

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ПЛЕВЕН
ФАКУЛТЕТ „ОБЩЕСТВЕНО ЗДРАВЕ”
КАТЕДРА „ИНФЕКЦИОЗНИ БОЛЕСТИ, ЕПИДЕМИОЛОГИЯ,
ПАРАЗИТОЛОГИЯ И ТРОПИЧЕСКА МЕДИЦИНА”

Д-Р ЛЮДМИЛ СТЕФАНОВ СТОЯНОВ

РОЛЯТА НА *BLASTOCYSTIS SP.* И *TOXOCARA SPP.*
КАТО ПАРАЗИТНИ АЛЕРГЕНИ:
ДИАГНОСТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ОСТРА
И ХРОНИЧНА СПОНТАННА УРТИКАРИЯ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Професионално направление: 7.1. Медицина
Докторска програма: „Медицинска паразитология и
хелминтология”

Научен ръководител: Доц. д-р Ивелин Ангелов, дм

Официални рецензенти:
Проф. д-р Искра Райнова, дмн
Доц. д-р Румен Харизанов, дм

ПЛЕВЕН
2025 г.

Дисертационният труд се състои от 152 страници и е илюстриран с 19 фигури и 12 таблици. Библиографската справка съдържа 214 литературни източници, от които 9 на кирилица и 205 на латиница.

Дисертационния труд е обсъден и предложен за защита на разширен катедрен съвет на катедра „Инфекциозни болести, епидемиология, паразитология и тропическа медицина” на 20. 06. 2025 г. - Протокол № 43/20.06.2025 г.

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на Медицински Университет - Плевен: www.mu-pleven.bg

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 24.10.2025 г. от 13:00 ч в зала Амброаз Паре, съгласно Заповед на Ректора на МУ - Плевен № 2089 пред научно жури в състав:

Външни за МУ - Плевен:

1. Проф. д-р Искра Георгиева Райнова, д.м.н.
2. Доц. д-р Румен Ненков Харизанов, д.м.
3. Доц. д-р Димитър Иванов Вучев, д.м.

Резервен член: Доц. д-р Борислава Георгиева Чакърова, д.м.

Вътрешни за МУ - Плевен:

1. Проф. д-р Милена Димитрова Карчева, д.м.
 2. Проф. д-р Ивелина Аспарухова Йорданова, д.м.
- Резервен член: Доц. д-р Таня Петкова Иванова, д.м.

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ:

ЕСР - Еозинофилен катионен протеин

ELISA - Enzyme linked immunosorbent essay

IgE - Имуноглобулин E

IgG - Имуноглобулин G

IU/ml - интернационални единици на милилитър

PCR - Polymerase chain reaction

SR - Sample Ratio

ST - Субтип

ДКЦ - Диагностично-консултативен център

ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина

ОУ - остра уртикария

ФЕМ - Формалин-етеров метод

ХСУ - хронична спонтанна уртикария

ЦНС - Централна нервна система

I. Въведение

Алергичните заболявания са едни от най-често срещаните в човешката патология и през последните години се наблюдава увеличение на заболяемостта от тях, особено в развитите страни. Механизмите и ролята на факторите на околната среда участващи в патогенезата на алергичните заболявания са все още неясни. Поради честото протичане на паразитозите с уртикария различни автори търсят възможна връзка между двете групи заболявания. Токсо-алергичният механизъм на увреждане при паразитозите е част от сложните патологичните процеси реализирани по време на инвазионния процес. Отделените продукти от жизнената дейност на паразитите и сложните имунопатологични реакции възникващи по време на болестния процес са част от причините за системната алергизация на организма на заразения човек. Честото откриване на вакуолни форми на *Blastocystis sp.* и на антитоксокарни IgG антитела при изследването на пациенти с уртикария ни даде основание да проучим ролята на тези два паразита като алергени.

Blastocystis sp. е често срещан анаеробен протозой, паразитиращ в лумена на дебелото черво на хората и животните. Клиничната проява на бластоцистозата варира от асимптомно носителство до различни по тежест гастро-интестинални и/или алергични прояви. Паразитът се представя в 34 субтипа (ST), като се смята, че генетичното му разнообразие определя клиничната проява на заболяването. По литературни данни, *Blastocystis sp.* е най-често откривания чревен паразит при пациенти с клинично изявена алергия, а развитието на алергична симптоматика е асоциирано с опаразитяване с ST3. По-рядко са описвани случаи на уртикария при пациенти опаразитени със ST1 или ST4. Предполага се, че

съществуват алелни различия във всеки от субтипозете на паразита, които биха могли да обяснят разликите в клиничните прояви на заболяването причинено от един и същ субтип.

Токсокарозата е хелминтно зоонозно заболяване причинено от миграцията на ларвите на *Toxocara canis* и *Toxocara cati* в организма на заразения човек. Заболяването се проявява в няколко клинични форми: вицерална, очна, токсокароза на ЦНС, обикновена и скрита токсокароза. По време на миграцията ларвите отделят екскреторно-секреторни антигени, които водят до алергизация на гостоприемника. Отделените антигени стимулират синтеза на имуноглобулин Е, развитието на периферна еозинофилия и локална секреция на еозинофилни протеини около паразитните ларви. Този процес се извява с развитието на астма-подобна симптоматика, уртикария и други алергични реакции.

В нашето проучване анализирахме честотата на опаразитяване с *Blastocystis sp.* и *Toxocara spp.* сред хоспитализирани болни пациенти с уртикария. Проучихме генотиповото разнообразие на *Blastocystis sp.* при пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария. Изследвахме промените в нивата на общия IgE и еозинофилния катионен протеин (ЕСР) и взаимовръзката им с нивата на антитоксокарните антитела при пациенти с уртикария.

Получените от нас резултати ще подпомогнат медицинските специалисти в ранното откриване на случаите на „скрита“ паразитоза протичаща като остра и хронична спонтанна уртикария. Те ще позволят да се определи необходимостта от етиологично лечение, което ще благоприятства обратното развитие на алергичните прояви.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на дисертационния труд е да се проучи ролята на *Blastocystis sp.* и *Toxocara spp.* като паразитни алергени при пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария.

От поставената цел са формулирани следните задачи:

1. Да се проучи и сравни честотата на инвазиране с *Blastocystis sp.* сред пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария и сред здрави контроли.

2. Да се определи генотиповата принадлежност на бластоцистни изолати от здрави лица и пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария.

3. Да се изследва и сравни честотата на носителство на антитоксокарни IgG антитела при пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария и здрави лица.

4. Да се сравнят нивата на общия IgE при здрави лица и пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария, носители на антитоксокарни IgG антитела.

5. Да се изследват и сравнят нивата на ЕСР при пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария, заразени с *Toxocara spp.*

III. МАТЕРИАЛИ

1. Изследвани контингенти:

В настоящето проучване са обхванати 1679 пациенти с клинично изявена уртикария, хоспитализирани в Алергологична клиника на УМБАЛ – Плевен или преминали текущо през паразитологична лаборатория на ДКЦ 2 - Плевен. За сравнителния анализ на проучването са изследвани и 1424 здрави лица. По своята насоченост на изследване те се разпределят както следва:

1.1. Пациенти с уртикария и здрави лица изследвани за бластоцистоза.

Изследвани са 1197 пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария и 1300 здрави лица без анамнестични данни за алергична симптоматика за наличие на опаразитяване с *Blastocystis sp.*

1.2. Пациенти с уртикария и лица без алергична симптоматика опаразитени с *Blastocystis sp.*, изолатите на които са генотипирани за субтипова принадлежност.

Генотипирани са бластоцистни изолати от 45 пациенти с уртикария и 24 паразитоносители без данни за придружаващи алергични заболявания.

1.3. Пациенти с уртикария и здрави лица, изследвани за наличие на антитоксокарни IgG антитела.

Проучена е честотата на носителство на антитоксокарни IgG антитела сред 297 пациенти с остра и хронична уртикария и 50 здрави лица без алергични прояви.

1.4. Пациенти с уртикария и контролна група лица без алергична симптоматика, изследвани за нива на общ IgE.

Изследвани са нивата на общ серумен имуноглобулин Е при 46 пациенти с уртикария носители на антитоксокарни IgG антитела, 46

пациенти с уртикария и отрицателен серологичен резултат за антитоксокарни антитела и 50 здрави лица без антитоксокарни антитела и без наличие на алергична симптоматика.

1.5. Пациенти с уртикария и контролна група лица без алергична симптоматика, изследвани за нива на ЕСР.

Проучени са стойностите на еозинофилния катионен протеин на 48 пациенти с уртикария носители на антитоксокарни IgG антитела, 45 пациенти с уртикария без наличие на антитоксокарни антитела и 50 здрави контролни лица, без антитоксокарни антитела и без анамнестични данни за алергични заболявания.

2. Изследвани материали.

2.1 Фекални проби изследвани за *Blastocystis sp.*

За микроскопска диагностика на *Blastocystis sp.* са изследвани пресни сутрешни фекални проби, доставени в химически чисти контейнери.

2.2. Среда на Джоунс.

Средата на Jones`е използвана за култивиране на изолати на *Blastocystis sp.* от фекални проби на пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария. Суспензия от средата е ползвана за изолиране на ДНК на паразита и генотипиране.

2.3. Серумни проби за откриване на антитоксокарни IgG антитела, общ IgE и ЕСР.

За отделяне на серум е използвана венозна кръв взета сутрин на гладно от кубиталната вена в затворена система, без антикоагулант, при спазване на определените изисквания за вземане на биологичен материал. Отделените серуми са съхранени в добре затворени, химически чисти транспортни епруветки, етикетирани с личните данни на пациента при -20⁰С. Размразяването им е извършвано еднократно в деня на имунологичното изследване.

IV. МЕТОДИ

1. Паразитологични методи:

1.1. Нативни методи.

1.1.1. Нативен препарат. Препарат за чревни протозои, приготвен с физиологичен разтвор. Микроскопиране с увеличение 400х.

1.1.2. Препарат, оцветен с Луголов разтвор. Нативен препарат, оцветен с Луголов разтвор. Микроскопиране с увеличение 400х.

1.2. Концентрационни методи:

1.2.1. Формалин-етеров метод (ФЕМ) (Ritchie, 1948). Обогатителен метод – фекална проба с 10% формалинов разтвор и етер, центрофугирана за 3 мин на 1500 обор./мин. Полученият седимент е изследван нативно или с Луголов разтвор.

1.3. Културелни методи:

1.3.1. Култивиране в среда на Джоунс (Jones', 1946). Средата на Jones' се използва за култивиране на *Blastocystis sp.* с цел изолиране на ДНК на паразита. Средата на Джоунс е ксенична култура, която съдържа $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 ; NaCl , дрожден екстракт, конски или говежди серум и е с приблизително pH 7.2. Култивирането на бластоцистни изолати се извършва при температура 36-37°C, а прекултивирането се прави на всеки 2-3 дни.

2. Молекулярно-биологични методи

2.1. Изолиране на геномна ДНК на *Blastocystis sp.* Геномна ДНК на *Blastocystis sp.* е изолирана с помощта на кит за мануална екстракция NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Германия) по протокол на фирмата производител.

2.2. PCR типирание с диагностични праймери STS. За типирание на бластоцистните изолати са използвани 7 двойки STS праймери. Последователността на праймерите е според Yoshikawa et al. (2004)

3. Имуноензимни методи:

3.1. Имуноензимен метод ELISA за определяне на специфични анти-Тоxосара IgG антитела. Серумни проби от пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария и здрави лица са тествани за антитоксокарни IgG антитела с търговски комплект RIDASCREEN® Тоxосара IgG ELISA (R-Biopharm AG - Германия), съгласно инструкциите на производителя.

3.2. Определяне нивата на общ имуноглобулин Е (IgE) с имуноензимен метод ELISA. Определяне на нивата на общия IgE от пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария и здрави лица е извършено с търговски кит ELISA IgE (NovaTec Immunodiagnostica GmbH - Германия).

3.3. Определяне нивото на Еозинофилния катионен протеин (ECP) с имуноензимен метод ELISA. Нивата на ECP са определени с търговски комплект Human Eosionophil Cationic Protein (ECP) ELISA Kit (CUSABIO - Китай), съгласно инструкциите на производителя.

4. Събиране на информация от изследваните лица. Събраната информация е отразявана в индивидуална карта на пациента, включваща паспортни, анамнестични, клинични и лабораторни данни.

5. Статистически методи. Данните са обработени със Statistical Package for the Social Sciences v.25 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) и EXCEL. Различията в групите са проверени с тестовете на Пирсън и Крускал-Уолис при ниво на значимост $P \leq 0.05$. Големината на ефекта между изследваните променливи е оценена чрез коефициента V на Крамер и при отчитане на степените на свобода df.

V. СОБСТВЕНИ ПРОУЧВАНИЯ

1. Определяне на честотата на инвазиране с *Blastocystis sp.* сред пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария.

За чревни протозои и хелминти са изследвани 1197 пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария и 1300 здрави лица, изследвани по профилактични индикации. От лицата с уртикария 479 са с остра уртикария и 718 са с хронична спонтанна уртикария. Разпределението на изследваните лица е представено на таблица №1.

