



ЛЕСОТЕХНИЧЕСКИ УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛТЕТ „ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА“

Катедра „Инфекциозна патология, хигиена,
технология и контрол на храните от животински произход“



РАДОСЛАВ МИТКОВ РАФАИЛОВ

**„Проучвания върху сърдечната дирофилариоза при кучета в
България“**

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на образователна
и научна степен „доктор“

Област на висше образование 6. „Аграрни науки и ветеринарна
медицина“

Професионално направление 6.4 „Ветеринарна медицина“

Научна специалност „Паразитология и инвазионни болести на
животните и човека“

Научен консултант: доц. д-р Костадин Павлов Кънчев, двм

София 2024 г.

СЪДЪРЖАНИЕ

| | | |
|------|---|----|
| | ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ | 4 |
| | УВОД | 6 |
| | ЦЕЛ И ЗАДАЧИ | 7 |
| | МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ | 8 |
| 1. | Събиране на проби от крайни гостоприемници. Определяне на местообитание, пол, породна принадлежност, киноложка принадлежност, килограми и възраст на изследваните кучета. | 8 |
| 2. | Събиране на проби от междинни гостоприемници | 8 |
| 3. | Бързи антигенни тестове | 8 |
| 4. | Метод на Knott за установяване на микрофиларии в кръв | 9 |
| 5. | Конвенционален PCR тест | 9 |
| 6. | Улов и видово определяне на комари - междинни гостоприемници | 10 |
| 7. | Real time PCR | 11 |
| 8. | Определяне началото и края на периода за ефективно заразяване на комарите според температурата на околната среда като абиотичен фактор през 2021 г. | 12 |
| 9. | Съпоставка на месечна лятна сезонна динамика при комарите от различни области на страната | 12 |
| 10. | Патологоанатомични изследвания | 12 |
| 11. | Статистически анализ | 13 |
| | РЕЗУЛТАТИ | 13 |
| 1. | Превалентност на <i>D. immitis</i> в България при кучета от различни райони на страната чрез използването на бързи антигенни тестове | 13 |
| 1.1. | Разпределение на кучетата участващи в проучването по градове и райони | 13 |
| 1.2. | Разпределение на кучетата участващи в проучването по местообитание | 14 |
| 1.3. | Разпределение на кучетата участващи в проучването по пол | 14 |
| 1.4. | Разпределение на кучетата участващи в проучването по породна принадлежност | 14 |
| 1.5. | Разпределение на кучетата участващи в проучването според киноложката си принадлежност | 14 |
| 1.6. | Разпределение на кучетата участващи в проучването според килограмите си | 14 |
| 1.7. | Разпределение на кучетата участващи в проучването по възраст | 15 |

| | | |
|------|---|----|
| 2. | Съпоставяне на резултатите получени по метода на Knott, с тези от бързи антигенни тестове и конвенционален PCR метод при изследваните кучета | 15 |
| 3. | Резултати за видовия състав на комари от райони на България с различни климатични и географски условия, изследвани за носителство на микрофиларии от <i>D. immitis</i> | 18 |
| 3.1. | Процентни стойности на видовия състав на заловените комари | 20 |
| 3.2. | Лабораторни резултати от PCR проучванията | 20 |
| 4. | Определяне началото и края на периода за ефективно заразяване на комарите | 21 |
| 5. | Съпоставка между сезонната месечна лятна динамика на комарите в различни градове на страната, изследвани за носителство на микрофиларии от <i>D. immitis</i> , чрез Real time PCR | 23 |
| 5.1. | Резултати от проучването на положително установени комари за наличие на микрофиларии от вида <i>D. immitis</i> от различни градове в страната чрез използването на Real time PCR | 23 |
| 5.2. | Видов състав на заловените комари по градове | 23 |
| 5.3. | Резултати от Real time PCR изследването при проучваните комари | 24 |
| 5.4. | Съпоставка между сезонната лятна динамика на комарите от различни градове на страната и носителството им с микрофиларии от вида <i>D. immitis</i> . | 26 |
| 6. | Патологоанатомична и хистологична оценка на измененията във вътрешни органи при кучета с доказана сърдечна диروفилариоза | 31 |
| | ИЗВОДИ | 35 |
| | ПРИНОСИ | 37 |
| | ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА | 38 |
| | НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД | 39 |
| | НАГРАДИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД | 40 |
| | УСТАНОВЕНИ ЦИТИРАНИЯ НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД | 41 |
| | БЛАГОДАРНОСТИ | 42 |
| | ABSTRACT | 44 |

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

| | |
|----------|--|
| MIR | Минимален процент на зарязване |
| PCR | Полимеразна верижна реакция |
| ДНК | Дезоксирибуноклеинова киселина |
| НИМХ-БАН | Национален институт по метеорология и хидрология към Българска академия на науките |
| ПЕЗК | Период на ефективно заразяване на комарите |
| СЗР | Северозападен район |
| СИР | Североизточен район |
| ЦСР | Централен северен район |
| ЦЮР | Централен южен район |
| ЮЗР | Югозападен район |
| ЮИР | Югоизточен район |

Дисертационният труд съдържа 187 страници, включително 13 таблици и 105 фигури, оформени в увод, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати, обсъждане, изводи, приноси, препоръки за практиката, използвана литература, състояща се от 393 заглавия, от които 62 на кирилица и 331 на латиница.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на **22.03.2024 г. 10:00 ч. в зала акад. Мако Даков** в сграда А на Лесотехнически университет, гр.София, бул. „Климент Охридски“ №10 на открито заседание на научно жури в състав:

Председател:

Доц. д-р Роман Пепович Петков, двм

Членове:

Проф. д-р Васил Костадинов Манов, двм

Проф. д-р Райко Димитров Пешев, дн

Проф. д-р Христо Йорданов Даскалов, кн

Доц. д-р Веселин Нанев Нанев, двм

Материалите по защитата (дисертационен труд, автореферат, рецензии и становища на научното жури) са на разположение в Деканата на ФВМ, София, бул. „Климент Охридски“ №10 и са публикувани на сайта на Лесотехнически университет (www.ltu.bg).

УВОД

Сърдечната диروفилария при кучетата е нематодоза, предизвикана от *Dirofilaria immitis* от разред *Spirurida*. Този нематод паразитира в *aa. pulmonales*, дясното предсърдие и дясната камера, но при много масивни инвазии, екземпляри се откриват и във *vena cava caudalis*.

Инвазии с *D. immitis* са констатирани не само при кучета, а и при диви каниди. При котките и човека са документирани предимно абортивни инвазии с *D. immitis*.

Междинни гостоприемници на *D. immitis* са много видове комари от родовете *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Culiseta* и *Coquilletidia*.

Климатичните промени и забраната за употреба на инсектицидни средства с неблагоприятно въздействие върху околната среда благоприятстват увеличаването на популациите на комарите в глобален мащаб. Това е свързано с нарастване на риска от разпространение на патогени пренасяни от комарите.

Диروفиларията е космополитно разпространено заболяване. Ендемични райони са констатирани в Европа. Най-висока превалентност е установена в САЩ. Аржентина, Китай, Южна Корея, Алжир, Италия, Испания, Румъния, Португалия, Турция и Гърция. Спорадични случаи са документирани в Германия, Холандия и Словакия. Превалентността на *D. immitis* в различните ендемични райони през годините варира от 12.0% до 80.0%. Досегашните изследвания на кучета от България показват, че превалентността на *D. immitis* варира от 6.6% до 34.33%.

Патогенното действие на *D. immitis* става обект на задълбочени изследвания едва в края на миналия век.

При инвазиите с *D. immitis* кучета, тежестта на клиничните признаци зависи от степента и давността на инвазията, наличието или отсъствието на ендосимбионтите *Wolbachia* spp., възрастта и общото здравословно състояние на животните и редица други фактори. Кучетата с нискостепенна инвазия може да са безсимптомни или със слабо проявени неспецифични признаци. Заболяването, при някои от животните, може да се манифестира с лека, средна, тежка или фатална респираторна и/или циркулаторна симптоматика.

Усилията за контрол върху популацията на домашните и бездомните кучета все още не постигат желаните резултати.

Настоящият дисертационен труд е насочен към проучване на превалентността на *D. immitis* при кучета и патологоанатомичните изменения, които предизвиква, чрез извършване на епидемиологични и паразитологични изследвания на животни, отглеждани в различен

риск от опаразитяване. Също така е предвидено да се изследват видове комари, отговорни за предаването на заболяването в страната, чрез използването на молекулярнобиологичен метод. Резултатите от проучването, касаещи крайните гостоприемници, ще допринесат за актуализиране на информацията относно превалентността на сърдечната дирофилариоза и измененията, които настъпват в животинския организъм. Получените данни, свързани с междинните гостоприемници, ще подпомогнат определянето на рисковите периоди за разпространение на хелминтозата в страната.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата работа е да се направи проучване на превалентността на сърдечната дирофилариоза при кучета в различни райони на България, както и да се прецизират възможностите за диагностика на заболяването, да се задълбочат знанията за патологичните изменения в крайните гостоприемници, за видовия състав на междинните гостоприемници, сезонната динамика на комарите в различни области на страната и да се направи корелация между техния брой и носителството им на микрофиларии от вида *D. immitis*.

