

РЕЦЕНЗИЯ

От проф. д-р Искра Георгиева Райнова, дн

Научна специалност „Паразитология и хелминтология“, Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), Отдел „Паразитология и тропическа медицина“

Относно: Дисертационен труд на д-р Людмил Стефанов Стоянов

Редовен докторант към катедра „Инфекциозни болести, епидемиология, паразитология и тропическа медицина“ към факултет „Обществено здраве“ при МУ Плевен. Област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт; Професионално направление 7.1 Медицина, Докторска програма: Медицинска паразитология и хелминтология.

Тема на дисертационния труд:

Ролята на *Blastocystis sp.* и *Toxocara spp.* като паразитни алергени: диагностични проучвания при пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария

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

Представените материали са на електронен носител и са в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение за придобиване на ОНС „Доктор“. При прегледа на дисертационния труд не открих данни за плагиатство.

Декларирам, че нямам общи научни разработки с докторанта и потенциален конфликт на интереси.

I. Провеждане на докторантурата: Д-р Стоянов като преподавател в Катедра „Инфекциозни болести, Епидемиология, Паразитология и Тропическа медицина“ е зачислен за редовен докторант през ноември 2019 г. По време на разработването на дисертационния труд е положил успешно изпитите за кандидатски минимум. След отчисляване с право на защита през 2024 г. е открита процедура за апробация на дисертационния труд.

II Актуалност и значимост на темата.

Дисертационният труд разглежда една много съвременна и актуална тема за връзката между алергичните състояния и паразитните болести. В случая се проучва влиянието на *Blastocystis sp.* и *Toxocara spp.* върху развитието на остра и хронична уртикария. В своята

разработка д-р Стоянов е включил един представител на паразитните протозои - *Blastocystis sp.* и един паразитен хелминт – *Toxocara spp.* Така към основната теза за връзката между паразитите и алергичните състояния се включват представители на двете големи групи паразити – протозои и хелминти.

Причините за развитие на алергия са разнообразни и според експертни оценки над 500 000 души са засегнати от дихателни алергии, а от тях 150 000 са деца. Често алергична симптоматика се установява в хода на инвазии, причинявани от различни паразитни видове и редица учени търсят взаимовръзка между тях. Едни от най-широко разпространените паразитози при хората са геохелминтозите и токсокарозата с причинител *Toxocara spp.* също се включва в тази група заболявания. В организма на човека се развива ларвната форма на токсокарите и като тъканен паразит отделя секреторно-екскреторни антигени, които стимулират имунната система и могат да доведат до силни алергични реакции, като астма, уртикария или атопия. От друга страна бластоцистозата, като чревна протозооза също може да протича с изявена алергична симптоматика. Проучването на разпространението на токсокарозата и бластоцистозата сред пациенти с остра и хронична уртикация, както и патогенетичното въздействие на етиологичните причинители на двете паразитози обуславят актуалността на темата на дисертационния труд. Използването на техники за генотипиране на изолати от *Blastocystis sp.* показва, че д-р Стоянов е овладял и успешно е приложил съвременни диагностични методики.

II. Структура на дисертационния труд

Научният труд на д-р Стоянов отговаря на изискванията за разработване на дисертационни трудове: начин на структуриране, представяне на проблема, анализ на получените данни и защита на основните тези на автора.

Представеният материал е разработен на 152 страници и съдържа 19 фигури и 12 таблици. В литературната справка са включени 214 заглавия, от които 9 на кирилица и 205 на латиница. Библиографията е актуална и изчерпателна, като 57% от източниците са публикувани в последните 10 години.

Литературният обзор е целенасочен и информативен, като представя изчерпателен преглед на разпространението и клиничната значимост на алергичните заболявания и паразитозите, авторът е дал конкретни и ясни определения за остра, хронична и спонтанна

уртикария. Описани са етиологията, таксономията, биологията, жизнения цикъл на *Blastocystis sp.*, установените субтипове от изолатите на паразита от хора и възможността за подробно е анализирана позитивната връзка между хелминтната инвазия и развитието на различни алергични състояния. Чрез включването на двата показателя - еозинофилен катионен протеин (ЕСР) и общ IgE д-р Стоянов търси допълнителни критерии за определяне стадия на инвазионния процес при пациенти с токсикароза и наличие на остра и хронична спонтанна уртикария.