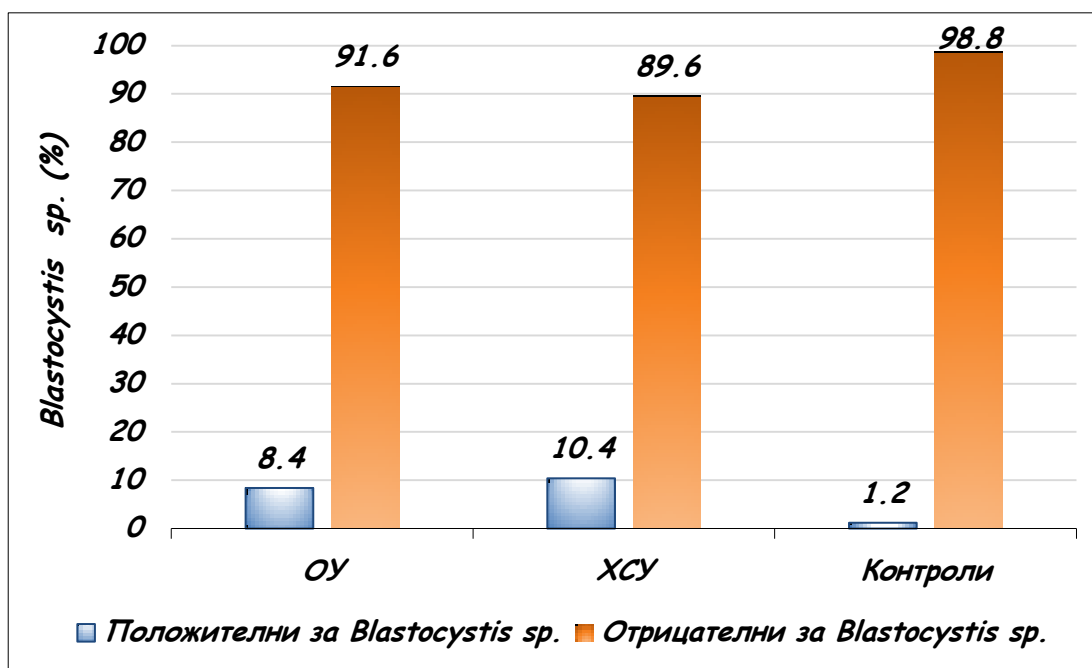
Табл. №1 Разпределение на лицата в сравняваните групи по диагноза, по пол и по възраст

Вид на алергичната реакция	Остра уртикария	Хронична спонтанна уртикария	Здрави контроли
	Бр. (%)	Бр. (%)	Бр. (%)
Пол			
Мъжки	154 (32.2%)	232 (32.3%)	427 (32.8%)
Женски	325 (67.8%)	486 (67.7%)	873 (67.2%)
Общо	479 (100.0%)	718 (100.0%)	1300 (100.0%)
Възраст Mdn (Min, Max)	51 (3, 82)	50 (3, 86)	40 (1, 82)

Опаразитяване с *Blastocystis sp.* е установено при 115 лица от изследваните – екстензитет на опаразитяване 9,6%. В контролната група от 1300 здрави лица опаразитяване с *Blastocystis sp.* е намерено при 15 човека (екстензитет - 1.2%).

Установяваме сигнификантно по-високо опаразитяване с *Blastocystis sp.* сред пациентите с уртикария в сравнение с лицата от контролната група ($\chi^2=92.793$, $df=2$, $P=0.001$, $V=0.193$), макар големината на ефекта да е малка ($V<0.21$ при $df=2$).

На фигура № 1 е представена честотата на опаразитяване с *Blastocystis sp.* сред пациентите с остра и хронична спонтанна уртикария и сред лицата от контролната група.

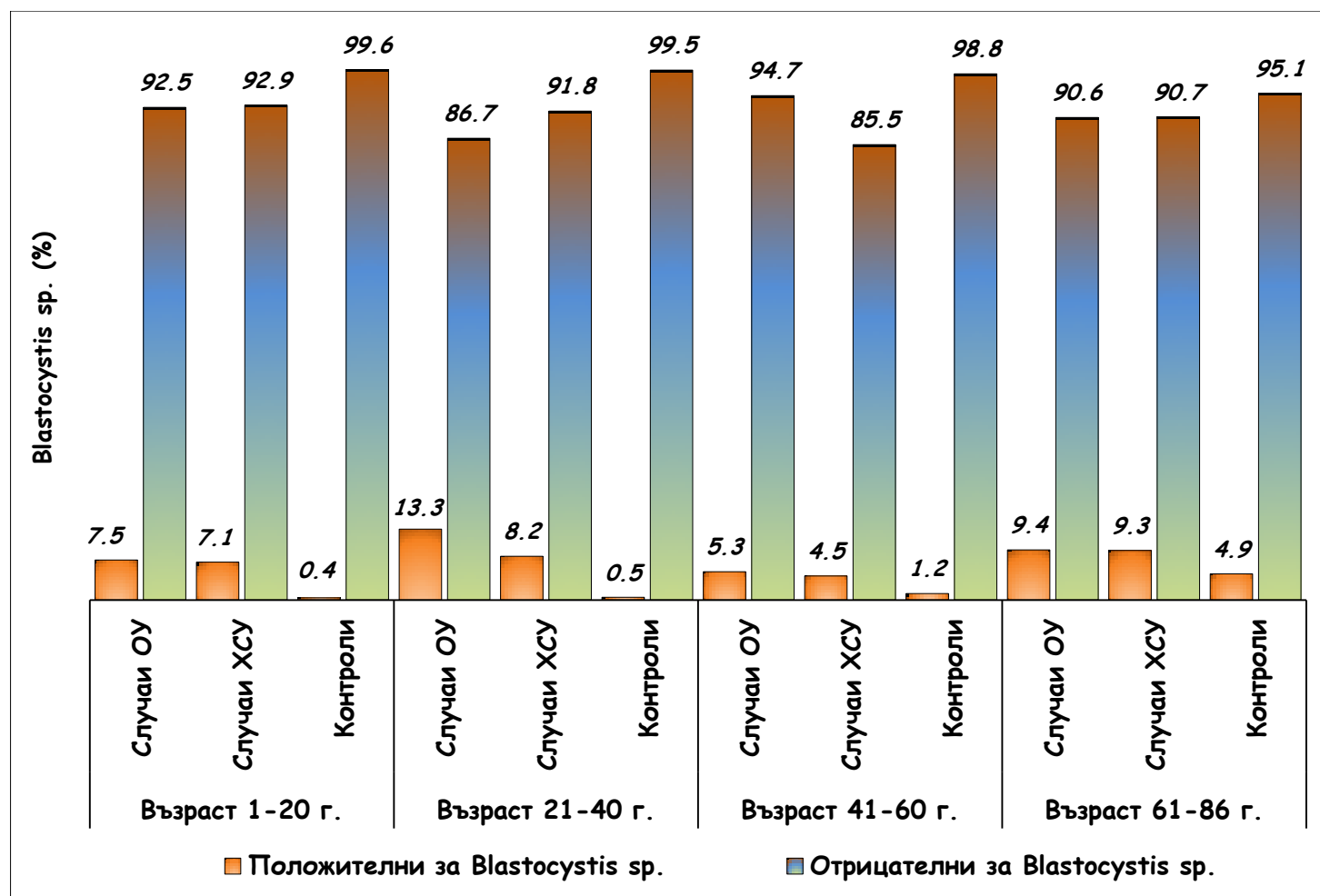


Фиг. № 1 Честота на опаразитяване с *Blastocystis sp.* сред сравняваните групи лица (%)

Екстензитът на бластоцистозата при пациентите с остра уртикария е 8.4%, а при лицата с хронична спонтанна уртикария – 10.4%. Не установяваме статистически достоверни различия в опаразитяването с *Blastocystis sp.* по вида на уртикариалната реакция ($\chi^2=1.452$; $df=1$; $p=0.228$).

Сред положителните за *Blastocystis sp.* пациенти преобладават случаите във възрастовите групи 41-60 години (37.40% от опаразитените) и 61-86 години (31.30%). Относителният дял на опаразитените пациенти на възраст между 1 и 20 години е 11.30%, а дела на опаразитените във възрастовата група 21-40 години е 20%.

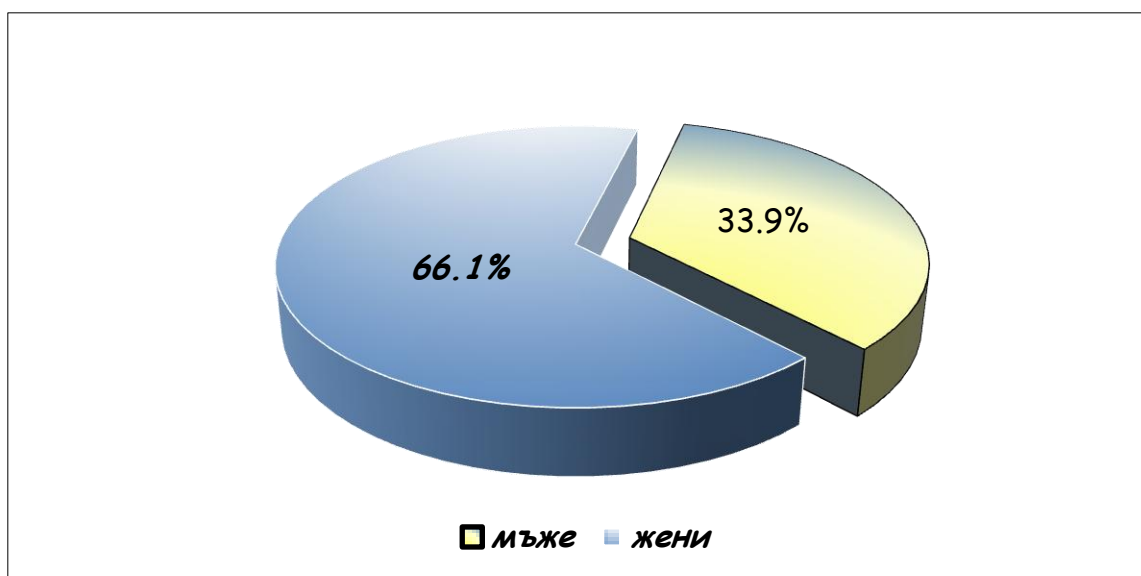
На фигура № 2 е показана честотата на бластоцистоза сред пациенти с уртикария и сред лицата от контролната група във всяка възрастова група.



Фиг. № 2 Честота на опаразитяване с *Blastocystis* sp. сред сравняваните групи лица – стратификация по **възраст** (%)

При стратифициране на лицата по възраст зависимостта между изследваните две променливи остава статистически значима, с изключение на последната възрастова група: Възраст 1-20 г. ($\chi^2=16.463$, $df=2$, $P=0.001$, $V=0.193$; Възраст 21-40 г. $\chi^2=38.069$, $df=2$, $P=0.001$, $V=0.246$; Възраст 41-60 г. $\chi^2=57.161$, $df=2$, $P=0.001$, $V=0.249$). Промяната в големината на ефекта показва, че възрастта е замъгляващ фактор.

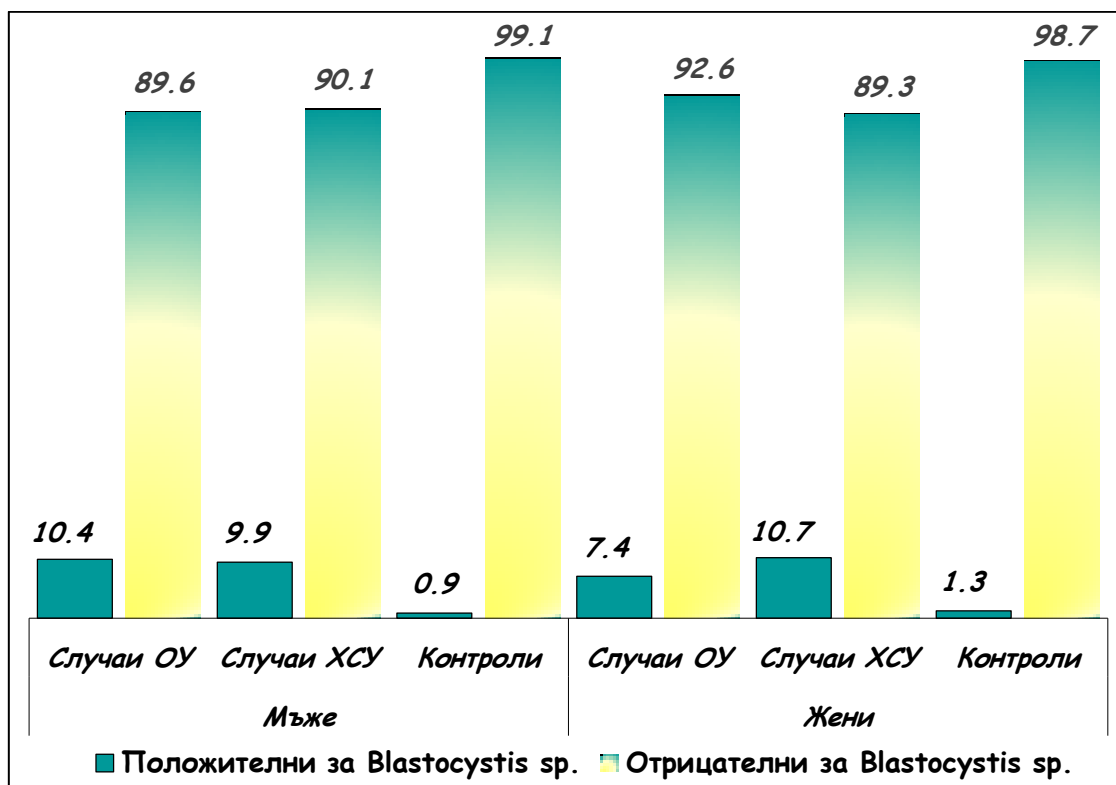
Относителният дял на опаразитени жени е 66,1% от всички пациенти с уртикария и бластоцистоза, а относителният дял на мъжете е 33,9% (фиг. №3).



Фиг. № 3 Относителен дял на положителни за бластоцистоза пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария, разпределени по пол (%)

Независимо от по-високия относителен дял на положителните за *Blastocystis sp.* пациенти от женски пол, екстензивният на бластоцистозата е по-висок при лицата с уртикария от мъжки пол – 9.4% при жените и 10.1% при мъжете.

Честотата на опаразитяване с *Blastocystis sp.* според вида на алергичната реакция и половата принадлежност на заразените е представена на фигура № 4.

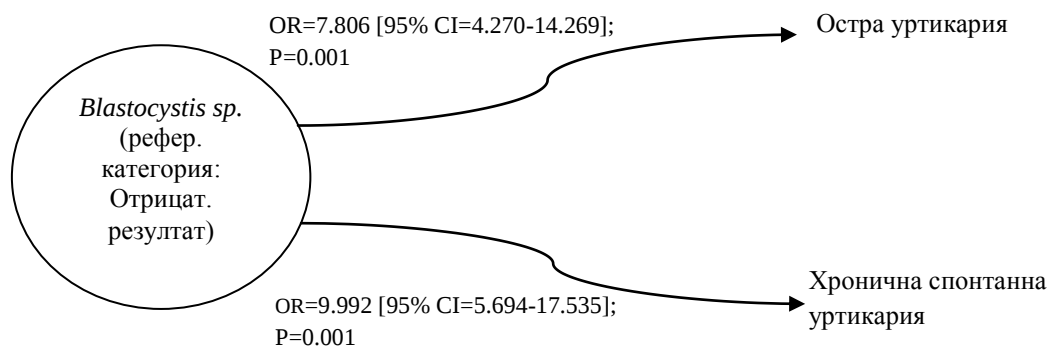


Фиг. № 4 Честота на опаразитяване с *Blastocystis sp.* сред сравняваните групи лица – стратификация по пол (%)

При изследваните пациенти с остра уртикария екстензитета на бластоцистоза сред мъжете е 10.4% и е сравнително по-висок от екстензитета при жените – 7.4%. Сред пациентите с ХСУ опаразитеността преобладава при жените - 10.7%, сравнено с 9.9% при мъжете.

При стратифициране на лицата по пол зависимостта между изследваните две променливи е статистически значима: Мъже $\chi^2=34.050$, $df=2$, $P=0.001$, $V=0.205$; Жени $\chi^2=60.825$, $df=2$, $P=0.001$, $V=0.190$. Поради промяната в големината на ефекта, полът подобно на възрастта, е замъгляващ фактор.

На фигура № 5 е построен логистичен регресионен модел (единична мултиноминална регресия), който доказва независимата роля на *Blastocystis sp.* в етиологията на алергичните реакции.



Фиг. №5 Резултати от логистичния регресионен анализ

Вероятността за опаразитяване с *Blastocystis sp.* сред пациенти с уртикария в сравнение с лицата от контролната група е около 8 пъти по-висока при пациенти с ОУ - OR=7.806 (95% CI=4.270-14.269; P=0.001) и почти 10 пъти по-висока при пациенти с ХСУ - OR=9.992 (95% CI=5.694-17.535; P=0.001).

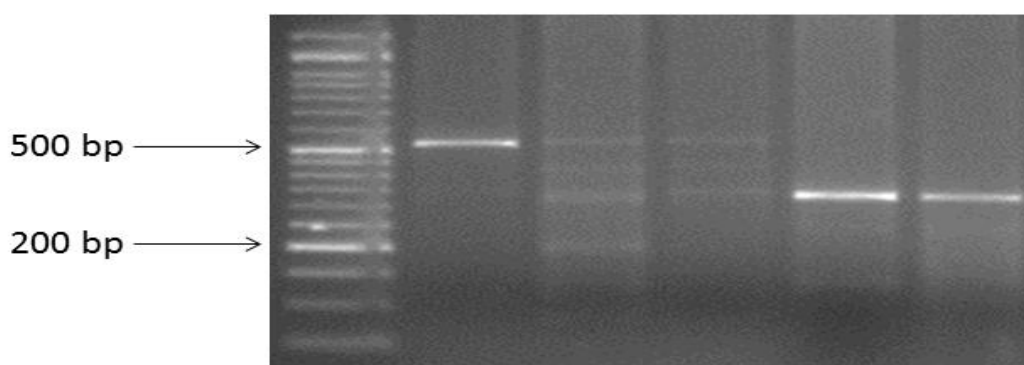
2. Определяне и сравняване на генотиповата принадлежност на бластоцистни изолати от пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария и контролна група лица

Чрез конвенционален PCR са генотипирани бластоцистни изолати от 45 пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария и от 24 здрави паразитоносители. Медианната възраст на изследваните с остра и хронична спонтанна уртикария е 47 г. (5, 80), а на здравите паразитоносители е 47 г. (2, 78).

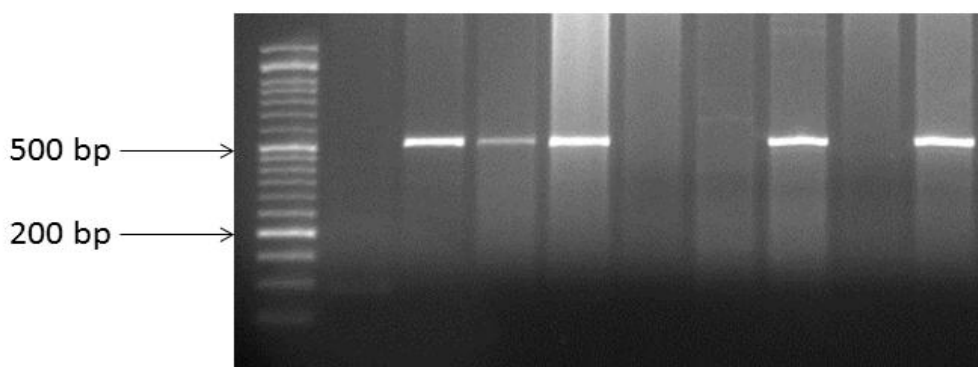
В групата на пациенти с алергични прояви са включени 19 лица от мъжки пол (42.22%) и 26 от женски пол (57.78%). Сред здравите паразитоносители 13 са мъже (54.17%), а 11 са жени (45.83%).

Според вида на алергичните прояви пациентите се разделят на 20 лица (44.44%) с остра уртикария и 25 болни (55.56%) с хронична спонтанна уртикария.

На фигурите № 6 и № 7 е представена гел електрофореза, отразяваща PCR типирание по Yoshikawa et al. със заложен праймер сетове за субтип 1 (ST1) и субтип 3 (ST3) на паразита.



Фиг. №6 Резултат от PCR типирание при използване на праймер сет SB83, съответстващ на субтип 1 (ST1).



Фиг. №7 Резултат от PCR типирание при използване на праймер сет SB227, съответстващ на субтип 3 (ST3).

От изследваните 45 проби от пациенти с алергична симптоматика ДНК на *Blastocystis sp.* е изолирана в 88.89% от тях (40 изолата). В контролната група на здравите паразитоносители на *Blastocystis sp.* ДНК на паразита е изолирана в 23 от 24 изследвани проби (95.84%).

При 9 от пациенти с уртикария и 6 от лицата в контролната група не се наблюдава амплификация на изследваните проби. Предполагаме, че това се дължи или на изолиране на ДНК на субтипове, за които не са заложили познати праймери или на наличие на генна изменчивост в търсените последователности.

Разпределението на изолираните субтипове в двете изследвани групи лица е представено на таблица № 2.

От 45 изследвани проби на пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария субтиповата принадлежност на *Blastocystis sp.* е определена в 31 изолата. При 25 пациенти (80.65%) е изолиран субтип 3 (ST3), а при 5 пациенти (16.13%) е изолиран субтип 1 (ST1). В пробата на един пациент (3.22%) PCR типирането установи наличието на два субтипа - ST1 и ST3.

В групата на здравите паразитоносители ST3 е открит при 11 лица (64.71%), а ST1 при 6 (35.29%) от изследваните. Въпреки, че са заложили праймери за 7 човешки субтипа на *Blastocystis sp.*, при PCR типирането не е установена ДНК принадлежаща на ST2, ST4, ST5, ST6 и ST7.

Най-често откривания субтип на *Blastocystis sp.* от пациенти с уртикария е ST3. Той е изолиран във фекалните проби на 25 пациенти (80.65%). Субтип 3 е установен при 11 от пациентите с остра уртикария (42.31%), при 15 от изследваните с хронична спонтанна уртикария (57.69%). Субтип 3 е най-често изолирания субтип и от здравите паразитоносители (в 64.71 % от изследваните).

Табл. № 2 Честота на изолираните субтипове на Blastocystis sp. от пациенти с алергична симптоматика и от здрави паразитоносители

Изследвана група	Не се изолира ДНК	Липса на амплификация	Субтип 1 (ST1)		Субтип 3 (ST3)		Субтип 1 + Субтип 3 (ST1 + ST3)		Общо установени субтипове	
	Брой	Брой	Брой	%	Брой	%	Брой	%	Брой	%
Пациенти с остра уртикария	3	5	1	8.33%	11	91.67%	0	0%	12	100%
Пациенти с хронична спонтанна уртикария	2	4	4	21.05%	14	73.68%	1	5.27%	19	100%
Всички изследвани пациенти с алергична симптоматика	5	9	5	16.13%	25	80.65%	1	3.22%	31	100%
Здрави паразитоносители	1	6	6	35.29%	11	64.71%	0	0%	17	100%

Нашето изследване е върху малък контингент алергично болни пациенти и не ни дава основание за категорични заключения. Поради високият процент (80%) очаквани честоти <5 не може да се извърши анализ за статистическа значимост на получените резултати.

3. Сравняване на честотата на носителство на антитоксокарни IgG антитела при пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария и контролна група лица

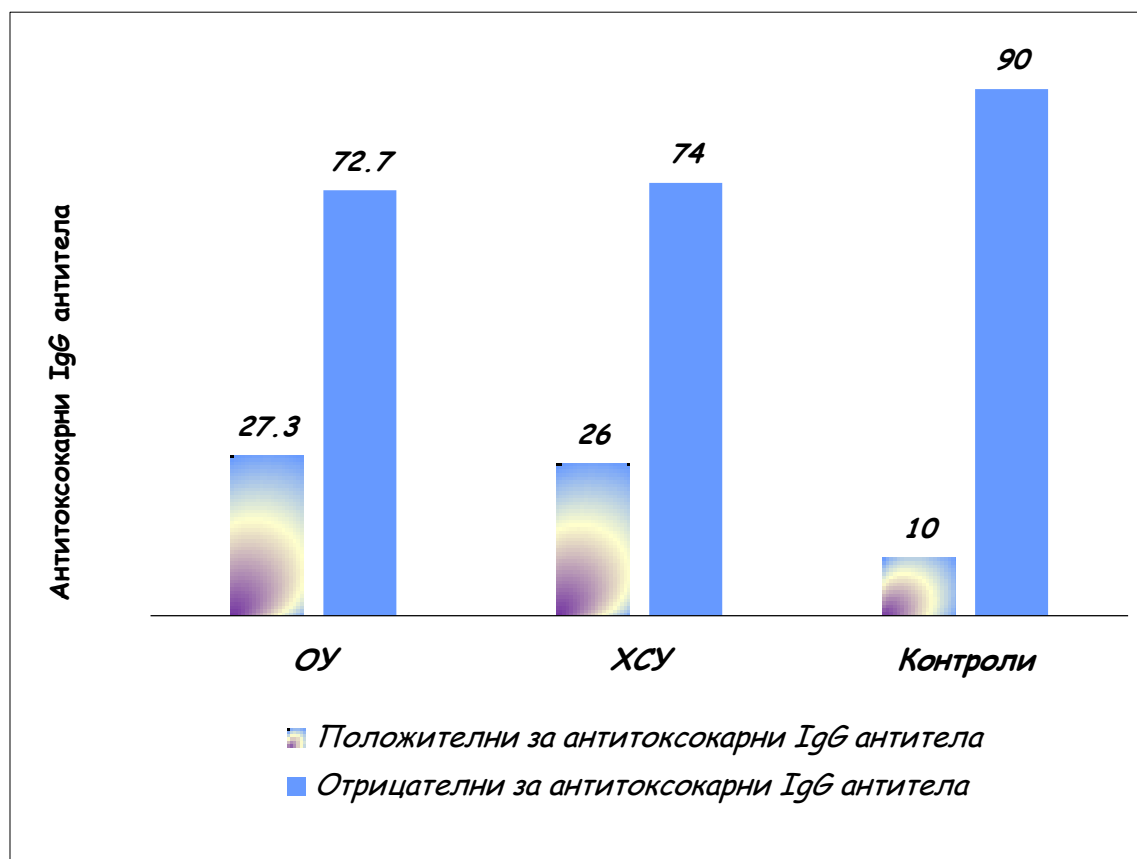
За период от 6 години (2018 - 2023 г.) в паразитологичен кабинет на ДКЦ - 2 Плевен за наличие на антитоксокарни IgG антитела са изследвани 297 пациенти с уртикария и 50 лица без алергични оплаквания. Разпределението на изследваните лица по вид на алергичната реакция, пол и възраст е представено на таблица №3.