За постигане на целта са поставени следните задачи:

1. Проучване на разпространението на *D. immitis* при кучета в различни райони в България чрез използването на бързи антигенни тестове.
2. Съпоставяне на резултатите, получени по метода на Knott, с тези от бързи антигенни тестове и конвенционален PCR метод при изследваните кучета.
3. Определяне на видовия състав на комарите с установено носителство на *D. immitis* в райони на България с различни климато-географски условия.
4. Установяване на началото и края на периода на ефективно заразяване на комарите;
5. Направата на съпоставка между сезонната месечна лятна динамика на комарите в различни градове на страната, изследвани за носителството на микрофиларии от *D. immitis*, чрез Real time PCR.
6. Извършване на патологоанатомична и хистологична оценка на изменения във вътрешни органи при кучета с доказана сърдечна дирофилариоза.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Материали

1. Събиране на проби от крайни гостоприемници. Определяне на местообитание, пол, породна принадлежност, киноложка принадлежност, килограми и възраст на изследваните кучета.

За периода 01.01.2017 до 30.06.2021 г. бяха проучени 2626 кучета от 10 града на България - Асеновград, Бургас, Видин, Гоце Делчев, Добрич, Ловеч, Пловдив, Русе, Свищов и София като бяха включени както животни отглеждани в домашни условия (апартаменти и къщи), така и безстопанствени кучета. В зависимост от изброените градове, територията на България беше разделена на шест района според номенклатурата на териториалните единици за статистика разпределение възприето при провеждане на проучванията - Северозападен район (СЗР), Централен северен район (ЦСР), Североизточен район (СИР), Югозападен район (ЮЗР), Централен южен район (ЦЮР), Югоизточен район (ЮИР).

2. Събиране на проби от междинни гостоприемници

За периода 27.03.2021 г. до 22.09.2021 г. бяха уловени 1290 женски комара, а за периода 01.05.2022 г. до 31.08.2022 г. 1890 женски комара от 9 града на България - Гоце Делчев, Ловеч, Мездра, Пловдив, Русе, Свищов, София, Търговище и Ямбол. В зависимост от изброените градове, територията на България се дели на шест района според номенклатурата на териториалните единици за статистика.

Методи

3. Бързи антигенни тестове

Изследванията бяха направени чрез „IDEXx SNAP 4Dx Plus TEST” с чувствителност 99.0% и специфичност 99.3% към антигените на *D. immitis*. Тестът включваше детекция на антигени, отделяни от нематода *D. immitis* и антители срещу векторно преносимите бактерии *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* и *Borelia burgdorferi*. Съхранението беше осъществено в хладилни условия при температура в диапазона от 2-8°C. Преди използването на теста той беше темперирен за около 30 min на стайна температура (18-25°C). В направеното проучване от всички животни беше получавана цяла кръв в епруветка с етилендиаминтетраоцетната киселина (EDTA). В кювета накапвахме четири капки дилуент и към тях добавяхме три капки от кръвта. Разклацахме 3-5 пъти и получената смес накапвахме в резервоара на плаката. След 30-60 sec след като пробата достигне до активирация кръг стартирахме теста Всеки тест беше отчитан до 8-мата минута. За

положителен резултат се считаше всеки тест, при който освен контролната точка се визуализираше втора точка, характерна за заболяването.

Антигенните тестове бяха направени във Ветеринарна клиника "Свети Георги" гр. София.

За скрининговото проучване в страната бяха тествани 2626 кучета.

При изследването с бързи антигенни тестове, модифициран метод на Knott и конвенционален PCR при тестване на кучета за наличие на антигени от вида *D. immitis* и наличие на микрофиларии от видовете *D. immitis* и *D. repens* на анализ бяха подложени 192 броя кучета от двата пола, без ограничение във възрастта, от начина им на отглеждане и породната принадлежност.

4. Метод на Knott за установяване на микрофиларии в кръв

На изследване по метода на Knott бяха подложени 192 кръвни проби. Всички проби бяха тествани за наличие на микрофиларии. В градуирана центрофужна епруветка беше поставяна 1 ml антикоагулирала кръв и бяха добавяни 9 ml 2% разтвор на формалин. Пробата беше хомогенизирана и беше оставяна в покой за 15 min до постигане на пълна хемолиза. Следваше центрофугиране за 10 min при 1000 rpm/min. Супернатантата се отстраняваше и утайката се изследваше под микроскоп за наличие на микрофиларии.

5. Конвенционален PCR тест

На конвенционален PCR бяха подложени 192 кръвни проби. За извършването на конвенционалният PCR бяха използвани следните апарати: термосайклер "Applied Biosystems GeneAmp PCR Systems 9700", токоподаващо устройство Consort EV202, UV-транслюминатор VILBER LOURMAT, центрофуга "Biofuge haemo Heraeus instruments", електронна везна KERN KB и магнитна бъркалка MM 2A.

Екстракцията на ДНК беше осъществена с помощта на екстракционен кит QIAamp cadof Pathogen Mini Kit.

За положителни контроли бяха използвани имагинални форми от *D. immitis* и *D. repens*. За отрицателни контроли беше използвана кръв в епруветка с антикоагулант от животни отрицателни по метода на Knott за наличие на микрофиларии, при които е извършвана редовна ежемесечна профилактика срещу междинните гостоприемници.

За амплификацията бяха използвани една двойка праймери за установяване на всички видове филарии при кучета (F: 5'-GTTCCAGAATAATCGGCTA-3'; R: 5'-ATTGACGGATG(AG)TTTGTACC-3'), един праймер за детекция на *D. immitis* (F: 5'-

TTTTTACTTTTTTGGTAATG-3') и един за *D. repens* (R: 5'-AAAAGCAACASAAATAA(CA)A-3'). Параметрите на температурния режим бяха следните: топлинно активиране при - 95°C за 3 min, денатурация - 95°C за 3 sec, прикрепяне на праймерите - 60°C за 1 min (40 цикъла) и окончателно удължаване - 72°C за 5 min.

Амплифицираните продукти бяха смесени с Loading buffer и прехвърлени в 2.5% агар, съдържащ GelRed в съотношение 1 µl към 10 ml TAE буфер и подложени на електрофореза за 1 h при напрежение 110 V.

Към всеки ред от гела бяха добавяни маркери показващи големината на базовите двойки през 100 bp, положителна контрола за *D. immitis*, положителна контрола за *D. repens*, положителна контрола за *D. immitis* и *D. repens*, и отрицателна контрола. Положителни проби за *D. immitis* бяха отчитани на 204 bp, за *D. repens* - на 327 bp и за филарии - на 500 bp.

Проучването чрез конвенционалния PCR беше проведено в „Национален диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт проф. д-р Г. Павлов“ София.

6. Улов и видово определяне на комари - междинни гостоприемници

Залавянето на комарите през 2021 г. беше осъществено чрез използването на два капана - Sentinel и Sentinel UVL Light. Поставянето им беше извършено в или в близост до приюти за кучета в гореспоменатите градове. За атрактант беше използван сух лед (замръзен въглероден диоксид). Събраният улов се умъртвяваше при -20°C. След това се прехвърляше в стерилни контейнери за постоянно съхранение при същите температурни параметри.

Половото и видово определяне на комарите беше извършено чрез стереоскоп МБС-2 №683100 според Schaffner et al. (2000) във Факултетска ветеринарно-медицинска лаборатория по Паразитология към Лесотехнически университет в гр. София и в Национален център за заразни и паразитни заболявания в гр. София.

Залавянето на комарите през 2022 г. беше осъществено чрез използването на осем капана - BG Sentinel Biogents. Поставянето им беше извършено в или в близост до приюти за кучета както и до животински обекти с наличие на голям брой отглеждани кучета в гореспоменатите градове. За атрактант беше използван сух лед (замразен въглероден диоксид) и атрактант BG – Lure Biogents (изкуствен човешки аромат), съдържащ смес от амоняк, млечна киселина и капронова киселина, които са силно привличащи за *Ae. albopictus* – (Biogents). За привличане на по-голям брой кръвосмукали комари, при някои от уловите около капаните, поставяхме съд с гниеща материя (сухи намокрани треви, мокро сено и

слама). Събраният улов беше умъртвяван при -20°C , след което беше поставян в стерилни контейнери за постоянно съхранение при същите температурни параметри.

Половото и видово определяне на комарите извършихме съгласно Schaffner et al. (2000) посредством стереоскоп МБС-2 №683100 във Факултетска ветеринарно-медицинска лаборатория по Паразитология към Лесотехнически университет в гр. София и в Национален център за заразни и паразитни заболявания в гр. София.

7. Real time PCR

Проучването на заловените през 2021 и 2022 г. комари за носителство на микрофиларии от вида *D. immitis* беше осъществено чрез Real time PCR. Всички уловени женски комари бяха групирани по вид, град и дата до 25 броя в проба, и съхранявани до момента на изследването при температурни условия при -20°C .

Real time PCR беше извършено чрез термосайклер „Rotor-Gene Q“, вортекс апарат ”PV-1”, ръчен хомогенизатор ”Biospec Products и центрофуга “Biofuge haemo Heraeus instruments”.

Пробите бяха хомогенизирани, като за целта към всяка сборна проба се добавяше по 1 ml EMEM среда и с ръчния хомогенизатор комарите бяха смлени за около 2 min до получаване на хомогенна суспензия. Така получените суспензии престояваха 12 h при температура от $+4^{\circ}\text{C}$. Следваше центрофугиране на 13 000 rpm/5 min, като супернатантата се използваше за по-нататъшна екстракция.

Амплификацията беше осъществена чрез използването на два праймера мултиплициращи 16S rRNA регион на микрофилариите, който може да се използва за установяване на ларвите L3 в комарите. Първият използван прав праймер е със секвенция ImmF (5'-CTA TAT GTT ACC TTA ATT GG-3'), а втория обратен праймер е със секвенция ImmR (5'-СТТ AAC CAT TAT СТТ AGA TCA G-3'). Използва се и сонда ImmT (5'-ROX-GTA GCT AGT AAG TTT ACC TTG-BHQ2-3'; ROX = 6-карбокси-ксродамин, BHQ2).

Термо профилът включваше първоначална денатурация за 15 min при 95°C , последвана от 50 цикъла, състоящи се от 15 sec при 95°C , 30 sec при 61°C и 30 sec при 72°C . PCR-ът завърши с последна стъпка от 30 sec на 40°C . Флуоресцентните сигнали бяха отчетени при последната стъпка на PCR (финално удължаване). За положителна контрола беше използвана цяла кръв от куче с установена дирофилариоза, наличие на микрофиларии по Knott и тествана преди това по друг протокол на конвенционален PCR. За отрицателна контрола беше използвана цяла кръв от куче тествана преди това по друг протокол на конвенционален PCR

От получените резултати беше изчислен и Minimum infection rate (MIR) Минимален процент на заразяване чрез следната формула $MIR = (\text{Брой положителни проби} / \text{Общ брой изследвани комари}) \times 1000$. MIR показва броя на инвазираните комари на 1000 тествани комара.

Real time PCR изследването беше направено в Национален диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт „Проф. д-р Г. Павлов“

8. Определяне началото и края на периода за ефективно заразяване на комарите според температурата на околната среда като абиотичен фактор през 2021 г.

Под внимание бяха взети средноденонощните стойности на температура, като основен абиотичен фактор определящ развитието на микрофилариите в междинните гостоприемници.

Данните се отнасяха за Враца, Ловеч, Пловдив, Русе, Свищов, София, Търговище, Хаджидимово и Ямбол за периода от 20.03.2021 до 22.09.2021 г. и бяха получени от НИМХ-БАН гр. София. Поради липса на измервателни метеорологични станции в градовете Гоце Делчев и Мездра информация за тях беше получена от най-близко разположените метеорологични станции съответно от гр. Хаджидимово и гр. Враца.

За целта бяха необходими стойностите на средноденонощната температура за дните от този период на годината, когато тя е равна на или по-висока от 14°C.

9. Съпоставка на месечна лятна сезонна динамика при комарите от различни области на страната

В проучването касаещо съпоставянето на месечната лятна сезонна динамика при комарите уловени през 2022 г. участваха междинни гостоприемници от родовете *Aedes* и *Culex*.

10. Патологоанатомични изследвания

Бяха направени шест аутопсии на кучета с доказана прижизнена сърдечна диروفилария. Всички аутопсирани кучета бяха безпородни. Половото разпределяне беше по равно, три мъжки и три женски животни. Най-младото аутопсирано животно беше на възраст от осем години, а най-възрастното на единадесет години.

Патологоанатомичните изменения бяха изследвани съобразно класическата обдукционна техника за месоядни животни в „Аутопсионната зала“ на Факултет „Ветеринарна медицина“ към Лесотехнически университет в гр. София.

След аутопсирането беше взет материал от белодробните артерии, дясното предсърдие и камера, белия дроб и бъбреците за морфологичен анализ, който беше фиксиран в 10% буфериран неутрален разтвор на формалин. Пробите бяха дехидратирани като преминаваха през възходяща алкохолна редица – 50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 96° и абсолютен алкохол (във всяка концентрация престояваха по 3 h). След обезводняването се просветлиха за няколко часа в ксилол, след което бяха включени в парафинови блокчета, които бяха нарязани с ротационен микротом (Euromex BioBlue), с дебелина на шнита 5 µm. Така направените срезове бяха прикрепени към предметни стъкла чрез хистологично лепило и отново се обработиха с ксилол и през низходяща алкохолна редица – абсолютен алкохол, 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%. След оцветяване с Hematoxylin-Eosin микроскопското изследване и фотографиране беше извършено със светлинен микроскоп с вградена камера Euromex BioBlue.

Патохистологичното изследване бе направено в „Хистологична лаборатория“ във факултета по Ветеринарна медицина към Лесотехнически университет в гр. София.

11. Статистически анализ

Данните са представени като средно \pm стандартна грешка от 3-9 повторения. Статистическата обработка на данните е направена чрез многовариантен дисперсионен анализ (multiple ANOVA), последван от Tukey тест. Значимите разлики при $P < 0.05$ са означени с различни букви.

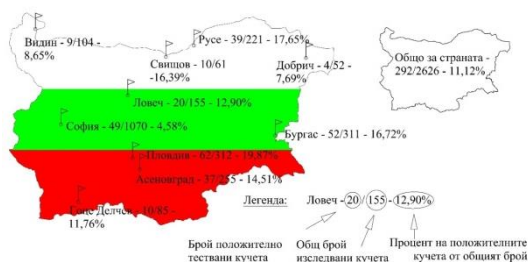
РЕЗУЛТАТИ

1. Превалентност на *D. immitis* в България при кучета от различни райони на страната чрез използването на бързи антигенни тестове

1.1. Разпределение на кучетата участващи в проучването по градове и райони

Получените резултати показват, че най-висок процент на инвазирани животни бяха установени в Пловдив – 19.87%, а най-нисък (4.58%) в София. В останалите градове беше установено, че процентът на инвазирани животни се колебаеше между 7.69% и 17.65%. Средната стойност за страната беше 11.12%.

На следващата фиг. 2 са представени процентните съотношения по райони. Най-висок процент на инвазирани животни беше установен в ЦЮР (17.46%), а най-нисък – в ЮЗР (5.11%). В останалите четири района на България процентите са в порядъка на 8.65% и 16.72.



Фиг. 1. Процент инвазирани кучета по градове.



Фиг. 2. Процент инвазирани кучета по райони.

1.2. *Разпределение на кучетата участващи в проучването по местообитание*

Данните показват по-голяма честота на положителни случаи при безстопанствените кучета. При тях получените процентни резултати бяха 24.75%, което е с почти четири пъти по-голяма честота в сравнение с отглежданите животни в домашни условия – 4.88%.

1.3. *Разпределение на кучетата участващи в проучването по пол*

Броят на положително тестваните мъжки животни спрямо общия брой позитивни кучета отговаряше на 56.16%, а на женските - 43.84%.

1.4. *Разпределение на кучетата участващи в проучването по породна принадлежност*

Резултатите показват, че най-висок процент на инвазираност имаше при следните породи кучета – Кавказка овчарка 36.84%, Акита ину 33.33%, Бийгъл 23.53%, Дратхаарт 23.08% и Българско овчарско куче и Курцхаар с по 20.00%.

1.5. *Разпределение на кучетата участващи в проучването според киноложката си принадлежност*

Резултатите показват високи стойности при Първа породна група „Овчарски и пастирски кучета“ - 18.44%, „Смесена порода“ - 14.41% и Трета, четвърта и пета породна група – „Ловни кучета“ - 8.70%. При останалите три групи резултатите бяха сравнително ниско – под 4.00%.

1.6. *Разпределение на кучетата участващи в проучването според килограмите си*

Резултатите показват по-високи стойности на инвазираност при Едрите породи - 13.77% за сметка на Дребните породи - 6.49%.

1.7. Разпределение на кучетата участващи в проучването по възраст

Процентното съотношение между всички положителни кучета в страната на възраст между 6 м. и под 2 г. към общия брой положителни кучета в България 9.24%, на възраст над 2 г. до под 7 г. – 67.47% над 7 г. - 23.29%.

2. Съпоставяне на резултатите получени по метода на Knott, с тези от бързи антигенни тестове и конвенционален PCR метод при изследваните кучета

На табл. 1 са представени обобщени резултати, при които има положителни стойности поне по един от приложените методи.

Таблица 1. Обобщени резултати от сравнителните изследвания.

| Номер на пробата | Конвенционален PCR <i>Canine fillaria</i> | Конвенционален PCR <i>D. immitis</i> | Конвенционален PCR <i>D. repens</i> | Бърз Ag тест | Метод на Knott <i>D.immitis</i> / <i>D.repens</i> |
|------------------|---|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------|---|
| 17 | - | - | - | + | (-) (-) |
| 26 | - | - | - | + | (-) (-) |
| 27 | - | - | - | + | (-) (-) |
| 35 | - | - | - | + | (-) (-) |
| 36 | - | - | - | + | (-) (-) |
| 37 | - | - | - | + | (-) (-) |
| 58 | + | + | - | + | (+) (-) |
| 64 | + | + | + | + | (+) (+) |
| 66 | + | + | - | + | (-) (-) |
| 70 | + | + | - | + | (+) (-) |
| 75 | + | + | - | + | (+) (-) |
| 82 | + | + | - | + | (-) (-) |
| 90 | + | - | - | - | (-) (-) |
| 97 | + | + | + | + | (+) (-) |
| 98 | + | + | + | + | (+) (+) |
| 99 | + | + | + | - | (+) (-) |

| | | | | | |
|-----|---|---|---|---|---------|
| 106 | - | - | - | + | (-) (-) |
| 125 | - | - | - | + | (-) (-) |
| 172 | - | - | - | + | (-) (-) |
| 173 | + | + | - | + | (+) (-) |
| 174 | - | - | - | + | (-) (-) |

При 19 от всички тествани 192 кучета получихме положителни резултати при антигенните тестове.

При изследване посредством конвенционалния PCR две от отрицателните проби по Knott бяха положителни за наличие на микрофиларии от вида *D. immitis*.

Две от положителните проби по Knott за микрофиларии от *D. immitis* чрез конвенционалния PCR бяха определени като коинвазия между *D. immitis* и *D. repens*.

Четири от положителните проби по Knott бяха потвърдени с конвенционалния PCR.

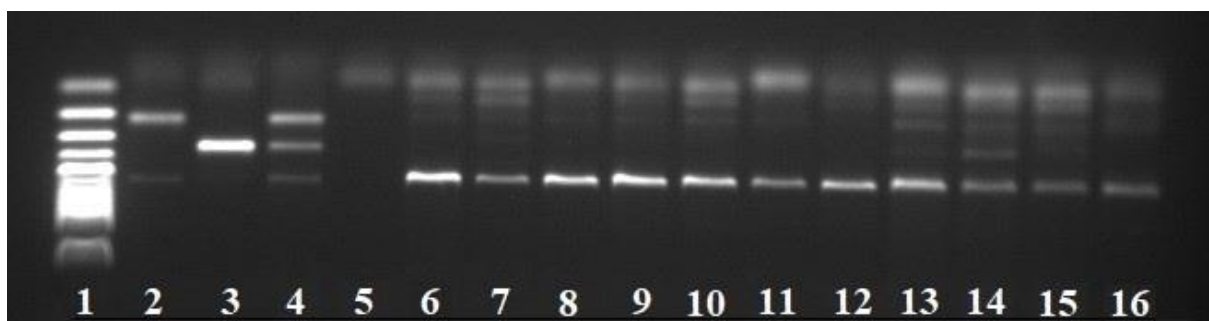
Две от положителните проби за коинвазия между *D. immitis* и *D. repens* по метода на Knott бяха потвърдени и чрез конвенционалния PCR.

Една от пробите, която беше отрицателна чрез бързия антигенен тест, метода на Knott, PCR за *D. immitis* и *D. repens*, беше положителна за филарии.

Една от пробите отрицателна на бързия антигенния тест, беше положителна по метода на Knott за наличие на микрофиларии от вида *D. immitis* и положителна при конвенционалния PCR за микрофиларии от *D. immitis* и *D. repens*.

Десет от антиген-положителните проби бяха отрицателни както по метода на Knott, така и при изследване с конвенционалния PCR метод.

Положителните PCR проби са представени на фиг. 3.



Фиг. 3. Конвенционален PCR. Всички получени положителни резултати.

- Гел М - Маркер;
- Гел № 1 - Положителна контрола за *D. immitis* и филарии;

- Гел № 2 - Положителна контрола за *D. repens* и филарии;
- Гел № 3 - Положителни контрола за *D. immitis*, *D. repens* и филарии;
- Гел № 4 - Отрицателна контрола;
- Гел № 5 - Положителна проба за *D. immitis* и филарии;
- Гел № 6 - Положителна проба за *D. immitis*, *D. repens* и филарии;
- Гел № 7 - Положителна проба за *D. immitis* и филарии;
- Гел № 8 - Положителна проба за *D. immitis* и филарии;
- Гел № 9 - Положителна проба за *D. immitis* и филарии;
- Гел № 10 - Положителна проба за *D. immitis* и филарии;
- Гел № 11 - Положителна проба за филарии;
- Гел № 12 - Положителна проба за *D. immitis*, *D. repens* и филарии;
- Гел № 13 - Положителна проба за *D. immitis*, *D. repens* и филарии;
- Гел № 14 - Положителна проба за *D. immitis*, *D. repens* и филарии;
- Гел № 15 - Положителна проба за *D. immitis* и филарии;

Определяне на чувствителността и специфичността на антигенния тест IDEXX SNAP 4Dx Plus и метода на Knott – при кучета, към нематодите *D. immitis* и *D. repens* чрез използването на конвенционален PCR

Резултатите са представени в табл. 2

Таблица 2. Получени стойности за чувствителност и специфичност чрез използването на IDEXX SNAP 4Dx Plus антигенен тест и метода на Knott.

| Чувствителност и специфичност на бърз антигенен тест IDEXX SNAP 4Dx Plus и метода на Knott спрямо конвенционален PCR | | | | | |
|---|--------------------|------------------|---|--------------------|------------------|
| Бърз антигенен тест IDEXX SNAP 4Dx Plus спрямо конвенционален PCR | | | Метод на Knott спрямо конвенционален PCR | | |
| | Чувствителност (%) | Специфичност (%) | | Чувствителност (%) | Специфичност (%) |
| <i>D. immitis</i> | 90.0 | 94.5 | <i>D. immitis</i> | 80.0 | 100.0 |
| <i>D. immitis</i> и <i>D. repens</i> | 75.0 | 91.5 | <i>D. immitis</i> и <i>D. repens</i> | 50.0 | 100.0 |

В резултат на направените изследвания беше установена ниска чувствителност на теста IDEXX SNAP 4Dx Plus, когато се среща коинвазия между двата нематода - 75%. Ниска чувствителност беше установена и при метода на Knott при коинвазия между двата вида диروفиларии - 50%. Доказва се максимално високата специфичност на метода на Knott при моноинвазия с *D. immitis* и при коинвазия между двата нематода.

3. Резултати за видовия състав на комари от райони на България с различни климатични и географски условия, изследвани за носителство на микрофиларии от *D. immitis*

От всички 9 града в България бяха събрани общо 1290 броя женски комара при извършени 58 улова. Това правеше по 22.24 женски комара средно на улов.

Най-голям брой комари бяха уловени в гр. Ямбол – 220, следван от София и Пловдив съответно с по 209 и 208 броя. В градовете Търговище и Мездра броят им варираше между 100 и 200. В Ловеч, Русе, Свищов и Гоце Дечев броят им беше под 100.

Броят на заловените женски комари е най-голям в СИР – 275, следват ЮЗР - 228, ЮИР - 220, , ЦЮР - 208, ЦСР - 182 и СЗР - 177.

Установени бяха четири вида комари – *C. pipiens*, *Ae. vexans*, *Ae. cinereus* и *Ae. caspius*, един комплекс – *An. maculipennis complex* и един род *Culiseta sp.* (фиг. 4-9).



Фиг. 4. Женски представител от вида *C. pipiens*.



Фиг. 7. Женски представител от вида *Ae. caspius*.



Фиг. 5. Женски представител от вида *Ae. cinereus*.



Фиг. 8. Женски представител от комплекса *An. maculipennis complex*.



