

## РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен „Доктор“ по научна специалност «Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания при животните», област на висше образование 6.0 Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина.

**Автор на дисертационния труд:** задочен докторант Красимира Желязкова Господинова, Ветеринарномедицински факултет, Тракийски университет, гр. Стара Загора

**Тема на дисертационния труд:** „Диагностични изследвания при ерлихиоза и анаплазмоза по кучета в България“

**Изготвил:** проф. д.н. Теодора Петрова Попова, Лесотехнически университет, гр. София, област на висше образование „Аграрни науки и ветеринарна медицина“, професионално направление: 6.4. Ветеринарна медицина, научна специалност “Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните”, определена за член на Научното жури със Заповед №318/02.02.2024 г. на Ректора на Тракийски университет (ТрУ), гр. Ст. Загора.

### • Кратко представяне на докторанта.

Красимира Желязкова Господинова е завършила средното си образование през 1993 г. в Природо-математическа гимназия "Гео Милев" в родния си град Стара Загора. През 1998 г. е завършила висше образование в Пловдивски университет "Паисий Хилендарски", гр. Пловдив и е придобила образователна степен „Магистър“, професионална квалификация „Биолог“. Защитила е с отличен успех дипломната си работа на тема „Холестерол оксидазна активност при бактерии от родовете *Pseudomonas* и *Achromobacter*“. През същата година постъпва на работа във Ветеринарномедицински факултет (ВМФ) в ТрУ в гр. Ст. Загора като технически сътрудник. От м. януари 1999 г. до март 2003 г. работи като Микробиолог в същия факултет, като извършва микробиологична диагностика на инфекциозни заболявания. През периода март 2003 г. – юни 2023 г. изпълнява длъжността Биолог във ВМФ в ТрУ, като извършва имунобиологична диагностика посредством ELISA и др. на инфекциозни заболявания. От м. юни до сега тя е асистент в същия факултет и преподава по дисциплините Имунология и Функционална патология. Владее писмено и говоримо английски език. Притежава педагогическа правоспособност и опит в работата с MS Office, Windows 10, лабораторни софтуери, с апаратура за ELISA; PCR и RT-PCR.

Красимира Господинова е зачислена в задочна докторантура в област на висше образование: 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление: 6.4. Ветеринарна медицина, докторска програма: „Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните“ към катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“ на ВМФ, със Заповед №545/07.03.2018 г. на Ректора на ТрУ. Темата на дисертационния труд е “Сравнителни диагностични изследвания при актуални векторно предавани рикетсиози при кучето в България”, с научен ръководител доц. д-р Владимир Сметославов Петров и четири годишно обучение (01.03.2018 г. - 01.03.2022 г.). Срокът на докторантурата е удължен с една година, считано от 07.03.2022 г. до

07.03.2023 г. със Заповед №490/28.02.2022 г. на Ректора на ТрУ. По-късно темата на дисертацията е променена на „Диагностични изследвания при ерлихиоза и анаплазмоза по кучета в България“ със Заповед №673/02.03.2023 г. на Ректора на ТрУ. Със същата заповед за втори научен ръководител е определен проф. д-мн Илия Цачев Цачев. **Красимира Господинова е изпълнила дейностите по обучението,** положила е изпитите от докторантския минимум по Епидемиология и инфекциозни болести с отличен успех и има необходимия брой кредити. Отчислена е с право на защита на дисертацията със Заповед №1123/31.03.2023 г. на Ректора на ТрУ.

#### • **Обща характеристика и структура на дисертационния труд.**

Дисертацията е написана на 157 стандартни страници. Тя **включва необходимите раздели**, а именно: заглавна страница, съдържание (3 стр.), използвани съкращения в текста (1 стр.), увод (2 стр.), литературен обзор (36 стр.), цел и задачи (1 стр.), материали и методи (16 стр.), резултати (22 стр.), обсъждане (33 стр.), изводи (1,5 стр.), приноси (0,5 стр.), препоръки за практиката (1 стр.), публикации, участия в научни форуми и в университетски научни проекти във връзка с дисертацията (1,5 стр.) и литературен указател (37 стр.). Това съотношение между разделите показва, че **дисертационният труд е структуриран правилно.**

#### • **Актуалност на проблема.**

Причинителите на векторно предаваните заболявания са определени видове бактерии, вируси и паразити, които се пренасят от членестоноги (комари, бълхи, кърлежи и пясъчни мухи). Днес те достигат около 17% от всички инфекциозни болести в световен мащаб с тенденция за увеличаване, главно поради нарастващото разпространение на преносителите. Това се дължи на глобалното затопляне на климата, активните международни контакти, но и на развиващата се лекарствена резистентност сред причинителите на тези заболявания и техните вектори. Най-значимите преносители са кърлежите, особено в районите с умерен климат, включително в Европа и у нас, предимно от родовете *Ixodes* и *Rhipicephalus*. Векторните болести при кучета също показват нарастващо териториално разпространение. Някои от тях са зооантропонози. Едни от най-значимите са тези, причинени от рикетсии от родовете *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* и др. В Европа основните инфекции от тази група са моноцитната ерлихиоза, причинявана от *E. canis*, гранулоцитната анаплазмоза с етиологичен агент *A. phagocytophilum* и цикличната тромбоцитопения, причинявана от *A. platys*. В нашата страна първите изследвания за наличието и разпространението на болестите от тази група са извършени от проф. Илия Цачев в началото на 21 век. Той доказва за пръв път в България моноцитна ерлихиоза при кучета през 2002-2003 г. в развъдник в Пловдивско (Цачев, 2006), а през 2008 г. установява и инфекция с *A. phagocytophilum* (Tsachev et al., 2008). След първоначалното откриване на тези инфекции у нас са провеждани серологични изследвания на домашни и бездомни кучета в различни региони на страната. Досега обаче липсват проучвания, потвърждаващи диагнозите чрез доказване на генома на етиологичните агенти при серопозитивни кучета с клинични признаци и хематологични отклонения, характерни за моноцитната ерлихиоза и гранулоцитната анаплазмоза. От тези данни се вижда **безспорната актуалност на проблема**, което дава основание за провеждане на задълбочени

комплексни диагностични изследвания на тези заболявания в България, представени в настоящия дисертационен труд.

