

РЕЦЕНЗИЯ

От проф. д-р Искра Георгиева Райнова, дн,

Научна специалност „Паразитология и хелминтология“, Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), зав. Отдел „Паразитология и тропическа медицина“

Относно: Дисертационен труд на Петя Василева Драгомирова, редовен докторант към катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“ към Медицински факултет на МУ Плевен. Област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт; Професионално направление 7.1 Медицина, Докторска програма: Медицинска биология.

Тема на дисертационния труд:

Криптоспоридиоза – диагностични, експериментални и епидемиологични проучвания

Научни ръководители: 1. Проф. Даниела Клисарова, дб

2. Доц. Нина Цветкова, дб

Представените материали са на електронен носител и са в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение за придобиване на ОНС „Доктор. При прегледа на дисертационния труд не открих данни за плагиатство.

Декларирам, че нямам общи научни разработки с докторанта и потенциален конфликт на интереси.

I. Провеждане на докторантурата: Със заповед № 946/11.05.2020 г. Петя Драгомирова, асистент по биология към катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“, Сектор „Биология“ към МУ-Плевен е зачислена като редовен докторант по докторска програма „Медицинска биология“. За научни ръководители са определени проф. Клисарова, дб и доц Цветкова, дб. По време на разработването на дисертационния труд Петя Драгомирова е положила успешно изпитите за кандидатски минимум. След отчисляване с право на защита, прието с решение на катедрен съвет на катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“ на 29.05.2024) (протокол № 6) със заповед № 3120 /04.11.2024 г. е открита процедура за апробация на дисертационния

труд, която беше проведена на 29.11.2024 г. (Протокол № 11/29.11.2024 г.) и дисертационния труд беше насочен за публична защита.

II. Актуалност и значимост на темата.

Дисертационната разработка е посветена на съвременните аспекти в диагностиката, някои експериментални и епидемиологични проучвания на криптоспоридиозата.

Тази паразитна зооноза е сравнително по-малко позната за здравната мрежа и затова насочеността към нея от ОПЛ, гастроентеролози, инфекционисти и др. е ограничена. Рядко се назначават паразитологични изследвания на пациенти с диарийен синдром. Проучвания, извършени въз основа на анализите на паразитната заболяемост за периода 2009-2018 г. установяват 0,03‰ заболяемост от криптоспоридиоза при изследване общо на 2706 души. Въпреки че криптоспоридиозата подлежи на задължително съобщаване и регистрация, съгласно нормативните документи на МЗ и се отчита в платформата Tessa на Европейския център за контрол на болестите (ECDC) в Стокхолм, събраните данни досега показват, че изследвания за тази паразитоза се извършват предимно в София (НЦЗПБ), Пловдив и Варна. Затова считам, че извършването на такива мащабни проучвания за криптоспоридиоза сред уязвими рискови групи от населението на област Плевен и сред животни, сочени като източници на инвазионни елементи на паразита е много навременно и необходимо. Актуалността на дисертационния труд се обуславя и от използването на съвременни методи за диагностика като полимеразната верижна реакция (PCR) и генотипирането на получените изолати чрез RFLP анализ, което не е извършвано досега в нашата страна.

III. Структура на дисертационния труд

Научният труд на Петя Драгомирова отговаря на изискванията за разработване на дисертационни трудове: начин на структуриране, представяне на проблема, анализ на получените данни и защита на основните тези на автора.

Представеният материал е разработен на 199 страници и съдържа 59 фигури и 26 таблици. В литературната справка са включени 397 заглавия, от които 55 са на български изследователи и 342 на латиница. Библиографията е актуална и изчерпателна, като източниците са избрани тематично, максимално близо до дисертационния труд.

Прегледът на научната литература е целенасочен и информативен, като предоставя един актуален обзор на съвременното състояние на проблема

„криптоспоридоза“. Добре са описани етиологията, таксономията, биологията и жизнения цикъл на род *Cryptosporidium*, както и патогенезата, патоанатомията, епидемиологията, клиниката, диагностиката, както и трудностите при лечението на заболяването.

Представени са подробно колебанията относно патогенността на криптоспоридиите, разликата между *Cryptosporidium hominis* и *Cryptosporidium parvum*, особеностите на жизнения цикъл, голямата съвкупност на видове и тяхната хетерогенност, начините на заразяване и разпространението сред хората и животните. Много добре са описани диагностичните методи, използвани последователно през годините и съвременните методи за откриване на паразитите или тяхната ДНК. Те са конкретни и очертават ясен план за провеждане на изследванията.

Цел и задачи.

На базата на направения анализ е очертана целта и са формулиране 7 задачи на дисертационния труд. Поставената цел е ясна и точна. Задачите са конкретни и са пряко свързани с научната хипотеза и постигането на целта на проучването.

Материалът и методите са описани много изчерпателно. Методичните подходи са правилно подбрани, както за постигане на целта на дисертационния труд, така и с оглед на достоверност на докладваните резултати. Включени са три групи изследвани лица – имунокомпетентни, изследвани по клинични и/или епидемиологични показания, имунокомпрометирани – известно е, че криптоспоридиозата е опортюнистична паразитоза и протича по-тежко при такива пациенти и контролна група от здрави лица. Броят на изследваните и от трите групи е достатъчен за статистически анализ. Таргетната група на животните също е много добре подбрана и достатъчна за изследване на връзката между животните и човека при заразяване с криптоспоридии.

В тази част на дисертационния труд се вижда, че докторантката е усвоила значителен набор от съвременни методи за диагностика и е подбрала правилно методичните подходи за разрешаване на поставената цел.

Приложените статистически методи са подходящи за анализ на резултатите от проучването. Нямам забележки или препорък към този раздел и му давам висока оценка.

Резултатите и тяхното обсъждане са представени в един раздел, който е развит на 54 страници. Описанието на данните следва логично реда на задачите на дисертационния труд. Резултатите са онагледени с с отлично изготвени таблици и

фигури, които дават синтезирана информация и улесняват възприемането на материала. Статистическата достоверност е представена много добре както в текста, така и при фигурите и таблиците. Получените резултати са убедителни и са описани ясно и точно, което създава отлична прегледност и документиране на научните факти. Прави впечатление откриването на значителен брой положителни за криптоспоридиоза лица и по трите използвани техники – 86 (7,6%) от общо изследвани 1133 по клинични и/или епидемиологични данни. При споменатото предишно проучване от 2021 г., което включва данни от анализите на паразитната заболяемост за 10 годишен период, от изследвани 2706 пациенти са установени 22 положителни (0,8%). Сравняването на тези данни доказва тезата на дисертантката, че криптоспоридиозата се подценява и не се търси активно при лица с диарийен синдром. Подробен анализ на познанията, касаещи тази паразитоза е осъществен с помощта на извършеното анкетно проучване, което също е представено много добре от Петя Драгомирова.

Подробно е обсъдена необходимостта от използване на участъци от два гена за идентификация на изолатите, като Петя Драгомирова много умело развива своята теза и доказва идентичността на нейните изолати от хора и животни с профила на щам *Cryptosporidium parvum* Iowa II, използван като референтен. Такава идентификация се доказва за пръв път в нашата страна и е важен научен принос на дисертантката.

Давам висока оценка на този раздел.

Заключение. Считам, че в заключението трябва да се обобщят получените резултати и да се наблегне на ситуацията в България по отношение на тази паразитоза.

Изводи. Изводите са 11 и са много добре формулирани. Те са конкретни, произтичат от поставените задачи, получените резултати и тяхното обсъждане.

Критични бележки и препоръки към дисертационния труд:

1. Считам, че литературният обзор е доста дълъг и подробен и би могъл да се съкрати, особено в началото - историческият преглед, също и лечението, което не е обект на специалността „Медицинска биология“.

2. При обсъждането на резултатите е добре да се оценят по тяхната специфичност и чувствителност използваните методи за диагностика – микроскопски, имунохроматографски и имуноензимния метод (ELISA).

