

СТ А Н О В И Щ Е

от проф.д-р Мария Петрова Георгиева – Средкова, дм
Научноизследователски институт
Медицински университет – Плевен

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Професионално направление : 4.3 Биологични науки

Докторска програма: Медицинска биология

Автор: Александър Божидаров Блажев

Форма на докторантурата: самостоятелна подготовка

Катедра: Анатомия, хистология, цитология и биология

Тема: „Проучване на заразеността с *Borrelia burgdorferi sensu lato* при иксодови кърлежи в Плевенска област“

Научни ръководители: Проф. д-р Милена Карчева, д.м. и
Доц. Милена Атанасова, д.б., Медицински университет-Плевен

Представяне на кандидата

Александър Божидаров Блажев завършва с магистърска степен Биологически факултет при ПУ „Паисий Хилендарски“, Пловдив през 1999 г. От 2002 г. до настоящия момент е асистент в сектор „Биология“ при катедрата по Анатомия, хистология, цитология и биология при Медицински университет – Плевен.

През м.септември 2018 г. е зачислен в докторска програма по Медицинска биология като докторант на самостоятелна подготовка. През 2022 г. е отчислен от докторантура със заповед на Ректора на Медицински университет - Плевен (№3143/10.10.2022 г.). На 31.03.2023 г. дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за официална защита от разширен Катедрен съвет на катедра по Анатомия, хистология, цитология и биология при МУ-Плевен.

Актуалност на тематиката

Въпреки постигнатите големи успехи в изучаването на етиологията,

епидемиологията, клиничната презентация, диагностиката и терапията на Лаймската борелиоза, тя продължава да се счита за сериозен здравен проблем. Все още значителен дял от случаите с тази инфекция остават с неизяснена етиология, което налага търсенето на нови подходи в микробиологичната диагностика и превенцията.

Въвеждането на надеждни методи за детекция на борелиите в иксодовите кърлежи ще подпомогне диагностиката и ще позволи създаване на база данни за носителството на *B.burgdorferi* s.l. в тяхната популация, което ще допринесе за по-задълбочено епидемиологично проучване и предприемане на адекватни мерки срещу разпространението на Лаймската борелиоза.

В нашата страна до този момент са провеждани само частични проучвания за оценка на носителството на *B.burgdorferi* s.l. и инфекциозния потенциал на кърлежовите популации. Подобни проучвания не са извършвани в Централна Северна България, въпреки нарастването на регистрираните случаи с Лаймска борелиоза в последните години, и това определя разработвания дисертационен труд като много актуален в научен и научно-приложен аспект.

Познаване на проблема

Докторантът е много добре запознат с биологията на *B.burgdorferi* s.l., биологията и екологията на иксодовите кърлежи, сложното взаимодействие между борелиите и кърлежите, епидемиологията, клиничната изява, диагностиката и профилактиката на Лаймската борелиоза, което му дава възможност да анализира много добре резултатите от собствените проучвания.

Методика на изследването

За постигане на поставената цел и решаване на свързаните с нея задачи е използван съвременен методологичен подход, който позволява получаване, оценка и анализ на коректни резултати.

Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е в обем 175 стандартни машинописни страници. Той включва: титулна страница; съкращения – 2 страници; въведение – 2 стр.; литературен обзор - 39 стр.; цел и задачи – 2 стр.; материали и методи – 26 стр.; резултати - 50 стр., обсъждане – 26 стр.; изводи и приноси – 3 стр. Онагледен е с 29 таблици, 37 фигури и 13 епизоотологични карти.

Библиографията включва 283 литературни източника, от които 49 (17.3%) са от последните 5 години.

Литературният обзор е написан компетентно на базата на обширна литературна справка. Структурата му корелира с поставените цел и задачи на дисертационния труд. Обзорът завършва с формулиране на нерешените проблеми в тази област, които отразяват същността на разработения труд.

Целта на дисертационния труд е формулирана точно. Произтичащите от нея 8 задачи съответстват на темата и тяхното изпълнение води до постигане на поставената цел.

