНА** оценка за представените за рецензиране: дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси и предлагам на уважаемото Научно жури да присъди, образователната и научна степен „ДОКТОР“ на Петя Василева Драгомирова в докторска програма „Медицинска биология“; Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт; Професионално направление: 7.1 Медицина.

03.01.2025

Изготвил рецензията: **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

Доц. д-р Борислава Георгиева Чакърва, дм



TRAKIA UNIVERSITY – STARA ZAGORA

REVIEW

by **Assoc. Prof. Dr. Borislava Georgieva Chakarova, PhD**

at **Trakia University – Stara Zagora,**

Department of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, Parasitology and Infectious Diseases

Member of the Scientific Jury, appointed by the Rector of the Medical University - Pleven
by Order No. 3762/17.12.2024

Subject: Dissertation for the award of the educational and scientific degree "Doctor of Philosophy"

Field of higher education: 7. Health and sports

Professional field: 7.1 Medicine

Doctoral program: Medical biology

Author: Petya Vasileva Dragomirova

Form of doctoral studies: full-time

Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology, Sector "Biology"

Topic: CRYPTOSPORIDIOSIS - DIAGNOSTIC, EXPERIMENTAL AND EPIDEMIOLOGY STUDIES

Scientific supervisors: Prof. Daniela Klisarova, PhD

Assoc. Prof. Nina Tsvetkova, PhD

Brief data from the professional and academic biography of the doctoral student

Petya Vasileva Dragomirova was born in the city of Pleven. In 1996, she graduated from the Pedagogical University "Paisiy Hilendarski", Plovdiv with the qualifications "Biology Teacher" and "Chemistry Teacher". Additional qualifications are: V Professional Qualification Degree at the Institute of Biology and Chemistry - Sofia (2002), Instructor in Basic and Specific Computer Skills at the Center for Continuing Education at the Agricultural University - Plovdiv. In 2022, she acquired a specialty "Medical Biology". From 1996 to 2002, she worked in the field of secondary education, and since 2011, she has moved to an academic position at the Medical University - Pleven. In 2020, she was enrolled in a full-time form of study in the doctoral program "Medical Biology". As an assistant

professor in biology, Ms. Dragomirova leads classes in the subjects "Human Biology" for medical and pharmacy students and participates in seminars and exercises for students from the Department of Language and Specialized Training in Bulgarian.

Actuality of the problem

Cryptosporidiosis is an intestinal parasitic disease caused by an intracellular protozoan parasite of the genus *Cryptosporidium* (type Apicomplexa). Hosts are animals at different evolutionary levels - fish, amphibians, reptiles, birds and mammals, incl. and humans. Although the species in the genus *Cryptosporidium* were determined more than a century ago, reliable information about their identification, clinical significance, epidemiology and treatment has been accumulated since the 1980s. *Cryptosporidium* sp.-infection has a fecal-oral mechanism of transmission: direct - upon contact with infected hosts and indirect - through ingestion of food and water contaminated with the oocysts of the parasite. In immunocompetent individuals, the infection is most often asymptomatic or oligosymptomatic cyst carriage. Cryptosporidiosis has gained particular importance after it was established that in people with HIV/AIDS and other immune-suppressing conditions and diseases, the infection occurs with profuse diarrhea with severe dehydration and intoxication. The spread of this zoonosis is cosmopolitan, and in economically developed countries *Cryptosporidium* sp. is one of the most frequently detected pathogens in epidemic outbreaks that occurred via water, occurring with diarrheal syndrome. Cryptosporidiosis becomes a socially significant disease in areas with socio-economic disadvantage and poverty, chronic malnutrition, problematic healthcare, with military conflicts and the inevitable humanitarian crises and migration. In farmed animals, *Cryptosporidium* sp. has been found to be one of the main enteropathogens involved in the etiology of neonatal diarrhea syndrome, leading to significant economic losses due to high morbidity, mortality, and growth retardation. *Cryptosporidium* sp. is also widely distributed among animals in the wild and this fact is of particular importance for maintaining sylvatic reservoirs. The specificity of the diagnosis of cryptosporidiosis leads to a significant number of undetected cases, and hence - an unrealistic assessment of the problem of "cryptosporidiosis". In the absence of specific prophylaxis, the modernization of diagnostic methods is the basis for the successful surveillance and control of cryptosporidiosis. These problems related to *Cryptosporidium* sp. and cryptosporidiosis have been thoroughly studied and analyzed by the doctoral candidate, under the guidance of her scientific supervisors Prof. Daniela Klisarova, PhD and Assoc. Prof. Nina Tsvetkova, PhD. In this dissertation, studies of some diagnostic methods, epidemiological characteristics among certain risk groups of individuals, as well as among animal species in Pleven and the region have been appropriately conducted. Considering the above, the topic of the dissertation is extremely relevant, competently chosen and with diverse aspects of the results and conclusions obtained.