От общия брой изследвани пациенти с уртикария 164 (55.22 %) са от женски пол, 133 (44.78 %) са мъже. Медианната възраст на уртикариално болните е 48 (1, 85). Средната възраст на пациентите с ОУ е 45 години (1, 82), при пациентите с ХСУ е 47 години (2, 85) и в контролната група – 56 години (9, 86). Сред изследваните пациенти преобладават лицата от женски пол - 54.5% с ОУ и 55.4% с ХСУ.

Табл. № 3 Разпределение на изследваните лица според вида на алергичната реакция, пол и възраст

Вид на алергичната реакция	Остра уртикария	Хронична спонтанна уртикария	Контроли
	Бр. (%)	Бр. (%)	Бр. (%)
Пол			
Мъжки	30 (45.5)	103 (44.6)	24 (48.0)
Женски	36 (54.5)	128 (55.4)	26 (52.0)
Общо	66 (100.0)	231 (100.0)	50 (100.0)
Възраст Mdn (Min, Max)	45 (1, 82)	47 (2, 85)	56 (9, 86)

На фигура № 8 са представени данните от честотата на носителство на антитоксокарни IgG антитела сред лицата с уртикария и в контролната група.

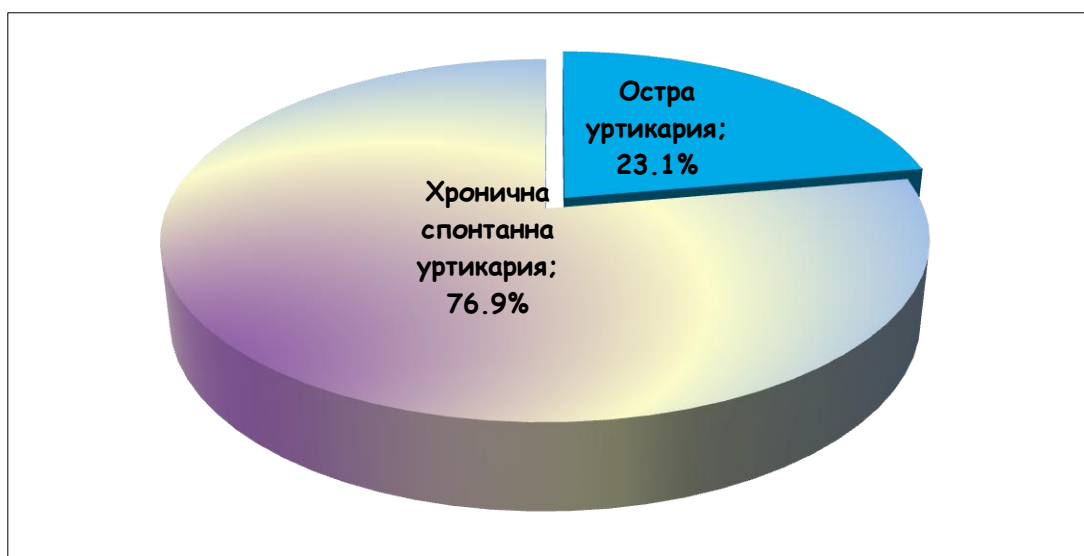


Фиг. № 8 Честота на носителство на антитоксокарни IgG антитела сред сравняваните групи лица (%)

От 297 пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария, 78 (26.3%) са показали положителен серологичен резултат за антитоксокарни IgG антитела. В контролната група от 50 изследвани лица - 5 са носители на антитоксокарни антитела (10%).

От изследваните 66 случая на остра уртикария 18 (27.3%) са показали положителен серологичен резултат. Шестдесет (26%) от пациентите с хронична спонтанна уртикария са с положителен серологичен резултат.

По-често за антитоксокарни антитела са изследвани пациенти с хронична спонтанна уртикария. От общо изследваните 297 лица, 231 са с хронична уртикария. Допускаме, че по-големия относителен дял на пациентите с положителен резултат за антитоксокарни антитела в групата с хронична спонтанна уртикария (76.9%) в сравнение с пациентите с остра уртикария (23.1%) се дължи на различния в броя изследвани пациенти в двете сравнявани групи (фиг. № 9).



Фиг. № 9 *Относителен дял на положителните за антитоксокарни антитела пациенти, според вида на алергичната реакция*

На таблица № 4 е показана честотата на носителство и стойностите на антитоксокарните IgG антитела във всяка от сравняваните групи лица.

Табл. № 4 Честота на носителство и нива на антитоксокарните IgG антитела сред изследваните пациенти с уртикария и изследваните лица от контролната група

Диагноза	Положителни за антитоксокарни антитела (n)		Стойност (SR)		Медианна стойност на антителата (SR)
	брой	%	Минимална стойност	Максимална стойност	
Остра уртикария	18	27.3	1.2	7.0	2.07
Хронична спонтанна уртикария	60	26	1.2	6.8	1.95
Контролна група	5	10	0.03	3.5	0.3

Установяваме сигнификантно по-висока ($\chi^2=6.267$, $df=2$, $p=0.044$, $V=0.193$, $V=0.134$) честота на положителните резултати за антитоксокарни IgG антитела сред пациентите с ОУ и ХСУ спрямо контролната група лица, макар големината на ефекта да е малка.

На фигура № 10 са представени резултатите от регресионен анализ. Извършената единична мултиноминална регресия потвърждава предиктивното значение на антитоксокарните IgG антитела по отношение на алергичните реакции.



Фиг. №10 Резултати от логистичния регресионен анализ

Пациентите с ОУ имат около 3,4 пъти (OR=3.375; 95% CI=1.156-9.850; P=0.026) по-висок риск за носителство на антитоксокарни IgG антитела спрямо контролната група лица, съответно при пациентите с ХСУ рискът е 3.2 пъти (OR=3.158; 95% CI=1.198-8.327; P=0.020) по-висок.

4. Сравняване на нивата на общия IgE при пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария и носителство на антитоксокарни IgG антитела спрямо контролната група лица.

Изследвахме и сравнихме нивата на общ IgE при три групи лица: пациенти с уртикария, носители на антитоксокарни IgG антитела (n = 46), пациенти с уртикария и отрицателен серологичен резултат за антитоксокарни антитела (n = 46) и здрави лица без алергична симптоматика (n = 50). Всички пациенти участващи в проучването са изследвани паралелно и за чревни протозои и хелминти и са показали отрицателен резултат.

От 46 пациенти с уртикария и положителен резултат за антитоксокарни антитела 12 (26.1%) са от мъжки пол, а 34 (73.9%) са жени. Медианата на възрастта на изследваните е 65.50 г. (21, 80). По вид на алергичната реакция, определена от специалист алерголог, пациентите от тази група се разпределят както следва: 20 лица с остра уртикария (43.5%) и 26 пациенти с хронична спонтанна уртикария (56.5%).

Медианната възраст на изследваните пациенти с уртикария и отрицателен резултат за антитоксокарни IgG антитела е 52 (10,78). Дванадесет от тях са мъже (26.1%), 34 (73.9%) са жени, 17 (37%) са с остра уртикария и 29 (63%) с хронична спонтанна уртикария.

В контролната група от 50 здрави лица 23 са мъже (46%) и 27 (54%) са жени, като медианната възраст на изследваните е 57.5 г. (9, 86).

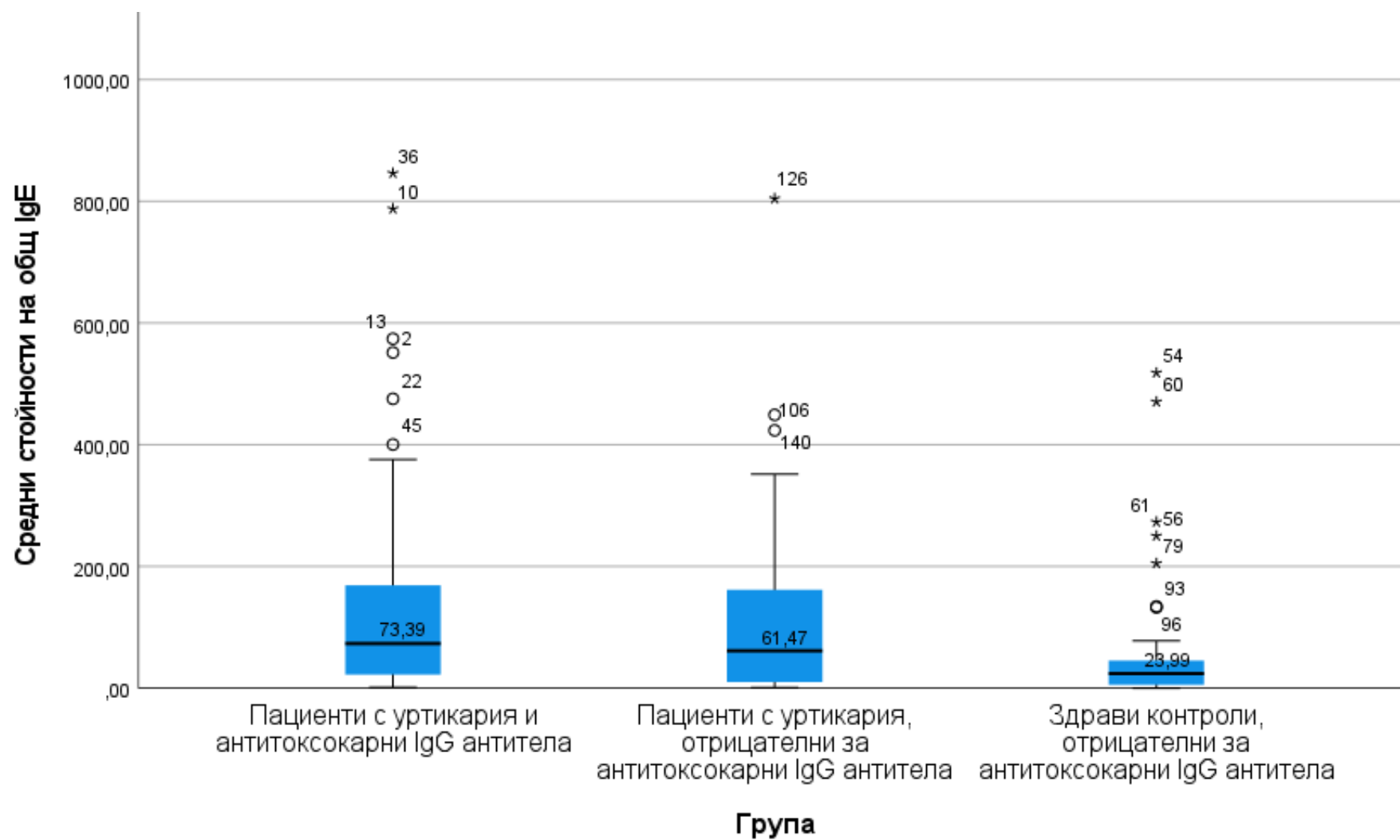
Стойностите на общия IgE при лицата от трите сравнявани групи са представени на таблица № 5.