IV. Приноси

Петя Драгомирова е посочила шест оригинални научни приноса и пет с приложен и потвърдителен характер. Приемам изцяло приносите, тъй като те отразяват най-важните научни постижения на дисертационния труд. Научната и практическата стойност на направените приноси е безспорна. Един от най-важните приноси на дисертантката е установяването на идентичността на изолатите на *Cryptosporidium* spp. от човешки и животински произход с използвания референтен щам *Cryptosporidium parvum* Iowa II (генотип 2).

V. Оценка на задължителните наукометрични показатели, свързани с дисертационния труд

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 3 журнални статии в списания с научно рецензиране и импакт ранг. Във всички публикации Петя Драгомирова е първи автор. Представена е справка за участие в 4 научни форума, като във всички е отново първи автор. Считаю, че по този начин резултатите от разработването на дисертационния труд са получили много добра независима научна оценка и са станали достояние на широк кръг от академичната общност. С това е изпълнено едно от важните изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за неговото приложение. Освен това Петя Драгомирова е ръководила два научно-изследователски проекта, финансирани от МУ Плевен във връзка с дисертационния труд.

Във връзка с изготвените публикации считаю, че получените резултати, особено от генотипирането е необходимо да бъдат отразени в международни списания с импакт фактор за обогатяване на базите данни за вида криптоспоридия, доказана в нашата страна.

VI. Авторефератът е структуриран в 52 страници, включва всички резултати от дисертационния труд и е изготвен целия освен на български и на английски език.

VII. Заключение

Познавам лично Петя Драгомирова и съм свидетел на нейната отдаденост и старание при разработването на дисертационния труд. От обзора и обсъждането проличава, че тя е запозната с публикуваните научни факти и може правилно да ги съпоставя и интерпретира. В методично отношение тя е овладяла адекватно приложила съвременни методи за изследвания. Получените резултати са анализирани с подходящи статистически методи и са описани и онагледени много добре. Жпределено считаю, че представеният дисертационен труд съдържа оригинални

научни приноси, които могат да послужат за повишаване на насочеността към криптоспоридиозата както след хуманните, така и сред ветеринарните специалисти за разкриване на пълната картина по отношение на тази паразитоза у нас.

Дисертационният труд съдържа научни и научно-приложни резултати, които отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за неговото прилагане. Дисертационният труд показва, че докторантката Петя Драгомирова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научната специалност „Медицинска биология“, като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за присъждането на образователната и научна степен **‘ДОКТОР’** на Петя Василева Драгомирова в докторска програма по „Медицинска биология“

06.01.2025 г.

Изготвила рецензията: На основание чл. 59 от ЗЗЛД
Проф. д-р Искра Райнова, дн

REVIEW

From Prof. Iskra Georgieva Raynova, MD, PhD, DSc

Scientific specialty "Parasitology and helminthology", National Center of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), head of the Department of Parasitology and Tropical Medicine

About: Dissertation of Petya Vasileva Dragomirova, full-time doctoral student at the Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology at the Faculty of Medicine of the Pleven University. Field of higher education 7. Health care and sports; Professional field 7.1 Medicine, Doctoral program: Medical biology.

Dissertation topic:

Cryptosporidiosis – diagnostic, experimental and epidemiological studies

Scientific supervisors: 1. Prof. Daniela Klisarova, PhD

2. Assoc. Nina Tsvetkova, PhD

The presented materials are on electronic media and are in accordance with the requirements of the Academic Staff Development Act and the regulations for its implementation for the acquisition of the educational and scientific degree "Doctor". When reviewing the dissertation, I found no evidence of plagiarism.

I declare that I have no common scientific developments with the doctoral student and no potential conflict of interest.

I. Conducting the doctoral studies: By Order No. 946/11.05.2020 Petya Dragomirova, assistant professor of biology at the "Anatomy, Histology, Cytology and Biology" Department, "Biology" Sector at MU-Pleven, is enrolled as a full-time doctoral student in the "Medical Biology" doctoral program. As scientific supervisors have been appointed prof. Klisarova, and assoc. prof. Tsvetkova. During the development of the dissertation work, Petya Dragomirova successfully passed the minimum candidacy exams. After deduction with the right of defense, accepted by a decision of the faculty council of the Department of "Anatomy, Histology, Cytology and Biology" on 29.05.2024 (protocol No. 6) with order No. 3120 /04.11.2024 a procedure for approbation of the dissertation was opened, which was held on 29.11.2024. (Protocol No. 11/29.11.2024) and the dissertation work was sent for public defense.

II. Relevance and importance of the topic.

The dissertation work is devoted to modern aspects in diagnostics, some experimental and epidemiological studies of cryptosporidiosis.

This parasitic zoonosis is relatively less known to the health network and therefore the focus on it by GPs, gastroenterologists, infectious disease specialists, etc. is limited. Parasitological tests are rarely prescribed for patients with diarrheal syndrome. Studies performed based on parasite incidence analyzes for the period 2009-2018 found 0.03‰ incidence of cryptosporidiosis in a study of a total of 2706 people. Although cryptosporidiosis is subject to mandatory notification and registration, according to the regulatory documents of the Ministry of Health and is reported on the Tessa platform of the European Center for Disease Control (ECDC) in Stockholm, the data collected so far show that research on this parasitosis is mainly carried out in Sofia (NCIPD), Plovdiv and Varna. Therefore, I believe that conducting such large-scale studies on cryptosporidiosis among vulnerable risk groups of the population of the Pleven region and among animals indicated as sources of invasive elements of the parasite is very timely and necessary. The relevance of the dissertation work is determined by the use of modern diagnostic methods such as the polymerase chain reaction (PCR) and the genotyping of the obtained isolates by RFLP analysis, which has not been carried out in our country so far.

III. Structure of the dissertation

The scientific work of Petya Dragomirova meets the requirements for the development of dissertation works: method of structuring, presentation of the problem, analysis of the obtained data and defense of the main theses of the author.

The presented material is developed on 199 pages and contains 59 figures and 26 tables. The literature reference includes 397 titles, of which 55 are by Bulgarian researchers and 342 are in Latin. The bibliography is up-to-date and comprehensive, with the sources selected thematically, as close as possible to the dissertation work.

The review of the scientific literature is targeted and informative, providing an up-to-date overview of the current state of the cryptosporidiosis problem. The etiology, taxonomy, biology, and life cycle of the genus *Cryptosporidium* are well described, as well as the pathogenesis, pathoanatomy, epidemiology, clinic, diagnosis, and treatment difficulties of the disease.

Controversies regarding the pathogenicity of cryptosporidia, the differences between *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*, life cycle characteristics, the large assemblage of species and their heterogeneity, modes of infection, and spread among humans

and animals are detailed. The diagnostic methods used consistently over the years and modern methods for detecting the parasites or their DNA are very well described. They are specific and outline a clear plan for conducting the research.

Purpose and tasks.

Based on the analysis, the goal was outlined and 7 tasks of the dissertation work were formulated. The goal is clear and precise. The tasks are specific and directly related to the scientific hypothesis and the achievement of the research goal.

The material and methods are described very comprehensively. The methodological approaches are correctly selected, both to achieve the goal of the dissertation work and to ensure the credibility of the reported results. Three groups of subjects were included - immunocompetent, examined by clinical and/or epidemiological indications, immunocompromised - cryptosporidiosis is known to be an opportunistic parasitosis and is more severe in such patients and a control group of healthy subjects. The number of subjects from all three groups was sufficient for statistical analysis. The animal target group is also very well selected and sufficient to study the animal-human relationship of cryptosporidia infection.

In this part of the dissertation work, it can be seen that the doctoral student has mastered a significant set of modern diagnostic methods and has correctly selected the methodical approaches to solve the set goal.

The applied statistical methods are suitable for analyzing the results of the study. I have no comments or recommendation for this section and give it a high rating.