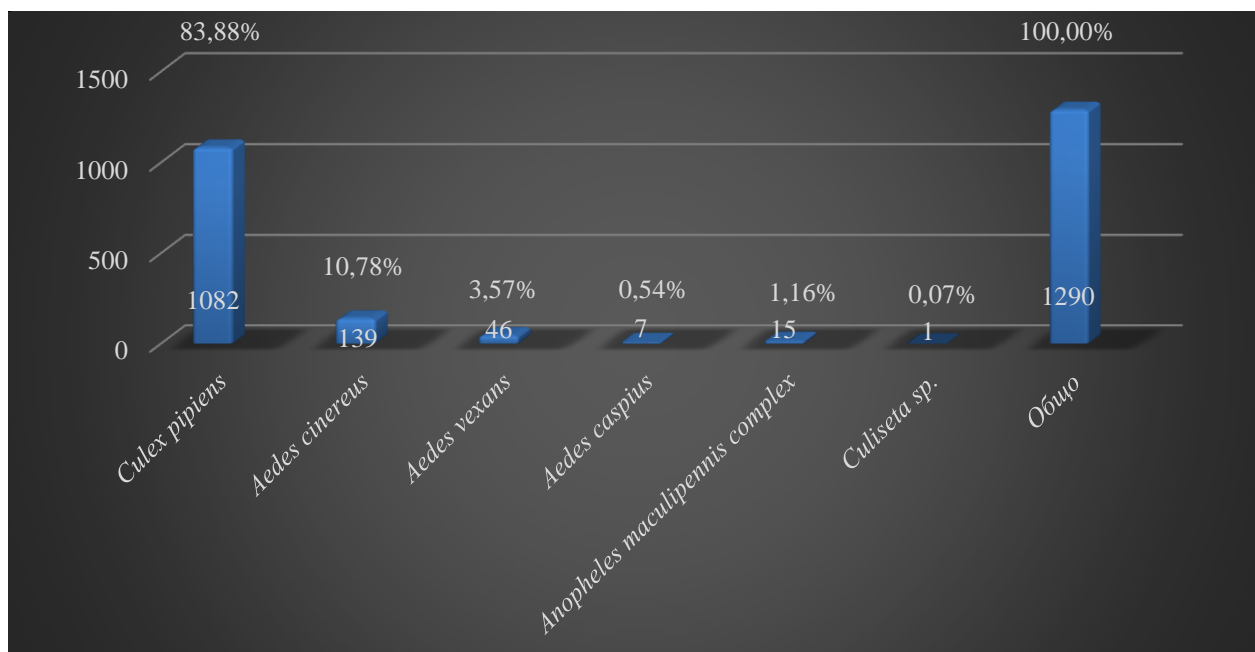
Фиг. 6. Женски представител от вида *Ae. vexans*.



Фигура 9. Женски представител от род *Culiseta*.

3.1. Процентни стойности на видовия състав на заловените комари

На фиг. 10 е представено процентното съотношение на всички видове уловени комари в страната.



Фиг. 10. Брой уловени комари и тяхното процентно съотношение по вид за цялата страна.

Преобладаващият вид в страната през изследвания период беше *C. pipiens*, следван от *Ae. cinereus*, *Ae. vexans* и *Ae. caspius*. Установен бе един комплекс *An. maculipennis complex* и един представител от род *Culiseta*.

3.2. Лабораторни резултати от PCR проучванията

На следващата табл. 3 са представени положителните резултати от всички тествани проби чрез Real time PCR.

Таблица 3. Резултати на тестваните проби с комари за наличие на микрофилярии от вида *D. immitis* през 2021 г.

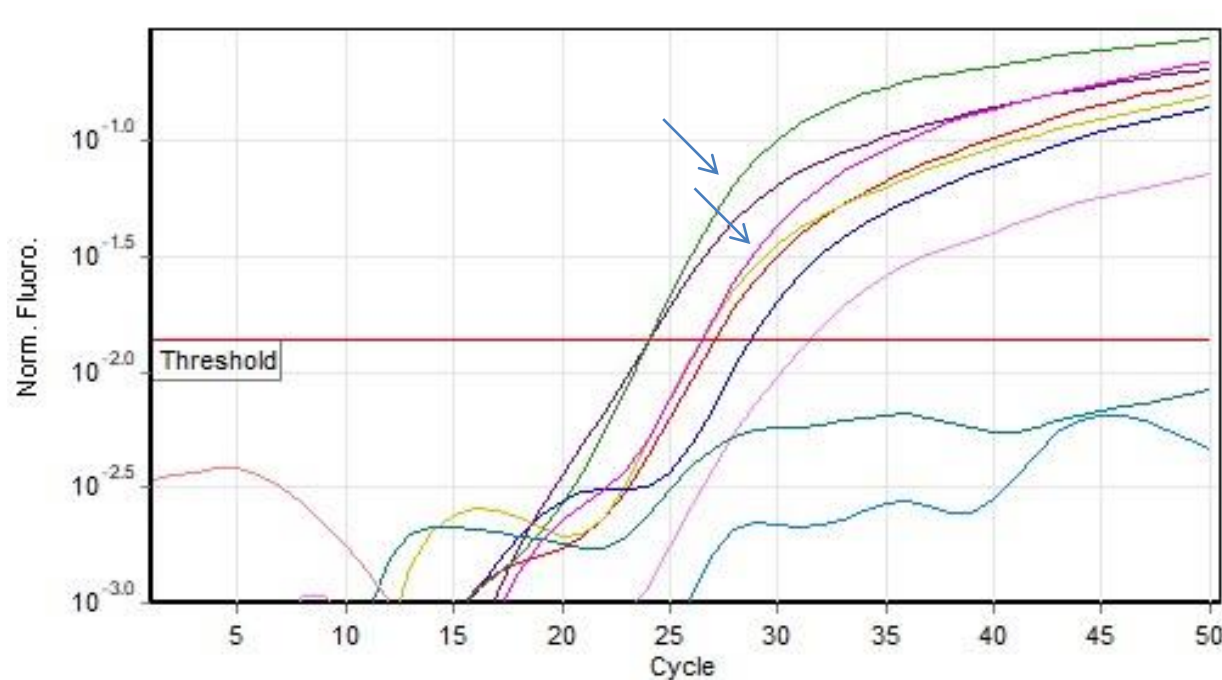
| Лабораторен код | Вид комар | Брой комари в проба | Район | Град | Дата на улова | Резултати от Real time PCR |
|-----------------|--------------------------------|---------------------|-------|-----------|---------------|----------------------------|
| 34 | <i>C.pipiens</i> | 18 | ЮЗР | София | 06.07. | положителен |
| 49 | <i>An.maculipennis complex</i> | 1 | СЗР | Мездра | 11.07. | положителен |
| 74 | <i>C.pipiens</i> | 25 | СЗР | Мездра | 03.08. | положителен |
| 93 | <i>C.pipiens</i> | 25 | ЦЮР | Пловдив | 12.08. | положителен |
| 111 | <i>C.pipiens</i> | 25 | СИР | Търговище | 22.08. | положителен |

При изследването на всички 152 сборни проби, бяха установени положителни резултати при 5 от тях (фиг. 11). Изчисления MIR бе следния:

Общата стойност на MIR - 3.87;

C. ripiens - 3.70;

An. maculipennis complex - 66.67;



Фиг. 11. Real time PCR.

Положителни контроли (сини стрелки) и всички пет положителни проби.

4. Определяне началото и края на периода за ефективно заразяване на комарите

В Мездра за началото на ПЕЗК бяха необходими 65 градусодни. ПЕЗК протичаше за 86 дни. Започваше 05.06.2021 г. и приключваше на 30.08.2021 г.

В Ловеч за началото на ПЕЗК бяха необходими 68 градусодни. ПЕЗК протичаше за 85 дни. Започваше 08.06.2021 г. и приключваше на 31.08.2021 г.

В Свищов за началото на ПЕЗК бяха необходими 55 градусодни. ПЕЗК протичаше за 103 дни. Започваше 27.05.2021 г. и приключваше на 06.09.2021 г.

В Русе за началото на ПЕЗК бяха необходими 44 градусодни. ПЕЗК протичаше за 101 дни. Започваше 27.05.2021 г. и приключваше на 04.09.2021 г.

В Търговище за началото на ПЕЗК бяха необходими 69 градусодни. ПЕЗК протичаше за 51 дни. Започваше 09.06.2021 г. и приключваше на 29.08.2021 г.

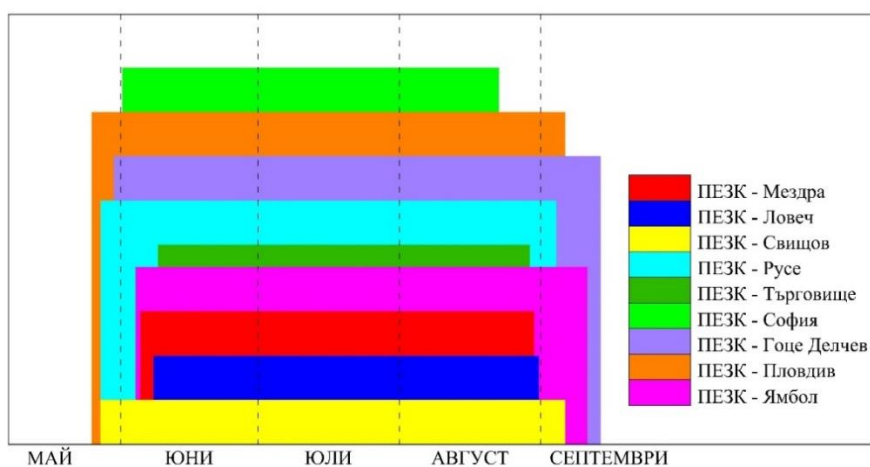
В София за началото на ПЕЗК бяха необходими 67 градусодни. ПЕЗК протичаше за 67 дни. Започваше 17.06.2021 г. и приключваше на 22.08.2021 г.