Табл. № 5 Стойности на общия IgE при пациенти с уртикария положителни и отрицателни за антитоксокарни IgG антитела и при здрави лица

Група	Диагноза	Стойност на общ IgE (IU/ml)		Медианна стойност на общ IgE (IU/ml)
		Минимална стойност	Максимална стойност	
Пациенти с уртикария, положителни за антитоксокарни IgG антитела	Остра уртикария	5	787.70	76.94
	Хронична спонтанна уртикария	1.21	846.30	43.40
	Общо	1.21	846.30	73.39
Пациенти с уртикария, отрицателни за антитоксокарни IgG антитела	Остра уртикария	5.60	804.50	59.20
	Хронична спонтанна уртикария	0.9	449.10	75.20
	Общо	0.9	804.50	61.47
Контролна група от здрави лица		1.62	518.23	23.99

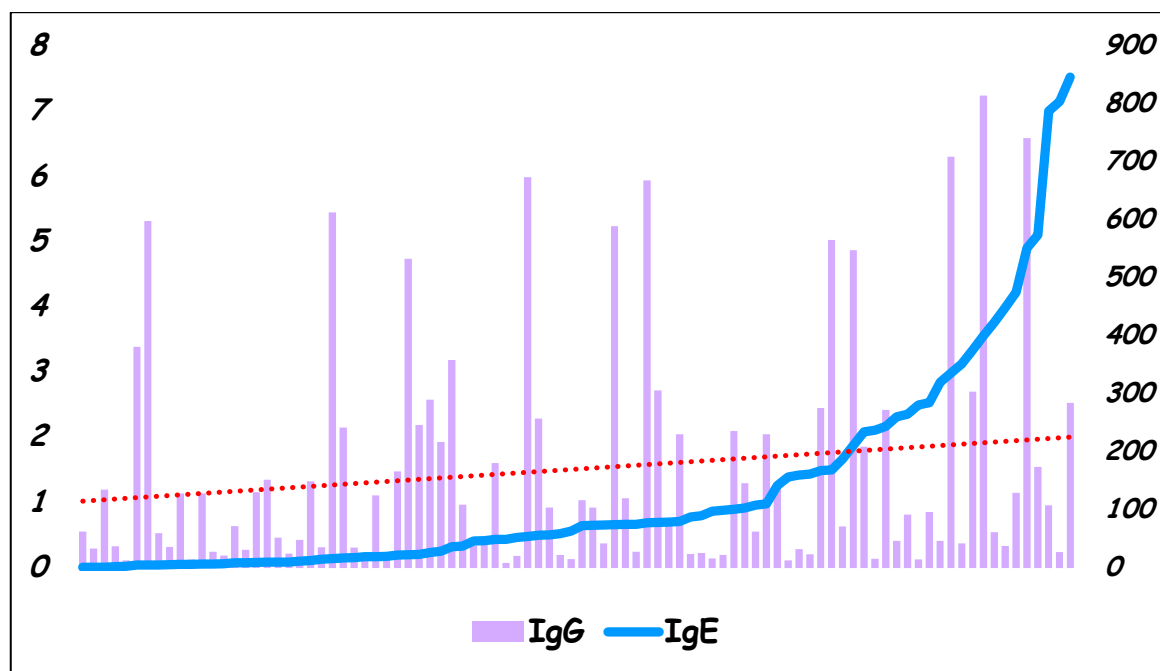
Резултатите от извършения тест на Крускал-Уолис (фиг. № 11) показват сигнификантно по-високи средни стойности на общия IgE (73.39, 1.2-846.3) при пациенти с алергична реакция и наличие на антитоксокарни IgG антитела, както и при пациенти с алергична реакция, но с отрицателен тест за IgG (61.47, 0.9-804.5) спрямо контролната група ($H=12.480$, $df=2$, $p=0.002$).

Между средните стойности на общия IgE в двете сравнявани групи алергично болни лица – с наличие и без ниво на антитоксокарни IgG антитела не установихме статистически значима разлика ($H=0.568$, $df=1$, $p=0.451$). Според вида на уртикариалната реакция също не открихме сигнификантни различия в нивата на общия серумен IgE ($H=1.069$, $df=1$, $p=0.295$).



Фиг. №11 Средни стойности на общ IgE в сравняваните групи лица

Статистически значима корелация установихме между нивата на антитоксокарни IgG антитела и нивата на общия серумен IgE ($p=0.235$; $p=0.005$) т.е с повишаване на стойностите на антитоксокарните IgG антитела се наблюдава пропорционално увеличение на стойностите на общия IgE (фиг. №12).



Фиг. № 12 Сравнителни промени в нивата на антитоксокарните IgG антитела и на общия IgE, при пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария

5. Сравняване на нивата на ЕСР между пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария, носители на антитоксокарни IgG антитела и здрави контролни лица.

Изследвахме нивата на ЕСР в три групи лица. В първата група са включени 48 пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария и положителен резултат за антитоксокарни IgG антитела. Втората група се състои от 45 пациента с уртикариална симптоматика, но без наличие на антитоксокарни IgG антитела. В третата група са включени 50 здрави лица,

без данни за алергична реакция и с отрицателен резултат от изследването за антитоксокарни IgG антитела.

Медианната възраст на пациентите с антитоксокарни антитела и уртикария е 64 (21, 76). Според вида на алергичната реакция те се разделят на 21 лица (43.8%) с остра уртикария и 27 пациенти (56.3%) с хронична спонтанна уртикария. Дванадесет от изследваните в тази група са от мъжки пол (25%), а 36 (75%) са жени.

Сред пациентите с уртикария и отрицателен серологичен резултат за антитоксокарни антитела с остра уртикария са 18 пациенти (40%) и 27 лица (60%) са с хронична спонтанна уртикария. Медианната възраст на участниците в тази група е 53 години (12, 78), като 15 са мъже (33.3%), а 30 са от женски пол (66.7%).

В контролната група от 50 здрави лица 23 са мъже (46%) и 27 (54%) са жени. Медианната възраст на изследваните от тази групата е 57.50 години (9, 86).

На таблица № 6 е представено разпределението на изследваните лица за еозинофилен катионен протеин по вид на алергичната реакция.

Табл. № 6 Разпределение на лицата в сравняваните групи според вида на уртикариалната реакция, пол и възраст

Вид на алергичната реакция	Остра уртикария	Хронична спонтанна уртикария	Контроли
	Бр. (%)	Бр. (%)	Бр. (%)
Пол			
Мъжки	15 (38.5)	12 (22.2)	23 (46.0)
Женски	24 (61.5)	42 (77.78)	27 (54.0)
<i>Общо</i>	<i>39 (100.0)</i>	<i>54(100.0)</i>	<i>50 (100.0)</i>
Възраст Mdn (Min, Max)	56 (17, 76)	58 (12, 78)	57.50 (9, 86)

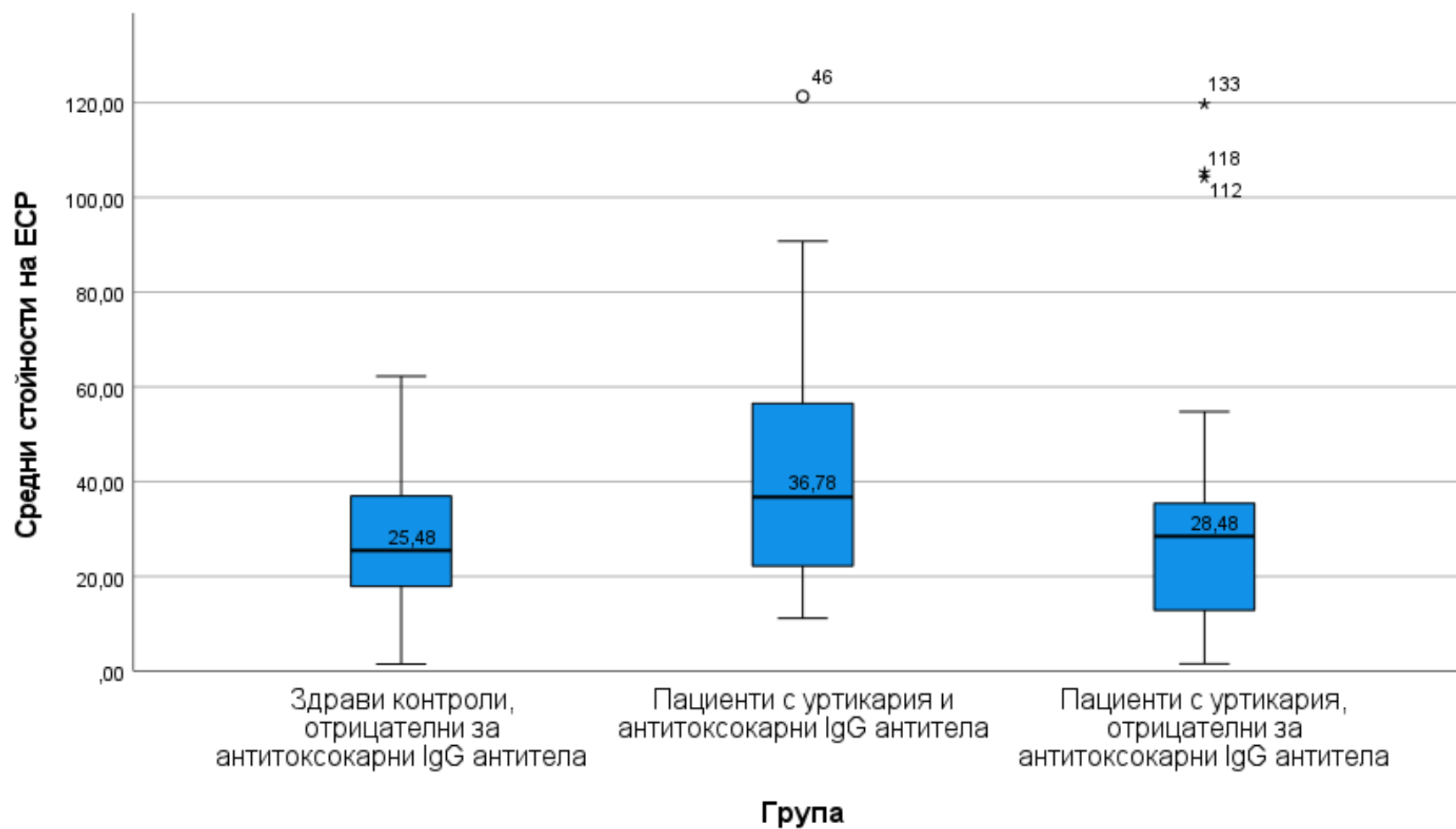
На таблица № 7 са показани стойностите на ЕСР сред трите групи изследвани лица.

Табл. № 7 Нива на ЕСР (ng/ml) сред изследваните лица по вид на алергичната реакция

Група	Диагноза	Стойност на ЕСР (ng/ml)		Медианна стойност на ЕСР (ng/ml)
		Минимална стойност	Максимална стойност	
Пациенти с уртикария, положителни за антитоксокарни и IgG антитела	Остра уртикария	11.21	90.80	39.51
	Хронична спонтанна уртикария	13.35	121.31	36.60
	Общо	11.21	121.31	36.77
Пациенти с уртикария, отрицателни за антитоксокарни и IgG антитела	Остра уртикария	1.56	43.37	28.96
	Хронична спонтанна уртикария	1.56	119.71	28.48
	Общо	1.56	119.71	28.48
Контролна група от здрави лица		1.56	62.27	25.48

Установяваме статистически значимо по-високи средни стойности на ЕСР при пациентите с уртикария и положителен серологичен резултат за антитоксокарни IgG антитела и при пациентите с уртикария без наличие на антитоксокарни антитела спрямо здравите контроли ($H=9.867$, $df=2$, $p=0.007$) (фиг. №13).

Откриваме статистически достоверна разлика в стойностите на еозинофилния катионния протеин между двете групи пациенти с уртикариална симптоматика ($H=6.841$, $df=1$, $p=0.009$), с и без наличие на антитоксокарни IgG антитела.

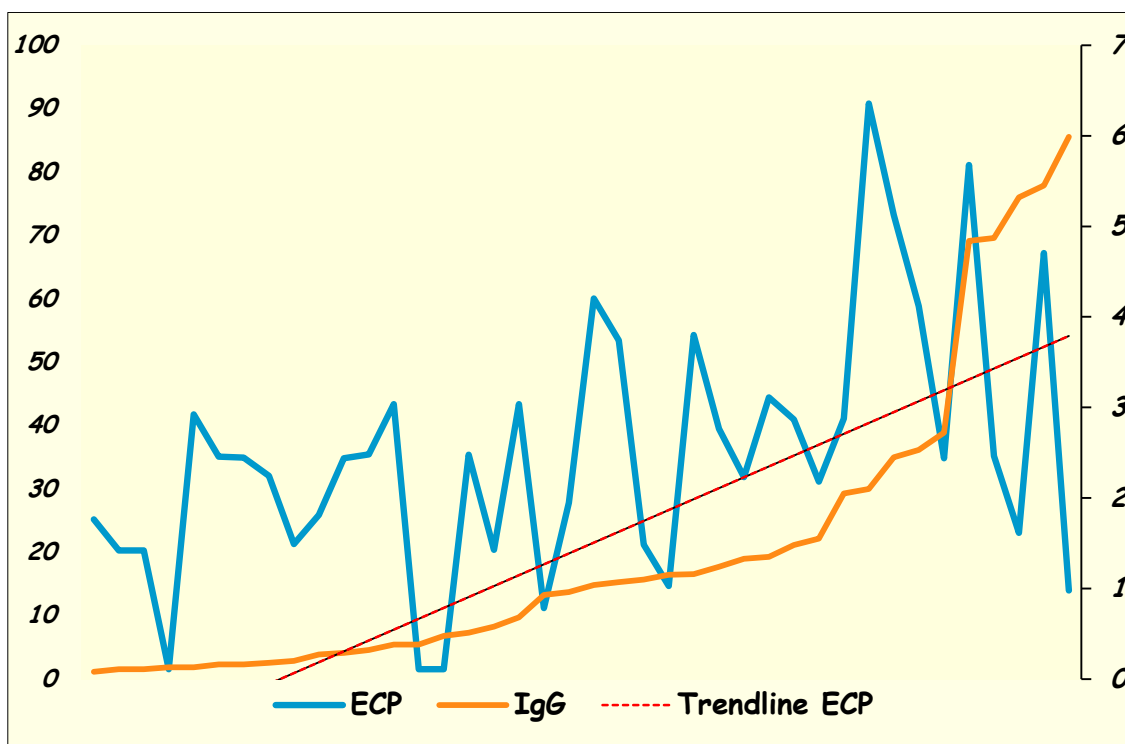


Фиг. № 13 Средни стойности на ЕСР в сравняваните групи лица

Установяваме статистически значимо по-високи нива на ЕСР между пациенти с остра уртикария и наличие на антитоксокарни IgG антитела и пациенти с остра уртикария без носителство на антитоксокарни антитела ($H=4.232$, $df=1$, $p=0.040$). Липсва значима разлика в нивата на ЕСР при пациенти с ХСУ, с и без носителство на антитоксокарни антитела ($H=3.213$, $df=1$, $p=0.073$).

