

НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР
ПО ЗАРАЗНИ И
ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

Изм. № 20.....

Вх. № *2677/12.12.2019*

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

До Председателя
на Научно жури, назначено
от Директора на НЦЗПБ
със заповед № 452/29.10.2019 г.

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Борислава Георгиева Чакърова, дм

Тракийски университет – Стара Загора, Медицински факултет

Катедра „Микробиология и паразитология“

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“

Област на висшето образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Докторска програма: „Паразитология и хелминтология“

Автор: Елеонора Маринова Кънева

Форма на докторантурата: Самостоятелна подготовка

Национален център по заразни и паразитни болести, гр. София. Отдел „Паразитология и тропическа медицина“

Тема: „РАЗРАБОТВАНЕ И ПРИЛОЖЕНИЕ НА СЕРОЛОГИЧНИ ДИАГНОСТИЧНИ МЕТОДИ И ОЦЕНКА НА ТЯХНОТО ЗНАЧЕНИЕ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СТАДИЯ НА ТОКСОКАРНАТА ИНВАЗИЯ ПРИ ХОРАТА“

Научен ръководител: Доц. д-р Искра Георгиева Райнова, дм, Национален център по заразни и паразитни болести, гр. София. Отдел „Паразитология и тропическа медицина“

Нямам общи публикации и нямам конфликт на интереси от друг характер по смисъла на ал. 1, т. 3 от ДР на ЗРАСРБ с докторанта

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Елеонора Кънева е завършила средното си образование в СОУ с разширено изучаване на биология и химия през 1994 г. в гр. Плевен, и висшето си – в Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет през 1999 г. Дипломира се с образователно-квалификационна степен „Магистър“ по специалността „Молекулярна биология“ и с професионална квалификация „Молекулярен биолог“, специализация „Вирусология“. През 2006 г. започва работа в Националния център по заразни и паразитни болести, гр. София, Отдел „Паразитология и тропическа медицина“ (ОПТМ) на длъжност „Биолог“, каквато изпълнява и понастоящем. Професионално е ангажирана в производството на диагностични тестове и среди, използвани в медицинската паразитология, участва в диагностичния процес на паразитните заболявания, асистира при провеждането на курсове по линия на СДО. През 2016 г. е зачислена по докторска програма „Паразитология и хелминтология“ в самостоятелна форма на обучение в Отдел „Паразитология и тропическа медицина“ в Националния център по заразни и паразитни болести, гр. София. Избраната темата за дисертационен труд е: *„Разработване и приложение на серологични диагностични методи и оценка на тяхното значение за определяне на стадия на токсокарната инвазия при хората“*, като тя е съобразена с професионалните умения и квалификация на дисертантката. Процедурата по предварително разглеждане на дисертационния труд е проведена на 17. 10. 2019 г. пред разширен колегиум на ОПТМ, като членовете единодушно приемат готовността му за защита пред Научно жури.

2. Обща характеристика на дисертационния труд

Дисертационният труд е структуриран, съгласно Правилника за приложение на ЗРАСРБ при НЦЗПБ, гр. София. Написан е на 208 стандартни страници и съдържа десет глави: въведение (1 страници); литературен обзор (35 страници); цел и задачи (1 страници); собствени проучвания: материал и методи (13 страници), резултати от собствени проучвания (79 страници); обсъждане на получените резултати (32 страници); заключение (2 страници); изводи (2 страници), приноси (1.5 страници); използвана литература (24 страници), публикации и участия в научни форуми, свързани с дисертацията (1 страници); резюмета на български и английски езици (5 страници). Онагледен е с 36 таблици и 54 фигури. Библиографската справка съдържа 306 заглавия.

3. Актуалност на тематиката

През последните години зоонозните заболявания обхващат все по-голям диапазон от неразрешени проблеми в човешката патология. Причините за този мащабен процес са разнообразни: променящи се територии на разпространение, нови взаимоотношения и връзки в епидемичните процеси, полиморфност на клиничните изяви, неудовлетворености, търсения и опити за прецизиране в диагностката, вариращи терапевтични възможности. Проучвайки многобройните проблеми на токсокарозата в медицинските ѝ аспекти, дисертантката и нейният научен ръководител доцент д-р Искра Райнова, адекватно и навреме си поставят научното предизвикателство да извършат поредица от изследвания, анализи и обсъждания на получените резултати и направят съответните изводи, като ги подредят в стройно конфигуриран и представен на вниманието ми дисертационен труд.

4. Познание на проблема

Задълбочените познания, с които дисертантката умело борави в работата си по написването на дисертацията си са заложили представения обширен **литературен преглед**. Информативно са представени историческите сведения за токсокарозата, таксономията, морфологията, жизнения цикъл и трансмисията на *Toxocara* spp., както и клиничните изяви на токсокарозата при човека. Подробно описани са, и съдържат научно тълкуване, както познатите, така и иновативно прилаганите лабораторно-диагностични методи, използвани с научна цел и за практическа употреба при заболяването. Те са и в основата на разработените и приложени серодиагностичните методи в дисертационния труд, с цел оценка и определяне значимостта им за диференциране стадийността на инвазията с *Toxocara* spp. От общо 306-те публикации, използвани за осветляване на проблематиката в научния проект, 10 – са от български автори, написани на кирилица и 296 – на български и чужди автори – на латиница. Ползваната научна литература, публикувана след 2000 година представлява 34% от библиографския списък.

Поставената в дисертацията **цел** е ясно изразена:

- разработване и оценка на потвърдителни серологични тестове за диагностика на токсокарозата;
- определяне на диагностичната стойност на общия IgE и на специфичните IgA антитела;
- въз основа на резултатите от тях – установяване на стадия на токсокарозата при хората.

Задачите, които са планирани за постигане на целта са 5, те са адекватно формулирани и по структура включват последователното изпълнение на основните етапи в научноизследователския проект.

Материал и методи

Използван е секреторно/екскреторен антиген, получен *in vitro* при култивиране на ларви на *Toxocara canis*. Изследваните серумни проби са от достатъчно на брой пациенти, общо 180, от които 130 - с клинични и серологични данни за токсокароза и 50 здрави лица – кръводарители (контролна група).

За имунодиагностика е работено с 4 съвременни търговски кита за *определяне на съответните специфични имуноглобулини*, произведени в Германия и Франция: (1) Имуноензимен метод (ELISA) за определяне на специфични антитоксокарни IgG антитела; (2) Имуноензимен метод (ELISA) за определяне на специфични антитоксокарни IgA антитела; (3) Имуноензимен метод (ELISA) за определяне на концентрацията на тотален серумен IgE. ELISA за определяне на антитоксокарни IgA антитела; (4) Western blot за определяне на специфични антитоксокарни IgG антитела. Приложени са поредица от *статистически методи*, избрани по целесъобразност, с възможност да бъдат приети за достоверни тези резултати, при които се установяват статистически значими разлики. Статистическите зависимости между количествените променливи са определени чрез t-тест, Anova, χ^2 , с ниво на статистическа значимост при $p < 0,05$.

Резултати и обсъждане

Представянето на **резултатите** от проучванията, тяхното **обсъждане** и съпоставка с тези, в откритите литературни източници, показват добрия аналитичен подход на дисертантката към проблематиката и адекватното ѝ боравене с научната литература. Като резултат от извършеното, са постигнати и формулираните научноизследователски цели. Стандартизирани са разработените лабораторни ELISA тестове за определяне на антитоксокарни IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 в човешки серум, посредством определяне на оптималните параметри на теста. Определени са специфичността и чувствителността на лабораторните ELISA тестове. Сред пациентите с клинични прояви на токсокароза и доказани тотални антитоксокарни IgG антитела в серума е установено, че най-често се фиксира продукция на IgG1, като рядко се установява едновременното присъствие на всички субкласове. Установена е статистическа зависимост между продукцията на антитоксокарни

IgG1 антитела с останалите IgG2, IgG3 и IgG4 субкласове. Антитоксокарни серумни IgA антитела са открити в $\frac{1}{4}$ от пациентите с токсокароза и тяхното наличие се коментира като индикация за ранния стадий на заболяването. Констатира се, че $\frac{2}{3}$ от пациентите с токсокароза имат повишено ниво на общия серумен IgE, сравнено с приетите за българската популация референтни стойности, а сред опаразитените деца с *Toxocara spp.*, нивото на серумния IgG е четири пъти по-високо. Акцентира се, че изчерпването на тоталния серумен IgE в периода между 6-ия и 9-ия месец от първото изследване дава възможност за определяне на активността на заболяването, а също така може да даде и индиректна оценка за ефективността на проведеното лечение. Статистическата обработка на данните позволява да се приеме, че продукцията на общ серумен IgE и на антитоксокарните IgG1 и IgG4 субкласове имат ключова роля в развитието на алергичен имунен отговор, насочен срещу секреторно/екскреторните антигени на *T. canis*. Налага се становището, че особена значимост в имунния отговор при токсокарозата имат специфичните IgA, IgG1, G2, G3 и G4 субкласове, както и общия серумен IgE. Изчерпването на специфичните IgA и IgG2 в периода между 9-ия и 12-ия месец след установяване на заболяването, може да бъде индикатор за хронифициране на токсокарната инвазия.

5. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Направените изводи (10), са правилно формулирани и са в съответствие с поставените цели и решени задачи и коректно отразяват получените резултати. В резултат на постигнатите научноизследователски цели, дисертантката определя **9 приноса** в дисертационния си труд. Дифенира ги като оригинални (6), с научно-приложен (2) и практически характер (1).

Приносите с оригинални и научно-приложен характер са следните:

- Разработени са стандартизирани лабораторни ELISA тестове за определяне на специфични IgG субкласове на базата на секреторно/екскреторен антиген от култивирани *in vitro* ларви на *T. canis*. Определени са оптималните параметри на тестовете и са оценени диагностичните им възможности при пациенти с токсокароза.
- При пациенти с токсокароза, в зависимост от пола им, възрастта и клиничната форма на заболяването, са установени различия в специфичния IgG субклас отговор.
- Открита е корелация между отделните IgG субкласове: субклас IgG1 има важна роля в имунния отговор при токсокарозата и IgG2 се изчерпва до една година от поставянето на диагнозата.

- Оценена е диагностичната стойност на специфичните IgA антитела при токсокарозата - поради по-бързото им изчерпване в хода на имунния отговор, отчитането на тяхната наличност в серума, дава възможност да се определи, че се касае за ранен стадий на заболяването.
- Поради изчерпването на специфичните IgA антитела и антитоксокарните IgG2 субклас антитела до една година от поставянето на диагнозата “токсокароза“, изследването им позволява разграничаване на остра от хронична токсокароза.
- Открити са взаимозависимости между продукцията на специфичните IgG субкласове, специфичните IgA и тоталните IgE антитела, които дават важна информация за хуморалния имунен отговор при токсокарозата.
- Установено е, че повишените стойности на тоталния серумен IgE при пациенти с токсокароза имат диагностична стойност
- При комплексното проследяване нивата на имунните маркери за токсокароза се констатира, че с голяма вероятност може да се определи стадия на заболяването и да се оцени ефекта от проведеното лечение.

Принос с приложен характер, е формулирането на диагностичния панел при токсокарозата и внедряването му в практиката: тестове за определяне на специфичните IgG субкласове, имунни маркери на специфични IgA и тотални IgE. Получената информация дава възможности за определяне и на схема за адекватно провеждане на терапия.

6. Оценка на личното участие на дисертантката в научноизследователската дейност и при написването на дисертационния труд

Периодът за събиране на материалите и провеждане на научноизследователската дейност е 10 години - между 2006 и 2015 година. Поради редица обективни фактори, този период едва ли би могъл да бъде по-кратък. Със зачисляването ѝ в свободна форма на докторантура през 2016 година, докторантката проявява отлични лични качества: умения за добро планиране, последователност в действията, увереност за успешното финализиране на многогодишния труд, и за период, по-кратък от определения в ЗРАСРБ, под ръководството на научния ѝ ръководител доцент д-р Райнова, дисертационният труд е завършен.

7. Претенция на публикациите по дисертационния труд

Публикациите, свързани с дисертацията са 4, от които 2 – в списания с импакт фактор: (1) Comptes rendus de l'Académie Bulgare des Sciences 2012, 65, 11, 1563-1568; IF - 0,210; (2)

Parasite Immunology, 2015, 37, 505-509; IF - 2.143 (общ IF 2.353). Участията в научни форуми са 4, от които 1 – в чужбина. Те отразяват резултатите от извършените проучвания. От общо 8 публикации и участия в научни форуми, в 7 дисертантката е първи автор, което показва ангажираността и личният ѝ принос в изработването на резултатите и написването на дисертационния труд.

Авторефератът към дисертационния труд е представен в 70 страници и коректно отразява структурата на дисертацията и основните глави от нея. Онагледен е с 19 таблици и 30 фигури. Приложени са и резюме на български и английски езици.

В предоставения ми окончателен вариант на дисертационен труд за придобиване на ОНС „Доктор“ от Елеонора Канева са взети под внимание някои от критичните ми бележки и препоръки, изложени при апробацията, провела се на колегиум в разширен състав. Последващите корекции са направени творчески, съобразно вижданията на дисертантката.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

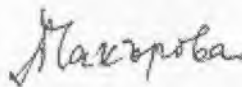
Дисертационният труд показва, че дисертантката Елеонора Кънева притежава теоретични познания и професионални умения по научната специалност „Паразитология и хелминтология“ като изявява качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване. Усвоените и приложените методи за диагностика на токсокарозата, получените резултати, съществените приноси, отразени в дисертацията, ми дават основание да считам, че така представеният научноизследователски труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за приложението му, приет в НЦЗПБ, гр. София.

Убедително давам своята **ПОЛОЖИТЕЛНА оценка** за проведените изследвания, получените резултати и приноси. Предлагам на уважаемите членове на Научното жури да присъди образователната и научна степен „ДОКТОР“ на Елеонора Маринова Кънева по научната специалност „Паразитология и хелминтология“, професионално направление: 4.3. Биологически науки.

9. 12. 2019 г.

гр. Стара Загора

Рецензент:



Доц. д-р Борислава Георгиева Чакърова, дм