Р Е Ц Е Н З И Я

на Доцент д-р Виолина Генова Боева – Бангъозова, дм

Относно: дисертационния труд на д-р Ирина Бориславова Маринова – гл. асистент в Отдела по "Паразитология и тропическа медицина" при НЦЗПБ – МЗ, София за присъждане на образователна и научна степен "доктор" на **тема: „Разработване и характеристика на потвърдителни серологични методи за диагностика на ехинококозата при хората и провеждане на имуноскринингово проучване за скритата опаразитеност"**

1. По актуалността и значимостта на темата.

Въпреки, че по проблемите на ехинококозата при човека в България са защитени най-много дисертационни трудове (над 18 броя, от които болшинството са от хирурзи и само 4 от паразитолози – 3 кандидатски и 1 докторска) все още ехинококозата продължава да бъде водещ медико-социален и икономически проблем за страната ни. Има още много какво да се желае за подобряване на ранната диагностика, за усъвършенстване на хирургичното и медикаментозно лечение, за намаляване на постоперативните рецидиви, за откриване на скритата заболяемост и др. Това личи и от годишният анализ на заболяемостта от паразитози (Курдова.Р. и колектив, 2009) където се отбелязва, че от страните в ЕС, България е с най-високата заболяемост - 6%ооо (за 2007 г.) и 5.1%ооо (за 2008 г.). Изключително сериозна тревога буди и нарастването на относителния дял на децата (0-19 г.) поразени от ехинококоза -21.46%, което е сигнал, че мерките спрямо източника на зараза са неефективни и това обосновава необходимостта от продължаване на националната програма. Отговорната административна общественост и МЗГХ не изпълняват задълженията си по борбата с ехинококозата (остава нерешен въпроса с бездомните кучета, 2/3 от територията на страната ни са без екарисажи; липсва ветеринарно-санитарен контрол при клането на животни в личните стопанства, не се налагат санкции на нарушителите и мн.др.).

Извършената здравна реформа у нас има негативно отражение върху борбата с паразитозите въобще и особено при ехинококозата. ОПЛ нямат достатъчна насоченост по този проблем, не назначават паразитологични изследвания на суспектните лица и закъсняват с ранното диагностициране на ехинококозата. Все още има какво да се желая за подобряването и на имунодиагностиката при ехинококозата. Използваните у нас ежедневно първични имунологични тестове за диагностика на ехинококозата, дават често кръстосана реактивност. Досега в България не са прилагани съвременни потвърдителни тестове с висока специфичност и чувствителност. Постиженията на молекулярната епидемиология в края на 20- ти век позволиха да се установят 10 щама при *E. granulosus*. На този етап в нашата страна не бяха извършвани проучвания върху генотипната принадлежност на болните с доказана ехинококоза. Изхождайки от гореизложеното считам, че темата на дисертационния труд е избрана много сполучливо, защото тя е много актуална и значима.

2. По структурата на дисертацията.

Дисертацията е структурирана съгласно Правилника на НЦЗПБ за приложение на ЗРАС и се състои от въведение, литературен обзор, цел и задачи, собствени проучвания (в т.ч. материали и методи), резулати и обсъждане, заключение, изводи, приноси и литература. Написана е на 159 страници, илюстрирана с 39 таблици и 29 фигури. Литературният списък включа 204 заглавия в т.ч. 166 на латиница и 38 на кирилица.

3. Литературна осведоменост.

В дисертациония труд на д-р И. Маринова са реферирани общо 204 научни публикации, в по-голямата си част (над 67%) публикувани през последните две десетилетия, както български (15), така и на водещи автори от чужбина (123). Литературният обзор включва публикации на изтъкнати автори в тази насока и в реномирани научни списания. Той дава възможност да се разберат постигнатите досега съвременни научни и практични постижения, а също така насоките в които следва да се развива научното дирене в областта на имунодиагностиката на ехинококозата при хората, за ранното и активно откриване на скритата опаразитеност при тази хелминтозооноза.

Считам, че дисертантката е много добре запозната с постиженията на световната паразитологична наука и практика, публикациите и изследванията у нас и в чужбина. Тя правилно, на бзата на научни доказателства оценява състоянието на проблема и в каква насока да проведе проучването на някои от нерешените въпроси по диагностиката и скрининговите изследвания при ехинококозата. Тези нейни виждания са формулирани като цел и задачи на дисертационната й тема.

4. Цел и задачи

Основната цел и задачи на дисертацията са ясно и добре формулирани, научно обосновани и изпълними. За реализиране на целта дисертантката си е поставила 5 задачи за изпълнение. Считам, че като съдържание целта и задачите показват добре обоснован подход за тяхната реализация.

5. Оценка на използваните методи и материали.