General characteristics and assessment of the dissertation work

The dissertation work is structured according to the Law on the Development of Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations for its implementation at the Medical University - Pleven. The laboratory analyses included in the dissertation work were performed at the Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology, Biology Sector, at the Medical University - Pleven and the National Reference Laboratory (NRL) for Diagnosis of Parasitic Diseases, Department of Parasitology and Tropical Medicine of the National Center for Parasites - Sofia. It has been discussed and is intended for defense by the Extended Department Council of the Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology at the Medical University of Pleven in 2024.

The dissertation is presented in 199 pages and is structured according to the requirements of the dissertation format. It is illustrated with 26 tables, 59 figures. The bibliography contains 397 literary sources.

In the *introduction*, the doctoral candidate systematically updates the problems and the reasons for choosing them as a topic for developing the dissertation. The *literature review* is presented in 48 pages and in its large volume it reflects the good information of the doctoral candidate. The review emphasizes the achievements in world science and scientific developments in our country on the specific aspects of the dissertation. A significant place is occupied by the subtopics related to the etiology, taxonomy, morphology and species diversity of the genus *Cryptosporidium*, the epidemiological features and the spread of cryptosporidiosis among humans and animals on a global and regional level. The possibilities for identification and etiological diagnosis of *Cryptosporidium* sp. in isolates of biological origin are described in detail. The skillfully selected illustrative material, which reinforces key parts of what is presented in the overview, is impressive. The doctoral candidate demonstrates good awareness of the topic of the dissertation work through the use of current scientific literature, with 30% of the titles and information in the bibliography having been published in the last 10 years.

In the part "*Own studies*", the goal set in the dissertation is well formulated: to study the biology, distribution, diagnosis and epidemiology of cryptosporidiosis among at-risk population groups in the Pleven region and nearby regions, and among animals by applying modern diagnostic methods. The tasks that are planned and implemented to achieve the goals are 7 and detail the scientific aspects of the research process.

In "*Material and Methods*", the *target groups* studied for a 7-year period from 2016 to 2023 are characterized in detail, totaling 1258 individuals. Of these, 1078 are immunocompetent and 55 immunocompromised and 125 clinically healthy children and adults - control group. Their age is between 4 months and 70 years. An animal population by species and age of the animals was also studied. A total of 107 samples from different types of farm animals (cows, goats, sheep) were examined. Of these, 96 were from animals with diarrheal syndrome and 11 - from animals without symptoms characteristic of intestinal parasites - the control group. The *methods* used are described in detail: **(1)** Morphological; **(2)** Immunological - for the detection of coproantigens in human and animal samples; immunochromatographic; enzyme-linked immunosorbent assay; **(3)** Molecular biology - isolation of *Cryptosporidium* sp. DNA from human and animal fecal samples; isolation of DNA with a commercial kit GeneAll® Exgene™ Stool DNA kit (GeneAll Biotechnology, Seoul, South Korea); isolation of DNA with a commercial kit PureLink® Genomic DNA Kit, (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA); isolation of DNA with a chelating agent Chelex® 100 (Bio-Rad Laboratories, California, USA); Polymerase Chain Reaction (PCR), primers used and amplification conditions; Nested PCR (nPCR) of a region of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* sp.; Nested PCR of a region of the COWP gene (nCOWP-PCR) of *Cryptosporidium* sp.; Real time Polymerase Chain Reaction for detection of *Cryptosporidium* sp.; **(4)** Epidemiological; **(5)** Sociological – documentary and questionnaire survey; **(6)** Statistical – the software products MS Excel Office 365 Pro Plus/2016 and Adobe Illustrator CC and ArcGIS Pro 3.3/2024 **(7)** Graphical analysis – with precise color mapping of the spread of *Cryptosporidium* sp. infection among humans and animals in the Pleven region by municipalities, which contributes to enriching the ideas about the spread and provides new guidelines for taking local differentiated anti-epidemic measures. Modern molecular biological techniques were developed and carried out in a team under the leadership of the doctoral student's

scientific supervisor – Associate Professor Dr. Nina Tsvetkova, PhD in the National Reference Laboratory (NRL) for Diagnosis of Parasitic Diseases at the National Center for the Study of Parasites, which clearly shows the precision of the work and the quality of the results obtained.