• **Степен на познаване на състоянието на проблема и творческа интерпретация на литературния обзор.**

В увода на дисертацията е добре описана същността на векторно предаваните инфекции, както и нарастващото им разпространение, включително и в нашата страна. Изтъкнато е значението на тези заболявания при кучетата, представени са бактериите, които ги причиняват и са посочени основните преносители. Изтъкната е необходимостта от извършване на комплексни диагностични проучвания в тази насока у нас.

В литературния обзор е направен подробен преглед на литературните данни, свързани с изучаваните векторно преносими инфекции при кучетата - моноцитната ерлихиоза, гранулоцитната анаплазмоза и цикличната тромбоцитопения. Разгледани са техните етиологични агенти. Описани са епидемиологията, патогенезата и клиничните признаци на заболяванията, както и хематологичните и биохимичните промени в организма на засегнатите животни. Добре са представени клиничните и лабораторни серологични тестове, използвани в диагностиката им, както и молекулярно-генетичните методи на изследване, като е направена и оценка на отделните методи. Литературният обзор завършва с **обобщение** на представената информация. Той е написан компетентно и е структуриран целесъобразно. От него личи задълбоченото познаване на изучаваните инфекции, на техните причинители, преносители и на използваните методи на изследване.

• **Цел, задачи, хипотези и методи на изследване. Съответствие на избраната методика на изследване с поставената цел и задачи на дисертационния труд.**

Целта на представения труд е извършване на диагностични проучвания посредством клинични, хематологични, антителни и молекулярно-генетични изследвания при съмнителни и потвърдени пациенти за моноцитна ерлихиоза, гранулоцитна анаплазмоза и циклична тромбоцитопения, вкл. и при протичането им като ко-инфекции при кучета в България. За изпълнението ѝ са поставени 7 задачи, които включват провеждане на клинични прегледи, хематологични и биохимични изследвания за подбиране на достатъчен брой кучета за включване в изследвания за моноцитна ерлихиоза и гранулоцитна анаплазмоза; извършване на различни антителни клинични и лабораторни тестове за моноцитна ерлихиоза и гранулоцитна анаплазмоза с анализ на резултатите; апробиране на PCR протокол за детекция на *E. canis*, *A. phagocytophilum* и *A. platys* от сем. *Anaplasmataceae*; съпоставяне и анализ на резултатите, получени от приложените клинични, хематологични, биохимични тестове и PCR. Целта и задачите на дисертационния труд са правилно подбрани и добре формулирани.

В раздела „Материали и методи“ добре са описани използваните в проучванията животни (106 кучета с признаци на изследваните рикетсиози), взетите за изследване проби, извършените серологични тестове, а именно клиничен серологичен ELISA тест - SNAP® 4Dx® Plus (хроматографски), непряка имунофлуоресцентна микроскопия и директна ELISA, както и използваната апаратура. Представени са приложените молекулярно-генетични методи, като са

описани екстрахирането на ДНК от кръв на изследваните кучета, протоколите за доказване на 345 bp сегмента от генетичната последователност на видове от сем. *Anaplasmataceae*, на 409bp фрагмента от *16S rRNA* гена на *E. canis* и на 444 bp фрагмента от *ankA* гена на *A. phagocytophilum* в кучешка кръв. Описани са също използваните протоколи за оптимизиране на температурата на амплификация на праймерите за доказване на *ankA* гена на *A. phagocytophilum* чрез градиентна PCR и за доказване на 678 bp фрагмента от *16S rRNA* гена от генетичната последователност на вида *A. platys* в кучешка кръв. Представен е и протоколът за електрофореза в агарозен гел. Посочени са използваните методи за статистическа обработка на получените данни.

Считам, че изследваните материали са достатъчни за получаване на достоверни резултати, а приложените методи са подходящи за изпълнение на поставените задачи и постигане на целта на изследванията. Познаването и приложението на тези методи представят автора като компетентен и добре подготвен специалист в областта на инфекциозната патология и в частност на векторните инфекции.

• **Онагледеност и представяне на получените резултати.**

Резултатите от извършените изследвания са представени прегледно и ясно в раздел „Резултати“. Описани са клиничните признаци, насочващи към проучваните рикетсиози, установени при първоначалния преглед на 106 пациента на Клиниката за дребни животни към Университетската ветеринарна болница при ТрУ в Ст. Загора. Представена е и честотата на проявлението им при първоначалния преглед. Дадени са измененията в хематологичните им показатели и отклоненията, установени при биохимичните изследвания на кръвните проби. Посочени са резултатите от серологичните клинични тестове с SNAP® 4Dx® Plus, като е установено, че положителни за *Ehrlichia* spp. са 58.49 %, положителни за *Anaplasma* spp. - 13.21 % и положителни за *Ehrlichia* spp. и *Anaplasma* spp. са 22.64 %. Негативните проби са 5.66 %. Извършеният индиректен имунофлуоресцентен тест за антитела е показал сходни резултати, като титър  $\geq 1:40$ , приет като положителен за наличие на IgG срещу *E. canis*, е установен при 59.43% от изследваните проби, 13.21% от тях са показали наличие на антитела срещу *A. phagocytophilum*, в 21.7% са установени антитела едновременно срещу *E. canis* и *A. phagocytophilum*, а 5.66% са били отрицателни. Посредством ELISA е установено наличие на антитела срещу *E. canis* в 48.11% от изследваните кръвни проби, в 11.32% от тях са доказани антитела срещу *A. phagocytophilum*, в 29.25% - срещу двете рикетсии (*E. canis* и *A. phagocytophilum*), а 11.32% от пробите са били отрицателни за антитела срещу тях. Анализирано е съответствието на резултатите, получени при използваните серологични тестове. При PCR изследванията за наличие на генетични последователности, специфични за *16S rRNA* гена на рикетсии от сем. *Anaplasmataceae*, 46 са били положителни за 345 bp сегмента на рибозомалния ген. В 26 от тях посредством PCR е установен 409 bp фрагмента от *16S rRNA* гена на *E. canis*. В 28 от 46-те положителни за сем. *Anaplasmataceae* проби е установено наличие на 444 bp фрагмента от *ankA* гена на *A. phagocytophilum*. В една от пробите, положителни за геном на сем. *Anaplasmataceae*, не е доказана ДНК на *E. canis* или *A. phagocytophilum*. При последвалото изследване на всички 46 положителни за семейството проби, е установено наличие на 678 bp фрагмента от *16S rRNA* гена на

*A. platys* в нея и в още една, с наличие на ДНК за *E. canis* и *A. phagocytophilum* едновременно. Въз основа на серологичните изследвания и тези с PCR са формирани 5 групи пациенти с активна инфекция с причинители *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys* и ко-инфекции. Посочена е честотата на установяване на основните клинични симптоми и хематологични промени при тях.

Считам, че представените резултати са **достатъчни** за постигане на целта на разработката. Обработени са статистически и са обобщени в **14 таблици**, от които ясно могат да се видят и сравнят получените данни. Таблиците в дисертацията са общо 24, но 10 от тях са в предходния раздел „Материали и методи“. Резултатите са онагледени с **9 фигури** с добро качество. Фигурите са 12, но три от тях са в „Материали и методи“, представящи фотографии на използвани диагностични тестове и китове. Фигури 4 – 6 са снимки на пациенти с клинични признаци на инфекция, фиг. 7 е графика, показваща честота на проявление на клиничните признаци, установени при първоначалния преглед, а останалите пет фигури (8 – 12) са снимки на резултати от PCR изследванията. От този раздел се вижда, че **поставените задачи са изпълнени и целта на работата е постигната.**

• **Обсъждане на резултатите и използвана литература.**

Получените резултати са сполучливо дискутирани в раздела „Обсъждане“, като са сравнени с тези на други автори у нас и в чужбина. Коментирани са разпространението на изследваните рикетсиози в различни страни, диагностиката им в практиката, значението на клиничните признаци в този аспект, както и на хематологичните и биохимичните отклонения. Изтъкнато е значението на подбора на пробите и целенасоченото тестване на животни с клинични и хематологични подозрения за откриването на серопозитивните кучета с много по-голяма честота. Отражено е значението на бързите тестове за установяване на антитела срещу тези причинители в клиниките за дребни животни. Направени са сравнения с данните на други автори у нас и в чужбина за серопревалентността при кучетата. Дискутирани са резултатите, получени при имунофлуоресцентните изследвания и тези с лабораторни ELISA китове, както и специфичността и чувствителността на приложените тестове. Установено е, че използваните ELISA тестове са с висока чувствителност и специфичност, което е потвърдено от високия процент на съвпадение между резултатите от тях и IFA. Изтъкнато е, че посредством IFA могат да се диференцират животните с активна инфекция от тези с хронична, като повторното изследване след около 2 седмици дава възможност да се докаже развитие на инфекцията. ELISA тестовете с количествено определяне на антителата също позволяват да се откриват остро боледуващите животни чрез доказване на сероконверсия. Възможността за установяване на динамика в титъра на антителата дава предимство на лабораторния ELISA тест пред бързия SNAP® 4Dx® Plus. Последният обаче е по-евтин, бърз и лесен за изпълнение, което го прави подходящ за използване в клиниките. Подчерган е рискът от серологична кръстосана реактивност между *A. phagocytophilum*, *A. platys* и видовете от род *Ehrlichia*. Коментирано е значението на изследванията посредством IFA за диференциране на животните с остра и хронична инфекция. Изтъкнато е, че при остро боледуване резултатите в PCR и серологичните тестове са положителни, защото антителата започват да се образуват още преди появата на клиничните признаци, но синтезът им продължава докато причинителят перзистира в организма. В случаите с положителни резултати в PCR и отсъствие на антитела е разгледана хипотезата, че заболяването е в самото начало и антителата все още са в малки количества под

откриваемия минимум. В такива случаи също се изисква да се извърши повторно серологично изследване, особено при проява на клинична картина. Коментирани са честотата на клиничните симптоми и причините за вариациите им при кучета с моноцитна ерлихиоза, гранулоцитна анаплазмоза и цикличната тромбоцитопения, и както и изменението в клетъчните и биохимичните кръвни показатели на пациентите. Посочени са причините за вариациите в честотата на клиничните признаци, както и за биохимичните отклонения. Изтъкнато е, че при хронично боледуване *E. canis* може да перзистира в тъкани като костен мозък и далак, което води до ниски концентрации на ДНК в системното кръвообращение, недостатъчни за PCR амплификация. По тази причина PCR изследванията при болни животни могат да бъдат отрицателни. В тестваната проба трябва да присъства откриваемо количество антиген или ДНК, което означава, че отрицателният резултат от теста не изключва наличието на инфекция. В такива случаи основателно предположение за развитие на заболяване е ако титърът на антителата се повиши поне четирикратно при повторно изследване на същия пациент след две седмици. За разлика от серологичните тестове, PCR позволява диференцирането на активни инфекции с *A. platys* от тези с *A. phagocytophilum*. Прави впечатление, че настоящите резултати от PCR тестовите са много сходни с редица изследвания в топли и влажни тропични и субтропични райони. Това подсказва, че климатичните промени, свързани с покачването на температурите в световен мащаб, позволяват разширяване на ареалите на различни видове кърлежи и повишаване на тяхната активност, с което рискът за заразяване с векторно-предавани микроорганизми прогресивно расте в страните с умерен климат като нашата. Обсъждането на резултатите завършва със **заключение**, в което е обоснована необходимостта от последователното използване на извънлабораторни и лабораторни инструменти за откриване на активните инфекции с тези патогени.

