

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Райко Димитров Пешев, д.н., рък. секция „Епизоотология и инфекциозни болести по животните“ в НДНИВМИ гр. София на дисертационен труд на тема: „Проучвания върху сърдечната дирофилариоза по кучета в България“ за присъждане на научна и образователна степен „Доктор“ 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“, представен от Радослав Митков Рафаилов, от катедра: „Инфекциозна патология, хигиена, технология и контрол на храните от животински произход“ от факултета по ветеринарна медицина към Лесотехническият Университет в гр. София.

**Автобиографични данни на кандидата:** Радослав Митков Рафаилов е роден на 07.02.1990 г. в гр. Ловеч. Средното си образование започва през 2005 г. и завършва през 2009 г. в Природо математическата гимназия с изучаване на английски език в гр. Ловеч. От 2009 до 2015 г. завършва като магистър ветеринарен лекар във Факултета по ветеринарна медицина към Лесотехническият университет гр. София. За два месеца работи като ветеринарен лекар в свинекомплекса на кооп Доверие, с Лесидрен. След това работи във ветеринарна клиника „Свети Георги“ Естрела Вет ООД като ветеринарен лекар. От 2016 г. до м. 12.2020 г. работи като асистент преподавател в Лесотехническият факултет. Там подготвя и провежда упражнения, семинарни занятия, практически и семестриални изпити по дисциплините: Паразитология, Болести по пчели, риби, дивеч, подвижна клиника и провеждане на научно изследователска дейност.

Представеният ми за изготвяне на рецензия дисертационен труд на тема: „Проучвания върху сърдечната дирофилариоза по кучета в България“ е написан на 187 страници, като е оформен в съответствие с изискванията за дисертационен труд и включва: Увод -2 стр., Литературен обзор – 32 стр., Собствени изследвания, Цел и задачи -1 стр., Материали и методи – 18 стр., Резултати – 66 стр., Обсъждане -19 стр., Изводи – 2 стр., Приноси – 1 стр., Препоръки за практиката – 1 стр., Участия в научни конференции и публикувани статии , свързани с дисертационния труд – 2 стр., Благодарности – 2 стр., Използвана литература 32 стр. Дисертационният труд е онагледен с 13 таблици и 105 фигури.

Сърдечната дирофилариоза е заболяване, предизвикано от нематода *D.Immitis*, който паразитира в дясното предсърдие, дясната камера и артерия пулмоналис, а при масивна инвазия се откриват екземпляри в задната празна вена. Междинни гостоприемници са много видове комари от родовете *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*, *Culiseta* и *Coquilletidia*. Заболяването е разпространено в целия свят, а в нашата страна в предишни изследвания е установено, че превалентността се движи между 6,6 и 34,3%. Промените в климата и забраната за употреба на инсектицидни средства, въздействащи неблагоприятно върху околната среда, са причини за увеличаване на популацията от комари в целия свят, което е свързано с увеличението на патогени, пренасяни от комари. Дирофилариозата не прави изключение от това. В дисертационния труд чрез проведените епизоотологични и паразитологични изследвания се проучва превалентността и особеностите на заболяването, изследват се видовете комари, участващи в предаването му и се прилагат молекулярно биологични изследвания с оглед подобряване диагностиката и бързо доказване на причинителя.

В раздел литературен обзор докторантът дава исторически факти за видовете паразити от род *Дирофилария* и превалентността на сърдечната дирофилариоза в световен мащаб, в Европа и България. Дадена е общата характеристика на *D.Immitis*, морфологията и биологичния цикъл на причинителя. Следва описание на заболяването при кучето, патогенеза, клинична картина и методи за диагностициране на заболяването. Дадени са методи и схеми за лечение на сърдечната дирофилариоза при кучетата. Посочени са няколко начина за лечение на дирофилариозата с различни комбинации от противопаразитни и лекарствени средства. Описано е и лечението според американската асоциация по сърдечни паразити и методите за хирургическа екстракция на възрастни форми на *D.Immitis* при кучета, аутопсионната находка, патологоанатомичните и патохистологични промени. Комарите са вектори на заболяването, описан е видовият им състав в Европа и в България и видовете комари, носители на микрофиларии, като са посочени факторите от които зависи разпространението им, както и важни климато-географски показатели и данни за развитието им. От така направения литературен обзор се вижда, че биологичният цикъл и морфологията на дирофилариите са частично проучени. Все още не е ясно времето на започването и завършването на предаването на микрофилариите от междинния до крайния гостоприемник. Също така не е добре изяснен въпроса кои от видовете комари са евентуални носители на инвазиоспособни ларви, които да инвазират крайните гостоприемници. Няма достатъчно данни за инвазирането на комарите и тяхната лятна динамика, като брой и разпространение и как климатогеографските особености въздействат върху разпространение на заболяването напоследък. Малко са данните за връзката на заразените кучета с причинителя, тяхното местообитание, породната им принадлежност, пол, възраст, тегло, с което би се изяснило предразположеността на индивидите в рамките на една порода, пола и възрастова предиспозиция към заболяването. Малко са данните в световен аспект относно патологоанатомичните и патохистологичните изменения в различни органи и системи на кучетата, болни от дирофилариоза. Като се изяснят тези особености ще се подобри превенцията и намали разпространението на заболяването в нашата страна.

От литературния обзор се вижда, че д-р. Рафаилов борави много добре със съвременната и по-стара литература, отнасяща се за самият причинител, за междинния гостоприемник, диагностичните методи за доказване, начините за лечение и превенция на заболяването. От така направения литературен обзор и неизяснените моменти по отношение на заболяването се извеждат и целите и задачите, поставени пред дисертационния труд, а именно: Да се направи проучване на превалентността на сърдечната дирофилариоза и да се прецизират възможностите за диагностика на заболяването, да се задълбочат знанията за патологичните изменения в крайните гостоприемници, сезонната динамика на комарите в различните области на страната и да се направи корелация между техния брой и носителството на микрофиларии от вида на *D.Immitis*. За осъществяването на тази цел са поставени за изпълнение и 6 задачи. Считаю, че целта и задачите са правилно зададени, от което ще произтече и по нататъшното правилно проучване на заболяването.

В раздел Материал и методи докторантът описва събирането на проби от крайните и междинни гостоприемници, определяне на местообитанието, половата и породна принадлежност на изследваните кучета, възраст и тегло. Описват се произхода, сезонните, географски и климатични особености на местата от които са уловени междинните гостоприемници. Методите за доказване на инвазията, а именно бързите антигенни тестове, метода на Knott за доказване на микрофиларии в кръвта,

конвенционалния PCR тест и полимеразно верижна реакция в реално време са описани детайлно. Посочен е начинът на улавяне чрез различни видове ловилки и видовото определяне на комарите, междинни гостоприемници на диروفилариозата, както и определяне началото и края на периода на ефективно заразяване (ПЕЗК) според температурата на околната среда и съпоставяне на месечната лятна сезонна динамика на комарите от различни области на страната. Представени са патологоанатомичните и хистологични методи за изследване и статистическите методи за анализ на данните от изследванията. Считаю, че материалите и методите са описани правилно и това е гаранция за получаване на коректни резултати от изследванията.

В раздел Резултати, д-р. Рафаилов в хронологичен ред дава данни от проучванията на превалентността на заболяването при кучетата от различни региони на страната след прилагането на бързите антигенни тестове за диагностика. Направен е сравнителен анализ на данните, получени с бързите антигенни тестове в сравнение с метода на Кнот и конвенционалния PCR тест. Прави впечатление правилното интерпретиране на резултатите от тези изследвания. В раздела следва определянето на видовия състав на комарите в нашата страна в зависимост от климатично-географските условия на изследваните региони, като е определено началото и края на ПЕЗК. Чрез полимеразно верижна реакция в реално време е направена съпоставка между лятната сезонна месечна динамика на комарите в различни градове от страната и са установени градусодните и началото и края на ПЕЗК. Накрая е представена патологоанатомичната и хистологична оценка на промените във вътрешните органи на заразените с диروفилария кучета. Искам да отбележа, че раздела е много добре онагледен, както с междинните гостоприемници, така и с патологоанатомичните и хистологични промени в крайните гостоприемници.

В раздел обсъждане хронологично са обсъдени резултатите от изследванията, като са съпоставени с данните на други изследователи и правилно са дискутирани получените данни от автора. Обсъдени са резултатите от изследванията на превалентността на заболяването в различните региони на страната, след използването на бързите антигенни тестове, като критично са дискутирани разликите между неговите изследвания и тези на други автори работили по проблема. Най-често от диروفилариоза са засегнати мъжките кучетата на възраст между 2 и 7 години от едрите породи, тоест имали са достатъчно години да се инвазират. Авторът прави заключение, че евентуален резервоар и източник на инвазията са безстопанствените, нетретирани със специфични противопаразитни средства кучета. Дискутира се увеличението на превалентността в сравнение с предишни години и се дава обяснение за това. Критично се обсъждат резултатите от лабораторните изследвания, получени чрез бързите антигенни тестове в сравнение с метода на Кнот и конвенционалния PCR тест и причините за разликите, които се получават от прилагането на различните тестове, като е дискутирана чувствителността и специфичността на тестовете. При направения анализ на резултатите, получени от определяне на видовия състав на комарите в нашата страна е установено, че те са четири вида един от вида *Culex pipiens*, три от вида *Aedes vexans*, *cinereus* и *caspius*, един *An.maculipennis complex* и един от род *Culiseta*, като те са разпределени в различни проценти в отделните региони и градове на страната. Авторът дискутира и резултатите за началото и края на периода на ефективното заразяване на комарите с причинителя, като досега в нашата страна не е правено такова проучване, което от своя страна е важно за започване на профилактичните мероприятия в най-подходящия момент. Дискутират се данните от използването на полимеразно верижна реакция в реално време и корелацията им с месечния пик на уловите на комари от

родовете *Culex* и *Aedes*. В последната част от обсъждането се дискутират данните от патологоанатомичните и хистологични промени във вътрешните органи на кучетата с дирофиляриоза, като се съпоставят с резултатите на други автори и се изказва становище, кои органи и системи са най-силно и тежко засегнати, освен тези принадлежащи към кръвоносната система. От обсъждането личи, че докторантът познава добре литературата, може да интерпретира правилно получените от него резултати и да изказва собствено мнение по разработвания проблем.

Считам, че дисертационния труд отразява едно комплексно изследване на разпространението на сърдечната дирофиляриоза по райони и градове в нашата страна, като са установени различните видове комари, вектори на заболяването и зависимостта между разпространението им и температурните и сезонните характеристики. Установени са микрофилярии на *D.Immitis* в 6 вида комари, населяващи нашата страна. Доказан е периода на ефективно заразяване на комарите през летните месеци в 9 града, намиращи се в различни части на страната. Разработен е и е адаптиран към условията на лабораторията метод за доказване на микрофилярии чрез полимеразно верижна реакция в реално време, което ще ускори поставянето на точна диагноза, а оттам назначаване на адекватно лечение и превенция.

Дадени са 14 извода, които напълно отговарят на резултатите от изследванията. Мисля, че изводите е могло да се съчетаят например, 5, 6, 7, 8 и 9 и да не са 14, а по-малко. Посочени са 4 приноса с оригинален характер и два с потвърдителен характер. Направени са и 7 препоръки за практиката. Във връзка с дисертационният труд д-р Рафаилов има общо 4 научни съобщения, с две от които е участвал в научни конференции на ВМФ при ЛТУ и други две научни съобщения, отпечатани в научни списания, в които докторантът е на първа място. По този начин той изпълнява изискванията на ЗРАСРБ и правилника на ВМФ към ЛТУ.

Мисля, че колегата се е съобразил с бележките на предварителният рецензент и на другите колеги, присъствали на предното заседание на секцията.

Към дисертационният труд имам следните бележки и въпроси: На стр. 9 В род дирофилярия са включени 27 вида, може би са повече от 27 вида. Определението за превалентност не е точно. Вие го представяте като общ брой случаи на дадено заболяване за определен период от време. Правилното определение е, че превалентността е отношението между засегнатите от болестта индивиди от дадена популация спрямо общия брой индивиди от тази популация, изложени на риск в определен период от време. На стр. 18 сърдечни червей – не е подходящо определение. На стр. 24 – подрязване на б.др. артерии. Въпрос: На стр. 55 защо като положителна контрола използвате имагиналните форми на *D.Immitis* и *D.Repens*, а не кръв от положителни животни по метода на Кнот, или в имунния тест, коя е презумцията. На стр. 56 втори абзац има повторение на положителните контроли за *D.Immitis* и *D.Repens*. По-долу пишете, че сте мерили количеството на ДНК, но не пишете в какви количества е. На стр. 67 фиг. 17 и 18 втори абзац: “Резултатите относно превалентността при мъжките кучета са представени в следващите две фиг. 17 и 18”. Фигурите обаче се отнасят за превалентността при женските кучета. На стр. 84 четвърти абзац - “Две от положителните проби по Кнот за микрофилярии бяха определени като коинвазия между *D.Immitis* и *D.Repens*”, [Въпрос: как сте ги определили, че се касае за коинвазия между двата вида. На стр. 84 шести абзац се повтаря изречението с изречението от 4 абзац. На стр. 84 седми абзац изречението е неясно едната проба по кой от двата или и в двата метода е положителна за филарии. На стр. 84 изречението: “Десет от антиген положителните проби бяха отрицателни както по