В раздел *материали и методи* е представена информативна схема на дизайна на проучването. Описани са използваните методи за събиране и идентифициране на иксодовите кърлежи, определяне на тяхната плътност и честотата на активно търсещите индивиди, и методите за картографиране на установените огнища с кърлежови популации в проучваните райони. Точно и подробно са описани методите за детекция на *B.burgdorferi* s.l. в иксодовите кърлежи. Освен класическото микроскопско изследване в тъмно зрително поле, е използван и съвременен молекулярно-генетичен метод (Nested PCR) с висока чувствителност. Статистическият анализ на резултатите е извършен с много добре подбрани съвременни методи, което позволява да се формулират коректно изводите и приносите от проучването.

Резултатите от собствените проучвания на асистент Александър Блажев са представени и онагледени много добре и тяхното описание отговаря на поставените задачи. Получените резултати от ретроспективното епидемиологично проучване показват по-висока от средната за страната заболяемост от Лаймска борелиоза в област Плевен. Установено е, че *Ixodes ricinus*, който е основен преносител на инфекцията е доминиращ вид в иксодофауната в областта. Максималната плътност и честота на активно търсещите кърлежи от този вид е в периода от април до края на месец май при оптимална температура 20°C и влажност на въздуха 60%. Сравнителният анализ за чувствителността на микроскопското изследване в тъмно зрително поле и nPCR за детекция на *B.burgdorferi* s.l. сочи, че въпреки липсата на пълно съвпадение на получените резултати, тези два метода приложени самостоятелно или заедно, могат да се използват успешно за оценка на инфектираността на кърлежите. Доказана е висока инфектираност (над 60%) в огнище с голяма плътност на кърлежите. Липсват различия в честотата на разпространение на кърлежите в районите, в които се прилагат и не се прилагат мерки за обезпаразитяване. На базата на получените

резултати са изработени 13 епизоотологични карти, извършен е екологичен анализ за местообитанията на кърлежите и тяхната инфектираност с *B.burgdorferi* s.l., и е извършена оценка на риска от заразяване на населението в района на Плевен.

Обсъждането и интерпретацията на получените резултати е извършено задълбочено и професионално . Анализът на всички резултати е съпоставен с данните от литературата, включително данните за страната,, което показва отлично познаване на проблема.

Изводите отразяват достоверно получените резултати и съответстват напълно на поставената цел и задачи.

Формулирани са общо 13 приноса, осем от които са с оригинален характер и пет са с потвърдителен характер. Като цяло дисертационният труд има принос за обогатяване на съществуващите знания в областта на екологията и епидемиологията на *B.burgdorferie.s.l.*

Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Във връзка с дисертационния труд са отпечатани 3 публикации, от които една в списание с IF, една в списание с SJR и една в българско реферирано списание . Във всичките три публикации асистент Блажев е първи автор, което показва неговата водеща роля и е доказателство, че дисертационният труд е негово лично дело. Докторантът има 7 участия на научни форуми в страната, едно участие във форум в чужбина и едно участие в научноизследователски проект. Тази висока научна активност покрива изцяло критериите за образователна и научна степен “Доктор“

Нямам бележки и препоръки към дисертационния труд.

Лични впечатления

Познавам асистент Блажев от съвместната ни работа във Вирусологична лаборатория на МУ-Плевен по време на пандемията с COVID-19. Впечатлена съм от неговия професионализъм и отговорност при провеждане на PCR изследванията, и от умението му да работи в екип.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на асистент Александър Божидаров Блажев отговаря напълно на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и

Правилника на МУ-Плевен. Представените материали и резултати от дисертационния труд съответстват на специфичните изисквания на МУ-Плевен.

Дисертационният труд показва, че докторантът Александър Божидаров Блажев притежава задълбочени теоретични познания и професионални умения по научната специалност „Медицинска биология“, и е способен самостоятелно да провежда научни изследвания

Предвид гореизложеното, **давам положителна оценка** на дисертационния труд и предлагам на почитаемото научно жури **да присъди образователна и научна степен „Доктор“** на асистент Александър Божидаров Блажев в докторска програма по Медицинска биология.

