



ЛЕСОТЕХНИЧЕСКИ УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ „ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА“

1797, гр. София, бул. "Климент Охридски" №10, тел.: (02) 868 02 35,

факс: (02) 862 28 30 e-mail: fvm_ttu@ttu.bg



СТАНОВИЩЕ

От: доц. д-р Георги Малинов Стоименов



Инфекциозна патология, хигиена, технология и контрол на храните от животински произход"

Факултет „Ветеринарна медицина“, Лесотехнически Университет

Научна специалност: „Елизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните“, **професионално направление:** 6.4. Ветеринарна медицина

Относно: дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“ по **научна специалност** „Елизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните“, **професионално направление:** 6.4. Ветеринарна медицина

Автор на дисертационния труд: Красмира Желязкова Господинова

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

Научни консултанти: доц. Владимир Петров, д-м и проф. Илия Цачев, д-мн

Основание за представяне на становището: участие в състава на научно жури по защита на дисертационния труд съгласно заповед № 318/02.02.2024 на Ректора на ТрУ.

1. Информация за дисертанта

Красмира Желязкова Господинова, се е обучавала по докторска програма „Елизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните“ към катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“ на Ветеринарномедицински факултет, на Тракийски университет. Зачислена е в докторантура, задочна форма на обучение със заповед № 545/07.03.2018 г., а със заповед № 490/28.02.2022 г. срокът на докторантурата е удължен с една година. След изпълнение на всички планирани дейности по обучението, успешно издържани изпити, смяна на темата на дисертационния труд със заповед № 647/02.03.2023 и представен проект на дисертационен труд е отчислена с право на защита със заповед № 1123/31.03.2023 г. на Ректора на Тракийски университет.

Обща характеристика на представения дисертационен труд

Актуалност на темата: Векторно предаваните заболявания и установяването на компетентни вектори в европейския регион според СЗО са сериозен проблем. Фактори като глобализацията, увеличаващите се транспорт и търговията с животни, продължаващата урбанизация и промените в околната среда и климата допринасят за разпространението на компетентните вектори и заболяванията, които пренасят. Векторно предаваните заболявания заемат сериозен процент от всички инфекциозни заболявания по хората и животните (представляват > 17% от инфекциозните заболявания и всяка година се регистрират по 1 милион смъртни случая). Бързата и качествена диагностика, адекватното лечение и разбира се контролът и ограничаването на компетентните вектори са най-добрата стратегия за защита на хората и животните от тези разрушителни заболявания. Кучешките векторно-предавани болести (CVBD) са група от често срещани заболявания, които през последните години показват все по-бързо териториално разпространение. Освен ветеринарно значение, за редица от тях е доказан и зоонозен характер. Диагностичните изследвания използвани при доказване на кучешките векторно-предавани болести в България са главно серологични и липсват изследвания, потвърждаващи/отхвърлящи активна инфекция чрез доказване на генома на



етиологичните агенти при серопозитивни кучета с клинични признаци и хематологични отклонения за моноцитна ерлихиоза и гранулоцитна анаплазмоза.

Ето защо, темата на дисертационния труд е актуална и по-детайлното изучаване и проучване на диагностичните методи доказващи генома на причинителите, ще бъде от полза за ветеринарномедицинската наука и практика.

Структура и обем: Дисертационния труд е написан на 157 страници и е добре балансиран по отношение на обем на отделните части: Съдържание – 3 стр.; Използвани съкращения в текста – 1 стр.; Увод – 2 стр.; Литературен обзор – 36; Цел и задачи – 1 стр.; Материали и методи – 16 стр.; Резултати – 22 стр.; Обсъждане – 33 стр.; Изводи – 2 стр.; Приноси – 1 стр.; Препоръки за практиката – 1 стр.; Публикации, участия в научни форуми и научни проекти във връзка с дисертацията – 2 стр.; Литературен указател – 37 стр.;

При написването на дисертационния труд са използвани 292 литературни източника, от които 4 на кирилица и 288 на латиница, а около 30 % (86/292) от литературните източници са от последните 10 години (след 2014 г.).