Разликата в нивата на катионния протеин между пациенти с остра и пациенти с хронична спонтанна уртикария не е сигнификантна ($H=0.146$, $df=1$, $p=0.703$).

Установена е възходяща корелация между нивата на ЕСР и нивата на антитоксокарните IgG антитела сред пациентите с ОУ ($\rho = 0.360$; $p = 0.024$), (фиг. №14).



Фиг. № 14 Сравнителни промени в стойностите на ЕСР и антитоксокарните IgG антитела при пациенти с остра уртикария.

Колкото по-високи са нивата на антитоксокарните IgG антитела, толкова по-изразени са нивата на ЕСР при пациентите остри прояви на алергична реакция. Не се открива статистически значима корелация между нивата на ЕСР и на антитоксокарните IgG антитела сред пациентите с хронична спонтанна уртикария ($\rho = 0.181$; $p = 0.191$).

VI. АНАЛИЗ НА РЕЗУЛТАТИТЕ И ОБСЪЖДАНЕ

През последните десетилетия случаите на алергични реакции в човешката патология значимо се увеличиха, което определя високата им социална значимост. По литературни данни в различните държави разпространението на алергичните заболявания варира от 10% до 30% и се определя от различия в географското им разположение, икономическото им развитие, начин на живот и хранене на населението (Grammatikos, 2008; Gutowska-Ślesik et al., 2023).

Клинично изявената алергия е полиетиологично заболяване при което наред с ендогенни фактори (генетичните предпоставки, имунен отговор) много и разнообразни екзогенни фактори провокират алергичните прояви. Познати са множество екзогенни алергени за човека – хранителни, аерогенни, животински, лекарствени вещества, ужилвания от насекоми и други. Към екзогенните алергени принадлежат и паразитните алергени (Caraballo et al., 2018; Björkander et al., 2019). Мигрирайки и размножавайки се в организма на заразения човек, паразитите отделят разнообразие от обменни продукти, резултат от жизнената им дейност. Това води до сенсibiliзация и алергизация на гостоприемника с развитие на системни алергични реакции (Петров и сътр., 2016). Както в острия, така и в хроничния стадии от протичането на инвазионната болест могат да се наблюдават уртикариална кожна реакция, ангиоедем, астматиформени пристъпи и други алергични прояви, които персистират във времето и променят качеството на живот на пациента (Kolkhir et al., 2016).

Познанията за етиологията на едно заболяване са определящи за диагностичното и терапевтично поведение на лекаря. В този смисъл уточняването на ролята на паразитите в патогенезата на алергичните заболявания, би подпомогнало диагностиката и лечението както на паразитозите, така и на алергичните състояния.

Търсейки връзката между инвазията с чревни и тъканни паразити и развитието на алергични прояви при съвременния човек учените са изградили няколко различни теории. Първата е т.н. „хигиенна хипотеза” предложена от Strachan през 1989 г., според която увеличаващата се честота на алергични състояния в съвременните общества се дължи на по-малкия брой деца в семействата, подобряването на качеството на живот и по-високата лична хигиена. Според Strachan децата живеещи в нехигиенични условия се заразяват по-често с паразитози в ранна детска възраст и по-рядко развиват атопия. За доказателство на своята теория той приема по-ниската честота на астма сред деца на фермерски семейства и деца живеещи в домакинства, където се отглеждат домашни животни (Strachan, 1989).

Друга теория е т.нар. „хипотеза на старите приятели”. Според нея по-честите алергични прояви са причинени от липсата на инвазиране с „полezni” паразити в ранна детска възраст. Тоест, гостоприемникът изисква имуномодулация от паразитни инвазии с цел правилно развитие на имунната система и избягване на развитието на имуномедиирани заболявания, включително алергични прояви (Bilbo et al., 2011; Lambrecht et al., 2017; McSorley et al., 2019).

Според други автори, механизма на имуномодулация на гостоприемниковата имунна система от хелминтите е епигенетичен процес, действащ чрез временна модификация на генната експресия, което води до загуба на „протективния” ефект след няколко поколения без опаразитяване с хелминти (Rook et al., 2017; Maizels, 2020; Rook, 2023). С това би могло да се обясни защо в някои проучвания е описан протективен ефект спрямо развитието на алергични прояви (при лица живеещи в ендемични региони с висока заболяемост от хелминтози), а при други се наблюдава алергизация (при изследвания върху лица от региони с ниска или липсваща заболяемост от хелминтози). Според мета-анализ на Arrais и

сътр., въпреки съществуващите съобщения за наличие на протективен ефект, хелминтите инвазии се асоциират с увеличена честота на алергичните прояви поради характерния за тях силно изразен Th2-тип имунен отговор (Arrais et al., 2022).

В нашето проучване си поставихме за цел да потърсим връзка между острата и хронична спонтанна уртикария с два сравнително по-слабо проучени в България паразита – *Blastocystis sp.* и *Toxocara spp.* Основание за това ни даде по-високата им честота на откриване при пациенти с алергична симптоматика, хоспитализирани в Алергологична клиника на Университетска болница – Плевен или преминали амбулаторно през Паразитологична лаборатория на ДКЦ 2 – Плевен.

Blastocystis sp. е широко разпространен зооантропонозен едноклетъчен микроорганизъм, за който се счита че е най-често откривания чревен едноклетъчен паразит в човешки фекални проби (Wawrzyniak et al., 2013; Skotarczak, 2018; Stensvold et al., 2020). След дългогодишното приемане на паразита за коменсал, днес повечето изследователи по света считат, че болестните му възможности се определят от субтиповата принадлежност на вида и от имунния отговор на гостоприемника (Tan et al., 2010; Ajjampur et al., 2016). Опаразитяването с *Blastocystis sp.*, независимо дали протича безсимптомно или с клинични прояви се означава с термина бластоцистоза. Най-разпространената форма, откривана при профилактични изследвания, е безсимптомното носителство (Vielma, 2019).

В епидемиологични проучвания, направени в Европа и Азия екстензитета на заразяване с *Blastocystis sp.* варира в широки граници: сред деца в Швейцария при 4.2% от изследваните; при разнороден по възраст контингент изследван в Словакия - 10.7%; в Китай – 3.37%; в Северен Кипър – 10.5%; в Иран – 24.46% (Seyer et al., 2017; Deng et al., 2019; Shirvani et al., 2020; Kantzanou et al., 2021).

В България бластоцистозата има местно разпространение. Данните на Националния център по заразни и паразитни болести, София, базирани на годишните анализи на паразитната заболяемост в страната, дават възможност да се придобие представа за разпространението на тази паразитна инвазия на национално ниво. През 2020 г. в страната са регистрирани 515 случая на бластоцистоза (екстензитет 0.17%), през 2021 – 1596 случая (екстензитет 0.44%), през 2022 г. 1593 случая (екстензитет 0.39%) и респективно през 2023 г. 1800 случая (екстензитет 0.53%) (Harizanov et al., 2022, 2023, 2024). При локално проучване в Плевенският регион, направено за период от 7 години, сред контингент от 14402 профилактично изследвани пациенти е установено инвазиране с *Blastocystis sp.* при 3,4% от изследваните. В същото проучване степента на екстензинвазия сред контингент изследван по клинични индикации е статистически достоверно по-висок – в 4.3% от пациентите (Ангелов и сътр., 2009).

Връзката между бластоцистоза и уртикария е разглеждана в много научни публикации с противоречиви заключения. Факт е обаче, че уртикарията е най-честата кожна проява при заразяване с *Blastocystis sp.* и множество проучвания с адекватен брой изследвани потвърждава тази връзка (Kantardjiev et al., 2019; Vezir et al., 2019; Aykur et al., 2022; Bahrami et al., 2022). В редица публикации тази връзка е била потвърдена и чрез отзвучаване на кожната реакция след проведено лечение с етиологично лекарствено средство (Bahrami et al., 2020; Fonte Galindo et al., 2023). Tuzer и сътрудници изследват влиянието на терапията върху клиничното протичане и лабораторните показатели при 70 души с ХСУ и бластоцистоза, лекувани с антихистамин и антипаразитен медикамент. Сравнявайки ги с 70 лица с ХСУ без бластоцистоза, лекувани само с антихистамин, те наблюдават значима обратна динамика в тежестта на

уртикарията, общия серумен имуноглобулин Е и периферната еозинофилия в първата група (Tuzer et al., 2022).

В нашето проучване изследвайки 1197 пациенти с уртикария установяваме опаразитяване с *Blastocystis sp.* в 115 фекални проби. Намереният екстензитет 9.6% едва ли отразява реалната честота на опаразитяване, като се има предвид че диагнозата е поставяна на базата на еднократно изследване. Честотата на заразяване в контролната група от 1300 здрави лица е 1.2 %. Разликата в екстензита на бластоцистозата в двете сравнявани групи е статистически достоверна ($\chi^2=92.793$, $df=2$, $P=0.001$, $V=0.193$) и ни дава основание да приемем, че опаразитяването с *Blastocystis sp.* е ко-фактор за развитието на уртикария.

В достъпната научна литература подобни данни откриваме в изследването на Aykur et al. – заразяване с *Blastocystis sp.* в 31.9% от изследваните пациенти с ХСУ; в проучването направено от Jafari A. et al, които установяват честота на бластоцистоза в 21.3% от пациенти ХСУ (Aykur et al., 2022; Jafari et al., 2024).

Установяваме сравнително висок риск за наличие на опаразитеност с *Blastocystis sp.* – 8 пъти по-висок от обикновено при наличие на ОУ (95% CI=7.806-14.269; $P=0.001$) и 10 пъти по-висок при ХСУ (95% CI=5.694-17.535; $P=0.001$). Високата вероятност за заразяване с *Blastocystis sp.* и високата му честота сред пациенти с уртикария потвърждават алергизирания потенциал на паразита за организма на заразения човек.

Развитието на молекулярно-биологичните методи създадоха възможност да бъдат направени важни открития в медицинската паразитология. Повече от 20 години продължава молекулярния анализ на *Blastocystis*, като въз основа на полиморфизма на малка субединица SSrRNA гена бяха изолирани множество рибозомни щамове, наричани още субтипове (ST) (Stensvold, 2020; Maloney et al., 2021). Установено, е че *Blastocystis sp.* се представя в около 34 субтипа, от които 22 субтипа са

приети за валидни. От човешки фекални проби са изолирани 14 субтипа – от ST1 до ST10, от ST12 до ST14 и ST16 (Stensvold et al., 2016; Cian et al., 2017; Lalev et al., 2020; Stensvold et al., 2020; Jiménez et al., 2022).

Почти 90% от човешките изолати на *Blastocystis sp.* принадлежат на ST1, ST2, ST3 и ST4 (Stensvold et al., 2016; Zanetti et al., 2020). Сред тези 4 субтипа ST3 е най-често изолирания субтип от хора и е наричан „човешки субтип“. Изолатите на ST3 от човека обаче показват генетични различия със ST3, изолиран от животни (Stensvold et al., 2012). Епидемиологичните проучвания установяват, че сред населението на Европа най-често се открива ST1, ST3 и ST4; в Американският континент - ST1 и ST2, а в Азия и Австралия - ST1 и ST3 (Stensvold et al., 2016; Skotarczak, 2018; Jiménez et al., 2019).

От пациенти с алергични прояви най-често изолирахме ST3. ST3 е установен при 11 от пациентите с остра уртикария и при 15 от изследваните с хронична спонтанна уртикария. ST3 е най-често изолирания субтип и сред здравите паразитоносители (64.71%)

Резултатите за разпространението на ST3 на *Blastocystis sp.* в Плевенския регион съвпадат с резултатите от предишно проучване сред лежащо болни пациенти в Университетска болница – Плевен (Lalev et al., 2020). ST3 е най-често изолирания субтип и в световен аспект, както сред пациенти с алергична симптоматика, така и при асимптомни лица (Cian et al., 2017).