The results and their discussion are presented in one section, which is spread over 54 pages. The description of the data logically follows the order of the tasks of the dissertation. The results are illustrated with excellently prepared tables and figures that provide synthesized information and facilitate the perception of the material. Statistical reliability is presented very well both in the text and in the figures and tables. The results obtained are convincing and described clearly and precisely, which creates an excellent overview and documentation of the scientific facts. The discovery of a significant number of individuals positive for cryptosporidiosis by all three techniques used is striking – 86 (7.6%) out of a total of 1133 examined according to clinical and/or epidemiological data. In the aforementioned previous study from 2021, which included data from parasite incidence analyzes over a 10-year period, 22 positives (0.8%) were found out of 2,706 patients examined. Comparing these data proves the thesis of the doctoral student that cryptosporidiosis is underestimated and not actively sought in persons with diarrheal syndrome. A detailed analysis of the knowledge

concerning this parasitosis was carried out with the help of the conducted survey, which was also presented very well by Petya Dragomirova.

The need to use regions of two genes to identify isolates is discussed in detail, with Petya Dragomirova very skillfully developing her thesis and proving the identity of her human and animal isolates with the *Cryptosporidium parvum* Iowa II strain profile used as a reference. Such identification is proven for the first time in our country and is an important scientific contribution of the doctoral student.

I rate this section highly.

Conclusion. I believe that in the conclusion the obtained results should be summarized and the situation in Bulgaria should be emphasized regarding this parasitosis.

Conclusions. There are 11 conclusions and they are very well formulated. They are specific, they arise from the tasks set, the results obtained and their discussion.

Critical notes and recommendations for the dissertation:

1. I believe that the literature review is quite long and detailed and could be shortened, especially at the beginning - the historical overview, also the treatment, which is not the subject of the "Medical Biology" specialty.

2. When discussing the results, an evaluation of the diagnostic methods used - microscopic, immunochromatographic and immunoenzymatic method (ELISA) can be given.

IV. Contributions

Petya Dragomirova has listed six original scientific contributions and five of an applied and confirmatory nature. I fully accept the contributions, as they reflect the most important scientific achievements of the dissertation work. The scientific and practical value of the contributions made is indisputable. One of the most important contributions of the doctoral student is establishing the identity of isolates of *Cryptosporidium* spp. of human and animal origin with the reference strain *Cryptosporidium parvum* Iowa II (genotype 2) used.

V. Assessment of mandatory scientometric indicators related to the dissertation work

The results of the dissertation work have been published in 3 journal articles in peer-reviewed and impact-ranked journals. In all publications, Petya Dragomirova is the first author. A certificate of participation in 4 scientific forums is presented, in all of which he is again the first author. I believe that in this way the results of the development of the

dissertation have received a very good independent scientific evaluation and have become available to a wide circle of the academic community. This fulfills one of the important requirements of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations for its application. In addition, Petya Dragomirova has supervised two research projects funded by the Pleven University in connection with the dissertation work.

In connection with the prepared publications, I believe that the obtained results, especially from the genotyping, need to be reflected in international journals with an impact factor to enrich the databases of the cryptosporidia species proven in our country.

VI. The abstract is structured in 52 pages, includes all the results of the dissertation and is prepared in Bulgarian and English languages.

VII. Conclusion

I know Petya Dragomirova personally and I have witnessed her dedication and diligence in the development of the dissertation work. From the overview and discussion it is clear that she is familiar with the published scientific facts and can correctly compare and interpret them. Methodologically, she has mastered and adequately applied modern research methods. The obtained results are analyzed with appropriate statistical methods and are described and illustrated very well. I definitely believe that the presented dissertation contains original scientific contributions that can serve to increase the focus on cryptosporidiosis both among human and veterinary specialists to reveal the complete picture regarding this parasitosis in our country.

The dissertation contains scientific and scientific-applied results that meet all the requirements of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations for its implementation. The dissertation shows that the doctoral student Petya Dragomirova possesses in-depth theoretical knowledge and professional skills in the scientific specialty "Medical Biology", demonstrating qualities and skills for independent conduct of scientific research.

Due to the above, I confidently give my positive assessment for the awarding of the educational and scientific degree "Doctor" to Petya Vasileva Dragomirova in the doctoral program in "Medical Biology"

06.01.2025

The review was prepared by: **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**
Prof. Iskra Raynova, MD, DSc