22.05.2023 г.

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

Проф.д-р Мария Петрова Георгиева–Средкова,дм



DIALOGUE PLUS LTD

CONFERENCE INTERPRETERS, TRANSLATORS,
INFORMATION SPECIALISTS

OFFICE: 1000 Sofia, 22 Venelin Str., Tel.: (+359 2) 980 54 46

Fax: (+359 2) 986 28 51 E-mail: dialog@dialog-bg.com, www.dialog-bg.com

Translation from Bulgarian

REVIEW

by Prof. Mariya Petrova Georgieva-Sredkova, MD, PhD

Scientific Research Institute

Medical University - Pleven

of a dissertation for awarding the educational and scientific degree of Doctor,

Professional field: 4.3 Biological sciences

Doctoral program: Medical Biology

Author: Alexander Bozhidarov Blazhev

Form of doctoral studies: Independent study

Department: Anatomy, Histology, Cytology and Biology

Topic: Investigation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in ixodid ticks in the Pleven region

Scientific supervisors: Prof. Milena Karcheva, MD, PhD and

Assoc. Prof. Milena Atanasova, PhD(BS), Medical University - Pleven

Introduction of the candidate

Alexander Bozhidarov Blazhev graduated with a master's degree from the Faculty of Biology at "Paisii Hilendarski" Plovdiv University in 1999. Since 2002 to the present, he is an Assistant in the Sector of Biology at the Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology at Medical University - Pleven.

In September 2018, he was enrolled in the Medical Biology doctoral program as an independent doctoral student. In 2022, he was dismissed from doctoral studies by order No. 3143/10/10/2022 of the Rector of Medical University - Pleven. On 31/03/2023, the dissertation was

discussed, approved and referred for official defense by the expanded Departmental Council of the Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology at MU - Pleven.

Actuality of the topic

Despite the great successes achieved in the study of etiology, epidemiology, clinical presentation, diagnosis and therapy of Lyme borreliosis, it continues to be considered a serious health problem. Still, a significant proportion of cases with this infection remain with an unclear etiology, which necessitates the search for new approaches in microbiological diagnostics and prevention.

The introduction of reliable methods for the detection of *Borrelia* in ixodid ticks will support the diagnosis and allow the creation of a database on the carriage of *B.burgdorferi* s.l. in their population, which will contribute to a deeper epidemiological study and adequate measures against the spread of Lyme borreliosis.

In our country, until now, only partial studies have been conducted to evaluate the carriage of *B.burgdorferi* s.l. and the infectious potential of tick populations. Similar studies have not been carried out in Central Northern Bulgaria, despite the increase in registered cases of Lyme borreliosis in recent years; this defines the developed dissertation as very relevant in scientific-research and scientific-applied aspects.

Knowledge of the topic

The doctoral student is very well versed in the biology of *B.burgdorferi* s.l., the biology and ecology of ixodid ticks, the complex interaction between *Borrelia* and ticks, the epidemiology, clinical presentation, diagnosis and prevention of Lyme borreliosis, which enables him to analyze very well the results of his independent studies.

Research methodology

In order to achieve the set objective solve the related tasks, a modern methodological approach was used, which allows obtaining, evaluating and analyzing correct results.

Characterization and evaluation of the dissertation

The dissertation has 175 standard typewritten pages. It includes: title page; abbreviations – 2 pages; introduction – 2 pages; literature review - 39 pages; objective and tasks - 2 pages; materials and methods – 26 pages; results - 50 pages; discussion - 26 pages; conclusions and contributions - 3 pages. It is illustrated with 29 tables, 37 figures and 13 epizootiological maps.

The bibliography includes 283 literature sources, of which 49 (17.3%) are from the last 5 years.

The literature review is competently written, based on an extensive literature reference. Its structure correlates with the set objective and tasks of the dissertation. The review ends with the formulation of the unresolved issues in this area, which reflect the essence of the developed work.