Изолирането на ST1 се асоциира най-често с чревна симптоматика или асимптомно носителство, но по литературни данни се открива и при пациенти с ХСУ (Bahrami et al., 2020). В нашето изследване ST1 беше установен при 5 пациенти с алергия (1 с ОУ и 4 с ХСУ) и при 6 здрави носители на *Blastocystis sp.*

Получените от нас резултати съвпадат с тези от епидемиологични проучвания върху разпространението на паразита в Европа, при които ST3 и ST1 са двата най-често регистрирани субтипа (Skotarczak, 2018).

Както в настоящето, така и в предишни генотипови изследвания направени в България, не се откриват изолати принадлежащи на ST4, въпреки че по литературни данни ST4 е третия по-честота изолат на *Blastocystis sp.* в Европа (Popruk et al., 2021). Подобно на ST4 в нито едно от изследваните лица не изолирахме ST2, въпреки че принадлежи на един от четирите най-изолирани субтипове от хора по света (Jiménez et al., 2019). Не се установиха изолати принадлежащи и на ST5, ST6 и ST7. ST5 е зоонозен субтип, който най-често е изолиран от прасета и рядко от хора с бластоцистоза, живеещи в Европа. ST6 и ST7 се изолират от птици и най-често се откриват сред местното население на Централна и Юго-Източна Азия (Süli et al., 2021). ST6 е рядък субтип в Европа, въпреки че в литературата са описани 4 случая на бластоцистоза протекла с гастроинтестинални оплаквания в съседна Сърбия. Спорадични случаи на инвазиране с ST6 и ST7 се установяват сред лица работещи в птицеферми в Полша (Rudzińska et al., 2023).

В нашето изследване ние откриваме приблизително еднакво разпространение на ST1 и ST3 сред болните с уртикария и здравите паразитоносители. Проучването ни е върху малък контингент алергично болни пациенти и не ни дава основание за категорични заключения. Получените от нас резултати не показват разлика в субтиповата принадлежност на *Blastocystis sp.* по вид на алергичната реакция, предполагаема от други автори. Необходим е анализ чрез мултилокусно типизиране на последователности или секвениране на ДНК за да се установи дали се обособяват подварианти на отделните субтипове и каква е тяхната връзка с клиничната проява на бластоцистозата. Отговорът на тези въпроси предстои да бъде получен. Ние считаме, че откриването на статистически

по-висока честота на заразяване с *Blastocystis sp.* сред пациентите с ОУ и ХСУ, макар и косвенно, определя паразитните антигени като алергени и изисква от специалистите алерголози да лекуват не само алергичните прояви, но и паразитното заболяване.

В многопосочното паразитологично изследване на хоспитализираните или амбулаторно преминаващи през Паразитологичните лаборатории пациенти с клинично изявена алергична реакция често откриваме носителство на антитоксокарни IgG антитела. Поради отсъствието на симптоми характерни за класическите клинични форми на токсокароза, обичайно приемаме болните с алергия, носители на антитоксокарни антитела, за случай на „скрита“ („covert toxocariasis“) токсокарна инвазия. Скрытата токсокароза, също често наричана “common” (обикновена токсокароза), често протича субклинично само с наличие на алергична симптоматика като уртикария, пруритус и астма-подобна симптоматика (Lee et al., 2014; Henke et al., 2023; Patterson, 2023).

Диагностицирането на токсокарозата е трудно, тъй като *Toxocara spp.* не достига полова зрялост в човека и не отделя заразни елементи (Петров и сътр., 2016; Ma et al., 2018). По тази причина диагностиката на токсокарозата се основава на имунологичната реакция в организма на заразяния и доказването на антитоксокарни IgG антитела в серумни проби от пациента. В рутинната диагностика на токсокарозата основно се прилага метода ELISA, докато Western blot, поради по-високата му чувствителност, се използва за потвърждаване на положителните резултати от ELISA (Yariktas et al., 2007; Rudzińska et al., 2017).

Серологичната диагностика на токсокарозата има своите недостатъци. Възможни са фалшиво положителни резултати, поради кръстосани реакции между екскреторно-секреторните антигени на *Toxocara spp.* и общите антигенни детерминанти на хелминти от родовете *Trichinella*, *Ascaris*, *Strongyloides* и *Ancylostoma*. (Rudzińska et al., 2017;

Noordin et al., 2020). Наличието на антитоксокарни IgG антитела отразява срещата на човек с паразита, но не може да определи стадия на инвазионния процес - остър, хроничен, латентен или персистенция на антитела. Известно е, че антитоксокарните IgG антитела доказани с ELISA тест могат да персистират до 2,7 години след инвазирането, а доказаните с Western blot - до 5 години (Fillaux et al., 2013). Това създава диагностични и терапевтични затруднения в клиничната практика и изисква разработването на допълнителни критерии за оценка на всеки един случай. Допускаме, че нивата на общия IgE и на еозинофилния катионен протеин (ЕСР) биха подпомогнали диагностиката на токсокарозата поради участието им, както в патогенезата на алергичните заболявания така и на паразитозите. Проучванията в дисертационния труд са насочени към честотата на опаразитяване с *Toxocara spp.* и проучване на нивата на общия IgE и ЕСР при пациенти с ОУ и ХСУ, носители на антитоксокарни антитела.

Статистическият анализ установява значима разлика между нивата на антитоксокарни IgG антитела както сред пациенти с ОУ, така и сред пациенти с ХСУ спрямо лицата от контролната група ($\chi^2=6.267$, $df=2$, $p=0.044$, $V=0.193$, $V=0.134$). Също така установихме, че риска за носителство на антитоксокарни IgG антитела е съответно 3.4 пъти по висок при лица с ОУ (95% CI=1.156-9.850; $P=0.026$) и 3.2 по-висок при лица с ХСУ (95% CI=1.198-8.327; $P=0.020$). Считаме, че по-високият риск отразява ролята на *Toxocara spp.* за развитие на алергизация на гостоприемника.

Подобна висока честота на носителство на антитоксокарни IgG антитела при пациенти с уртикария е описана и от други изследователи. При проучване в Бразилия е установена серопозитивност за антитоксокарни антитела в 16% от изследваните деца с уртикария (Yoon et al., 2018). Humbert и сътр. описват носителство на антитоксокарни IgG

антитела при 19.5% от изследваните от тях пациенти с уртикария (Humbert et al., 2020). Първите проучвания върху честотата на разпространение на токсикарозата в България са извършени от Райнова и сътр. Установено е носителство на антитоксокарни антитела при 10.9% от лицата суспектни за токсикароза и сред 4% от клинично здравите кръвни донори (Райнова, 2006). За период 2000-2017 г. в страната са изследвани 660 лица с клинично изявена алергия, от които 12% са с положителен серологичен резултат за токсикароза (Райнова, 2020). За периода 2018-2020 година от 386 лица, преминали през националната референтна лаборатория „Диагностика на паразитозите“ на НЦЗПБ – София, са установени специфични анти-токсокарни антитела при 22.3% от изследваните, като 17.6% от положителните са били с алергична симптоматика (Кънева и сътр., 2022). Откритата от нас статистически значима разлика в носителството на антитоксокарни IgG антитела между пациенти с алергия и здрави лица се потвърждава и от други подобни проучвания (Humbert et al., 2000; Mohammadzadeh et al., 2018; Yoon et al., 2018; Darvish et al., 2021).

Разсъждавайки над получените резултати приемаме, че токсикарните антигени са човешки алергени, но вида на алергичната реакция и нейните прояви във времето най-вероятно зависят от характера и стадия на инвазионния процес и от състоянието и чувствителността на имунния отговор на заразения човек.

И ние, както повечето изследователи считаме, че връзката алергия - токсикароза не е случайна, независимо че в достъпната литература съществуват и противоречиви заключения (Kaneva et al., 2015; Maizels, 2016; Kim et al., 2017). Установената от нас честота на носителство на антитоксокарни IgG антитела при пациентите с различни клинични форми на алергия ни дава основание да препоръчаме серологично изследване на всеки алергично болен пациент.

Както беше отбелязано по-горе, важен момент в клиничната оценка на случаите на носителство на антитоксокарни IgG антитела при пациенти с уртикария е да се определи необходимостта от успоредна антиалергична и антипаразитна терапия. Дългата персистенция на антитоксокарни антитела създава условия за нерационална полипрагмазия. За да се оцени необходимостта от антипаразитна терапия при тези пациенти, трябва да бъдат създадени допълнителни клинични, серологични и лабораторни критерии. Като лабораторни критерии биха могли да се използват промените в нивата на общия IgE и нивото на еозинофилния катионен протеин, като участници в локалната имунна реакция при токсокароза.

Потенциалът на общия серумен имуноглобулин Е като диагностичен маркер при токсокарна инвазия произтича от ролята му в имунопатогенезата на паразитните и алергичните заболявания (Caraballo et al., 2023). Още през 1998 година Obwaller и сътр. описват завишени нива на тотален серумен IgE при лица с токсокароза (Obwaller et al., 1998). Abd El Wahab и сътр. установяват статистически значима връзка между носителството на антитоксокарни IgG антитела и наднормените стойности на общия IgE при деца с бронхиална астма (Abd El Wahab et al., 2023). В проучване извършено в Испания, сред деца на мигранти инвазирани с *Toxocara spp.*, са открити завишени стойности на общ IgE при около 50% от изследваните. Авторите също така описват и понижаване на титрите на IgE след етиологична терапия със Albendazole (Bustamante et al., 2022). В България нивата на общ IgE при човешка токсокароза са изследвани от Кънева и сътр. през 2019 година. При 120 пациенти с висцерална и очна форми на токсокароза те откриват статистически значимо увеличение на средните стойности на общия IgE (153.7 IU/ml) в сравнение със средните стойности на общи IgE при здрави контроли (49.40 IU/ml) (Kaneva et al., 2019).

В нашето проучване установяваме статистически значимо по-високи средни нива на общия IgE при групите пациенти с уртикариална симптоматика (с положителен и отрицателен серологичен резултат за антитоксокарни IgG антитела) спрямо контролната група от здрави лица. Подобно на проучването на Кънева и сътр. средните стойности на общ IgE при пациентите с ОУ и ХСУ са близо три пъти по-високи, отколкото при лицата без алергична симптоматика (Kaneva et al., 2019). Darvish и сътрудници описват сигнификантна разлика в нивата на общ серумен IgE между деца с астма носители на антитоксокарни IgG антитела и деца с астма без антитоксокарни антитела (Darvish et al., 2021). Datolli et al. откриват наднормени стойности на общ IgE сред бразилски донори на кръв с положителен серологичен резултат за антитоксокарни IgG антитела (Dattoli et al., 2021).

Интересна е намерената от нас статистически достоверна корелационна зависимост между нивото на общия IgE и нивото на антитоксокарните IgG антитела. Високото ниво на общия IgE, както и корелационната зависимост между нивата на общия IgE и на антитоксокарните IgG антитела биха могли да са белег на скорошна инвазия с *Toxocara spp.* и активност на болестния процес – условие за провеждане на етиологично лечение.

Намерените от нас резултати за връзка между нивата на общия IgE и антитоксокарните IgG антитела при пациенти с ОУ и ХСУ ни дават основание да препоръчаме изследването за токсокароза на всеки пациент с алергична симптоматика, показал наднормени нива на общ IgE. Ранното откриване и етиологично лечение на случаите на „скрита“ токсокароза ще благоприятства не само обратното развитие на алергичните прояви, но и ефекта на антипаразитната терапия.

Еозинофилните клетки са фракция гранулоцити, които участват в патогенезата както на алергичните заболявания, така и на паразитозите

(Rosenberg et al., 2007; Amoani et al., 2019; Sakyi et al., 2022). Като част от локалния противопаразитен имунен отговор еозинофилите секретират от гранулите си група цитотоксични протеини, един от които е еозинофилния катионен протеин (ЕСР). ЕСР е протеин от семейството на рубонуклеазите, за който е демонстрирано *in vitro*, че във високи концентрации може да парализира или убива мигриращи паразити в тъканите на гостоприемника (Hotz et al., 2022). Независимо от краткия му полуживот (45 мин), се счита че той отразява тоталната маса на активираните еозинофили в организма на гостоприемника. Поради това ЕСР би бил по-надежден критерий от периферната еозинофилия за еозинофилната реакция при токсокароза, тъй като анеозинофилните форми при заразяване с *Toxocara spp.* са сравнително чести (Shah et al., 2021). Вече е установено, че ЕСР може да се използва успешно в диагностиката и определяне на тежестта на инвазиите с *Ancylostoma duodenale* и *Necator americanus*, при които стойностите на ЕСР корелират с интензитета на инвазията (Sakyi et al., 2022).

В нашето проучване установихме че, средните стойности на нивата на ЕСР са статистически значимо по-високи в групите пациенти с уртикария и положителен и отрицателен резултат за антитоксокарни антитела в сравнение със средните стойности на ЕСР при здрави лица ($H=9.867$, $df=2$, $p=0.007$).