В тази част на дисертацията изпъква **умението на автора да анализира получените резултати и да ги сравнява с тези на други автори. Високата литературна осведоменост на докторанта проличава и тук.**

В резултат на извършените проучвания са формулирани **10 извода**, които ясно отразяват резултатите в последователността на поставените задачи.

#### • Припоси на дисертационния труд.

**Припосите**, произтичащи от извършените изследвания и анализи, са **4** на брой, като **три от тях са оригинални за нашата страна, а един е потвърдителен.** Те са добре формулирани. За пръв път в България чрез молекулярно-генетични методи е установена ДНК на *E. canis* и на *A. phagocytophilum* в кръвни проби от кучета и е доказано заболяването циклична тромбоцитопения при куче (**оригинални приноси**). Потвърдено е, че установяването на клиничните признаци и хематологичните промени, описани при моноцитна ерлихиоза, гранулоцитна анаплазмоза, циклична тромбоцитопения или ко-инфекции не са достатъчно основание за поставяне на диагноза, дори при положителен серологичен резултат, без етиологично изследване за съответния причинител (**потвърдителен принос**).

Дадени са и **четири препоръки** за практиката, свързани с диагностиката и терапията на векторните инфекции моноцитна ерлихиоза и гранулоцитна анаплазмоза при кучетата в нашата страна.

- **Публикувани статии и цитирания.** Пресценка на публикациите по дисертационния труд. Отражение в науката – използване и цитиране от други автори.

Приложеният списък на научните публикации, свързани с дисертацията, включва **три** статии на английски език, като във всичките докторантът Красимира Господинова е водещ автор. Отпечатани са през периода 2019 - 2023 г., като една от тях е публикувана в „Trakia Journal of Sciences“, рефериран в Web of Science, а останалите две – в реферираното в **Scopus** (Q3) научно списание „Bulgarian Journal of Veterinary Medicine“. Публикациите в BJVM са с общ **SJR: 0.36**, което е показател за високото ниво на научната продукция на докторанта. Представен е разделителен протокол за приноса на съавторите в една от научните статии, при което получените от докторантката К. Господинова **точки от публикациите са 31, с които тя изпълнява минималните национални изисквания за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“**.

Представена е справка от Централната библиотека на ТрУ за 12 публикации с участието на К. Господинова в издания, рефериращи и индексирани в световни бази данни. Седем от тях са индексирани в Web of Sciences и имат общ **Impact factor: 9,623**. Пет от тези статии имат и Импакт ранг (Scopus). Други 5 са публикувани в научни списания с Импакт ранг и имат общ **SJR: 5,419 (Scopus)** или **2,933** при приетото зачитане на единия от показателите за статия с IF SWJR. **Една** от тях е свързана с настоящия дисертационен труд, с общ **SJR: 0,177**. На този етап няма установени цитирания на публикации, свързани с дисертацията, но **девет** от останалите научни статии, в които участва като съавтор К. Господинова, са цитирани в **45** публикации, реферирани в Scopus и Web of Sciences. От тях приемам **41**, тъй като четири са косвени автоцитати (3-ти, 12-ти, 15-ти и 20-ти от представения списък от библиотеката на ТрУ). Тези наукометрични резултати са безспорен показател за високото ниво на научноизследователската дейност и публикационната активност на К. Господинова. Те я представят като **опитен и обещаващ изследовател**, с ясни перспективи за бъдещо развитие и принос в науката.

Докторантката е участвала и в **три международни научни конференции** през 2019 и 2023 г.: XXI Symposium of epizootiologist and epidemiologist (XXI Epizootiology Days), Novi Sad, 08-10 April 2019; Трета международна научна конференция „Ветеринарната медицина в полза на хората“ Стара Загора, 22-23.10.2021 г. и Международна научна конференция “One Health”, 12.05.2023 г., Стара Загора.

Красимира Господинова има **участие в университетски научен проект** във връзка с дисертацията: Научен проект № 9/2020 „Молекулярно-генетични изследвания върху разпространението на инфекции с *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, *Anaplasma phagocytophilum* и *Anaplasma platys* при кучета“.

**Литературният указател** включва голям брой литературни източници – **292** бр. и показва отличната информираност на автора за състоянието на проблема в нашата страна и в чужбина. Само 4 от източниците са на кирилица, но заедно с някои от цитираните публикации на български автори на латиница, те обхващат основната част от предходните изследвания на рикетсиози по кучетата у нас и в Р. Северна Македония. От всички цитирани публикации 15 са на български автори и 277 - на чуждестранни. Делът на източниците от последните 10 години е 30,6 % (89

бр.), което показва добра осведоменост на автора за съвременното състояние на проблема.

• **Оценка на степента на личното участие на дисертанта в приносите.**

Докторантът Красимира Господинова е водещ автор на всички публикации, представени във връзка с дисертацията, което приемам за показател за активното ѝ участие в нейното разработване. Считаю, че дисертационният **труд е нейно лично дело**, осъществено под вещото ръководство на научните ѝ ръководители доц. д-м Владимир Петров и проф. д-мн Илия Цачев.

• **Критични бележки, препоръки и въпроси.**

Моите бележки, препоръки и въпроси бяха представени на Разширения катедрен съвет за предварително обсъждане на дисертационния труд. Повечето от тях са взети пред вид в окончателния му вариант.