Surveys were conducted among children and adults – persons working or residing in childcare facilities – kindergartens and nurseries, as well as those working in medical institutions. The aim is to obtain information about health knowledge regarding intestinal parasites, incl. with *Cryptosporidium* sp. In parallel with the survey, a brochure with a health and educational purpose was distributed. The compilation of the surveys and the information brochure was carried out in a team with the scientific supervisor of the doctoral candidate – Professor Dr. Daniela Klisarova, PhD, which guarantees the provision of accurate information to the respondents regarding intestinal parasites and the achievement of reliable results from the study. Sampling from children and adults is voluntary and is accompanied by filling out an informed consent form.

In one section are the obtained *results* and their *discussion*. Their comparison with those in the open literary sources shows the good analytical approach of the doctoral candidate to the issue and her adequate handling of the scientific literature. The visualization of the results in tables, diagrams, maps, photos and other visual representations is synthesized and informative, and their layout is in a very good aesthetic form. As a result of what has been done, the scientific research goals have been achieved:

- A prevalence of *Cryptosporidium* sp.-invasion of 7.6% is established among certain groups of the population of the city of Pleven and Pleven region. The largest relative share of cyst secretors is in the age range between 3 and 7 years.
- Based on demographic indicators - age, sex, place of residence, ethnicity among a certain contingent of people in Pleven region, an assessment of the frequency of *Cryptosporidium* sp. -invasion is made - a weakly expressed trend in the spread of cryptosporidiosis is outlined with a predominance of people of Bulgarian ethnicity, urban residents.
- It is established that the frequency of *Cryptosporidium* sp. parasitism correlates with the species affiliation and age of the studied farm animals.
- It is confirmed that the high degree of polymorphism in the segments of the two genes used in the analyses is a suitable marker for species identification of cryptosporidia.
- The applied molecular methods show that *Cryptosporidium parvum* is the main causative agent of cryptosporidiosis in humans and ruminants in the Pleven region.
- It is proven that the application of morphological, immunological and molecular biological methods for the diagnosis of *Cryptosporidium* sp. are the basis for the detection of hidden parasitism among the studied target groups of individuals.
- Based on an analysis based on the Geographic Information System, the areas of distribution of cryptosporidiosis during the period 2016 - 2023 were established.
- By applying the survey method, it was established that education, profession, place of work in a city/village, influence the knowledge of respondents about intestinal parasitic invasions, in particular about cryptosporidiosis. Those working in hospitals, people with a higher level of education and qualification, as well as those working in cities, have the best knowledge.
- The benefit of health education among certain risk groups and healthcare workers is confirmed.

Contributions and significance of the dissertation work for science and practice

In her *conclusion*, the doctoral candidate links the obtained results with the global processes of migration of large groups of people and animals, climate change, the financial security of parasitological research, therapy and prevention, thereby demonstrating the breadth of knowledge on the topic and the erudition of a scientist.

The 11 conclusions made are correctly formulated and are in accordance with the set goals and solved tasks and correctly reflect the obtained results.

The doctoral candidate defines the self-assessment of the contributions in the dissertation work with an original character of 6 (six), and with an applied and confirmatory - 4 (four), which confirms the correct choice of topic and the significance of the work for biological science and epidemiological practice.

Evaluation of publications on the dissertation work

The **author's reference** list of the dissertation presents the titles of 3 (three) scientific publications in connection with the dissertation: 1 (one) scientific publication in refereed and indexed journals (Web of Science), 2 (two) - in refereed and indexed journals in other world secondary literature sources and 4 (four) participations in scientific forums with reports. She also participates in 2 (two) scientific projects on the topic of the dissertation, funded by the Medical University - Pleven. This reference indicates compliance and fulfillment of the minimum national requirements for the educational and scientific degree "Doctor of Philosophy" according to the Law on the Development of Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations for its implementation at the Medical University -Pleven.

The **author's abstract** to the dissertation is 52 pages long, illustrated with 10 tables, 31 figures and correctly reflects the main sections of the dissertation work.

Conclusion

The dissertation shows that the doctoral candidate Petya Vasileva Dragomirova possesses scientific knowledge and practical skills in the field of protozoology, in particular modern diagnostics, molecular and experimental biology, theoretical epidemiology. In the process of forming research skills, the doctoral candidate has gathered and created a significant set of competencies and demonstrated skills and organizational qualities for independent scientific research.

Given the above, I give my **POSITIVE assessment** for the submitted for review: dissertation, abstract, achieved results and contributions and I propose to the esteemed Scientific Jury to award the educational and scientific degree "Doctor of Philosophy" to Petya Vasileva Dragomirova in the doctoral program "Medical Biology"; Field of higher education: 7. Health and Sports; Professional field: 7.1 Medicine.

03.01.2025

Prepared the review: **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

Assoc. Prof. Dr. Borislava G. Chakarova, PhD