Подобни резултати са описани в други проучвания. Кънева и сътр. установяват статистически значима разлика в нивата на ЕСР между пациенти серопозитивни за антитоксокарни IgG антитела и клинично здрави донори на кръв (Kaneva et al., 2020). При проучване във Франция сред пациенти със скрита форма на токсокароза е открита значима разлика в средните стойности на ЕСР между пациенти с алергична симптоматика и пациенти без алергични прояви (Magnaival et al., 2020).

Откриваме статистически значима разлика в нивата на ЕСР между пациенти с уртикария, носители на антитоксокарни IgG антитела, и

пациенти с уртикария и отрицателен резултат за антитоксокарни антитела ($H=6.841$, $df=1$, $p=0.009$).

В достъпната литература открихме научни съобщения от автори, които са изследвали промените в нивата на ЕСР при пациенти с токсокароза, преди и след етиологична терапия. Magnaval и сътр. описват случай на 11 годишно момиче с астматична симптоматика, положителен серологичен резултат за антитоксокарни IgG антитела и завишени нива на ЕСР от 28 mg/l. След проведена 21 дневна терапия с антихелминтния препарат диетилкарбамазин те наблюдават спад на ЕСР до 8 mg/l (Magnaval, 2011). Niedworok et al. установяват статистически значимо понижаване на нивата на ЕСР при пациенти носители на антитоксокарни антитела 6 месеца след терапия с Mebendazole (Niedworok, 2008). В нашето проучване не успяхме да проследим динамиката на стойностите на катионния протеин във времето поради еднократния характер на изследването.

Установяваме статистически значимо по-високи нива на ЕСР сред пациенти с ОУ, носители на антитоксокарни IgG антитела, в сравнение с нивата на ЕСР при пациенти с ОУ, но с отрицателен серологичен резултат за антитоксокарни антитела ($H=4.232$, $df=1$, $p=0.040$). Не се установи подобна зависимост при сравняване нивата на ЕСР при пациентите с ХСУ ($H=3.213$, $df=1$, $p=0.073$). Тъй като еозинофилния катионен протеин е част от секретирания от еозинофилите цитотоксични протеини, предполагаме че установените в нашето проучване завишени стойности на ЕСР при пациенти с ОУ отразяват скорошно заразяване с *Toxocara spp.* и съвпадат с изразената локална еозинофилна реакция. Подобни резултати са описвани и преди в литературата. При проучване в Корея е установена положителна корелация между нивата на ЕСР и интензитета на тъканна еозинофилна инвазия при пациенти с токсокароза (Choi et al., 2003).

Както в проучването на нивата на общия IgE, така и сравнявайки нивата на ЕСР с нивата на антитоксокарните IgG антитела в изследваните групи пациенти с уртикария, установяваме наличие на статистически достоверна позитивна корелация при пациентите с остра уртикария ($\rho = 0.360$; $p = 0.024$). В достъпната литература не срещаме подобни изследвания, за да ги сравним с намереното от нас.

Трябва да се отбележи, че промени в нивата на ЕСР могат да се открият не само при хелминтни заболявания. Повишени стойности на ЕСР се наблюдават и при атопични състояния като бронхиална астма и алергичен ринит, при еозинофилни неопластични процеси, както и при някои бактериални заболявания като туберкулоза (Bystrom et al., 2011; Lu, 2021). В този смисъл намерените от нас отклонения в нивата на ЕСР при болни с остра и хронична спонтанна уртикария, носители на антитоксокарни антитела, трябва да бъдат внимателно интерпретирани в диагностичната практика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При направеното от нас проучване е установена значително по-висока честота на опаразитяване с *Blastocystis sp.* и *Toxocara spp.* при пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария, в сравнение с честотата на заразяване при здрави лица. Този факт ни дава основание да препоръчаме паразитологично изследване за чревна и тъканна паразитоза при всички случаи на клинично изявена алергична реакция. Намерените отклонения в нивата на общия IgE и ЕСР при пациенти носители на антитоксокарни IgG антитела, макар и внимателно интерпретирани, биха могли да бъдат използвани за оценка на случаите на „скрита“ токсикароза по време на клинично изявена алергия. Считаме, че извършените от нас проучвания и формулирани заключения ще бъдат от полза за лекарите от практическата здравна мрежа и ще ги подпомогнат при вземането на решения по отношение диагностичното поведение при изясняване на

етиологията на алергичните прояви и необходимостта от паралелно лечение с антиалергични и антипаразитни лекарствени средства.

VI. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

Изводи:

1. В нашето проучване се установи 9,6% екстензитет на заразяване с *Blastocystis sp.* сред пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария.

2. При паразитологичното изследване на сравнително еднакъв брой пациенти с клинично изявена алергия и здрави лица екстензитетът на опаразитяване с *Blastocystis sp.* е статистически значимо по-висок при пациентите с уртикария.

3. Генотипирането на изолати от пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария и от здрави лица, опаразитени с *Blastocystis sp.* е с данни за разпространение на два субтипа - ST1 и ST3, независимо че в изследването бяха заложени праймери за субтипове от ST1 до ST7.

4. Установихме статистически значима по-висока честота на носителството на антитоксокарни IgG антитела сред пациентите с уртикария спрямо здрави лица от контролна група.

5. Средните стойности на общия серумен IgE при пациенти с уртикария и носителство на антитоксокарни IgG антитела са статистически значимо по-високи в сравнение със средните нива на общия IgE при лица от контролната група.

6. Установихме статистически достоверна възходяща корелация между нивата на антитоксокарни IgG антитела и нивата на общия серумен IgE. С повишаване на нивата на антитоксокарните IgG антитела се наблюдава пропорционално увеличаване на стойностите на общия IgE.

7. Нивата на ЕСР сред пациентите с уртикария са статистически значимо по-високи в сравнение с тези при здрави лица.

8. Стойностите на ЕСР при пациенти с уртикария и наличие на антитоксокарни IgG антитела са статистически значимо по-високи от тези при пациенти с уртикария и липса на антитоксокарни антитела.

9. Установена е статистически достоверна позитивна корелация между нивата на ЕСР и на антитоксокарните IgG антитела при пациентите с остра уртикария.

Приноси:

Научно-теоретични приноси с оригинален характер:

1. Апробиран и приложен е молекулярно-генетичен метод за определяне на субтиповата принадлежност на *Blastocystis* sp., изолиран от пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария.

2. С помощта на имунологични и статистически методи е охарактеризирана разликата в нивата на ЕСР между пациенти с уртикария и наличие на антитоксокарни IgG антитела, и такива с уртикария и без наличие на антитоксокарни антитела и възможността той да бъде ползван като индикатор за наличие на паразитна инвазия.

3. Установената възходяща корелация между нивата на общия IgE, ЕСР и нивата на антитоксокарните IgG антитела при пациенти с остра уртикария, дава индиректна възможност за определяне на етиологията на алергичното състояние.

Приноси с научно-приложен характер:

1. В резултат на комплексно проучване е определен екстензитетът на опаразитяване с *Blastocystis* sp. на значителен контингент хоспитализирани пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария.

2. Чрез анализ на честотата на заразяване с *Blastocystis* sp. сред пациенти с клинично изявена алергия е установена необходимостта от провеждане на изследване за чревни паразити при всеки пациент с остра или хронична спонтанна уртикария.

3. Направено е проучване върху честотата на носителство на антитоксокарни IgG антитела, доказани с метода ELISA, сред голям контингент от болни с остра и хронична спонтанна уртикария.

4. Чрез статистически методи е доказана сигнификантна разлика в честота на носителство на антитоксокарни IgG антитела между пациенти с уртикария и здрави лица и е установена необходимостта всеки пациент с клинично изявена алергия да бъде подложен на серологично изследване за тъканна паразитоза.

5. Установените статистически значими промени в нивата на общия IgE и ECP, корелиращи с нивата на антитоксокарните IgG антитела могат да се използват в медицинската практика като допълнителни критерии за оценка на случаите на „скрита“ токсикароза при пациенти с уртикария.

VII. Списък на публикации, участия и проекти във връзка с дисертационния труд

Публикации във връзка с дисертацията

1. Lalev M, Nankov V, **Stoyanov L**, Angelov I. Polymerase chain reaction-based subtype diversity of *Blastocystis* species isolates obtained from hospitalized patients with blastocystosis. *Archives of the Balkan Medical Union*. 2020;55(3):431-436. ISSN 2558-815X. (SJR - 0,128; Q4)
2. Kaneva E, **Stoyanov L**, Lalev M, Angelov I, Harizanov R. *Blastocystis sp.* and *Toxocara spp.* Coinfection in Patients with Clinically Manifested Skin Allergy. *Acta Microbiologica Bulgarica*. 2023;39(4):423-427. ISSN 2603 - 3755. (SJR - 0,136; Q4)
3. **Stoyanov L**, Angelov I. Carriership of anti-Toxocara IgG antibodies among patients with clinical allergy. *J of IMAB*. 2024;30(2):5490-5494. ISSN 1312 - 773X. (IF - 0,1; Q4)

Участия на конгреси и конференции с научни съобщения във връзка с дисертацията

1. **Стойанов Л**, Ангелов И. Клинично изявената алергия и връзката ѝ с носителство на антитоксокарни IgG антитела. XI-та национална научна конференция HIV/AIDS и екзотични инфекциозни и паразитни болести. 30 май - 02 юни 2024, Цигов чарк.
2. **Стойанов Л**, Драгомирова П, Ангелов И. Проучвания върху нивата на общия IgE и антитоксокарни IgG антитела при пациенти с клинично изявена алергия. XI-та национална научна конференция HIV/AIDS и

екзотични инфекциозни и паразитни болести. 30 май - 02 юни 2024, Цигов чарк.

3. Стоянов Л, Нанков В, Лалев М, Ангелов И. Генотипиране на *Blastocystis* sp. изолати от пациенти с клинично изявена алергия и здрави паразитоносители. XI-та национална научна конференция HIV/AIDS и екзотични инфекциозни и паразитни болести. 30 май - 02 юни 2024, Цигов чарк.

4. Стоянов Л, Кънева Е, Ангелов И. Еозинофилният катионен протеин като допълнителен маркер в диагностиката на скритите форми на токсокароза при пациенти с клинично изявена алергия. Юбилейна научна конференция с международно участие „50 години медицинско образование и наука в Плевен”, 01-03 ноември 2024 г., гр. Плевен

Научно-изследователски проекти свързани с труда на дисертацията

1. Проект № D2/2023г „Промени в нивата на общия IgE, еозинофилния катионен протеин и броя на еозинофилните клетки при пациенти с токсокароза и клинично изявена алергия“, финансиран от Медицински университет - Плевен

РЕЗЮМЕ

Паразитните заболявания често протичат с развитие на клинично изявена алергия, като резултат от алергизираният ефект на жизнената дейност на паразита в гостоприемника. В нашето проучване, изследвахме ролята на *Blastocystis sp.* и *Toxocara spp.* като алергени, поради честото им откриване сред пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария.

Установихме 9.6% екстензитет на опаразитяване с бластоцистоза сред 1197 пациенти с уртикария и екстензитет от 1.2% сред 1300 здрави лица без алергична симптоматика. Честотата на опаразитяване с *Blastocystis sp.* при пациенти с остра уртикария е 8.4%, а при пациенти с хронична спонтанна уртикария е 10.4%. В нашето проучване категориите възраст и пол са замъгляващи фактори за опаразитяване с *Blastocystis sp.* Установихме, че вероятността за наличие на бластоцистоза е 8 пъти по-висока при лица с остра уртикария спрямо контролите и 10 пъти по-висока при пациенти с хронична спонтанна уртикария, спрямо здрави контроли.

Проучихме субтиповата принадлежност на бластоцистни изолати от 45 пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария и от 24 здрави паразитоносители. Изолирахме субтип 1 и 3, което отговаря на резултатите от предишни проучвания извършвани в страната и в Европа. Установихме приблизително еднакво разпределение на двата субтипа, както сред пациенти с уртикария, така и сред здрави лица.

Открихме носителство на антитоксокарни IgG антитела при 26.3% от 297 пациенти с остра и хронична уртикария и при 5% от изследваните лица без алергични прояви. Рискът за носителство на антитоксокарни антитела е 3.4 по-висок при пациенти с остра уртикария и 3.2 при пациенти с хронична спонтанна уртикария спрямо здравите контроли.

При проучване на общия серумен IgE, установихме значимо по-високи медианни стойности на IgE при пациенти с уртикария, с и без

наличие на антитоксокарни IgG антитела спрямо контроли без алергична симптоматика и без носителство на антитоксокарни антитела. Открихме корелационна зависимост при пациентите с уртикария между нивата на общ серумен IgE и нивата на антитоксокарни IgG антитела.

Повишени нива на еозинофилен катионен протеин са установени при пациенти с уртикария и носителство на антитоксокарни IgG антитела спрямо пациенти с уртикария и липса на антитоксокарни антитела и спрямо здрави контроли. Отчитаме и корелация между стойностите на ECP и на антитоксокарни IgG антитела при пациенти с остра уртикария.

Резултатите от нашите проучвания ще бъдат от практическа полза и ще подпомогнат диагностичното поведение при пациенти с алергични прояви и нуждата от допълнително етиологично противопаразитно лечение.