• **Авторефератът** е написан на 52 страници и пълноценно представя резултатите от изследванията, изложени в дисертацията. **Оформен е добре** и включва необходимите раздели съгласно общоприетите изисквания (съдържание, използвани съкращения, увод, цел и задачи, материали и методи, резултати, обсъждане, изводи, приноси, препоръки за практиката, публикации във връзка с дисертацията, участия в научни форуми, в университетски научен проект и резюме на български и английски език), както и 24 таблици и 5 фигури, представящи резултатите. **Той отразява обективно структурата и съдържанието на дисертационния труд.**

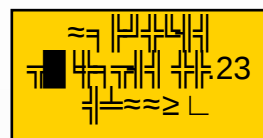
**В заключение** считам, че представеният от Красимира Желязкова Господинова дисертационен труд **отговаря на критериите и показателите за придобиване на ОНС „Доктор“**, заложи в ЗРАСРБ, Правилника за приложението му и **Вътрешния правилник за развитие на академичния състав в ТрУ**. Изготвен е съгласно изискванията, достатъчен е по обем и съдържа необходимите раздели. Изследваните пациенти и използваните материали са достатъчни, както и приложените методи, които са съвременни и подбрани целесъобразно, с оглед извършване на комплексна диагностика на изследваните рикетсиози. Резултатите са обработени статистически, обобщени в таблици и илюстрирани с подходящи фигури. Литературната осведоменост на автора е много добра, което се вижда от обзора на литературата и обсъждането на резултатите, които са компетентно анализирани и сравнени с тези на други автори. Въз основа на това давам своя **положителен вот** и предлагам на уважащите членове на Научното жури също да гласуват **положително за придобиване от Красимира Желязкова Господинова на образователната и научна степен „Доктор“** по научната специалност «Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания при животните», област на висше образование 6.0 Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина.

20.02.2024 г.

гр. София

Изготвил:

(проф. д-р Т. Попова, д.н.)





## REVIEW

on a dissertation work for obtaining the educational and scientific degree "Doctor" (PhD) in the scientific specialty "Epizootology, infectious diseases and prevention of infectious diseases in animals", field of higher education 6.0 Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, professional direction 6.4. Veterinary Medicine.

**Author of the dissertation:** part-time doctoral student Krasimira Zhelyazkova Gospodinova, Faculty of Veterinary Medicine, Thrakia University, Stara Zagora

**Topic of the dissertation:** "Diagnostic studies on ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Bulgaria"

**Prepared by:** Prof. D.Sc. Teodora Petrova Popova, University of Forestry, Sofia, higher education field "Agrarian Sciences and Veterinary Medicine", professional direction: 6.4. Veterinary Medicine, scientific specialty "Epizootology, infectious diseases and prevention of infectious diseases in animals", designated as a member of the Scientific Jury by Order No. 318/02.02.2024 of the Rector of Thrakia University (TrU), St. Zagora.

### • Brief presentation of the doctoral student.

Krasimira Zhelyazkova Gospodinova completed her secondary education in 1993 at the "Geo Milev" Science and Mathematics School in her hometown of Stara Zagora. In 1998, she graduated from Plovdiv University "Paisiy Hilendarski", Plovdiv, and obtained the Master's degree, the professional qualification "Biologist". She successfully defended her diploma thesis on "Cholesterol oxidase activity in bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Achromobacter*". In the same year, she started working at the Veterinary Medical Faculty (VMF) at the TrU in the city of St. Zagora as a technical assistant. From January 1999 to March 2003, she worked as a Microbiologist in the same faculty, performing microbiological diagnostics of infectious diseases. During the period March 2003 - June 2023, she performed the position of Biologist in the VMF in TrU, performing immunobiological diagnostics of infectious diseases by means of ELISA, etc. From June until now, she is an assistant at the same faculty and teaches the disciplines of Immunology and Functional Pathology. Fluent in written and spoken English. She possesses pedagogical license and experience in working with MS Office, Windows 10, laboratory software, with ELISA equipment; PCR and RT-PCR.

Krasimira Gospodinova is enrolled in part-time doctoral studies in the field of higher education: 6. Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, professional direction: 6.4. Veterinary Medicine, doctoral program: "Epizootology, infectious diseases and prevention of infectious diseases in animals" at the Department of "Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases" of the VMF, with Order No. 545/03.07.2018 of the Rector of the TrU. The topic of the dissertation is "Comparative diagnostic studies in current vector-transmitted rickettsioses in the dog in Bulgaria", with scientific supervisor Assoc. Dr. Vladimir Ssetoslavov Petrov and four years of training (01.03.2018 - 01.03.2022). The term of the doctoral studies was extended by one year, starting from 07.03.2022 to 07.03.2023, by Order No. 490/28.02.2022 of the Rector of the TrU. Later, the topic of the dissertation was changed to "Diagnostic studies in ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Bulgaria" with Order No. 673/02.03.2023 of the Rector of TrU. With the same order, Prof. Iliya Tsachev Tsachev was appointed as the second

scientific supervisor. **Krasimira Gospodinova has completed the training activities**, passed the doctoral minimum exams in Epidemiology and Infectious Diseases with excellent success and has the required number of credits. She was awarded the right to defend her dissertation by Order No. 1123/31.03.2023 of the Rector of TrU.

- **General characteristics and structure of the dissertation work.**

The dissertation is written on 157 standard pages. **It includes the necessary sections**, namely: title page, table of contents (3 pages), abbreviations used in the text (1 page), introduction (2 pages), literature review (36 pages), purpose and tasks (1 page), materials and methods (16 p.), results (22 p.), discussion (33 p.), conclusions (1.5 p.), contributions (0.5 p.), recommendations for practice (1 p.), publications, participation in scientific forums and university research projects in connection with the dissertation (1.5 pages) and bibliography (37 pages). This ratio between the sections indicates that **the dissertation is structured correctly**.

- **Timeliness of the problem.**

The causative agents of vector-borne diseases are certain types of bacteria, viruses and parasites that are transmitted by arthropods (mosquitoes, fleas, ticks and sand flies). Today they reach about 17% of all infectious diseases worldwide with a tendency to increase, mainly due to the increasing prevalence of carriers. This is due to the global warming of the climate, active international contacts, but also to the developing drug resistance among the causative agents of these diseases and their vectors. The most significant vectors are ticks, especially in regions with a temperate climate, including in Europe and in our country, mainly from the genera *Ixodes* and *Rhipicephalus*. Vector-borne diseases in dogs also show increasing territorial distribution. Some of them are zoonoses. One of the most significant are those caused by rickettsia of the genera *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, etc. In Europe, the main infections of this group are monocytic ehrlichiosis caused by *E. canis*, granulocytic anaplasmosis with the etiological agent *A. phagocytophilum* and cyclic thrombocytopenia caused by *A. platys*. In our country, the first studies on the presence and spread of diseases from this group were carried out by Prof. Iliya Tsachev at the beginning of the 21st century. He proved for the first time in Bulgaria monocytic ehrlichiosis in dogs in 2002-2003 in a kennel in Plovdiv (Tsachev, 2006), and in 2008 he also established an infection with *A. phagocytophilum* (Tsachev et al., 2008). After the initial detection of these infections, serological tests of domestic and stray dogs in different regions were conducted in our country. However, until now there are no studies confirming the diagnoses by proving the genome of the etiological agents in seropositive dogs with clinical signs and hematological abnormalities characteristic of monocytic ehrlichiosis and granulocytic anaplasmosis. These data show the **indisputable relevance of the problem**, which gives grounds for conducting in-depth complex diagnostic studies of these diseases in Bulgaria, presented in this dissertation.

- **Degree of knowledge of the state of the problem and creative interpretation of the literature review.**

**In the introduction** of the dissertation, the essence of vector-borne infections is well described, as well as their increasing spread, including in our country. The importance of these diseases in dogs is highlighted, the bacteria that cause them are presented and the main carriers are indicated. The need to carry out complex diagnostic studies in this direction in our country is highlighted.

**In the literature review**, a detailed review of the literature data related to the studied vector-borne infections in dogs - monocytic ehrlichiosis, granulocytic anaplasmosis and cyclic thrombocytopenia is made. Their etiological agents are reviewed. The epidemiology, pathogenesis and clinical signs of the diseases are described, as well as the hematological and biochemical changes in the body of the affected animals. The clinical and laboratory serological tests used in their diagnosis, as well as the molecular genetic research methods, are well presented, and an assessment of the individual methods is also made. The literature review ends with a **summary** of the presented information. It is competently written and structured expediently. **It shows the in-depth knowledge of the studied infections, their causative agents, vectors and the research methods used.**

**• Purpose, tasks, hypotheses and research methods. Correspondence of the chosen research methodology with the set goal and tasks of the dissertation work.**

**The purpose** of the presented work is to carry out diagnostic studies by means of clinical, hematological, antibody and molecular genetic tests in suspected and confirmed patients for monocytic ehrlichiosis, granulocytic anaplasmosis and cyclic thrombocytopenia, incl. and when they occur as co-infections in dogs in Bulgaria. For its implementation, 7 tasks have been set, which include conducting clinical examinations, hematological and biochemical tests to select a sufficient number of dogs for inclusion in studies for monocytic ehrlichiosis and granulocytic anaplasmosis; performing various antibody, clinical and laboratory tests for monocytic ehrlichiosis and granulocytic anaplasmosis with analysis of the results; testing of PCR protocol for detection of *E. canis*, *A. phagocytophilum* and *A. platys* from family *Anaplasmataceae*; comparison and analysis of the results obtained from the applied clinical, hematological, biochemical tests and PCR. **The purpose and tasks of the dissertation work are correctly selected and well formulated.**

In the "**Materials and methods**" section, the animals used in the studies (106 dogs with signs of the investigated rickettsioses), the samples taken for research, the serological tests performed, namely clinical **serological** ELISA test - SNAP® 4Dx® Plus (chromatographic), indirect immunofluorescence microscopy and direct ELISA, as well as the **equipment** used, are well described. The applied **molecular genetic** methods are presented, describing the extraction of DNA from the blood of the studied dogs, the protocols for proving the 345 bp segment of the genetic sequence of species of the family *Anaplasmataceae*, the 409 bp fragment of the 16S rRNA gene of *E. canis* and of 444 bp fragment of the *ankA* gene of *A. phagocytophilum* in dog blood. Also described are the protocols used to optimize the amplification temperature of the primers for the detection of the *ankA* gene of *A. phagocytophilum* by gradient PCR and for the detection of the 678 bp fragment of the 16S rRNA gene from the genetic sequence of the species *A. platys* in dog blood. The protocol for agarose **gel electrophoresis** is also presented. The methods used for **statistical processing** of the obtained data are indicated.

I believe that **the researched materials are sufficient** to obtain reliable results, and **the applied methods are** suitable for fulfilling the tasks and achieving the goal of the research. The knowledge and application of these methods present the author as a competent and well-prepared specialist in the field of infectious pathology and vector infections in particular.