За подбор на подходящ антиген в реакцията Western blot са изследвани 10 човешки ехинококови течности от кисти на местни щамове на *E. granulosus*. Изследвани са 9, 265 човешки кръвни серуми, от тях (265 от лица с доказана ехинококоза, 194 от пациенти с други паразитози, 300 здрави лица и 8506 обхванати при имуноскрининга). В проучването са използвани утвърдени рутинни микроскопски методи, за фертилност и стерилност на ехинококовите течности, използвани като антиген; два метода за обработка на антигена; спектрофотометричо определяне на белтъчното съдържание на използваните антигени; полиакриламид-гел електрофореза (SDS-PAGE); Приложен е ензимосвързан имуносорбентен тест (ELISA) за откриване на IgG антитела срещу *E. granulosus* на две различни фирми (БулБио-НЦЗПБ и R-Biopharm). Използван е количествен метод за откриване на анти-ехинококови IgE в серума чрез автоматизираната система ImmunoCAP. Разработен е собствен лабораторен Western blot, който е сравнен с търговския кит за Echinococcus Western bot IgG.

Проведен е имуноскрининг сред хората в 8 области на страната – Бургас, Варна, Плевен, Пловдив, Сливен, Стара Загора, Хасково и Ямбол. Първоначално серумите са изследвани в РИОКОЗ с ELISA (БулБио) в едно разреждане 1:400, като първичен метод. След което всички положителни проби са тествани в НЦЗПБ с ELISA (Ridascreen) като втора първична реакция и Western blot като потвърдителен метод. За достоверност получените резултати са обработени статистически чрез софтуерна програма SPSS 15.0 for Windows, с изключение за ROC анализа за който е използвана програмата MedCalc. Приложени са и следните статистически методи: анализ на честотното разпределение, методи на Стюдент (t- тестове); проверка на статистически хипотези чрез непараметрични методи.

Преценката ми за този раздел е, че като методичен набор за изследването (традиционни и нови) значителен е общия брой на изследвания контингент – като различни възрастови и рискови групи, пациенти с различна органна локализация на ехинококовите кисти; получен е антиген от местен щам на *E. granulosus* и е разработен и оценен лабораторен Western blot; изследвани са серумните анти-ехинококови IgE,

Всичко това потвърждава, че изследванто е на съвременно научно ниво и получените резултати, обработени статистически на софтуерна програма, позволяват да се правят достоверни анализи, обобщения, заключения и научно-обосновани изводи.

6. Оценка на получените резултати и тяхната научна стойност.

Получените научни резултати и тяхното обсъждане в светлината на известните в литературата данни са изложени в 5 основни глави на дисертацията на 82 страници. В прегледен и добре оформен табличен вид и фигури са дадени сведения за резултатите от имуноскрининга сред изследваните контингенти, а при лицата с доказана ехинококоза отделно по възрастови групи и в зависимост от органната локализация на ехинококовата киста. Имунологичните резултати и особено полученият антиген от местен щам на *E. granulosus* и разработеният лабораторен Western blot, сравнен с търговския кит на Western blot, дават данни които разширяват знанията в област за която литературните източници са малко, особено количественото откриване на анти-ехинококови IgE в серума чрез автоматизираната система ImmunoCAP. Епидемиологичният спектър на проблема показва скрита опаразитеност (екстензинвазия) - 0.68% при реализираният имуноскрининг, като най- поразени са младите възрастови групи (20-29 г. и от 0 -19 г.), следвани от тези на 40-49 г., а най- малко от горната възраст, над 80 г. Тук трябва да изтъкна още веднаж широката литературна осведоменост на дисертантката върху проблема и умението й да анализира, сравнява и обобщава получените резултати с данните и изводите на наши и чуждестранни автори.

Основните научни приноси, според моето виждане могат да се резюмират в следната последователност:

1. Проучени са местни изолати на E. granulosus, от които е получен и използван антиген на *E. granulosus* от местния щам (G_1). Той е използван за разработването и получаването на лабораторен Western blot.. Тези проучвания, са оригинални и се правят за първи път у нас.
2. Сравнени са диагностичните стойности (чувствитеност и специфичност) на лабораторния Western blot с търговския кит на Western blot, като е получена оригинална информация за фракците в Western blot на местния щам (G_1).
3. За пъви път в България е разработен, стандартизиран и внедрен в практиката потърдителен лабораторен метод Western blot за диагностиката на ехинококозата при хората с антиген от местен щам на *E. granulosus*.
4. Установената характеристиката на бандовете в Western blot при ехинококоза, според органната локализация на кистите и тяхните размери допълват научните познания в тази област.
5. Оценен е и внедрен количествен тест за изследване на серумни специфични IgE при ехинококозата чрез автоматизираната система ImmunoCAP. Получените резултати имат оригинален характер, защото се извършват за първи път в България и в тази насока има малко публикации в чуждата литература.
6. Установено е, че Western blot е значително по-добър метод за потвърдителна диагностика на ехинококозата и не може да бъде изместен от ImmunoCAP за доказване на анти-ехинококовите IgE. Последният е подходящ при данни за кръстосана реактивност и за допълнитлна реакция при нееднозначни резултати. Тези резултати също имат оригинален характер за страната ни.
7. Извършен е имуноскрининг на ехинококозата сред определени контингенти лица в 8 области на страната със съвремени имунологични методи: първичен тест (ELISA - БулБио) и потвърдителени (ELISA – вносен кит от Франция) + Western blot. Установена е скрита опаразитеност в цялата извадка – ЕИ (0.68%), което потвърждава, че има активен източник на заразата и сочи полезността от масовия серологичен скрининг за ранното и активно откриване на тази хелминтозооноза.

