



СТАНОВИЩЕ

върху дисертационен труд за
получаване на образователна и научна степен "доктор" по

Докторска програма:

"Епизоотология, инфекциозни болести
и профилактика на заразните заболявания
по животните"

Професионално направление:

Ветеринарна медицина

Научна област:

Аграрни науки и ветеринарна медицина

Тема на дисертация:

**ДИАГНОСТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ
ЕРЛИХИОЗА И АНАПЛАЗМОЗА ПО КУЧЕТА
В БЪЛГАРИЯ**

Автор на дисертационния труд:

Красимира Желязкова Господинова

Докторант към ВМФ, ТрУ – Стара Загора

От:

Член на разширено научно жури
със Заповед 318 от 02-02-2024

проф. д-р Илия Цачев, д.в.м.н

Ветеринарномедицински факултет

Тракийски университет, Стара Загора

Научна специалност: „Епизоотология, инфекциозни
болести и профилактика на заразните заболявания
по животните“

1. Информация за дисертанта.

Красимира Желязкова Господинова е родена през 1975 г. Завършила средното си образование в град Стара Загора в природоматематическата гимназия с усилено изучаване на английски език през 1993 г.

През 1998 г. се дипломира в Пловдивския университет "Паисий Хилендарски" като магистър-биолог със специалност генетика и микробиология. Година по-късно е назначена като микробиолог в катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“ на Ветеринарномедицинския факултет при Тракийския университет в Стара Загора. От 2018 г. е задочен докторант в същата катедра. На проведения изпит по специалността от докторантския минимум се представи отлично. От юни 2023 г. е асистент в секция Функционална патология и имунология към катедра Обща и функционална патология.

Красимира Господинова е много добър учен, за което обективно свидетелстват нейните наукометрични данни от научната платформа Scopus 2024. Тя е с H index 4 и е с 10 статии, от които 3 публикувани в top 25 на световнопризнатите цитирани научни издания

2. Обща характеристика на представения дисертационен труд.

Дисертационният труд е написан на 157 страници и е структуриран традиционно: увод - литературен преглед - цел и задачи - материал и методи - резултати - обсъждане - изводи - приноси - препоръки за практиката - литературен указател - публикации във връзка с дисертацията - участия в научни форуми и научни проекти.

3. Актуалност.

Най-често срещаните и актуални векторно-преносими заболявания при кучетата от последните десетилетия са моноцитната ерлихиоза и гранулоцитната анаплазмоза в световен мащаб. Те за първи път в нашата страна са установени преди двадесетина години но тяхната диагностика винаги е актуална и нуждаеща се от постоянно популяризиране и особено от нови проучвания с оглед те да спомогнат както за по-лесното адаптиране в лабораторни условия на различни лабораторни методи, така и за получаване на нови резултати от нашата страна. В този контекст, подбраната научна тема е сполучливо подбрана.

❖ **Становище.** Подбраната за разработване тема от докторанта Красимира Госодинова ДИАГНОСТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ ЕРЛИХИОЗА И АНАПЛАЗМОЗА ПО КУЧЕТА В БЪЛГАРИЯ е изключително актуална и навременна.

4. Литературен обзор.

В литературната справка са разгледани подробно: етиологията, епидемиологията, патогенезата, клиничните признания на заболяванията моноцитна ерлихиоза, гранулоцитна анаплазмоза и циклична тромбоцитопения. Подробно са представени съществуващите клинични и лабораторни серологични тестове. Описани са и молекуларно-генетичните тестове, приложими в диагностиката на проучваните заболявания. В края на обзора Красимира Господинова аналитично прави обобщение на представения литературен преглед.

Използвани са 292 литературни източника, от които 4 на кирилица и 288 на латиница. От последните 10-години са представени 86 нови заглавия (включително и от 2023 г.), което е 29% от общия брой.

Много добро впечатление прави познаването на авторите (15) и техните публикации от България свързани с темата на дисертацията. Всички, които са работили, са отразени в литературната справка.

- ❖ **Становище.** Литературният обзор за ерлихиозата и анаплазмозата (епидемиологични данни, патогенеза, клинични признания, хематологични и биохимични промени, серологична и молекуларно-генетична диагностика) е съвременно осветлен, творчески представен и изискано научно интерпретиран.

5. Цел/Задачи/Методи.

Поставената цел е ясно заявлена и точно формулирана:

Да се извършат диагностични проучвания чрез клинични, хематологични, серологични и молекуларно-генетични, изследвания, като се анализират клиничните признания, хематологичните и биохимични промени при съмнителни/потвърдени пациенти за моноцитна ерлихиоза, гранулоцитна анапламоза, циклична тромбоцитопения, вкл. и при протичането им като ко-инфекции при кучета в България.

За решаването на поставената цел са поставени и изпълнени **7 конкретни задачи** като: 1. Провеждане на клинични прегледи, хематологични и биохимични изследвания за подбиране на достатъчен брой кучета за включване в изследвания за МЕ и ГА. 2. Извършване на няколко различни видове антителни клинични тестове за МЕ и ГА с анализ на резултатите. 3. Извършване на няколко различни видове антителни лабораторни тестове за МЕ и ГА с анализ на резултатите. 4. Апробиране на PCR протокол за детекция на сем. *Anaplasmataceae* - *E. canis*. 5. Апробиране на PCR протокол за детекция на сем. *Anaplasmataceae* - *A. phagocytophilum*. 6. Апробиране на PCR протокол за детекция на сем. *Anaplasmataceae* - *A. platys*. 7. Съпоставяне и анализ на резултатите: PCR/серология/клинична картина/хематология/биохимия.

Проучването е проведено върху 106 кучета с насочващи клинични признания за кърлежо-преносими заболявания. От тях са вземани кръвни преби за серологични, молекуларно-генетични, хематологични и биохимични изследвания.

- ❖ **Становище.** Подбранате методични постановки и диагностичния инструментариум, са съобразени с целта и задачите на проучването.

6. Резултати.

Получените резултати от проучванията са отразени в дисертацията на 23 страници, визуализирани в 12 фигури и 24 таблици. Най-значимите резултати тук са свързани с молекуларно-генетичната детекция на *Ehrlichia canis* и *Anaplasma phagocytophilum*, както и на *Anaplasma platys*. Много добро впечатление прави синтезирано представените данни от клиничните, серологичните, молекуларно-генетичните, хематологичните и биохимичните изследвания, които в крайна сметка са най-добрия алгоритъм за крайната диагноза.

- ❖ **Становище.** Поставените от мен в предварителните обсъждания въпроси, коментари, бележки и препоръки са взети под внимание в раздела и са представени коректно.

7. Обсъждане.

В обсъждането Красимира Господинова сполучливо и убедително анализира и съпоставя получените от нейните опити резултати с известните от литературатурата у нас и в чужбина. На някои места дори дискусията се насочва извън целта и посочените задачи, като автора, макар и да не е ветеринарен лекар, сполучливо и убедително изразява професионално ветеринарномедицинско мнение и становище, така необходими за науката и ежедневната ветеринарно-медицинска практика. Стилът е строго научен и професионален.

- ❖ **Становище.** И тук голяма част от поставените в предварителните дискусии въпроси, коментари, бележки и препоръки са взети под внимание.

8. Изводи / Приноси / Препоръки.

Красимира Господинова в своята дисертация формулира осем изводи.

Бележка. Смятам че щеше да бъде по-добре, ако изводи 5 и 6 бяха редактирани и формулирана така:

5. При 51% (54) от кучетата включени в изследването с клинична картина за векторно-преносимо заболяване и положителен серологичен резултат не може категорично да бъде поставена диагноза МЕ, или ГА, или ЦТ или ко-инфекции между тях поради отрицателният PCR тест.
6. При 6% (6) от кучетата включени в изследването серологично и молекулярно-генетично не беше потвърдена инфекция с *E. canis*, *A. phagocytophilum* или *A. platys*, независимо от клинична картина насочваща векторно-преносимо заболяване.

В дисертационния труд са отбелязани и четири приноси, три от които са оригинални, свидетелстващи за творческия заряд на дисертанта Красимира Господинова:

- ❖ За първи път в България чрез молекулярно-генетични методи са доказани *E. canis*, *A. phagocytophilum* и *A. platys*.

Направени са и четири препоръки, много добре формулирани и актуални за ежедневната ветеринарномедицинска практика с кучета. Тяхното популяризиране и прилагане са отлична основа в контекста на продължаващото следдипломно обучение, така често коментирано във ветеринарномедицинските среди у нас.

- ❖ **Становище.** Приемам изводите, приносите и препоръките за практиката.

9. Лично участие.

Уверен съм, че дисертационният труд е лично дело на дисертанта.

10. Оценка на публикациите по дисертацията.

Във връзка с дисертацията са публикувани три статии, чиито резултати са част от дисертацията. Две от тях са в авторитетното българско ветеринарномедицинско списание *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, което е в квартил 3 (Q₃). На всичките статии първи автор е Красимира Господинова. Няма данни за цитиране на посочените статии у нас или в чужбина.

1. Gospodinova Kr., Zhelev, G., & Petrov, V. (2019). Comparison of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay test with an indirect immunofluorescent antibody test in diagnosing ehrlichia and anaplasma infections in dogs. *Trakia Journal of Sciences*, 17 (4), 346-352. ISSN 1313-7050 (print), ISSN 1313-3551 (online) doi:10.15547/tjs.2019.04.009.
2. Gospodinova, K., Koev, K., & Petrov, V. (2022) Performance of laboratory ELISA and rapid ELISA tests for *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. antibody detection in dogs. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 25(4), 658-664. ISSN 1311-1477; DOI: 10.15547/bjvm.2439.
3. Gospodinova, K., Stanilov, I., Miteva, L., Tsachev, I. & Petrov V. (2023) Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophylum* in blood samples from dogs in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, Online First, ISSN 1311-1477; DOI: 10.15547/bjvm.2023-0003

11. Автореферат.

Представеният автореферат е написан на 52 страници и отразява обективно структурата и съдържанието на дисертационния труд.

З а к л ю ч е н и е

Дисертационният труд **ДИАГНОСТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ ЕРЛИХИОЗА И АНАПЛАЗМОЗА ПО КУЧЕТА В БЪЛГАРИЯ** е актуален, навременен и много добре реализиран.

Научените и приложените от **Красимира Желязкова ГОСПОДИНОВА** различни методи на изследване, изведените експерименти, получените резултати, направените препоръки и ценните приноси, ми дават основание да смяtam, че представения дисертационен труд е защитим пред научно жури, отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и ПРАСТУ, и го оценявам **ПОЛОЖИТЕЛНО**.

Завършвам своето становище с "правило от любим учител":

No single test is sufficient for diagnosing an infectious disease in a sick patient. EB

12-03-2024

Стара Загора

Изготвил становището:

Á Á Á ÉNA Á

проф. д-р Илия Начев двМН



STATEMENT

On the PhD dissertation submitted by Krassimira Zhelyazkova Gospodinova on:

DIAGNOSTIC RESEARCH AT EHLICHIOSIS AND ANAPLASMOSIS IN DOGS IN BULGARIA

submitted for awarding PhD scientific and educational degree in the science specialty „Epizootiology, infectious diseases and prevention in animals”, professional area 6.4 “Veterinary medicine”, field of higher education 6.0. “Agricultural science and veterinary medicine”.

Statement prepared by: prof. Ilia Tsachev, DSc

Faculty of Veterinary Medicine at Trakia University, Stara Zagora

1. Brief biographical data about the candidate. Krassimira Zhelyazkova Gospodinova was born in 1975. She graduated secondary school in Stara Zagora in 1993 and in 1998 the University of Plovdiv "Paisii Hilendarski" as a master-biologist in genetics and microbiology. A year later she was appointed as a microbiologist at the Department of Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases of the Faculty of Veterinary Medicine at the Trakia University - Stara Zagora. Since 2018 Krasimira Gospodinova is a part-time PhD student in the same department. Since June 2023 she has been an assistant professor in the Functional Pathology and Immunology Section of the Department of General and Functional Pathology.

Krasimira Gospodinova is a thorough young scientist, which is objectively evidenced by her scientific metrics from the scientific platform Scopus 2024. She has an H index 4 and 10 articles, 3 of which have been published in the top 25 of the world's cited scientific journals.

2. General characteristics of the submitted dissertation. The dissertation is written in 157 pages and is structured traditionally: introduction - literature review - aim and objectives - material and methods - results - discussion - conclusions - contributions - recommendations for practice - reference index - publications related to the dissertation - contributions to scientific forums and research projects.

3. Relevance of the problem. Monocytic ehrlichiosis /ME/ and granulocytic anaplasmosis /GA/ are the most common and current vector-borne diseases in dogs worldwide in recent decades. They were first established in Bulgaria twenty years ago but their diagnosis is always up to date and in need of constant promotion and especially of new studies in order to help both the easier adaptation in the laboratory of different laboratory methods and to obtain new results from our country. In this context, the scientific topic is well chosen.

Opinion. The topic selected for research by the PhD student Krasimira Gospodinova DIAGNOSTIC RESEARCH IN EHLICHIOSIS AND ANAPLASMOSIS IN DOGS IN BULGARIA is extremely topical and timely.

4. Literature awareness. The literature review discusses in detail: etiology, epidemiology, pathogenesis, clinical features of monocytic ehrlichiosis, granulocytic anaplasmosis and cyclic thrombocytopenia. Existing clinical and laboratory serological tests are presented in detail. Molecular genetic tests applicable in the diagnosis of the diseases under study are also described

very well. At the end of the review Krasimira Gospodinova analytically summarizes the presented literature data.

Two hundred and ninety-two literature sources were used, of which four in Cyrillic and two hundred and eighty-eight in English. Eighty-six new titles (including 2023) have been submitted in the last ten years, 29% of the total.

The knowledge of the Bulgarian authors (15) and their publications related to the dissertation topic is presented in depth. All who have contributed are reflected in the reference list.

Opinion. The literature review on ehrlichiosis and anaplasmosis (epidemiological data, pathogenesis, clinical features, haematological and biochemical changes, serological and molecular genetic diagnosis) is up-to-date, creatively presented and exquisitely scientifically interpreted.

5. Aim/Objectives/Methods. The stated objective is clearly stated and precisely formulated: To carry out diagnostic survey by clinical, haematological, serological and molecular genetic investigations, analyzing the clinical signs, haematological and biochemical changes in suspected/confirmed patients for monocytic ehrlichiosis, granulocytic anaplasmosis, cyclic thrombocytopenia, including their course as co-infections in dogs in Bulgaria. In order to solve the set objective, seven specific tasks were set and implemented, such as: 1. Conducting clinical examinations, hematological and biochemical tests to select a sufficient number of dogs for inclusion in studies for ME and GA. 2. Performing several different types of antibody clinical tests for ME and GA with analysis of results. 3. Perform several different types of antibody laboratory tests for ME and GA with analysis of results. 4. Validation of a PCR protocol for the detection of family Anaplasmataceae - *Ehrlichia canis*. 5. Validation of a PCR protocol for the detection of family Anaplasmataceae - *Anaplasma phagocytophilum*. 6. Validation of a PCR protocol for the detection of family Anaplasmataceae - *Anaplasma platys*. 7. Comparison and analysis of results: PCR/serology/clinical signs/hematology/biochemistry.

The study was conducted among 106 dogs with clinical signs suggestive of tick-borne diseases. Blood samples were collected for serological, molecular genetics, haematological and biochemical investigations.

Opinion. Selected methodological formulations and diagnostic tools, are consistent with the aim and objectives of the study.

6. Results. The results obtained from the studies are reported in the thesis in 23 pages, visualized in 12 figures and 24 tables. The most significant results relate to the molecular genetic detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum*, as well as *Anaplasma platys*. Very good link is made by the synthesized presentation of the clinical, serological, molecular genetics, hematological and biochemical data, which ultimately represent the best algorithm for the final diagnosis.

Opinion. A large part of the placed in preliminary discussions questions, comments, notes and recommendations are taken into account.

7. Discussion. In the discussion, Krasimira Gospodinova successfully and convincingly analyzes and compares the results obtained from the survey with the known results from the literature at home and abroad. In some places, the discussion even goes beyond the aim and the stated tasks, as the author, although not a veterinarian, successfully and convincingly expresses professional veterinary opinion, so necessary for science and everyday veterinary practice. The style is strictly scientific and professional.

Opinion. Again, much of the questions, comments, observations and recommendations have been taken into account.

8. Conclusions / Contributions / Recommendations. Krasimira Gospodinova formulated eight conclusions in her dissertation.

Note. I think it would be better if conclusions 5 and 6 were edited and formulated like this:

5. In 51% (54) of the dogs included in the study with a clinical signs of vector-borne disease and a positive serological result, a diagnosis of ME, or GA, or CT or co-infections between them could not be definitively made due to the negative PCR test.

6. In 6% (6) of the dogs included in the study serologically and molecularly genetically, infection with *E. canis*, *A. phagocytophilum* or *A. platys* was not confirmed, regardless of a clinical signs pointing to a vector-borne disease.

The thesis also notes four contributions, three of which are original, attesting to the creative charge of the PhD student Krasimira Gospodinova:

- ❖ For the first time in Bulgaria by molecular genetic methods are proven *E. canis*, *A. phagocytophilum* and *A. platys*.

Four recommendations, very well formulated and relevant to daily veterinary practice with dogs, are also made. Their promotion and application are an excellent basis in the context of continuing postgraduate education, so often commented in veterinary circles in this country.

Opinion. I accept the conclusions, contributions and recommendations for practice.

9. Personal participation. I am confident that the dissertation work is the personal work of the PhD student.

10. Evaluation of publications on the dissertation. Three articles have been published in connection with dissertation, the results of which are part of the dissertation. Two of them are in the authoritative Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, which is in quartile 3 (Q3). The first author of all articles is Krasimira Gospodinova. There is no evidence of citation of these articles in this country or abroad.

1. Gospodinova Kr., Zhelev, G., & Petrov, V. (2019). Comparison of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay test with an indirect immunofluorescent antibody test in diagnosing ehrlichia and anaplasma infections in dogs. Trakia Journal of Sciences, 17 (4), 346-352. ISSN 1313-7050 (print), ISSN 1313-3551 (online) doi:10.15547/tjs.2019.04.009.

2. Gospodinova, K., Koev, K., & Petrov, V. (2022) Performance of laboratory ELISA and rapid ELISA tests for Ehrlichia spp. and Anaplasma spp. antibody detection in dogs. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 25(4), 658-664. ISSN 1311-1477; DOI: 10.15547/bjvm.2439.

3. Gospodinova, K., Stanilov, I., Miteva, L., Tsachev, I. & Petrov V. (2023) Molecular detection of Ehrlichia canis and Anaplasma phagocytophilum in blood samples from dogs in Bulgaria. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, Online First, ISSN 1311-1477; DOI: 10.15547/bjvm.2023-0003

11. Dissertation abstract. The abstract is written in 52 pages and reflects objectively the structure and content of the thesis.

CONCLUSIONS

The PhD dissertation DIAGNOSTIC RESEARCH IN CANINE EHRLICHIOSIS AND ANAPLASMOSIS IN BULGARIA is up-to-date, timely and very well implemented. The various research methods learned and applied by Krasimira Zhelyazkova GOSPODINOVA, the experiments carried out, the results obtained, the recommendations made and the valuable contributions, give me reason to believe that the presented dissertation is defensible before a scientific jury, meets the requirements of the Law on development of academic staff in the Republic of Bulgaria and the Rules of Trakia University, and I rate it POSITIVELY.

I conclude my statement with a "rule from a favorite teacher":

No single test is sufficient for diagnosing an infectious disease in a sick patient. EB

12-03-2024

Stara Zagora

Statement prepared by: Á Á ÉHÁ Á

Prof. Dr. Ilia Tsachev, DSc