- **Demonstrativity and presentation of the obtained results.**

The results of the researches are presented in an overview and clearly in the "Results" section. The clinical signs pointing to the examined rickettsioses, established during the initial examination of 106 patients of the Small Animal Clinic at the University Veterinary Hospital at the Trakia University of St. Zagora are described. The frequency of their manifestation at the initial examination is also presented. The changes in their hematological indicators and the deviations found in the biochemical tests of the blood samples are given. The results of serological clinical tests with SNAP® 4Dx® Plus are indicated, and had been found that positive for *Ehrlichia* spp. are 58.49%, positive for *Anaplasma* spp. - 13.21 % and positive for *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. are 22.64%. The negative samples are 5.66%. The performed indirect immunofluorescence test for antibodies had shown similar results, as a titer  $\geq 1:40$ , accepted as positive for the presence of IgG against *E. canis*, had been found in 59.43% of the examined samples, 13.21% of them showed the presence of antibodies against *A. phagocytophilum*, in 21.7% antibodies were detected simultaneously against *E. canis* and *A. phagocytophilum*, and 5.66% were negative. By means of ELISA, the presence of antibodies against *E. canis* is found in 48.11% of the examined blood samples, in 11.32% of them antibodies against *A. phagocytophilum* are proven, in 29.25% - against both rickettsiae (*E. canis* and *A. phagocytophilum*), and 11.32% of the samples had been negative for antibodies against them. The consistency of the results obtained with the serological tests used had been analyzed. In PCR studies for the presence of genetic sequences specific for the *16S rRNA* gene of rickettsiae of the family *Anaplasmataceae*, 46 are positive for the 345 bp segment of the ribosomal gene. In 26 of them, a 409 bp fragment of the *16S rRNA* gene of *E. canis* is detected by PCR. A 444 bp fragment of the *ankA* gene of *A. phagocytophilum* is found in 28 of the 46 samples positive for the family *Anaplasmataceae*. No *E. canis* or *A. phagocytophilum* DNA is detected in one of the *Anaplasmataceae* genome-positive samples. In the subsequent examination of all 46 positive samples for the family, the presence of a 678 bp fragment of the *16S rRNA* gene of *A. platys* is found in it and in another one, with the presence of DNA for *E. canis* and *A. phagocytophilum* simultaneously. Based on serological and PCR tests, 5 groups of patients with active infection with *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys* and co-infections are formed. The frequency of establishing the main clinical symptoms and hematological changes in them is indicated.

I consider that the presented results are **sufficient** to achieve the goal of the development. They are statistically processed and summarized in **14 tables**, from which the obtained data can be clearly seen and compared. There is a total of 24 tables in the dissertation, but 10 of them are in the previous section "Materials and methods". The results are illustrated with **9 good quality figures**. There are 12 figures, but three of them are in "Materials and Methods", presenting photographs of diagnostic tests and kits used.

Figures 4 – 6 are photographs of patients with clinical signs of infection, Fig. 7 is a graph showing frequency of manifestation of the clinical signs found at the initial examination, and the remaining five figures (8-12) are photographs of PCR tests results. From this section it can be seen that **the set tasks have been completed and the purpose of the work has been achieved.**

#### • Discussion of results and literature used.

The obtained results are successfully discussed in the "Discussion" section, comparing them with those of other authors at home and abroad. The distribution of the examined rickettsioses in different countries, their diagnosis in practice, the importance of clinical signs in this aspect, as well as hematological and biochemical deviations, are discussed. The importance of sample selection and targeted testing of animals with clinical and hematological suspicions for the detection of seropositive dogs with a much higher frequency is highlighted. The importance of rapid antibody tests for these agents in small animal clinics is highlighted. Comparisons have been made with the data of other authors at home and abroad on seroprevalence in dogs. The results obtained with immunofluorescence tests and those with laboratory ELISA kits are discussed, as well as the specificity and sensitivity of the tests applied. The ELISA tests used are found to have high sensitivity and specificity, which is confirmed by the high percentage of concordance between their results and IFA. It has been pointed out that by means of IFA, animals with active infection can be differentiated from those with chronic infection, and their re-examination after about 2 weeks makes it possible to prove the development of the infection. ELISA tests with quantitative determination of antibodies also allow detection of acutely infected animals by demonstrating seroconversion. The ability to detect dynamics in the antibody titer gives the laboratory ELISA an advantage over the rapid SNAP® 4Dx® Plus. However, the latter is cheaper, faster and easier to perform, which makes it suitable for use in clinics. The possibility of serological cross-reactivity between *A. phagocytophilum*, *A. platys* and *Ehrlichia* species is highlighted. The importance of IFA studies in differentiating animals with acute and chronic infection is commented on. It is pointed out that in case of acute illness, the results in PCR and serological tests are positive, because antibodies begin to form even before the appearance of clinical signs, but their synthesis continues as long as the causative agent persists in the body. In cases with positive results in PCR and absence of antibodies, the hypothesis that the disease is at the very beginning and the antibodies are still in small amounts below the detectable minimum is considered. In such cases, it is also required to carry out a repeated serological examination, especially when a clinical picture is manifested. The frequency of clinical symptoms and the reasons for their variations in dogs with monocytic ehrlichiosis, granulocytic anaplasmosis and cyclic thrombocytopenia are commented on, as well as the changes in the cellular and biochemical blood parameters of the patients. Reasons for variations in frequency of clinical signs as well as biochemical abnormalities are indicated. It has been suggested that in chronic disease, *E. canis* can persist in tissues such as bone marrow and spleen, resulting in low concentrations of DNA in the systemic circulation insufficient for PCR amplification. For this reason, PCR tests in sick animals may be negative. A detectable amount of antigen or DNA must be present in the tested sample, which means that a negative test result does not exclude the presence of an infection. In such cases, a reasonable assumption of the development of an acute infection is if the antibody titer rises at least fourfold when retesting the same patient two weeks later. Unlike serological tests, PCR allows the differentiation of active *A. platys* infections from those with *A. phagocytophilum*. It is noteworthy that the present results of the PCR tests are very similar to a number of studies in warm and humid tropical and subtropical regions. This suggests that climatic changes associated with the rise in global temperatures allow expanding the ranges of various tick species and increasing their activity, with which the risk of infection with vector-borne microorganisms progressively grows in countries with a temperate climate such as ours. The discussion of the results ends with a

**conclusion** justifying the need for the consistent use of non-laboratory and laboratory tools to detect active infections with these pathogens.

In this part of the dissertation, **the author's ability to analyze the obtained results and compare them** with those of other authors stands out. **The high literary awareness** of the doctoral student is also evident here

.As a result of the studies carried out, **10 conclusions** were formulated, which clearly reflect the results in the sequence of the set tasks.