The objective of the dissertation is precisely formulated. The resulting 8 tasks correspond to the topic and their completion leads to achieving the set objective.

In the *Materials and methods* section, an informative scheme of the study design is presented. The methods used to collect and identify ixodid ticks, to determine their density and the frequency of actively lurking ticks, and the methods for mapping the established foci with tick populations in the studied areas are described. The methods for detecting *B.burgdorferi* s.l. in ixodid ticks are described accurately and in detail. In addition to the classic microscopic examination in a dark field of view, a modern, high sensitivity molecular genetic method (Nested PCR) was also used. The statistical analysis of the results was carried out with very well-chosen modern methods allowing correct formulation of the conclusions and contributions of the study.

The results of Assist. Prof. Alexander Blazhev's independent research are presented and illustrated very well, and their description corresponds to the tasks set. The results obtained from the retrospective epidemiological study show higher than the national average incidence of Lyme borreliosis in the Pleven region. It was established that *Ixodes ricinus*, which is the main carrier of the infection, is the dominant species in the ixodofauna in the region. The maximum density and frequency of actively lurking ticks of this species is in the period from April to the end of May at an optimal temperature of 20°C and air humidity of 60%. The comparative analysis of the sensitivity of dark field microscopy and the nPCR for detecting *B.burgdorferi* s.l. indicates that, despite the lack of complete coincidence of the obtained results, these two methods, applied alone or together, can be successfully used to estimate the infectivity of ticks. A high infectivity (over

60%) has been proven in a focus with high density of ticks. There were no differences in the prevalence of ticks in areas with and without deworming measures. Based on the obtained results, 13 epizootiological maps were made, an ecological analysis of tick habitats and their infectivity with *B.burgdorferi* s.l. was performed, as well as an assessment of the risk of infection of the population in the Pleven region.

The discussion and interpretation of the obtained results was carried out thoroughly and professionally. The analysis of all the results is compared with the literature data, including these for the country, which shows an excellent knowledge of the topic.

The conclusions reliably reflect the obtained results and fully correspond to the set objective and tasks.

A total of 13 contributions were formulated, eight of which were of an original nature and five of a confirmatory nature. In general, the dissertation contributes to the enrichment of existing knowledge in the field of ecology and epidemiology of *B.burgdorferi*.s.l.

Assessment of the doctoral student's publications and personal contributions

In relation to the dissertation, 3 articles were published, one in a journal with an IF, one in a journal with a SJR and one in a Bulgarian peer-reviewed journal. In all three publications, Assist. Prof. Blazhev is the first author, which shows his leading role and is proof that the dissertation is his personal work. The doctoral student has 7 participations in scientific forums in the country, one participation in a forum abroad and one participation in a scientific research project. This high scientific activity fully covers the criteria for the educational and scientific degree of Doctor.

I have no remarks and recommendations for the dissertation.

Personal impressions

I know Assist. Prof. Blazhev from our joint work at the Virology Laboratory at MU - Pleven during the COVID-19 pandemic. I am impressed by his professionalism and responsibility in conducting the PCR tests, and by his ability to work in a team.

CONCLUSION

The dissertation of Assist. Prof. Alexander Bozhidarov Blazhev fully meets the requirements of the Act on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria, the Regulations for its application and the Regulations of MU - Pleven. The presented materials and results of the dissertation correspond to the specific requirements of MU - Pleven.

The dissertation shows that the doctoral student Alexander Bozhidarov Blazhev has in-depth theoretical knowledge and professional skills in the scientific specialty of Medical Biology and is capable of independently conducting scientific research.

In view of the above, I give a positive assessment of the dissertation and propose to the honorable scientific jury **to award the educational and scientific degree of Doctor to Assist. Prof. Alexander Bozhidarov Blazhev in the doctoral program of Medical Biology.**

May 22, 2023

Reviewer:

Prof. Mariya Petrova Georgieva-Sredkova, MD, PhD

I, the undersigned Anastasia Papazian, hereby certify the correctness of the translation made by me from Bulgarian into English of the attached document: Review. The translation contains (5) five pages.

Translator:

