

НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР
ПО ЗАРАЗНИ И
ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

Изх. № 20... г.

Вх. № 2717/16, 12, 12 / 20... г.

Бул. "Янко Сакъзов" № 26
София 1504, тел: 9446999

Рецензия

от проф. д-р Росица Иванова Курдова-Минчева дм, член на научно жури

Научна специалност ПАРАЗИТОЛОГИЯ И ХЕЛМИНТОЛОГИЯ

Институция: Национален център по заразни и паразитни болести, гр. София

относно дисертационен труд за ОНС „доктор“

на тема: „Разработване и приложение на серологични диагностични методи и оценка на тяхното значение за определяне на стадия на токсокарната инвазия при хората“

Автор: Елеонора Маринова Кънева

Докторант: на самостоятелна подготовка в НЦЗПБ-София

Област на висшето образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки

Докторска специалност: ПАРАЗИТОЛОГИЯ И ХЕЛМИНТОЛОГИЯ

Научен ръководител: Доц. д-р Искра Георгиева Райнова, дм, НЦЗПБ-София

Декларирам, че не съществува конфликт на интереси между мен и автора на дисертационния труд по смисъла на ал. 1, т. 3 и 5 от ДР на ЗРАСРБ.

Анализ на кариерния профил на кандидата

Елеонора Кънева е родена на 03.09.1976 г., в гр. Плевен. През 1999 г. завършва Софийски университет „Св. Климент Охридски“, гр. София с магистърска степен по молекулярна биология. Първоначално работи като медицински лаборант във Ветеринарен кабинет „Д-р Кънев“ (ЕТ „Христо Кънев – 92“), а от 2006 г. до сега е биолог в Отдел „Паразитология и тропическа медицина“ към НЦЗПБ – гр. София.

За изграждането на Е. Кънева като квалифициран специалист допринася участието ѝ в редица курсове за продължаващо медицинско обучение по медицинска паразитология и тропическа медицина в НЦЗПБ-София, по real-time PCR анализ в Биосистеми ООД, гр. София, по статистика – работа с пакета SPSS20 и др.

Има 16 статии, от които 3 в български списания и 3 в чужди издания с импакт фактор и 4 внедрявания. Участвала е с постери и доклади в редица научни форуми.

Владее английски език, ниво B2.

Актуалност на разработваната в дисертационния труд тема

Зоохелминтозата токсокароза е с повсеместно разпространение и се причинява от миграцията и локализацията на ларвите на животинските нематоди *Toxocara canis* и *Toxocara cati* в човешките тъкани. Въпреки, че първите описания на заболяването при хората датират от средата на миналия век, интересът на изследователите към него не само не отслабва, но и се увеличава през последните години.

Актуалността на разработения от Е. Кънева дисертационен труд се обуславя от няколко факта:

- Установената сравнително висока серопозитивност, варираща в западните страни от 2-5% сред здравото градско население до 14-37% по селата, а в тропическите – тя достига до 63% (Magnaval et al., 1994). Проучвания в България показват 8,6% серопревалентност сред клинично здравите лица (Raynova, 2008).
- Освен известните класическите синдроми – висцерална ларва мигранс, очна токсокароза и невротоксокароза, са описани скрита токсокароза, която се проявява с неспецифични клинични симптоми, а също безсимптомна форма. Тяхното диагностициране изисква усъвършенстване на лабораторната диагностика.
- Лабораторната диагностика на токсокарозата се базира на индиректни методи – серологични, поради неприложимостта на микроскопските методи, защото в организма на човека паразитите не се развиват до възрастен стадий и не отделят яйца, а идентификация на ларвите също не е възможна. Понастоящем ELISA IgG с ларвен секреторно/екскреторен антиген и Western blot са най-широко използваните и препоръчвани тестове за диагностика и се прилагат и у нас. Обаче поради персистирането на антитяло продукцията, предизвикана от токсокарните ларви в организма на гостоприемника,

прилаганите серологични методи не дават възможност за определяне на стадия на инвазията – остра или хронична, както и на периода на заразяване и на ефекта от проведеното лечение. Това налага разработването на нови допълнителни потвърдителни тестове.

- Данните на други изследователи за протективното и диагностично значение на специфичните IgG субкласове при токсокарозата са твърде противоречиви, което е индикатор за необходимостта от задълбочени изследвания по този въпрос.
- Все още се изяснява и диагностичната стойност на серумния тотален IgE, чието повишение над 500 IU/ml според Magnaval et al. (2001) е допълнителен маркер на свежа инвазия при пациенти с токсокароза.
- При други паразитози, например при токсоплазмозата, специфичните IgA антитела са важен имунологичен маркер за доказване на остра – свежа или реактивирана инфекция. Проведените изследвания в тази насока при пациенти с токсокароза са малобройни, обаче информацията, макар и изключително оскъдна, дава надежда, че специфичните IgA антитела биха могли да свидетелстват за остра инвазия. Необходими са допълнителни проучвания за потвърждаване на тези първични данни.

Тези факти показват, че докторантката съвсем обосновано се е насочила към разработване и оценка на допълнителни потвърдителни методи за диагностика на токсокарозата.

Обща характеристика на дисертационния труд

В дисертационния труд е спазена класическата структура, включваща следните глави:

Въведение – 1 стр.,

Литературен обзор – 35 стр.,

Цел и задачи – 1 стр.,

Материали и методи – 13 стр.,

Резултати от собствени проучвания – 74 стр.,

Обсъждане на получените резултати – 31 стр.,

Заключение – 1 стр.,

Изводи – 2 стр.,

Приноси – 2 стр.,

Използвана литература – 24 стр.,

Публикации и участия с научни съобщения в конгреси и конференции, свързани

с дисертацията – 2 стр. и
Резюме – 3 стр.

Трудът е написан на 208 стандартни страници на добър литературен български език. Съотношението между отделните раздели е добре балансирано, като най-голямо внимание е отделено на два раздела – Резултати и Обсъждане. Трябва да се отбележи богатото онагледяване на текста с подходящо подбрани и информативни таблици (36 бр.) и фигури (54 бр.).

Преглед на дисертационния труд и оценка на резултатите

Литературен обзор. Посветен е на конкретната тема на дисертацията и включва анализ на 306 източника, от които 71 на кирилица и 144 на латиница. Трябва да се подчертае, че са отразени пълно и проучванията на българските автори, които са работили по проблема. Общото впечатление е, че дисертантът показва добра осведоменост и възможности да анализира адекватно известните до момента данни по темата.

На базата на литературния анализ и необходимостта от подобряване на диагностиката на токсокарозата, дисертантът мотивирано и ясно извежда поставените цел и задачи на дисертацията.

Цел и задачи. Целта на дисертационния труд е “разработване и оценка на потвърдителни серологични тестове за диагностика на токсокарозата, както и определяне на диагностичната стойност на общия имуноглобулин Е (IgE) и на специфичните IgA антитела за установяване на стадия на токсокарозата при хората». Формулираните 5 задачи отразяват конкретно основните направления в разработката на Е. Кънева.

Материали и методи. За разработване на серологичните тестове е използван секреторно/екскреторен антиген от ларви на *T. canis*, получен от култивирани *in vitro* ларви на паразита по апробирана в НЦЗПБ методика (de Savigny, 1975; Rainova, 2006). В проучването са включени достатъчен брой пациенти – 130, с клинични симптоми на заболяването и потвърдени серологично чрез ELISA-IgG и Western blot. За определяне на параметрите на разработените методи са включени серумни проби от 46 здрави лица, получени от кръводарители и предоставени от Националния център по хематология и трансфузиология, негативни за токсокароза в ELISA-IgG.

Приложени са подходящи съвременни търговски китове: на RBiopharm (Germany) - Ridascreen *Toxocara* IgG, на TestLine Clinical Diagnostisc, CR за определяне на антитоксокарни IgA антитела, на Euroimmun, Germany за определяне на концентрацията на тотален серумен IgE и Western blot IgG - на LD BIO (France), които са предпоставка за достоверни резултати.

Статистическата обработка на данните с помощта на статистически пакет SPSS версия 20.0. дава основание резултатите и изводите да се приемат за обективни.

Оценка на резултатите, техния анализ и интерпретация

Поради дългото персистиране на антитоксокарните IgG антитела в организма на човека и съществуването на кръстосани реакции с други хелминтни заболявания дисертантът се насочва към проучване на значението в диагностиката на токсокарозата на други изотипове антитела - общ IgE и специфични IgA антитела, както и на антитоксокарните IgG субкласове антитела (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4).

Безспорно достойнство на труда е разработването, стандартизирането и оценката на ELISA на базата на секреторно/екскреторен антиген от *in vitro* култивирани ларви на *T. canis* за определяне на нивото на специфичните субкласове антитела IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 при пациенти с клинично изявена и серологично потвърдена токсокароза, като е постигната висока специфичност (92-95,7%) на лабораторните тестове.

Високо оценявам резултатите от изследването на 130 пациента с токсокароза с разработените тестове, показващи специфични IgG1 субклас антитела при голяма част от тях – 65%, IgG2 – при 43%, IgG3 – при 31% и IgG4 - при 42%, като са констатирани различия в специфичния IgG субклас отговор по пол, възраст и клинична форма (висцерална и очна). Едновременното наличие на всички субкласове е отчетено сравнително рядко – при 7,7% от изследваните пациенти, обаче е открита статистически значима зависимост между продукцията на антитоксокарни IgG1 антитела с всеки един от останалите IgG субкласове - IgG2, IgG3 и IgG4. Като установява задължителното присъствие на IgG1 в комбинациите с другите субкласове, дисертантът прави коректното заключение за важната роля на този субклас в имунния отговор при

токсокарозата. А данните за изчерпване на IgG2 до една година след първоначалната диагноза ѝ позволяват да идентифицира тези антитела като имунологичен маркер за определяне на стадия на инвазията – остра или хронична.