• **Contributions of the dissertation work.**

**The contributions** resulting from the conducted research and analysis are **4** in number, **three of which are original for our country, and one is confirmatory**. They are well worded. For the first time in Bulgaria, using molecular genetic methods, DNA of *E. canis* and *A. phagocytophilum* is detected in blood samples from dogs and the disease cyclic thrombocytopenia in a dog was proven (original contributions). It has been confirmed that the establishment of the clinical signs and hematological changes described in monocytic ehrlichiosis, granulocytic anaplasmosis, cyclic thrombocytopenia or co-infections are not sufficient grounds for making a diagnosis, even with a positive serological result, without an etiological study for the relevant causative agent (confirmatory contribution ).

There are also **four recommendations for practice** related to the diagnosis and therapy of vector infections monocytic ehrlichiosis and granulocytic anaplasmosis in dogs in our country.

• **Published articles and citations. Assessment of dissertation publications. Reflection in science - use and citation by other authors.**

The attached list of scientific publications related to the dissertation includes **three** articles in English, in all of which doctoral student Krasimira Gospodinova is the lead author. They are printed in the period 2019 - 2023, and one of them is published in "Trakia Journal of Sciences", referenced in Web of Science, and the other two - in the scientific journal "Bulgarian Journal of Veterinary Medicine" referenced in **Scopus** (Q3). Publications in BJVM have a total **SJR: 0.36**, which is an indicator of the high level of scientific production of the doctoral student. A separating protocol is presented for the contribution of the co-authors in one of the scientific articles, with which the doctoral student K. Gospodinova received **31 points from the publications, and so she fulfills the minimum national requirements for obtaining the educational and scientific degree "Doctor" (PhD)**.

A reference from the Central Library of TrU is presented for 12 publications with the participation of K. Gospodinova in editions referenced and indexed in global databases. Seven of them are indexed in Web of Sciences and have a **total Impact factor: 9.623**. Five of these articles also have an Impact Rank (Scopus). Another 5 are published in scientific journals with Impact rank and have a total **SJR: 5.419** (Scopus) or 2.933 if one of the indicators for an article with IF SWJR is taken into account. One of them is related to the current dissertation, with a **total SJR: 0.177**. At this stage, there are no established citations of publications related to the dissertation, but nine of the remaining scientific articles, in which K. Gospodinova participates as a co-author, are cited in **45** publications referenced in Scopus and Web of Sciences. Of these, I accept **41**, as four are

indirect self-citations (3rd, 12th, 15th and 20th in the list presented by the library of the Trakia University). These scientometric results are an indisputable indicator of the high level of research experience and publication activity of K. Gospodinova. They present her as an **experienced and promising researcher**, with clear prospects for future development and contribution to science.

The doctoral student also had participated in **three international scientific conferences** in 2019 and 2023: XXI Symposium of epizootiologist and epidemiologist (XXI Epizootiology Days), Novi Sad, 08-10 April 2019; Third international scientific conference "Veterinary medicine for the benefit of people" Stara Zagora, 22-23.10.2021 and International scientific conference "One Health", 12.05.2023, Stara Zagora.

Krasimira Gospodinova had participated in a **university scientific project** in connection with the dissertation: Scientific project No. 9/2020 "Molecular-genetic studies on the spread of infections with Ehrlichia canis, Ehrlichia ewingii, Anaplasma phagocytophilum and Anaplasma platys in dogs".

**The literary index** includes a large number of literary sources - **292** items, and shows the author's excellent awareness of the state of the problem in our country and abroad. Only 4 of the sources are in Cyrillic, but together with some of the cited publications of Bulgarian authors in Latin, they cover the main part of the previous studies of rickettsioses in dogs in our country and in the Republic of North Macedonia. Of all cited publications, 15 are by Bulgarian authors and 277 - by foreign authors. The share of sources from the last 10 years is 30.6% (89 items), which shows the author's good awareness of the current state of the problem.

• **Assessment of the degree of the dissertation student's personal involvement in the contributions.**

Doctoral student Krasimira Gospodinova is the lead author of all publications presented in connection with the dissertation, which I take as an indicator of her active participation in its development. I believe that **the dissertation is her personal work**, carried out under the expert guidance of her scientific supervisors, Associate Professor Vladimir Petrov and Prof. Iliya Tsachev.

• **Criticisms, recommendations and questions.**

My notes, recommendations and questions were presented to the Extended Departmental Board for preliminary discussion of the dissertation work. Most of them are taken into account in its final version.

• **The abstract** is written on 52 pages and fully presents the results of the research presented in the dissertation. **It is well designed** and includes the necessary sections according to generally accepted requirements (contents, abbreviations used, introduction, aim and objectives, materials and methods, results, discussion, conclusions, contributions, recommendations for practice, publications in connection with the dissertation, participation in scientific forums, in university scientific project and summary in Bulgarian and English), as well as 24 tables and 5 figures presenting the results. **It objectively reflects the structure and content of the dissertation work.**

**In conclusion,** I consider that the dissertation work presented by Krasimira Zhelyazkova Gospodinova **meets the criteria and indicators for acquiring the educational and scientific degree "Doctor" laid down in the Law on the Development of Academic Staff in the Republic of Bulgaria, the Rules for its implementation and the Rules for development of academic staff at Trakia University.** It is prepared according to the requirements, is sufficient in volume and contains the necessary sections. The examined patients and the materials used are sufficient, as well as the applied methods, which are modern and selected appropriately, with a view to performing a complex diagnosis of the investigated rickettsioses. The results are processed statistically, summarized in tables and illustrated with appropriate figures. The author's literature awareness is very good, as evidenced by the literature review and discussion of the results, which are competently analyzed and compared with those of other authors. Based on this, I give **my positive vote** and suggest to the respected members of the Scientific Jury to also **vote positively for the acquisition by Krasimira Zhelyazkova Gospodinova of the educational and scientific degree "Doctor" (PhD)** in the scientific specialty "Epizootology, infectious diseases and prevention of infectious diseases in animals" , area of higher education 6.0 Agricultural sciences and veterinary medicine, professional direction 6.4. Veterinary Medicine.

20.02.2024  
City of Sofia

Review prepared by:   
(prof. T. Popova, DSc)