Литературен обзор: В този раздел е включена изчерпателна информация относно етиология, епидемиологични особености, патогенеза, клинични признаци, хематологични и биохимични изменения при инфекции с моноцитна ерлихиоза, гранулоцитна анаплазмоза и циклична тромбоцитопения. След подробното описание на т. нар. извън лабораторни методи за диагностика на посочените по-горе заболявания е направен плавен преход към лабораторните такива. Описани са достъпните на пазара и широко използвани в практиката клинични серологични тестове (т.нар. бързи тестове за диагностика), техните предимства и недостатъци. Следва детайлно описание на лабораторните серологични тестове и на молекулярно-генетичните такива. Изтъкнати са предимствата на различните диагностични методи и мястото им в диагностичния алгоритъм на разглежданите заболявания, като и мястото им в практиката. Литературният обзор завършва с обобщение на описаните литературни данни. Разделът е написан компетентно на добър литературен български език с лесен за четене и възприемане научен стил. В него ясно проличават задълбочените знания и информираност на докторанта. Смятам, че целта е ясно и конкретно формулирана, а задачите 7 на брой са поставени в логична последователност и са формулирани конкретно, точно и са адекватни за постигане на поставената цел.

Материали и методи: В раздела на първо място са представени броя изследвани кучета (106), както и чек лист с клиничните признаци насочващи към заболяванията моноцитна ерлихиоза и гранулоцитна анаплазмоза. След което подробно са описани използваните серологични и молекулярно-биологични методи. Детайлно са описани протоколите по екстракция на нуклеиновите киселини и тези за амплификация на различните сегменти от генома на *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* и *A. platys*. С нужните подробности е описана и опитната постановка целяща оптимизиране на температурата за прикрепване на праймерите при протокола за амплификация на *ankA* гена на *Anaplasma phagocytophilum* чрез градиентен PCR. За изпълнение на заложената цел са използвани различни методи на изследване, като всички те са актуални и адекватни за постигане на поставените задачи.

2. Оценка на получените резултати

Резултатите от проведените от докторанта изследвания, са представени на 22 страници, като са включени 9 фигури. Основно снимки на пациенти и снимки илюстриращи резултатите от молекулярно-генетичното изследване. Представени са и 14 таблици. От описаните резултати може да се стигне до заключението, че докторантът е изпълнил успешно поставените му научни задачи и е



постигнал добри резултати. Получените в следствие на проведените лабораторни тестове резултати, приемам за достоверни и лично дело на докторанта.

3. Оценка на обсъждането, научните и научно-приложни приноси

Обсъждането е задълбочено и компетентно интерпретира получените резултати с данните на други автори. Това е индикатор за аналитичност, задълбоченост и добра подготовка на докторанта. В раздела ясно проличават и се очертават нейните задълбочени познания в областта. В дисертацията са формулирани 10 извода, 3 оригинални и 1 потвърдителен приноси и 4 препоръки за практиката. Приемам ги във вида, в който са представени.

4. Оценка на публикациите по дисертацията

Във връзка с дисертацията са подготвени и публикувани 3 научни статии на английски език, като 2 от тях са публикувани в списание „Bulgarian Journal of Veterinary Medicine“ научното списание на ветеринарно-медицинският факултет към Тракийски университет, Стара Загора и една в научното списание *Trakia Journal of Science*. И в трите публикации докторантът е водещ автор, което потвърждава личното му участие в изпълнението на поставените научни задачи. Двете списания са включени в списъка на НАЦИД със съвременните български научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация. Докторантът е предоставил справка-декларация за изпълнение на минималните национални изисквания, както и разделителен протокол за една от статиите.

5. Оценка на автореферата

Запознат съм с автореферата и намирам, че той отразява напълно и адекватно съдържанието и постиженията на дисертацията.

6. Критични бележки, препоръки и въпроси

Нямам критични бележки по същество относно темата, методите и резултатите. Всички бележки, които имах бяха представени при предварителното обсъждане на дисертационния труд в първичното звено и докторанта се е съобразил с тях, като ги е коригирал в текста. Препоръчвам на докторанта в бъдеще да публикува своите научни разработки не само в български научни списания, тъй-като темата е актуална и резултатите би могло да бъдат публикувани в научни списания в чужбина.

7. Заключение

Дисертационният труд на Красимира Желязкова Господинова я очертава, като изследовател, със самостоятелно мислене и солидни познания в областта на епизоотологията, инфекциозните болести и профилактиката на заразните заболявания по животните.

Достоинствата на дисертационния труд, публикационната активност, личният принос на автора и изпълнените изисквания за необходимите количествени и качествени критерии ми дават пълно основание да дам своята положителна оценка на представения дисертационен труд. Предлагам на уважаемото научно жури да присъди на Красимира Желязкова Господинова образователната и научна степен „ДОКТОР“ в област на висше образование 6. Аграрни науки и Ветеринарна медицина, професионално направление: 6.4. Ветеринарна медицина, научна специалност „Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните“.

22.03.2024 г.

Гр. София

Изготвил становището:

Á Á Á
Á Á Á

/д-р Георги Стоименов/



ACADEMIC STATEMENT

Assoc. Prof. PhD. Georgi Malinov Stoimenov

Department „Infectious pathology and hygiene, technology and control of food from animal origin“,
Faculty of Veterinary Medicine, University of Forestry

Scientific specialty: "Epizootiology, infectious diseases and prevention of the infectious diseases of animals", professional field: 6.4. Veterinary Medicine

Regarding: PhD thesis for obtaining of PhD degree in scientific specialty „Epizootiology, infectious diseases and prevention of the infectious diseases of animals“, professional field: 6.4. Veterinary Medicine

Author of the PhD thesis: Krasimira Zhelyazkova Gospodinova

Title of the PhD thesis: „Diagnostic tests for ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Bulgaria“

Scientific consultants: Associate prof. Vladimir Petrov, PhD and Prof. Iliia Tsachev, DSci

Grounds for presenting the opinion: member of the scientific jury for the defense of the PhD thesis according to Order № 318/02.02.2024 of the Rector of Trakia University

1. Information about the PhD student

Krasimira Zhelyazkova Gospodinova, was trained in the doctoral program "Epizootology, infectious diseases and prevention of infectious diseases in animals" at the Department of "Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases" of the Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University. She was enrolled in a doctoral course, part-time form of study, by Order No. 545/07.03.2018. After that the term of the doctoral course was extended by one year with Order No. 490/28.02.2022. After completing all the planned training activities, successfully passing exams, changing the topic of the dissertation work by order No. 647/02.03.2023 and presenting a project of the PhD thesis, it was awarded with the right of defense by order No. 1123/31.03.2023 of Rector of Trakia University.

2. General characteristics of the presented dissertation (PhD thesis)

Relevance of the topic: Vector-borne diseases and the establishment of competent vectors in the European region are, according to the WHO, a serious problem. Factors such as globalization, increasing animal transport and trade, continued urbanization, and environmental and climate changes contribute to the spread of competent vectors and the diseases they transmit. Vector-borne diseases account for a significant percentage of all infectious diseases in humans and animals (more than 17% of all infectious diseases causing approximately 1 million deaths each year). Rapid and accurate diagnosis, adequate treatment and of course control and limitation of competent vectors are the best strategies to protect humans and animals from these devastating diseases. Canine vector-borne diseases (CVBD) are a group of common diseases that have shown an increasingly rapid territorial spread in a recent years. In addition to veterinary importance, a zoonotic nature has also been proven for a number of them. The diagnostic tests used to prove canine vector-borne diseases in Bulgaria are mainly serological and there is no implemented in the routine laboratory work and practice tests which confirm/reject active infection by proving the genome of the etiological agents in seropositive dogs with clinical signs and hematological changes for monocytic ehrlichiosis and granulocytic anaplasmosis.



Therefore, the topic of the dissertation work is relevant and a more detailed study and research of the diagnostic methods proving the genome of the causative agents will be beneficial for veterinary medical science and practice.

Structure and volume: The dissertation is written on 157 pages and is well balanced in terms of volume of individual parts: Contents – 3 pages; Abbreviations used in the text – 1 page; Introduction – 2 pages; Literature review – 36; Purpose and tasks - 1 page; Materials and methods – 16 pages; Results – 22 pages; Discussion 33 pages; Conclusions – 2 pages; Contributions – 1 page; Recommendations for practice – 1 page; Publications, participation in scientific forums and scientific projects in connection with the dissertation – 2 pages; Literature index – 37 pages;

In writing the dissertation, 292 literary sources were used, of which 4 in Cyrillic and 288 in Latin, and about 30% (86/292) of the literary sources are from the last 10 years (after 2014).

Review of the literature: In this section is included a comprehensive information on the etiology, epidemiological parameters, pathogenesis, clinical signs, hematologic, and biochemical changes in infections with monocytic ehrlichiosis, granulocytic anaplasmosis, and cyclic thrombocytopenia. After the detailed description of the so-called field laboratory methods for diagnosis of the above-mentioned diseases, a smooth transition to the laboratory methods was made. Clinical serological tests available on the market and widely used in practice (so-called rapid diagnostic tests), their advantages and disadvantages are described. After that a detailed description of laboratory serological tests and molecular genetic tests is made. The advantages of the various diagnostic methods and their place in the diagnostic algorithm of the considered diseases are highlighted, as well as their place in practice. The literature review ends with a summary of the described literature data. The section is competently written in a good literary Bulgarian language with an easy to read and understand scientific style. It clearly shows the in-depth knowledge and awareness of the doctoral student. I believe that the goal is clearly and concretely formulated, and the 7 tasks in number are set in a logically and are formulated concretely, precisely and are adequate to achieve the set goal.

Materials and methods: The section begin with description of the number of examined dogs (106), as well as a checklist with the clinical signs pointing to the diseases monocytic ehrlichiosis and granulocytic anaplasmosis. After that, the used serological and molecular biological methods are described in detail. The protocols for extraction of nucleic acids and those for amplification of the different segments of the genome of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* and *A. platys* are described in detail. The experimental set-up aimed at optimizing the temperature for attachment of the primers in the protocol for amplification of the *ankA* gene of *Anaplasma phagocytophilum* by gradient PCR is also described with the necessary details. Various research methods were used to fulfill the set goal, and all of them are up-to-date and adequate to achieve the set tasks.

Evaluation of the obtained results

The results of the research conducted by the doctoral student are presented on 22 pages, including 9 figures. Mainly pictures of patients and pictures illustrating the results of molecular genetic testing. Fourteen tables are also presented. From the described results, it can be concluded that the doctoral student successfully completed the scientific tasks set for him and achieved good results. I consider the results obtained as a result of the laboratory tests to be reliable and the personal work of the doctoral student.

3. Evaluation of the discussion, scientific and scientific-applied contributions

The discussion is thorough and competently interprets the results obtained with the data of other authors. This is an indicator of analytical, thoroughness and good preparation of the PhD student. The section clearly shows and outlines her in-depth knowledge of the field. The PhD Thesis contains 10 conclusions, 3 original and 1 confirmatory contributions, 4 recommendations for practice. I accept them in the form in which they are presented and positively evaluate them.



4. Evaluation of the publications associated with the PhD Thesis

In connection with the PhD thesis, 3 scientific articles were prepared and published in English. Two out of Three are published in the journal "*Bulgarian journal of veterinary medicine*", the scientific journal of the Faculty of Veterinary Medicine at the Trakia University, Stara Zagora, and one in the *Trakia journal of science*. In all of them, the PhD student is a leading author, which confirms his personal participation in the implementation of the set scientific tasks. The journals are included in the NACID list of modern Bulgarian scientific publications, referenced and indexed in world-renowned databases with scientific information. The PhD student has provided a reference-declaration of fulfillment of the minimum national requirements for this educational and scientific degree, as well as a separation protocol for one of the articles.

5. Evaluation of the abstract of the PhD thesis

I am familiar with the abstract and I find that it reflects fully and adequately the content and achievements of the PhD thesis.

6. Critical remarks, recommendations and questions

I haven't critical remarks about the subject, methods, and results. All the notes I had were presented in the preliminary discussion of the PhD thesis in department "Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases" and the PhD student has taken them into account by correcting them in the text. I would like to recommend to the PhD student in the future to publish his research not only in Bulgarian scientific journals, as the topic is relevant and the results could be published in scientific journals abroad.

7. Conclusion

The PhD thesis of Krasimira Zhelyazkova Gospodinova outlines her, as a researcher, with independent thinking and solid knowledge in the field of Epizootology, infectious diseases and prevention of infectious diseases in animals. The importance of the PhD thesis, the publication activity, the personal contribution of the author and the fulfilled requirements for the necessary quantitative and qualitative criteria give me full reason to give my positive assessment of the presented dissertation work. I propose to the respected scientific jury to award Krasimira Zhelyazkova Gospodinova the educational and scientific degree "DOCTOR" in the field of higher education 6. Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, professional direction: 6.4. Veterinary medicine, scientific specialty "Epizootology, infectious diseases and prevention of infectious diseases in animals"

22.03.2024 г.

Sofia

Signature:

/Assoc. Prof. PhD. Georgi Stoimenov/