метода на Кнот, така и при изследване с конвенционалния PCR метод. ” Въпрос: Коя е причината да са отрицателни по тези два теста? На стр. 84 фиг. 32 беше хубаво отдолу в легендата да напишете големината на различните филарии в базови двойки напр. *D.Immitis* -204 bp, *D.Repens*-327 bp, филария-500 bp. По правилно е да се напише ямка, или линия 1, 2, 3 и т.н. а не гел 1, 2, 3, защото това, което изливате е гел, а мястото, където капете пробите са слотове или ямки. На стр. 85 и 86 при определяне на диагностичната чувствителност и специфичност на Idexx Snap 4Dx и Knott методите спрямо конвенционалния PCR върху колко проби е извършена вероятно на 192 те проби кръв. Въпрос: По кой метод е изчислена диагностичната чувствителност и специфичност. Кой метод е използван като златен стандарт за определяне на чувствителността и специфичността на тестовете. На стр. 105 как е определен трешолда- границата на откриване, защо е толкова високо поставен. Къде е кът-офа. На стр. 106 табл. 9, отразяваща данните от Rt PCR първоначално се получават едни стойности от изследванията, а при повторното изследване сте установили други стойности. Ако направите и трето изследване и получите други нови резултати какво става тогава? Направена ли е стандартна крива. Въпрос: коя е причината за тази разлика и според Вас до кой цикъл трябва да се приеме, че пробата е положителна до 38,4 или до 31,49, защото не е все едно дали пробата ще се установи дали е положителна до 38 или 31 цикъл. Ако сте приели до 35 цикъл на фиг. 83 положителните проби не са 14, а са по-малко, защото имате няколко проби, които минават над праговата стойност след 35 цикъл. На стр. 125 микроскопските снимки са много хубави, но е било добре да бъдат сложени и негативни контроли от кучета без констатирано заболяване. На стр. 128 непосъвместно третиране – какво значи това. На стр. 132 Предимствата на този едностъпков PCR се базира на това, че се амплифицира общ ген може би сте имали в предвид и се използват специфични праймери. Стр. 133 изречението в първи абзац ”Една от пробите.....беше положителна за филарии” по кой метод вероятно по Rt PCR. На същата стр. 133 последния абзац ”Липсата на микрофиларии може да се обясни с наличието само на женски имагинални форми или прилагане на антинематодни средства. ” Първото твърдение е невярно, тъй като PCR доказва специфично ДНК и 12 S RNA, независимо дали са женски или мъжки филариите. Второто допускане е по-вероятно. Стр. 134 втори абзац долу ”Ниски резултати от гледна точка на чувствителността се получават при коинвазирани животни и по двата метода. ” Въпрос: коя е причината за това според Вас? Стр. 147 Изводи: Извод № 2 не може да се приеме за извод, защото има едно съждение и то не произлиза от настоящите проучвания. В раздел приноси последните два приноса не ги приемам, защото това са известни неща, установени преди това. Препоръки за практиката -3, 4, 5 и 6 препоръка е могло да се съберат в една, като се препоръча на ветеринарните лекари да обърнат внимание на тези изменения при поставяне на диагнозата. Така написани звучат като резултати, а не като препоръки.

Посочените от мен бележки и въпроси не намаляват ценността на разработката не са по същество, а са повече от технически характер и имат за цел да видят как мисли и отговаря автора на възникналите и зададени от мен въпроси.

**Заклучение:** Представеният ми за рецензиране дисертационен труд на тема: ”Проучвания върху сърдечната дирофилариоза по кучета в България” за присъждане на научна и образователна степен „Доктор” от Радослав Митков Рафаилов, представлява актуален научен труд с важно значение за ветеринарната паразитология. Поставените цели и задачи са коректно поставени и изпълнени, като получените резултатите и изведените изводи са достоверни. Считаю, че тези данни ще бъдат от полза за колегите

ветеринарни паразитозии, работещи с домашни любимци. Считам, че дисертационият труд изпълнява критериите на ЗРАСРБ и правилника на ВМФ към ЛТУ и му давам положителна рецензия.

София

15.02.2024 г.



Проф. Р.Пешев, д.н.