Получените резултати имат научно-приложен характер и успешно могат да послужат при стартирането на бъдещите национални и регионални профилактични програми.

Във връзка с дисертационния си труд д-р Маринова е публикуала **7** работи, от които първи автор е в 5, като **2** от тях са с **Impact factor** (1 в издание на БАН от 2010 и 1 – под печат в Parasite Immunology, 2011). Има 5 научни внедрявания, от които на 3 е първи автор. Реализирала е **7** участия с доклади в научни форуми по темата, от които 2 в чужбина. Отличена е с награда - сертификат, за най- добър постер на млад учен на 12.11.2004 от Българското научно паразитологично дружество в София.

Заключението е аналитично, доста подробно и обобщаващо получените резултати, като дава пълна представа за извършената изследователска работа. Изводите от получените резултати в изследването и направените анализи са формулирани в 10 пункта и съотвестват на поставените задачи и крайната цел.

Критични бележки и препоръки:

• Литературният обзор е голям по обем (26 страници). Би трябвало да бъде написан по- кратко и синтетично, съгласно Правилника за приложението на ЗРАС.

• На стр.121, не съм напълно съгласна с обяснението, че видът *E. multilocularis* официално не е регистриран сред хората. Досега в България са публикувани 5 случаи на алвеококоза сред хората и не са официално опровергани. Последната такава публикация е от Й. Бръчкова (1999) – патологоанатом от ВМИ-Плевен. Наредбата №21 на МЗ „За реда за регистрация, съобщаване и отчет за заразните болести" е от 18.07. 2005 г. Препоръчвам бъдещите проучвания на д-р Маринова да бъдат насочени и към търсене на алвеококоза.

• В резултатите от имуноскрининга серопозитивните не са анализирани по местоживеене (град, село). Прави впечатление преобладаващият по-голям брой изследвани лица по-желание, а не на рисковите контингенти, а така също и на тези от женски пол, което според мен най- вероятно се дължи на обективни организационни пречки възникнали в хода на реформиращото ни се здравеопазване.

• Заключението е доста голямо (4½ страници) при наличието на изводи и на места в него се дублират данните от раздела „Резултати и обсъждане".

Тези забележки не засягат по същество получените резултати и в никакъв случай не омаловажават достойнствата на дисертационния труд.

Кратки данни за дисертантката

Д-р Ирина Маринова е родена на 06. 09.1976 г. Завършва МУ- София през 2000 г. Тя има общ трудов стаж 6 години. Професионалният й маршрут започва като педиатър в МБАЛ- Пирдоп (15.10. 2001 г. до 14.01. 2002), а след това неонатолог в СБАЛАГ „Св. София" (15.01.2002 -19.02.2002 г). Специализира 1 година микробиология в Катедрата по микробиология към МФ – София. От м.Х.2003 г. – 2007 г. е зачислена като докторант по мед. паразитология в НЦЗПБ, а по-късно от 01.08. 2005 г. до 30.11.2008 г. е назначена като ординатор в ОПТМ. След успешно издържан конкурс (от 1.12. 2008 г.) работи като н.с.II ст. (понастоящем гл. асистент в същият отдел). В момента е докторант на самостоятелна подготовка. Притежава специалност по мед. паразитология (от 2006 г.) и много добра компютърна грамотност. Владее много добре (писмено и говоримо) италиянски и английски езици.

Заключение. Представеният дисертационен труд на гл. ас.д-р Ирина Бориславова Маринова третира един изключително актуален за страната ни медико-социален проблем. Трудът е лично дело на дисертантката с изключение на масовия имуноскрининг, проведен свместно с други специалисти. Разработен е чрез използването на широк набор от морфологични, имунологични, клинични и епидемиологични методи. Същият е написан на добре издържан литературен език и онагледен с таблици и фигури. Научните резултати са убедително документирани и добре

аргументирани. Приемам като достоверна справката за научните приноси. На основание **чл. 32** от Правилника за приложение на **ЗРАС** и от гореизложеното становище давам **положителна оценка** за присъждането на образователната и научна степен „доктор" на **д-р Ирина Бориславова Маринова.**

03.06.2011 г. Изготвила: Доц. д-р Виолина Боева-Бангьозова, дм
С о ф и я

½