Цел и задачи.

На базата на направения анализ е очертана целта и са формулирани 5 задачи на дисертационния труд. Поставената цел на научната разработка е ясна и точна. Задачите са конкретни и са пряко свързани с научната хипотеза и постигането на целта на проучването.

Материалът и методите са описани изчерпателно. Методичните подходи са правилно подбрани, както за постигане на целта на дисертационния труд, така и с оглед на достоверност на докладваните резултати. Включени са 3103 лица от Плевенска област, като 1679 са изследвани за чревни и тъканни паразитози по повод симптоми на остра и хронична спонтанна уртикария и 1424 са здрави лица без анамнестични данни за алергична симптоматика. Броят на изследваните лица и пациенти е достатъчен за статистически анализ.

От описанието на използваните методи се вижда, че д-р Стоянов е усвоил значителен набор от съвременни диагностични техники, които да помогнат за разрешаване на поставената цел.

Приложените статистически методи са подходящи за анализ на резултатите от проучването. Нямам забележки или препорък към този раздел и му давам висока оценка.

Резултатите от проведените изследвания са представени в един раздел на общо 32 страници. Описанието на данните следва логично реда на задачите на дисертационния труд. Резултатите са онагледени с отлично изготвени таблици и фигури, които дават синтезирана информация и улесняват възприемането на материала. Статистическата достоверност е представена много добре както в текста, така и при фигурите и таблиците. Получените резултати са убедителни и са описани ясно и точно, което създава отлична прегледност и документиране на научните факти.

По първата задача за чревни протозои и хелминти са изследвани 1197 пациенти с остра уртикария (ОУ) и хронична спонтанна уртикария (ХСУ) и 1300 здрави лица. Екстензитетът на опаразитяване с *Blastocystis sp.* сред пациентите с уртикария е сигнификантно по-висок (9.6%) в сравнение с лицата от контролната група (1.2%). Интересни са резултатите за опаразитяването с *Blastocystis sp.* при пациенти с уртикария по възраст и пол. Авторът установява по-висока опаразитеност след лицата на възраст между 41-60 г. (37.40%) и жените (66.1%). Сравнението с контролната група показва, че вероятността за опаразитяване с *Blastocystis sp.* е около 8 пъти по-висока при пациенти с ОУ и почти 10 пъти по-висока – при пациенти с ХСУ.

По втората поставена задача чрез конвенционален PCR са генотипирани бластоцистни изолати от 45 пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария и от 24 здрави паразитоносители. Основно и при двете групи изследвани лица се откриват суптипове ST3 и ST1, които са сред най-често изолираните субтипове на *Blastocystis sp.*

По третата задача за наличие на антитоксокарни IgG антитела са изследвани 297 пациенти с уртикария и 50 здрави лица без алергични оплаквания. Данните за пациентите са събрани ретроспективно от наличната медицинска документация за периода 2018-2023 г.

Прави впечатление доста високият относителен дял на положителните за токсикароза пациенти както с остра и хронична уртикария – 26.3%, така и в контролната група - 10%. Друг интересен резултат е, че пациентите с уртикария (ОУ и ХСУ) имат средно 3.3 пъти по-висок риск за носителство на антитоксокарни IgG антитела спрямо контролната група.

За изпълнение на четвъртата задача д-р Стоянов проучва връзката между стойностите на общия IgE при три групи: а) пациенти с уртикария и токсикароза; б) пациенти с уртикария, но без данни за токсикароза и в) здрави лица. Авторът не установява статистически значима разлика в средните стойности на общия IgE при първите две групи, но открива данни за корелация между нивата на антитоксокарните IgG антитела и общия IgE.

При изпълнението на петата задача д-р Стоянов сравнява стойностите на ЕСР при същите групи изследвани пациенти, описани в задача № 4. Резултатите са показали статистически достоверна разлика в стойностите на еозинофилния катионния протеин при групите пациенти с уртикариална симптоматика с и без наличие на специфични токсикарни

антитела. Също важно е наблюдението, че в зависимост от нивата на антитоксокарните IgG антитела са и стойностите на ЕСР при пациентите с остри прояви на алергичната реакция.

Анализът и обсъждането на резултатите е ясно и аналитично, като дава пълна представа за извършената изследователска работа и съответства на поставените задачи и крайна цел. В заключение дисертантът обобщава, че при пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария честотата на опаразитяване с *Blastocystis sp.* и *Toxocara spp* е значително по-висока в сравнение с тази при здрави лица и препоръчва паразитологично изследване за чревна и тъканна паразитоза при всички случаи на клинично изявена алергична реакция.

III. Изводи. Изводите са 9 и са много добре формулирани. Те са конкретни, произтичат от поставените задачи, получените резултати и тяхното обсъждане.

IV. Приноси

Д-р Стоянов е посочил три научно-теоретични приноси с оригинален и пет с научно-приложен характер. Приемам изцяло приносите, тъй като те отразяват най-важните научни постижения на дисертационния труд. Научната и практическата стойност на направените приноси е безспорна, като особено ценни са определянето на субтиповата принадлежност на изолати на *Blastocystis sp.* от пациенти с остра и хронична спонтанна уртикария и установената възходяща корелация между нивата на общия IgE, ЕСР и стойностите на антитоксокарните IgG антитела при пациенти с остра уртикария, което може индиректно да дава възможност за определяне на етиологията на алергичното състояние.

V. Оценка на задължителните наукометрични показатели, свързани с дисертационния труд

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 3 журнални статии в списания с импакт фактор и импакт ранг. Представена е справка за участие в 4 научни форума, като във всички е д-р Стоянов първи автор. Считаю, че по този начин резултатите от разработването на дисертационния труд са получили много добра независима научна оценка и са станали достояние на широк кръг от академичната общност. С това е изпълнено едно от важните изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за неговото приложение. Освен това д-р Стоянов е ръководил един научно-изследователски проект, финансирани от МУ Плевен при разработването на дисертационния труд.

Във връзка с изготвените публикации считам, че получените резултати, особено от генотипирането е необходимо да бъдат отразени в международни списания с импакт фактор за обогатяване на базите данни за изолатите на *Blastocystis* sp., доказани в нашата страна.

V. **Авторефератът** е структуриран в 55 страници и включва всички резултати от дисертационния труд

VI. **VII. Заключение**

Дисертационният труд съдържа научни и научно-приложни резултати, които отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за неговото прилагане. Дисертационният труд показва, че докторантът д-р Людмил Стоянова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научната специалност „Медицинска паразитология и хелминтология“, като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за присъждането на образователната и научна степен **‘ДОКТОР’** на д-р Стоянов в докторска програма по „Медицинска паразитология и хелминтология“

София 14.09.2025 г.

Изготвила рецензията: **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**
Проф. д-р Искра Райнова, дн

REVIEW

By Prof. Dr. Iskra Georgieva Rainova, DSc

Scientific specialty "Parasitology and Helminthology," National Center for Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Department of Parasitology and Tropical Medicine

Regarding: Dissertation by Dr. Lyudmil Stefanov Stoyanov

Regular doctoral student at the Department of Infectious Diseases, Epidemiology, Parasitology, and Tropical Medicine, Faculty of Public Health, Medical University of Pleven. Field of higher education 7. Healthcare and sports; Professional field 7.1 Medicine, Doctoral program: Medical Parasitology and Helminthology.

Thesis topic:

The role of *Blastocystis* sp. and *Toxocara* spp. as parasitic allergens: diagnostic studies in patients with acute and chronic spontaneous urticaria

Scientific supervisor: Assoc. Prof. Ivelin Angelov Angelov, MD

The materials presented are on electronic media and comply with the requirements of the Academic Staff Development Act and the Regulations for its application for the acquisition of ONS "Doctor. Upon reviewing the dissertation, I found no evidence of plagiarism.

I declare that I have no joint scientific projects with the doctoral student and no potential conflict of interest.

I. Conduct of the doctoral program: Dr. Stoyanov as a lecturer in the Department of Infectious Diseases, Epidemiology, Parasitology, and Tropical Medicine, was enrolled as a regular doctoral student in November 2019. During the development of his dissertation, he successfully passed the minimum candidate exams. After being expelled with the right to defend in 2024, a procedure for the approval of the dissertation was opened.

II. Relevance and significance of the topic.

The dissertation examines a very contemporary and relevant topic concerning the relationship between allergic conditions and parasitic diseases. In this case, the influence of *Blastocystis* sp. and *Toxocara* spp. on the development of acute and chronic urticaria. In his study, Dr. Stoyanov included one representative of parasitic protozoa - *Blastocystis* sp. and one parasitic helminth - *Toxocara* spp. Thus, the main thesis on the relationship between parasites and allergic conditions includes representatives of the two large groups of parasites - protozoa and helminths.

The causes of allergy development are diverse, and according to expert estimates, over 500,000 people are affected by respiratory allergies, 150,000 of whom are children. Allergic symptoms are often observed during invasions caused by various parasitic species, and a

number of scientists are looking for the connection between them. Some of the most widespread parasitic diseases in humans are soil transmitted parasitic diseases and toxocariasis caused by *Toxocara spp.* is from this group of diseases. The larval form of *Toxocara* develops in the human body and, as a tissue parasite, secretes secretory-excretory antigens that stimulate the immune system and can lead to severe allergic reactions such as asthma, urticaria, or atopy. On the other hand, blastocystosis, as an intestinal protozoan disease, can also cause pronounced allergic symptoms. The study of the prevalence of toxocariasis and blastocystosis among patients with acute and chronic urticaria, as well as the pathogenetic effect of the etiological agents of the two parasitoses, determine the relevance of the topic of the dissertation. The use of genotyping techniques for *Blastocystis sp.* isolates shows that Dr. Stoyanov has mastered and successfully applied modern diagnostic methods.

II. Structure of the dissertation

Dr. Stoyanov's scientific work meets the requirements for the development of dissertations: structure, presentation of the problem, analysis of the data obtained, and defense of the author's main theses.

The presented material is developed on 152 pages and contains 19 figures and 12 tables. The bibliography includes 214 titles, of which 9 are in Cyrillic and 205 are in Latin. The bibliography is up-to-date and comprehensive, with 57% of the sources published in the last 10 years.

The literature review is focused and informative, providing a comprehensive overview of the prevalence and clinical significance of allergic diseases and parasitic infections in modern conditions. The pathogenesis of allergic reactions in parasitic diseases is discussed, and the author provides specific and clear definitions of acute, chronic, and spontaneous urticaria. The etiology, taxonomy, biology, and life cycle of *Blastocystis sp.* are described, as are the established subtypes of parasite isolates from humans and the possibility of developing urticaria in patients with blastocystosis. With regard to toxocariasis, the positive relationship between helminthic invasion and the development of various allergic conditions is also analyzed in detail. By including two indicators—eosinophil cationic protein (ECP) and total IgE—Dr. Stoyanov seeks additional criteria for determining the stage of the invasive process in patients with toxocariasis and the presence of acute and chronic spontaneous urticaria.

Goal and objectives.

Based on the analysis, the goal is outlined and five objectives of the dissertation are formulated. The goal of the scientific research is clear and precise. The tasks are specific and directly related to the scientific hypothesis and the achievement of the study's objective.

The material and methods are described in detail. The methodological approaches are correctly selected, both for achieving the objective of the dissertation and for ensuring the reliability of the reported results. A total of 3,103 individuals from the Pleven region were included, of whom 1,679 were examined for intestinal and tissue parasitosis due to symptoms of acute and chronic spontaneous urticaria, and 1,424 were healthy individuals with no history of allergic symptoms. The number of individuals and patients examined is sufficient for statistical analysis.

The description of the methods used shows that Dr. Stoyanov has mastered a significant set of modern diagnostic techniques that help achieve the set goal.

The statistical methods applied are appropriate for analyzing the results of the study. I have no comments or recommendations on this section and give it a high rating.

The results of the studies are presented in a single section of 32 pages. The description of the data follows the logical order of the tasks of the dissertation. The results are illustrated with excellently prepared tables and figures, which provide synthesized information and facilitate the perception of the material. Statistical reliability is presented very well both in the text and in the figures and tables. The results obtained are convincing and are described clearly and accurately, which creates excellent clarity and documentation of the scientific facts.

For the first task on intestinal protozoa and helminths, 1,197 patients with acute urticaria (AU) and chronic spontaneous urticaria (HSU) and 1,300 healthy individuals were examined. The prevalence of *Blastocystis sp.* infection among patients with urticaria is significantly higher (9.6%) compared to individuals in the control group (1.2%). The results for *Blastocystis sp.* infection in patients with urticaria by age and gender are interesting. The author found higher parasitism among individuals aged 41-60 (37.40%) and women (66.1%): Comparison with the control group shows that the probability of *Blastocystis sp.* infection is about 8 times higher in patients with AU and almost 10 times higher in patients with HSU.

For the second task, blastocyst isolates from 45 patients with acute and chronic spontaneous urticaria and from 24 healthy parasite carriers were genotyped using conventional PCR. Subtypes ST3 and ST1, which are among the most frequently isolated subtypes of *Blastocystis sp.*, were found in both groups of subjects.

For the third task, 297 patients with urticaria and 50 healthy individuals without allergic complaints were tested for the presence of anti-*Toxocara* IgG antibodies. Patient data were collected retrospectively from available medical records for the period 2018-2023.

The relatively high proportion of patients positive for toxocariasis is striking, both in acute and chronic urticaria (26.3%) and in the control group (10%). Another interesting result

is that patients with urticaria (AU and HSU) have an average of 3.3 times higher risk of carrying anti-toxocara IgG antibodies compared to the control group.

To accomplish the fourth task, Dr. Stoyanov studied the relationship between total IgE values in three groups: a) patients with urticaria and toxocariasis; b) patients with urticaria but no evidence of toxocariasis; and c) healthy individuals. The author found no statistically significant difference in the mean total IgE levels in the first two groups, but found evidence of a correlation between anti-*Toxocara* IgG antibody levels and total IgE.

In the fifth task, Dr. Stoyanov compares the ECP values in the same groups of patients described in task No. 4. The results showed a statistically significant difference in the values of eosinophil cationic protein in groups of patients with urticarial symptoms with and without specific toxocara antibodies. It is also important to note that, depending on the levels of anti-toxocara IgG antibodies, the ECP values in patients with acute manifestations of allergic reactions also vary.

The analysis and discussion of the results is clear and analytical, providing a complete picture of the research work carried out and corresponding to the tasks set and the ultimate goal. In conclusion, the author summarizes that in patients with acute and chronic spontaneous urticaria, the frequency of parasitization with *Blastocystis sp.* and *Toxocara spp.* is significantly higher than that in healthy individuals and recommends parasitological testing for intestinal and tissue parasitosis in all cases of clinically evident allergic reactions.

III. Conclusions. There are 9 conclusions, which are very well formulated. They are specific, derived from the tasks set, the results obtained, and their discussion.

IV. Contributions

Dr. Stoyanov has indicated three scientific-theoretical contributions of an original nature and five of a scientific-applied nature. I fully accept the contributions as they reflect the most important scientific achievements of the dissertation. The scientific and practical value of the contributions made is indisputable, with the determination of the subtype affiliation of *Blastocystis sp.* isolates from patients with acute and chronic spontaneous urticaria and the established upward correlation between total IgE levels, ECP, and anti-*Toxocara* IgG antibody values in patients with acute urticaria, which may indirectly enable the determination of the etiology of the allergic condition.

V. Assessment of the mandatory scientometric indicators related to the dissertation

The results of the dissertation have been published in three journal articles in magazines with impact factor and impact rank. A report on participation in four scientific forums is presented, with Dr. Stoyanov as the first author in all of them. I believe that in this way, the

results of the dissertation have received a very good independent scientific evaluation and have become known to a wide range of the academic community. This fulfills one of the important requirements of the Law on the Development of Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations for its application. In addition, Dr. Stoyanov led a research project funded by MU Pleven during the development of the dissertation.

With regard to the publications, I believe that the results obtained, especially from genotyping, should be published in international journals with an impact factor in order to enrich the databases on *Blastocystis* sp. isolates proven in our country.

VI. The abstract is structured in 55 pages and includes all the results of the dissertation.

VII. Conclusion

The dissertation contains scientific and applied scientific results that meet all the requirements of the Law on the Development of Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations for its implementation. The dissertation shows that the doctoral student Dr. Lyudmil Stoyanova has in-depth theoretical knowledge and professional skills in the scientific specialty "Medical Parasitology and Helminthology" demonstrating qualities and skills for conducting independent scientific research.

For the reasons stated above, I am confident in giving my positive assessment for the awarding of the educational and scientific degree of "DOCTOR" to Dr. Stoyanov in the doctoral program in "Medical Parasitology and Helminthology."

Sofia, 14 September 2025

Review prepared by: **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**
Prof. Dr. Iskra Rainova, DSc