Авторът правилно се насочва към проучване на диагностичната стойност и на други класове специфични антитела. За първи път у нас тя изследва и открива антитоксокарни серумни IgA антитела в 26,2% от пациентите с токсокароза. Особен интерес представляват отчетените най-високи стойности на IgA при първичното изследване и тяхното изчерпване след 9-12 месеца на фона на задържаща се IgG позитивност, което ѝ дава основание да предположи, че те са свързани с ранния стадий на заболяването.

На базата на международния опит дисертантът за първи път у нас проучва общия серумен IgE при пациенти с токсокароза и установява при значителна част (75%) от тях средна концентрация, превишаваща четири пъти референтните стойности при здрави лица, при това стойностите са по-високи при инвазираните деца в сравнение с възрастните. Представени са убедителни данни за значителен спад (под референтния лимит) на нивото на тоталния серумен IgE в периода от 6-ия до 9-ия месец след първичното изследване, което предоставя възможност за приложение на този маркер за определяне на активността на заболяването и индиректни данни за ефективността на проведеното лечение.

Чрез сравнителна оценка на получените резултати Е. Кънева получава свидетелство за връзка между продукцията на специфичните IgG, специфичните IgA и тоталните IgE субкласове, което е важна характеристика на хуморалния имунен отговор при токсокарозата.

Определен приносен характер има заключението на Е. Кънева, че установяването на антитоксокарни IgA и IgG2 субклас антитела и на тотални IgE може да улесни диагнозата на токсокарозата и да бъде полезно за определяне на остра инфекция с *Toxocara sp.* поради по-ранното им изчерпване.

Оценка на изводите и приносите

Авторът формулира 10 извода, които съответстват на поставените задачи и получените от проучването резултати.

Приемам приносите от самооценката на докторанта и смятам, че те отразяват обективно реалните постижения.

Оценявам като по-значими и оригинални следните приноси:

1. За първи път в България са разработени и оценени стандартизирани лабораторни ELISA тестове на базата на секреторно/екскреторен антиген от култивирани *in vitro* ларви на *T. canis* за определяне на специфични IgG субкласове – IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 за диагностика на токсокарозата.
2. Установени са различия в специфичния IgG субклас отговор на пациентите по пол, възраст и клинична форма на токсокарозата.
3. Оригинални са данните за корелация между отделните IgG субкласове. Доказана е важната роля на субклас IgG1 в имунния отговор при токсокарозата и е установено изчерпване на IgG2 до една година след първоначалната диагноза.
4. Данните за диагностичната стойност на специфичните IgA антитела за определяне на ранния стадий на токсокарозата са първи по рода си у нас.
5. Оригинална е получената информация за връзката между продукцията на специфичните IgG субкласове, специфичните IgA и тоталните IgE антитела, които дават важна информация за хуморалния имунен отговор при токсокарозата.

Определено внимание заслужават и някои приноси с научно-приложен характера като:

1. Данните за диагностичното значение на повишените стойности на тоталния серумен IgE при пациенти с токсокароза са първи по рода си у нас.
2. Оригинален е предложеният от дисертанта диагностичен подход за проследяване на специфичните IgG субкласове (особено IgG2), специфичните IgA и тоталните IgE антитела в динамика, чрез който може с голяма вероятност да се определи стадия на заболяването и да се съди за ефекта от проведеното лечение.

Отражение на научните резултати на кандидата в литературата

Авторефератът е написан на 73 страници и включва резюме на английски език. Съдържанието му съответства на изложението в дисертационния труд.

Представени са 4 публикации във връзка с темата на дисертацията – 2 в

български издания и 2 – в чужди с IF 2.143 и – 0.210. На три работи Е. Кънева е първи автор, което недвусмислено говори за активната ѝ роля в тяхното разработване. Тя е участвала с постери и доклади в три национални научни форума и в един международен, което е документирано с резюмета.

Критични бележки

Дисертационният труд е оформен прецизно и нямам съществени забележки. При окончателното оформяне дисертантът се е съобразил с всички бележки и предложения, направени по време на вътрешната защита.

Заклучение

Рецензията на дисертационен труд е актуален, добре планиран и компетентно изпълнен със съвременни лабораторни методи под отговорното ръководство на научния ръководител и има съществен принос в областта на съвременната диагностика на паразитните болести.

Смятам, че внедряването на разработените тестове за определяне на специфичните IgG субкласове в практиката, както и включването в комбинацията от имунологични диагностични маркери на специфичните IgA и тоталните IgE ще подобри диагностиката на токсокарозата при хората и ще помогне за формулиране на адекватен терапевтичен подход.

Публикационната активност във връзка с дисертацията е достатъчна за тази научна степен.

Дисертационният труд напълно отговаря на научните критерии в ЗРАСРБ и Правилника на НЦЗПБ за ОНС “доктор”. Това ми дава основание да гласувам категорично за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ по научната специалност „Паразитология и хелминтология“ на Елеонора Маринова Кънева.

Изготвил рецензията:

15.12.2019 г.

Проф. д-р Росица Курдова-Минчева, дм

