

СТАНОВИЩЕ

от Проф. д-р Виктория Цветанова Дойчева, дм

Катедра „Епидемиология и хигиена“, МУ – София

Външен член на Научно жури , определено със

Заповед № 1247/25.04.2023г. на Ректора на МУ-Плевен

Относно: Дисертационен труд на Александър Божидаров Блажев, докторант на самостоятелна подготовка към Сектор „Биология“ на Катедра“ Анатомия, хистология, цитология и биология“, МФ при МУ-Плевен, на тема: „Проучване на заразеността с *Borrelia burgdorferi sensu lato* при иксодови кърлежи в Плевенска област“ с Научени ръководители: проф. д-р Милена Карчева, дм и доц. Милена Атанасова дб за придобиване на образователна и научна степен „**доктор**“ по научната специалност „Медицинска биология“ в професионално направление „Биологически науки“

Представените документи от докторанта А. Блажев отговарят на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ- Плевен.

Професионално развитие

Александър Блажев е роден през 1975г. в гр. Русе. През 1999г. завършва магистърска степен „Биология“ със специализация „Музейно дело, ботанически и зоологически градини“ в ПУ „ П. Хилендарски“- гр. Пловдив. От 2009г. е асистент в Сектор „Биология“ в МУ- Плевен. Има призната специалност „Медицинска биология“ от 2006г. Основните научни направления в които работи са Молекулярна биология, Паразитология и Имунология. Владее отлично английски и руски езици и притежава добри познания по китайски език, както и отлична компютърна грамотност. Със Заповед № 2296 / 25.09.2018г. на Ректора на МУ-Плевен е зачислен като докторант на самостоятелна подготовка в Сектор „Биология“ за придобиване на образователна и научна степен „доктор“. Отчислен с право на защита с Протокол от разширен Катедрен съвет от 31.03.2023г.

Актуалност на дисертационния труд

Избраната тема на дисертационният труд е съвременна и актуална. Лаймската борелиоза е широко разпространена природо-огнищна трансмисивна инфекция. Нивото на заболяемостта е в пряка зависимост от степента на разпространение и заразеност с причинителя на инфекцията на кърлежите от род *Ixodes* (*Ix. ricinus*, *Ix. scapularis*, *Ix. persulcatus*, *Ix. ricinus*). Динамиката на заболяемостта от Лаймска борелиоза е в пряка зависимост от биологичната активност на преносителите на причинителя. У нас инфекцията е диагностицирана за първи път през 1987 г. от Й. Савова, Л. Ангелов и Ив. Вапцаров. През 1993г. А. Томов изолира в чиста култура причинителя от кърлежи събрани в околностите на гр. София. Мащабните епидемиологични проучвания на заболяването показват, че в България това е най-широко разпространената природо-огнищна кърлежово-преносима инфекция. За преносители на причинителя на Лаймска борелиоза в различните региони на земното кълбо са различни видове кърлежи от род *Ixodes*, като в Европа водеща роля има *Ixodes ricinus*. Епидемиологичната практика през последните години показва, че при Лаймската борелиоза, наред с природните, съществуват и антропоургични огнища. Множество крайградски и градски паркове често се оказват екологични ниши за осъществяване на жизнения и сезонен цикъл на кърлежите, преносители на инфекцията.

Структура на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 197 стандартни страници и е богато онагледен с 28 таблици, 39 фигури и 13 карти. Структуриран е съгласно изискванията. Библиографската справка включва 283 литературни източници- 14 на кирилица и 269 на латиница, повечето от последните 10 години.

Литературният обзор е написан компетентно и е структуриран в съответствие с изискванията, като осветлява подробно и всеобхватно всички аспекти на етиологията, клиниката, диагностиката, епидемиологията, контрола, надзора и профилактиката на Лаймската борелиоза, както и морфолого-анатомичните характеристики на кърлежите – преносители на причинителя *Borrelia burgdorferi sensu lato*. От него проличава, че разработваният проблем се познава много добре от

дисертанта. Поставен е акцент върху цялостната характеристика на причинителя на инфекцията. Задълбочено са представени взаимоотношенията между причинителя и преносителя на Лаймската борелиоза..

В Собствените проучвания са посочени целта, задачите материалите и методите на изследване. Целта е ясно и точно формулирана- чрез идентификация и анализ на иксодофауната в Плевенска област и характеризиране инфектираността на *Ixodes ricinus* с *Borrelia burgdorferi* s.l. да се установят огнищата с кърлежови популации и тяхната популационна плътност като на базата на установените данни се направи оценка на риска от заразяване на населението в областта. За нейното постигане са набелязани 8 задачи. Използвани са съвременни методи – ретроспективен епидемиологичен анализ на Лаймската борелиоза в България и в Плевенска област , правила за събиране и изследване на кърлежи, като най-често използваните техники са влаченето (dragging) и флагирането (flagging), определяне на плътността на активно дебнещите кърлежи и определяне на районите за събиране на кърлежи. В хода на проучването са включени райони, неизследвани до момента в България. Те са както следва: защитена местност „Кайлъка“, Плевен, поддържани и неподдържани зони в ЗМ „Кайлъка“, природна забележителност (ПЗ) „Карстово ждрело на р. Чернелка“ от с. Горталово до с. Къртожабене, поречието на р. Вит от с. Дисевица до „Исторически мост на победата“ над река Вит – Плевен, с. Садовец, местност „Гарван дол“ и с. Гривица, местност „Тачова чешма“. Подробно дисертанта описва методите на екстракция на ДНК от уловените кърлежи, както и гнездова полимеразна верижна реакция (nested PCR – гнездова, „вложена“ nPCR) за детекция на причинителя на инфекцията *Borrelia burgdorferi sensu lato* от кърлежи *Ixodes ricinus*. Картографирането на районите А. Блажев осъществява чрез софтуер за географска информационна система Географските координати на всеки един кърлеж се извличат от Google Карти и експортират в Microsoft Excel 2016 непосредствено след събирането им . Дисертантът използва съвременни статистически методи за анализ и обработка на данните от своето проучване.

В Глава Резултати дисертантът извършва задълбочено епидемиологично проучване и анализ на кърлежово-преносимите инфекции в България и

Плевенска област. Подробно са описани кампаниите по събиране на кърлежи в Плевенска област. Събирането на иксодови кърлежи от дисертанта е извършено за период от 7 години (2016-2022 г.) през пролетно-летния сезон от март до края на юни според метеорологичните условия. Проведени са общо 75 кампании на събиране, при които са събрани 1459 кърлежи (1376, от които чрез флагиране) от района на Плевенска област. Посочен е видовият състав на иксодовите кърлежи, които са открити за периода на проучването, средната плътност и честота на кърлежите от вида *Ixodes ricinus* по години, разпределение по пол и стадий на развитие, както и природните фактори- температура и влажност при събирането на кърлежите.

А. Блажев извършва сравнителен анализ на кърлежите от определените райони на Плевенска област и представя своите резултати от сравняване популациите на *Ix. ricinus* между различните райони на проучване. В резултат от цялостната изследователска работа от проучването А. Блажев е изработил епизоотологични карти обхващащи няколко района на Плевенска област.

Дисертантът прави 10 обобщени извода, в които е синтезирана неговата проучвателна и изследователска дейност. Приносите са разделени на приноси с оригинален характер- 8 и приноси с потвърдителен характер - 5, които аз напълно приемам.

Проведено е комплексно ретроспективно епидемиологично и социално-демографско проучване на популационни извадки с доказана Лаймска борелиоза. За първи път в Плевенска област е направено проучване на популациите от иксодови кърлежи. За първи път е използвана честотата на активно причакващите кърлежи като индекс за сравнение на различните популации *Ixodes ricinus*. За първи път в Плевенска област се изследват популациите на *Ixodes ricinus* за носителство на спирохети от комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*. За първи път в България е проучена популационната плътност и честота на кърлежите от вида *Ixodes ricinus*. За първи път в България се улавя и идентифицира активно причакващ женски индивид от вида *Ixodes frontalis*.

Оригинален принос на проучването е установяването на ареали на *Ixodes ricinus* с екстремно висок процент на инфектираност с *Borrelia burgdorferi sensu lato*. За първи път в България се извършва сравняване на кърлежовите популации събирани от зони с регулярно третиране и поддържане на тревните площи с естествени неподържани райони.

Автореферат и публикации свързани с темата на дисертационния труд

Авторефератът към дисертационния труд отразява правилно структурата му и съдържа най-важните резултати и изводи от проучването.

Във връзка с темата на дисертационния труд А. Блажев представя 3 научни публикации реферирани и индексирани в световни бази данни, от които 1 с импакт-фактор (IF) и 2 с импакт ранг (SJR), както и 8 участия в научни форуми- 7 в България и 1 в чужбина. А. Блажев има участие и в два проекта. От Справка от МУ- Плевен за цитиранията на А. Блажев е видно, че за периода 01.01.2022г.- 25.04.2023г. броя на цитиранията е 27, от които 21 в списания с импакт фактор и импакт ранг.

Заключение

В заключение, считам, че дисертационния труд на Александър Блажев за придобиване на образователна и научна степен „доктор“ по актуалност, обем на проучването, методология, изводи, конкретни научни и приложни приноси отговаря напълно на критериите на Закона за развитие на академичния състав в Р България и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ-Плевен.

Във връзка с всичко гореизложено давам своята положителна оценка и препоръчвам на членовете на Научното жури да присъдят на Александър Божидаров Блажев образователната и научна степен „доктор“ по научната специалност „Медицинска биология“.

10.05.2023г

Проф. д-р В. Дойчева, дм **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**



DIALOGUE PLUS LTD

CONFERENCE INTERPRETERS, TRANSLATORS,
INFORMATION SPECIALISTS

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

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

Translation from Bulgarian

REVIEW

by Prof. Viktoriya Tsvetanova Doycheva, MD, PhD

Department of Epidemiology and Hygiene, MU - Sofia

External member of the Scientific Jury,

appointed by Order No. 1247/ 25/04/2023 of the Rector of MU - Pleven

Regarding: Dissertation of Alexander Bozhidarov Blazhev, independent doctoral student at the Sector of Biology, Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology, Faculty of Medicine, MU - Pleven, on the topic: Investigation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in ixodid ticks in the Pleven region, with scientific supervisors: Prof. Milena Karcheva, MD, PhD and Assoc. Prof. Milena Atanasova, PhD(BS), for attaining the educational and scientific degree of **Doctor** in the scientific specialty of Medical Biology in the professional field of Biological Sciences

The documents presented by the doctoral student A. Blazhev comply with the Act on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations on the Terms and Conditions for Attaining Scientific Degrees and Holding Academic Positions at MU - Pleven.

Professional Development

Alexander Blazhev was born in 1975 in the city of Ruse. In 1999, he graduated with a master's degree in biology, with a specialization in Museum work, botanical and zoological gardens at "P. Hilendarski" Plovdiv University. Since 2009, he has been an Assistant in the Department of Biology at MU - Pleven. He has a recognized specialty in Medical Biology since 2006. The main scientific areas in which he works are Molecular Biology, Parasitology and Immunology. He is fluent in English and Russian and has good knowledge of Chinese, as well as excellent computer literacy. By Order No. 2296/ 25/09/2018 of the Rector of MU - Pleven, he was enrolled as an independent doctoral student in the Sector of Biology for attaining the educational and scientific degree of Doctor. He was dismissed with the right of defense a protocol of the expanded Departmental Council from 31/03/2023.

Topicality of the dissertation

The chosen topic of the dissertation is modern and relevant. Lyme borreliosis is a widespread naturally occurring transmissible infection. The level of morbidity is directly dependent on the degree of spread and contamination with the causative agent of the infection - ticks of the genus *Ixodes* (*I. ricinus*, *I. scapularis*, *I. perscultatus*, *I. pacificus*). The dynamics of Lyme borreliosis is directly dependent on the biological activity of the carriers of the causative agent. In our country, the infection was diagnosed for the first time in 1987 by Y. Savova, L. Angelov and Iv. Vaptsarov. In 1993, A. Tomov isolated the causative agent in a pure culture from ticks collected in the vicinity of the city of Sofia. Large-scale epidemiological studies of the disease have shown that in Bulgaria, it is the most widespread natural-focus tick-borne infection. The carriers of the causative agent of Lyme borreliosis in the different regions of the globe are various tick species of the genus *Ixodes*, with *Ixodes ricinus* playing a leading role in Europe. Epidemiological practice in recent years has shown that in Lyme borreliosis, along with the natural, there are also anthropurgic foci. Many suburban and urban parks often turn out to be ecological niches for carrying out the life and seasonal cycle of ticks, carriers of the infection.

Structure of the dissertation

The dissertation is written on 197 standard pages and is richly illustrated with 28 tables, 39 figures and 13 maps. It is structured according to the requirements. The bibliographic reference includes 283 literature sources - 14 in Cyrillic and 269 in Latin, most of them from the last 10 years.

The literature review is competently written and structured in accordance with the requirements, illuminating in detail and comprehensively all aspects of the etiology, clinic, diagnosis, epidemiology, control, surveillance and prevention of Lyme borreliosis, as well as the morphological-anatomical characteristics of the ticks that carry the agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato. It is clear from the review that the topic being developed is known very well by the doctoral student. Emphasis is placed on the overall characterization of the causative agent of the infection. The relationships between the causative agent and the carrier of Lyme borreliosis are thoroughly presented.

The objective, tasks, materials and research methods are specified in the **Independent studies chapter**. The objective is clearly and precisely formulated through identification and analysis of the ixodofauna in the Pleven region and characterization of the infectivity of *Ixodes ricinus* with *Borrelia burgdorferi* s.l. with the aim to establish the foci of tick populations and their population density, and based on the established data, to assess the risk of infection of the population in the region. For its achievement, 8 tasks were set. Modern methods were used - a retrospective epidemiological analysis of Lyme borreliosis in Bulgaria and in the Pleven region, rules for collecting and examining ticks, with the most frequently used techniques being dragging and flagging, determining the density of actively lurking ticks and tick collection areas. During the study, areas unexplored in Bulgaria were included. They are as follows: "Kaylaka" protected area, Pleven, maintained and unmaintained areas in the "Kaylaka" ZM, "Karst Gorge of the Chernelka River" natural landmark from the village of Gortalovo to the village of Kartozhabene, the Vit river from the village of Disevitsa to the "Historical Bridge of Victory" over the Vit river - Pleven, the village of Sadovets, the area of "Garvan Dol" and the village of Grivitsa, the area of "Tachova Cheshma". The dissertation describes in detail the methods of DNA extraction from the collected ticks, as well as nested polymerase chain reaction (nested PCR, nPCR) for detection of the causative agent of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection from *Ixodes ricinus* ticks. The mapping of the regions was carried out by A. Blazhev using geographic information system software. The geographic coordinates of each tick were extracted from Google Maps and exported to Microsoft Excel 2016 immediately after their collection. The doctoral student uses modern statistical methods to analyze and process the data from his study.

In the **Results chapter**, the doctoral student carries out a thorough epidemiological study and analysis of tick-borne infections in Bulgaria and the Pleven region. The tick collection campaigns in the Pleven region are described in detail. The collection of ixodid ticks by the doctoral student was carried out over a period of 7 years (2016-2022) during the spring-summer season, from March to the end of June according to meteorological conditions. A total of 75 collection campaigns were conducted, during which 1,459 ticks were collected (1,376 of which by flagging) from the Pleven region. The species composition of ixodid ticks that were found during the study period, the average density and frequency of *Ixodes ricinus* ticks by year, distribution by sex and stage of development, as well as the natural factors - temperature and humidity when ticks were collected - were indicated.

A. Blazhev performs a comparative analysis of ticks from certain areas of the Pleven region and presents his results of comparing the populations of *I. ricinus* between the different study areas. As a result of the overall research work, A. Blazhev has produced epizootiological maps covering several areas of the Pleven region.

The doctoral student has drawn 10 general conclusions, which synthesize his study and research activities. The contributions are divided into contributions of an original nature - 8 and contributions of a confirmatory nature - 5, which I fully accept.

A complex retrospective epidemiological and socio-demographic study of population samples with proven Lyme borreliosis was conducted. For the first time in the Pleven region, a study of the populations of ixodid ticks was conducted. For the first time, the frequency of actively lurking ticks was used as an index to compare different *Ixodes ricinus* populations. For the first time in the Pleven region, *Ixodes ricinus* populations were investigated for carrying spirochetes from the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex. For the first time in Bulgaria, the population density and frequency of ticks of the species *Ixodes ricinus* was studied. For the first time in Bulgaria, an actively lurking female individual of the species *Ixodes frontalis* was caught and identified.

An original contribution of the study is the establishment of areas of *Ixodes ricinus* with an extremely high rate of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato. For the first time in Bulgaria, a comparison of the tick populations collected from areas with regular lawn treatment and maintenance with natural unmaintained areas is carried out.

Abstract and publications related to the topic of the dissertation

The abstract to the dissertation correctly reflects its structure and contains the most important results and conclusions of the study. In connection with the topic of the dissertation, A. Blazhev presents 3 scientific publications refereed and indexed in global databases, of which 1 with an impact factor (IF) and 2 with an impact rank (SJR), as well as 8 participations in scientific forums - 7 in Bulgaria and 1 abroad. A. Blazhev has also been involved in two projects. From the reference on the citations of A. Blazhev, prepared by MU – Pleven, it is evident that for the period 01/01/2022 – 25/04/2023, the number of citations is 27, of which 21 are in journals with impact factor and impact rank.

Conclusion

In conclusion, I believe that the dissertation of Alexander Blazhev for attaining the educational and scientific degree of Doctor in terms of relevance, scope of the study, methodology, conclusions, specific scientific and applied contributions fully meets the criteria of the Act on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations for the terms and conditions for attaining scientific degrees and holding academic positions at MU - Pleven.

In connection with all of the above, I give my positive assessment and recommend the members of the Scientific Jury to award the educational and scientific degree of Doctor in the scientific specialty of Medical Biology to Alexander Bozhidarov Blazhev.

May 10, 2023

Prof. V. Doycheva, MD, PhD

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

Translator:

