

## СТАНОВИЩЕ

от проф. Регина С. Комса-Пенкова, д. б. н.

Медицински университет-Плевен, Катедра "Химия и Биохимия", Сектор "Биохимия"

на дисертационния труд за присъждане на образователна и научна степен "доктор"

Професионално направление: 4.3. Биологични науки

Докторска програма: Медицинска биология

Автор: Александър Божидаров Блажев

Форма на докторантура: самостоятелна подготовка

Катедра: "Анатомия, хистология, цитология и биология" сектор "Биология"

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

Научни ръководители: проф. д-р Милена Карчева, д.м. и доц. Милена Атанасова д.б.,  
Медицински Университет - Плевен

Със заповед №1247/25.04.2023 г. На Ректора на Медицински Университет – Плевен съм определена за вътрешен член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема "Проучване на заразеността с *Borrelia burgdorferi* sensu lato при иксодови кърлежи в Плевенска област" на Александър Божидаров Блажев – докторант на самостоятелна подготовка към катедра "Анатомия, хистология, цитология и биология", с научни ръководители проф. д-р Милена Карчева д.м. и доц. Милена Атанасова д.б. от Медицински Университет – Плевен.

Представеният от докторанта комплект от документи е в съответствие с Правилника за развитие на академичния състав и изискванията за придобиване на образователната и научна степен "доктор" съгласно Приложение 2.2. на Медицински университет - Плевен. Представен е проект на автореферат и дисертационен труд.

### 1. Биографични данни

Александър Божидаров Блажев завършва Пловдивски Университет "Паисий Хилендарски" през 1999 г. с ОКС магистър по биология.

Професионалната кариера на ас. Блажев в областта на биологията започва през 2001 г., когато е назначен като биолог в МУ – Плевен.

През 2002 г. А. Блажев спечелва конкурс за асистент и през 2009 г. придобива специалност "Медицинска биология". Води упражнения по биология на български и английски език за студенти от медицина, фармация и ДЕСО.

А. Блажев активно участва в научно-изследователската и публикационната дейност на сектор "Биология". Той е член на изследователски екипи в над 10 научни проекта, финансирани от МУ – Плевен. Награждаван е 2 пъти през последните 5 години за отлични постижения в научно-изследователската дейност.

Към 2018 г. е зачислен за докторант на свободна подготовка към катедра "Анатомия, хистология, цитология и биология".

## **2. Актуалност на дисертационния труд**

В дисертационния си труд Александър Блажев анализира иксодофауната в Плевенска област с цел да установи инфектираността на *Ixodes ricinus* с *Borrelia burgdorferi* s.l. Полученните данни се използват за оценка на риска от заразяване с лаймска борелиоза (ЛБ), най-често срещаната естествена кърлежово-преносима зоонозна инфекция на населението в страните с умерен климат.

Актуалността на дисертационният труд е значима тъй като подобно изследване на кърлежовите популации за носителство на *B. burgdorferi* s.l. не е провеждано до настоящия момент в Плевенската област, въпреки че ежегодно се регистрират случаи на лаймска борелиоза.

Кърлежово-преносимите инфекции представляват сериозен проблем за общественото здраве, във връзка с това резултатите получените от изследванията на Александър Блажев ще допринесат за подобряване на знанията за разпространението на иксодови кърлежи в района и свързаните с тях патогени. По-доброто разбиране на рисковете, свързани с тези инфекции ще допринесе за разработването на по-ефективни мерки за контрол и превенция на рисковете.

## **3. Структура на дисертационния труд**

Дисертационен труд на А. Блажев е написан в обем от 175 стандартни страници, структуриран по следния начин: въведение 2 стр., литературен обзор - 38 стр; цел и

задачи - 2 стр; материали и методи - 26 стр; резултати - 49 стр; дискусия - 25 стр; изводи и приноси - 7 стр, библиография - 15 стр., в която са включени общо 183 литературни източници, от които 17 на български език.

Онагледването на получените резултати е представено с 39 репрезентативни фигури, 29 таблици, 13 эпизоотични карти и 2 приложения.

### **3.1 Оценка на литературния обзор**

Литературният обзор включва подробни данни за биологична характеристика на *B. burgdorferi* s.l., морфология, устройство на външната мембрана, външни мембранни протеини, организация на генома и таксономия. Описана е основната морфолого-анатомичната характеристика на семейство Ixodidae, което включва таксономия, систематика, морфология и анатомия на кърлежите, както и екологията, жизненият цикъл на семейството.

Много подробно е разгледано и взаимодействието между кърлежите и спирохетите на Лаймската борелиоза. Добре представено и разпространението на инфекцията, устойчивостта в гостоприемника и предаването от кърлежи към гръбначен гостоприемник. Също така се анализира взаимодействието между векторите и патогена.

Разглежда се географското разпространение на ЛБ, в различните региони по света, където това заболяване е налице, придавайки значение на факторите, които влияят върху разпространението ѝ. Представени са и клинични прояви на инфекция с *Borrelia burgdorferi* s.l, лабораторна диагноза, лечение и профилактика в България.

Като обем материалът е достатъчен и отговаря на целта и задачите поставени в дисертацията.

### **4. Цел и задачи**

Целта и задачите са формулирана точно и ясно.

### **5. Методология на изследването**

Използваните методи в изследването са добре подбрани за постигане на целите на проучването.

Ретроспективния епидемиологичен анализ за заболяемостта в района и дава насоки за изследване на регистрираните случаи на трансмисивни инфекции в Плевенска област и България.

Описани са методите за събиране на активни иксодови кърлежи, както и индексите за плътност и честота на популациите в различните райони на изследване. Подробно е описана флората и фауната на изследваните райони, което помага за разбиране на екологичните фактори, влияещи върху разпространението на *I. ricinus*. Проучването е фокусирано върху защитената местност "Кайлъка" и е разделено на 8 зони, групирани в две категории в зависимост от обработката на тревните площи и посещаемостта от хора.

Пилотните проучвания за наличие на спирохети в *Ixodes ricinus* са извършени с тъмнополева микроскопия и две nested PCR на *flaB* и *5S-23Sigs*.

Резултатите са верифицирани чрез Cohen's kappa тест. Статистическата обработка е извършена чрез IBM SPSS v.23, GraphPad Prism v.8 и MS Excel 2016.

Епизоотологичните карти са изработени чрез съвременни географски информационни системи и софтуери със свободен достъп.

## **6. Резултати и Дискусия**

Резултатите са представени последователно според поставените задачи и след това са подробно дискутирани.

Анализирана е заболяемостта в Плевенска област въз основа на регистрираните случаи от трансмисивни инфекции. Представени са резултати от кампаниите по събиране на кърлежи. Най – голям дял са индивидите от вида *Ixodes ricinus* – 1297 броя. Установена е средната честотата на *I. ricinus* за Плевенска област  $0.56 \pm 0.43$  n/min и плътност от  $4.84 \pm 7.52$  n/100 m<sup>2</sup>. Общата изчислена плътност (TQI) в ЗМ „Кайлъка“ е  $5.89 \pm 8.60$  n/100 m<sup>2</sup>, а честотата (TF) е  $0.61 \pm 0.46$ .

Осъществено е сравнение на популациите *I. ricinus* между различни проучени райони, които демонстрират зони с изключително висока плътност и честота на кърлежи (м. „Тачова чешма“, ЗМ „Кайлъка“ и ПЗ „Карстово ждрело на р. Чернелка“).

Разгледани са подробно резултатите от ЗМ „Кайлъка“ с двете групи територии (поддържани и неподдържани тревни площи), като не се установяват статистически значими разлики в плътностите и честотата на кърлежите в тези зони на ЗМ „Кайлъка“.

Наличието на *Borrelia burgdorferi* s.l. е установено в три от изследваните райони. В проучването на ЗМ "Кайлъка" за наличие на *B. burgdorferi* s.l. в кърлежи от вида *I. ricinus* е установено, наличие на спирохети в 45.2% от тях.

Проучването на 202 кърлежа с PCR е дало следните резултати:

- 97 кърлежа (48%) са били позитивни при амплификацията на *23S/5S* *igs* гена
- 104 кърлежа (51.5%) са били позитивни при амплификацията на *FlaB* гена
- Не е установена статистически значима разлика в наличието на инфектирани кърлежи между тези, събрани от градските поддържани площи и тези, събрани от други места (49.66% спрямо 42.69%,  $p = 0.177$ ). Въпреки това, наблюдава се по-висока честота на инфекция при кърлежите от градските поддържани площи.

В раздела дискусията е направен анализ на резултатите в сравнение с информацията с други проучвания в Европа. Дисертантът умело интерпретира своите резултати в контекста на специфичните за България и в частност Плевенски регион климатогеографски и екологични фактори.

За първи път се разглеждат проблеми, свързани, както с иксодофауната така и с разпространението на спирохетите от групата на ЛБ в Плевенска област. Екологичният анализ, базиран на географска информационна система (ГИС) позволява да се анализира информацията за специфичните подходящи местообитания за тези видове кърлежи в района, което осигурява полезна база за контролни интервенции. В своята цялостност резултатите допринасят за по-задълбочено представяне на проблема и възможни интервенции.

### **Оценка на изводите и приносите**

Формулираните изводи от докторанта съответстват на постигнатото в дисертационния труд.

Авторефератът вярно и точно отразява цялостния дисертационен труд.

### **Публикационна активност**

Резултатите от изследванията в дисертационния труд са публикувани 3 статии в пълен текст и са представени и като 7 научни съобщения в България и на един международен форум в чужбина.

Научните постижения включват 32 публикации в Scopus и 76 цитата на статии.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Убедена съм, че предложеният дисертационен труд напълно отговаря на изискванията за научната степен, формулирани от Закона за развитието на академичния състав в Република България и Правилника за развитието на академичния състав в Медицински университет – Плевен.

Давам положителна оценка на постигнатото от докторанта и предлагам на научното жури да присъди научната степен ОНС „Доктор“ по Научна специалност „Медицинска Биология“, Професионално направление 4.3. „Биологически науки“, област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика.

гр. Плевен, 31.05.2023 г.

(проф. Регина С. Комса-Пенкова, д.б.н.) **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

# PhD Thesis Evaluation Report

By Prof. Regina S. Komsa-Penkova, Ph.D. D.Sc

Medical University – Pleven, Department of Chemistry and Biochemistry, Sector of  
Biochemistry,

of the dissertation for obtaining the educational and scientific degree "Doctor" in the field of  
higher education 4. Natural Sciences, Mathematics and Informatics, professional field 4.3.  
Biological Sciences, Doctoral Program in Medical Biology

**Candidate:** Alexander Bozhidarov Blazhev

**PhD form:** Self-study

**Scientific Unit:** Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology, Sector of Biology,  
Medical University - Pleven

**Thesis Title:** Investigation of *Borrelia burgdorferi* Senu Lato Infection in Ixodid Ticks in the  
Pleven Region

**Scientific advisers:**

Prof. Milena Dimitrova Karcheva, MD, PhD

Assoc. prof. Milena Atanasova Atanasova-Radeva, PhD

By order № 1247/25.04.2023 of the Rector of the Medical University – Pleven, I have been appointed as an internal member of the Scientific Jury to ensure a procedure for defence of Alexander Bozhidarov Blazhev's dissertation work on the topic "**Investigation of *Borrelia burgdorferi* Senu Lato Infection in Ixodid Ticks in the Pleven Region**" for the acquisition on the educational and scientific degree "Doctor" in the field of higher education 4. Natural sciences, mathematics and informatics, professional field 4.3. Biological Sciences, Doctoral Program in Medical Biology.

No gaps were found in the documentation provided by Alexander Blazhev, the requirements of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria (LDASRB), the Regulations for the implementation of the LDASRB (RILDASRB) and the Rules for the conditions and procedure for acquiring academic degrees and occupying academic positions at Medical University – Pleven were met.

## **1. Biographical data**

Alexander Bozhidarov Blazhev graduated from Paisiy Hilendarski University -Plovdiv in 1999 with a master's degree in biology.

Assistant Professor Blazhev's professional career in biology began in 2001 when he was appointed biologist at the Medical University in Pleven.

In 2002, he was appointed assistant professor after a competition and, in 2009, acquired a speciality in Medical Biology. Alexander Blazhev teaches biology (practicals and seminars) in Bulgarian and English to medical and pharmacy students and pre-admission courses for students in the Department of General and Special Language Training.

Blazhev actively participates in the research and publication activities of the Biology sector. He is a member of research teams in more than ten scientific projects funded by MU – Pleven. He has been awarded twice in the last five years for excellence in research.

In 2018 he was enrolled as a self-study doctoral student at the Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology.

## **2. Actuality of the dissertation work**

In his dissertation, Alexander Blazhev analyzed the Ixodid fauna in the Pleven region, intending to establish the infectivity of *Ixodes ricinus* with *Borrelia burgdorferi* s.l. The obtained data are used to assess the risk of infection with Lyme borreliosis (LB), the population's most common natural tick-borne zoonotic infection in countries with a temperate climate.

The relevance of the dissertation work is significant because a study on the hard tick populations carrying *B. burgdorferi* s.l. was conducted for the first time in the Pleven region. However, cases of Lyme borreliosis are registered every year.

Tick-borne infections are a serious public health problem. Therefore the results obtained from Alexander Blazhev's research will contribute to improving knowledge about the distribution of hard ticks in the area and the pathogens associated with them. A better understanding of the risks associated with these infections will contribute to developing more effective risk control and prevention measures.

## **3. Structure of the dissertation work**

The dissertation work of A. Blazhev is written in a volume of 175 standard pages, structured as follows: introduction - 2 pages, overview - 38 pages, purpose and tasks - 2 pages, materials and methods - 26 pages, results - 49 pages, discussion - 25 pages, conclusions and contributions - 7 pages, bibliography - 15 pages, which includes a total of 183 literary sources, of which 17 are in Bulgarian.



The overview of the obtained results is presented with 39 representative figures, 29 tables, 13 epizootic maps, and 2 appendices.

### **3.1 Evaluation of the literature review**

The literature review includes detailed data on *B. burgdorferi* s.l.: biological characterization, morphology, outer membrane organization, outer membrane proteins, genome organization, and taxonomy. The main morphological-anatomical characteristics of the family Ixodidae are described, which include taxonomy, systematics, morphology, and anatomy of ticks, as well as the ecology and life cycle of the family.

The interaction between ticks and Lyme borreliosis spirochetes has also been examined in great detail. The spread of infection, persistence in the host, and tick-to-vertebrate transmission are well presented. The interaction between the vectors and the pathogen is also analyzed.

The geographical distribution of LB in different regions of the world where this disease is present is considered, rendering important the factors for its spread. The clinical manifestations of the infection with *Borrelia burgdorferi* s.l., laboratory diagnosis, treatment, and prevention in Bulgaria are also presented.

The material is sufficient and corresponds to the purpose and tasks set in the dissertation.

### **4. Purpose and tasks**

The goal and tasks are formulated precisely and clearly.

### **5. Research methodology**

The methods used in the study are well chosen to achieve the objectives of the study.

The retrospective epidemiological analysis of the morbidity in the area provides guidelines for researching the registered cases of transmissible infections in the Pleven region and Bulgaria.

The methods of collecting questing hard ticks and the density and frequency indices of the populations in the different study areas are described. The flora and fauna of the study areas are described in detail, which helps to understand the ecological factors affecting the distribution of *I. ricinus*. The study focused on the protected area (PA) "Kaylaka" and was divided into 8 zones, grouped into two categories depending on the treatment of the lawns and human attendance.

Pilot studies on the presence of spirochetes in *Ixodes ricinus* were performed with dark-field microscopy and two nested PCRs of *flaB* and *5S-23Sigs* genes.

The results were verified by Cohen's kappa test. Statistical processing was performed using IBM SPSS v.23, GraphPad Prism v.8 and MS Excel 2016.

The epizootological maps are made using modern geographic information systems and software with free access.

## 6. Results and Discussion

The results are presented sequentially according to the tasks set and then discussed in detail.

Morbidity in the Pleven region was analyzed based on the registered cases of transmissible infections. The results of tick collection campaigns are presented, with the largest number of individuals belonging to the species *Ixodes ricinus* - 1297 specimens. The average frequency of *I. ricinus* in the Pleven region was found to be  $0.56 \pm 0.43$  n/min, and the tick density was  $4.84 \pm 7.52$  n/100 m<sup>2</sup>. The total calculated density (TQI) in the "Kaylaka" Protected Area is  $5.89 \pm 8.60$  n/100 m<sup>2</sup>, and the tick frequency (TF) is  $0.61 \pm 0.46$ .

A comparison of *I. ricinus* populations was made between different studied areas to identify the ones with an extremely high density and frequency of ticks (Tachova cheshma, Kaylaka, and the Karst gorge on the Chernelka River).

The results of the Kaylaka PA with the two groups of territories (urbanized and unmaintained – wild lawns) were examined in detail, and no statistically significant differences were found in the densities and frequency of ticks in these areas of the Kaylaka PA.

The presence of *Borrelia burgdorferi* s.l. was found in three of the study areas. In the study of the "Kaylaka" PA for the presence of *B. burgdorferi* s.l. of the *I. ricinus* ticks, the presence of spirochetes was also detected in 45.2% of them

The PCR study of 202 ticks yielded the following results:

- 97 ticks (48%) were positive for *23S/5S igs* gene amplification
- 104 ticks (51.5%) were positive for *FlaB* gene amplification
- No statistically significant difference was found in the presence of infected ticks between those collected from urban maintained areas and those collected from other locations (49.66% vs 42.69%,  $p = 0.177$ ). However, a higher infection rate was detected in ticks found in urban maintained areas.

In the discussion section, the results are analyzed compared to information from other European studies. The dissertation expert skillfully interprets the results in the context of climate-geographical and ecological factors specific to Bulgaria and, in particular, the Pleven region.

For the first time, problems related to both the ixodid fauna and the presence of LB group spirochetes in the Pleven region were considered. Ecological analysis based on geographic information system (GIS) allows for evaluating information about specifically suitable habitats for these tick species in the area, providing a helpful basis for control interventions. Overall, the results contribute to a deeper understanding of the problem and possible interventions.

## **Evaluation of conclusions and contributions**

The conclusions formulated by the doctoral student correspond to what was achieved in the dissertation work.

The abstract faithfully and accurately reflects the entire dissertation work.

## **Publication activity**

The results from the research in the dissertation were published in 3 articles in full text and 7 scientific reports in Bulgaria and at one forum abroad.

Scientific achievements include 32 Scopus publications and 76 article citations.

## **7. Conclusion**

I am convinced that the proposed dissertation fully meets the requirements for the scientific degree formulated by the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations on the Development of the Academic Staff at the Medical University – Pleven.

I give a positive evaluation of the achievements of the doctoral student and propose to the scientific jury to award the PhD scientific degree in the scientific speciality "Medical Biology", Professional direction 4.3. "Biological sciences", the field of higher education 4. "Natural sciences, mathematics and informatics.

Pleven, 31.05.2023

(Prof. Regina S. Komsa-Penkova, Ph.D. D.Sc) **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**