В Гоце Делчев за началото на ПЕЗК бяха необходими 58 градусодни. ПЕЗК протичаше за 107 дни. Започваше 30.05.2021 г. и приключваше на 13.09.2021 г.

В Пловдив за началото на ПЕЗК бяха необходими 54 градусодни. ПЕЗК протичаше за 105 дни. Започваше 25.05.2021 г. и приключваше на 06.09.2021 г.

В Ямбол за началото на ПЕЗК бяха необходими 43 градусодни. ПЕЗК протичаше за 100 дни. Започваше 04.06.2021 г. и приключваше на 11.09.2021 г.

Обобщена информация е представена на фиг. 12.



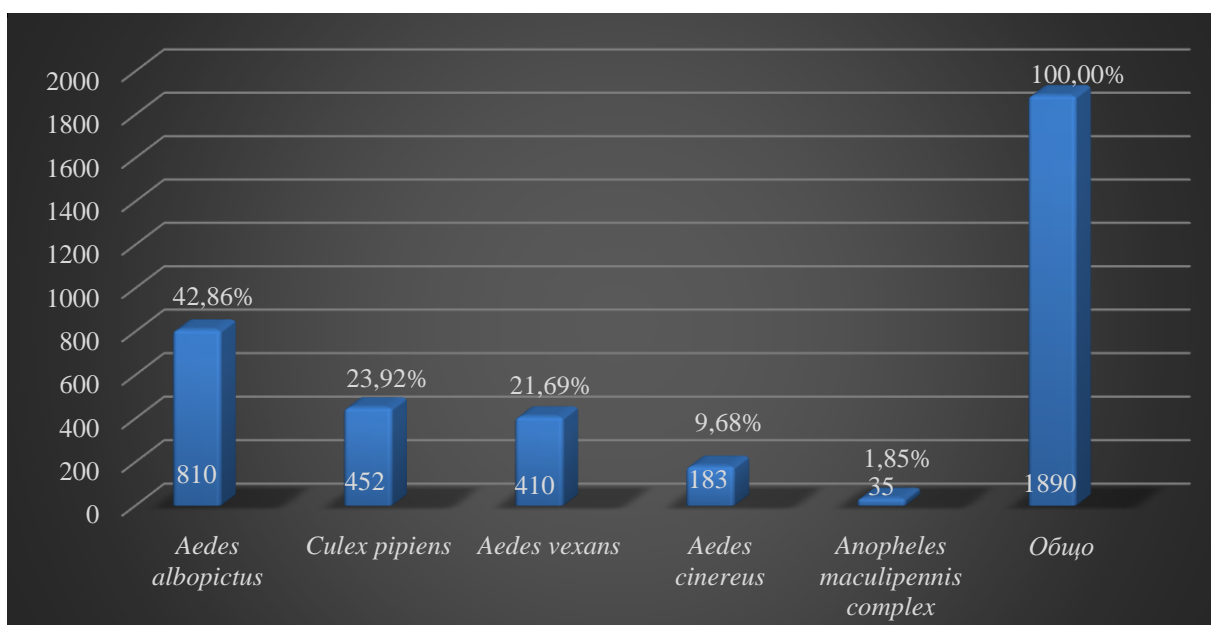
Фиг. 12. Начало и край на ПЕЗК по градове.

Резултатите показват, че ПЕЗК повсеместно за страната започваше в периода от края на месец май (Свищов, Русе, Гоце Делчев и Пловдив) до средата на месец юни (Враца, Ловеч, Търговище, София и Ямбол). Най-рано ПЕЗК според климатичните данни за 2021 г. стартираше в Пловдив на 25 май, съответно най-късно - в София на 17 юни. ПЕЗК завършваше в края на август (Враца, Ловеч, Търговище и София) или началото на септември месец (Свищов, Русе, Гоце Делчев, Пловдив и Ямбол). Най-рано ПЕЗК завършваше в София 22 август. Най-късно ПЕЗК завършваше в Ямбол – на 11 септември. Продължителността на ПЕЗК според температурните условия в страната беше от 67 дни (София) до 107 дни (Гоце Делчев). Стойностите, получени от градусодните показваха, че най-бързото им достигане беше в Ямбол - 43 градусодни и най-бавно достигат в Търговище - 69 градусодни.

5. Съпоставка между сезонната месечна лятна динамика на комарите в различни градове на страната, изследвани за носителство на микрофиларии от *D. immitis*, чрез Real time PCR

5.1. Резултати от проучването на положително установени комари за наличие на микрофиларии от вида *D. immitis* от различни градове в страната чрез използването на Real time PCR

От всички 9 града в България бяха събрани общо 1890 броя женски комара. На фиг. 13 е представено процентното съотношение на всички видове уловени комари в страната.



Фиг. 13. Брой уловени комари и тяхното процентно съотношение по вид за цялата страна.

Най-често срещания уловен вид през годината на територията на страната беше *Aedes albopictus*, следван от *C. pipiens*, *Ae. vexans*, *Ae. cinereus* и *An. maculipennis complex*.

5.2. Видов състав на заловените комари по градове

На следващата табл. 4 са представени резултатите относно видовото разпределение на комарите по градове.

Таблица 4. Видов състав на заловените комари по градове.

| Град | <i>Ae. albopictus</i> | <i>C. pipiens</i> | <i>Ae. vexans</i> | <i>Ae. cinereus</i> | <i>An. maculipennis complex</i> | Общо |
|-------------|-----------------------|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------------------|------|
| Мездра | 121 | 79 | 73 | 31 | 4 | 308 |
| Ловеч | 67 | 38 | 44 | 11 | 4 | 164 |
| Свищов | 76 | 27 | 27 | 10 | 6 | 146 |
| Русе | 85 | 34 | 41 | 4 | 6 | 170 |
| Търговище | 54 | 35 | 28 | 19 | 3 | 139 |
| София | 101 | 61 | 48 | 26 | 4 | 240 |
| Гоце Делчев | 40 | 23 | 27 | 11 | 2 | 103 |
| Пловдив | 139 | 70 | 68 | 30 | 5 | 312 |
| Ямбол | 127 | 85 | 54 | 41 | 1 | 308 |

Във всички проучвани градове с най-голяма честота се срещаща вида *Ae. albopictus*. В отделните градове, *C. pipiens* и *Ae. vexans* бяха установявани с различна честота. Най-малък брой представители се срещаха от вида *Ae. cinereus* и комплекса *An. maculipennis complex*.

5.3. Резултати от Real time PCR изследването при проучваните комари

На следващата табл. 5 са представени резултатите относно видовото разпределение на комарите по градове.

Таблица 5. Положителни резултати от проведеното проучване върху комари за наличие на микрофиларии на *D. immitis* през 2022 г.

| Лабораторен код | Вид комар | Брой комари в проба | Град | Дата на улова | Резултати |
|-----------------|-----------------------|---------------------|--------|---------------|-------------|
| 9 | <i>Ae. albopictus</i> | 8 | Мездра | 17.07. | положителен |
| 33 | <i>Ae. albopictus</i> | 10 | Мездра | 08.08. | положителен |
| 66 | <i>Ae. cinereus</i> | 1 | Ловеч | 08.06. | положителен |

| | | | | | |
|-----|-----------------------|---|-------------|--------|-------------|
| 102 | <i>Ae. vexans</i> | 3 | Ловеч | 13.08. | положителен |
| 136 | <i>Ae. albopictus</i> | 4 | Свищов | 11.07. | положителен |
| 191 | <i>Ae. vexans</i> | 6 | Русе | 09.08. | положителен |
| 194 | <i>Ae. albopictus</i> | 7 | Русе | 17.08. | положителен |
| 209 | <i>Ae. vexans</i> | 1 | Търговище | 10.07. | положителен |
| 221 | <i>Ae. vexans</i> | 3 | Търговище | 31.07. | положителен |
| 247 | <i>C. pipiens</i> | 4 | София | 20.06. | положителен |
| 306 | <i>Ae. albopictus</i> | 2 | София | 31.08. | положителен |
| 330 | <i>Ae. albopictus</i> | 2 | Гоце Делчев | 13.08. | положителен |
| 340 | <i>C. pipiens</i> | 3 | Гоце Делчев | 30.08. | положителен |
| 449 | <i>Ae. cinereus</i> | 4 | Ямбол | 27.08. | положителен |

След изследването на всички 457 сборни проби, бяха установени положителни резултати при 14 от тях. Изчисленият MIR бе следния:

Общата стойност на MIR - 7.41;

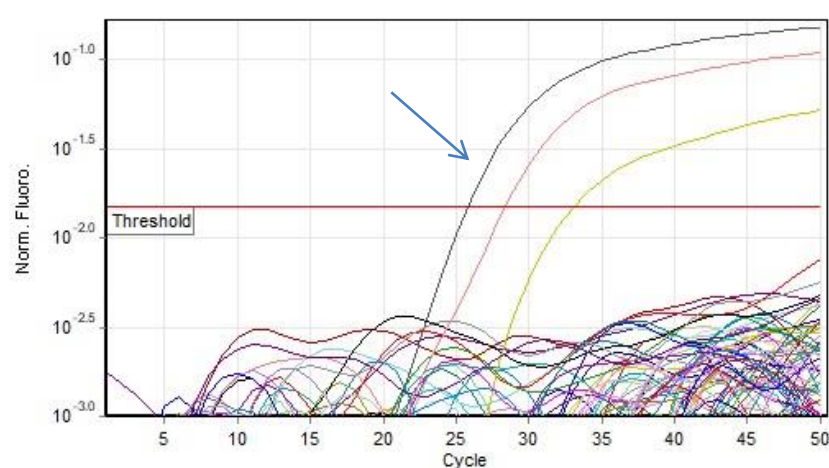
Ae. cinereus – 16.39;

Ae. vexans – 9.76;

Ae. albopictus – 6.17;

C. pipiens – 4.42;

На фиг. 14 е представен положителна PCR проба за наличие на микрофиларии в изследваните комари.

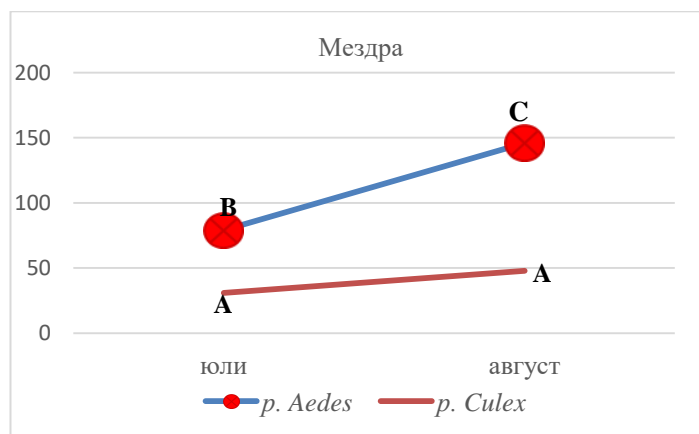


Фиг. 14. Real time PCR.

Положителна контрола (синя стрелка) и две положителни проби.

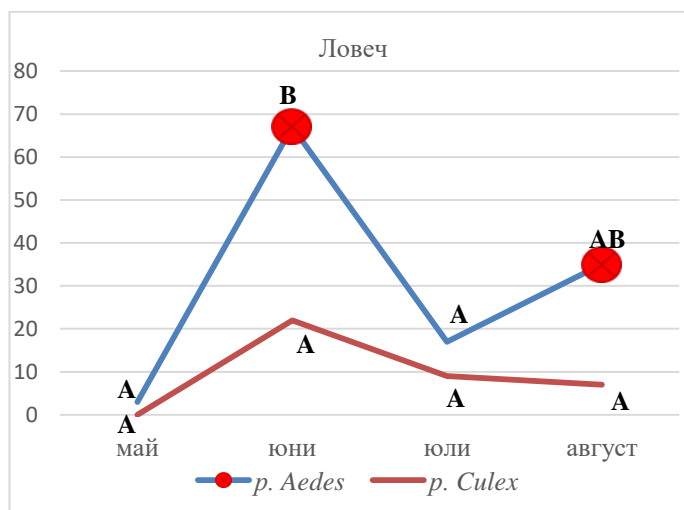
5.4. Съпоставка между сезонната лятна динамика на комарите от различни градове на страната и носителството им с микрофиларии от вида *D. immitis*.

На следващите фиг. 15-23 е представена сезонната лятна динамика на броя уловени комари от род *Aedes* и род *Culex*. С червени точки върху видовата права са отбелязани месеца на положителните проби.

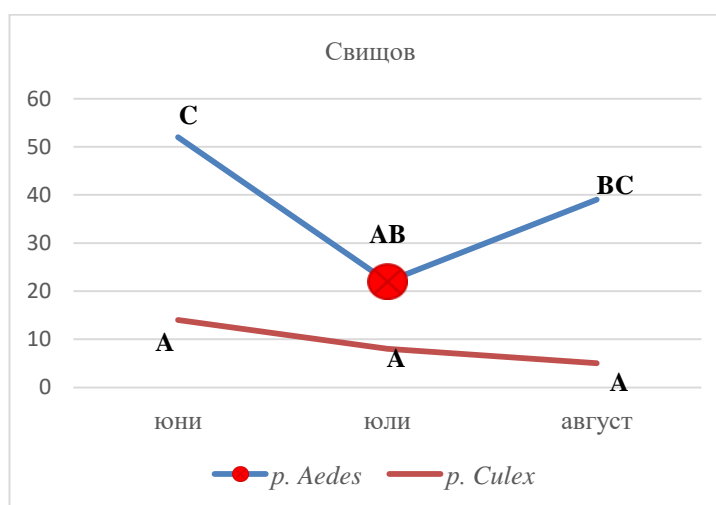


Фиг. 15. Месечна лятна сезонна динамика и численост на установените родове комари, представена като среден дневен улов за съответния месец, в град Мездра. С червени точки е отбелязан броя на положителните проби и периода на установяването им.

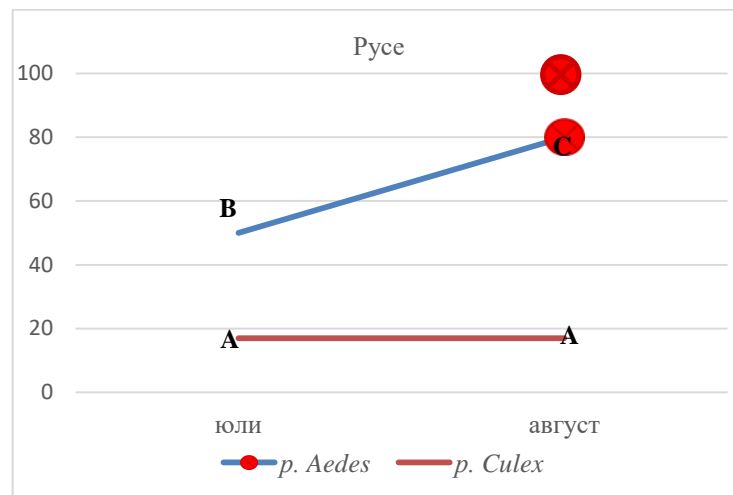
Данните са представени като средно \pm стандартна грешка ($n=3-9$). Различните букви показват статистически достоверните разлики при $P<0.05$.



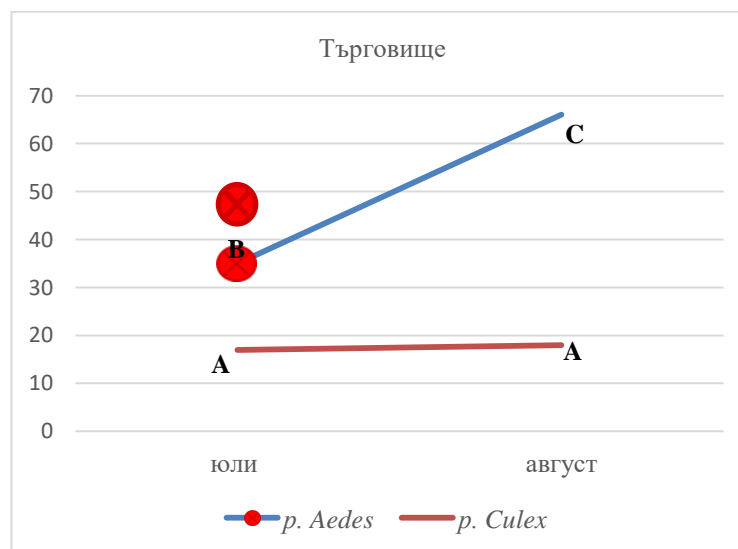
Фиг. 16. Месечна лятна сезонна динамика и численост на установените родове комари, представена като среден дневен улов за съответния месец, в град Ловеч. С червени точки е отбелязан броя на положителните проби и периода на установяването им. Данните са представени като средно +/- стандартна грешка (n=3-9). Различните букви показват статистически достоверните разлики при $P < 0.05$.



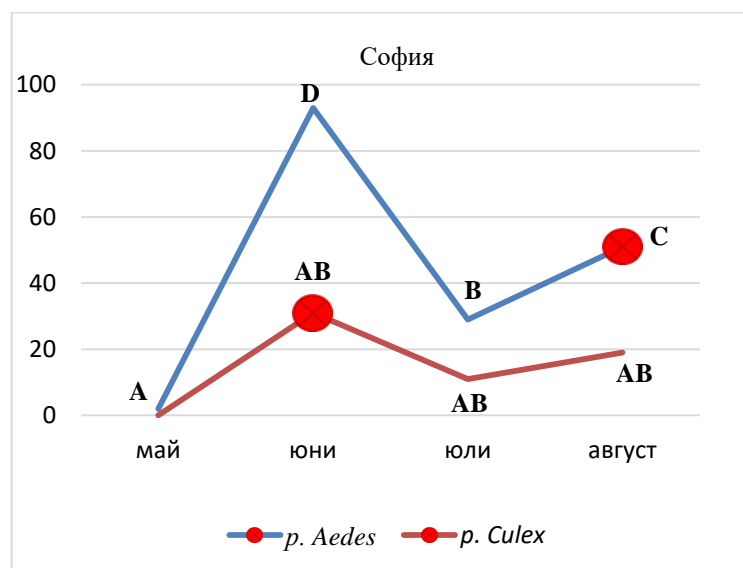
Фиг. 17. Месечна лятна сезонна динамика и численост на установените родове комари, представена като среден дневен улов за съответния месец, в град Свищов. С червени точки е отбелязан броя на положителните проби и периода на установяването им. Данните са представени като средно +/- стандартна грешка (n=3-9). Различните букви показват статистически достоверните разлики при $P < 0.05$.



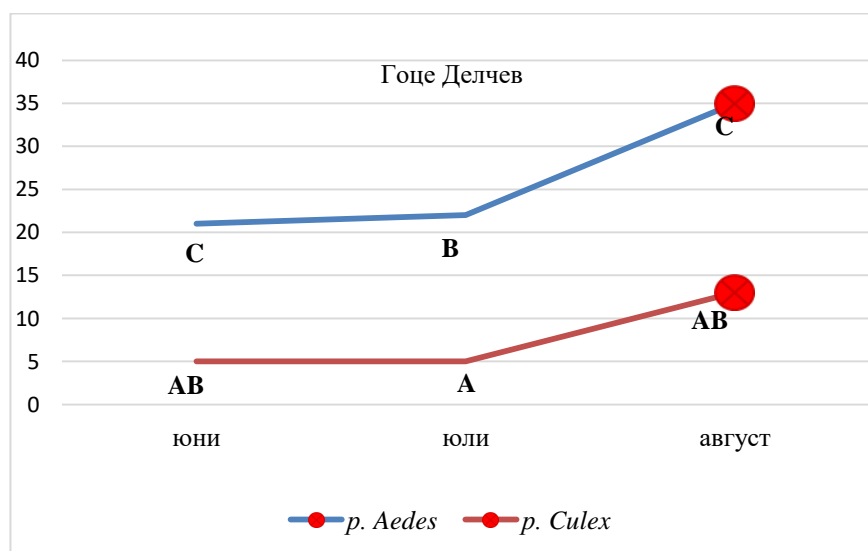
Фиг. 18. Месечна лятна сезонна динамика и численост на установените родове комари, представена като среден дневен улов за съответния месец, в град Русе. С червени точки е отбелязан броя на положителните проби и периода на установяването им. Данните са представени като средно +/- стандартна грешка (n=3-9). Различните букви показват статистически достоверните разлики при P<0.05.



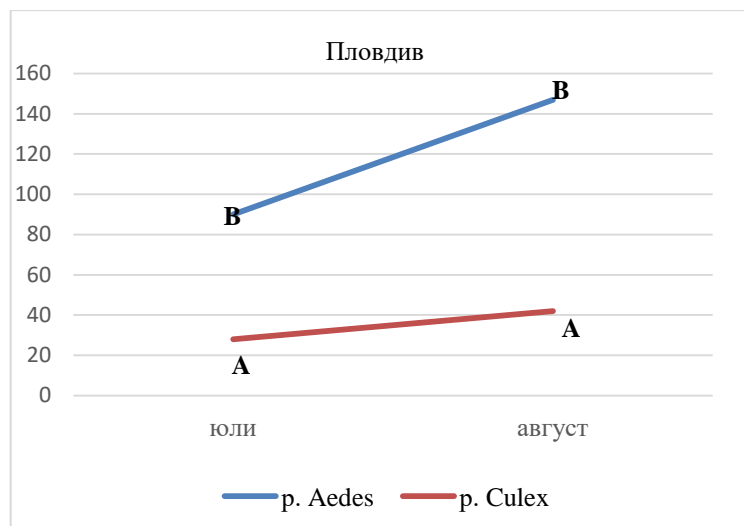
Фиг. 19. Месечна лятна сезонна динамика и численост на установените родове комари, представена като среден дневен улов за съответния месец, в град Търговище. С червени точки е отбелязан броя на положителните проби и периода на установяването им. Данните са представени като средно +/- стандартна грешка (n=3-9). Различните букви показват статистически достоверните разлики при P<0.05.



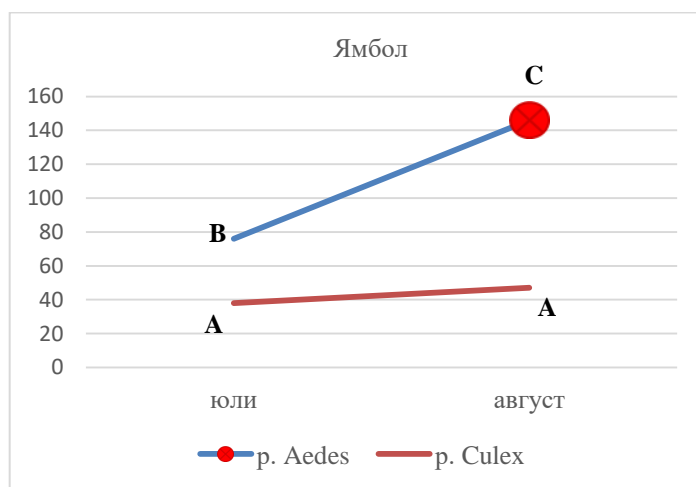
Фиг. 20. Месечна лятна сезонна динамика и численост на установените родове комари, представена като среден дневен улов за съответния месец, в град София. С червени точки е отбелязан броя на положителните проби и периода на установяването им. Данните са представени като средно +/- стандартна грешка (n=3-9). Различните букви показват статистически достоверните разлики при $P < 0.05$.



Фиг. 21. Месечна лятна сезонна динамика и численост на установените родове комари, представена като среден дневен улов за съответния месец, в град Гоце Делчев. С червени точки е отбелязан броя на положителните проби и периода на установяването им. Данните са представени като средно +/- стандартна грешка (n=3-9). Различните букви показват статистически достоверните разлики при $P < 0.05$.



Фиг. 22. Месечна лятна сезонна динамика и численост на установените родове комари, представена като среден дневен улов за съответния месец, в град Пловдив. Данните са представени като средно +/- стандартна грешка (n=3-9). Различните букви показват статистически достоверните разлики при $P < 0.05$.



Фиг. 23. Месечна лятна сезонна динамика и численост на установените родове комари, представена като среден дневен улов за съответния месец, в град Ямбол. С червени точки е отбелязан броя на положителните проби и периода на установяването им. Данните са представени като средно +/- стандартна грешка (n=3-9). Различните букви показват статистически достоверните разлики при $P < 0.05$.

Сезонната динамика на уловените комари в страната показваше, че първите видове у нас бяха от род *Aedes*. Те бяха установени през месец май. Данни за откриването на *C. pipiens* (единствен представител от род *Culex*) имаше от месец юни. В градовете, където имаше улов в месеците между май и август (Ловеч и София) и юни и август (Свищов) пикът на комарите

от двата рода беше през месец юни. Изключение прави гр. Гоце Делчев, където пикът на уловените комари беше през месец август, въпреки, че бяха обхванати месеците юни, юли и август. В останалите градове където уловът беше извършен в периода юли и август най-много установени видове бяха срещани през месец август.

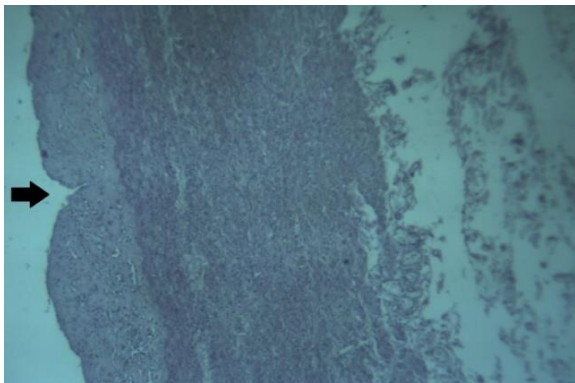
Обобщените резултати и данни от таблиците показваха положителна корелация между пика на броя уловени комари и положителни сборни проби, установени чрез PCR real time. При 71.43% от случаите, когато имаше положителни проби, те съвпадат с първия или втория сезонен месечен пик на уловени комари по род. При комарите от род *Aedes* стойностите бяха 66.67%, а при комарите от род *Culex* стойностите бяха 100%.

6. Патологоанатомична и хистологична оценка на измененията във вътрешни органи при кучета с доказана сърдечна диروفилария

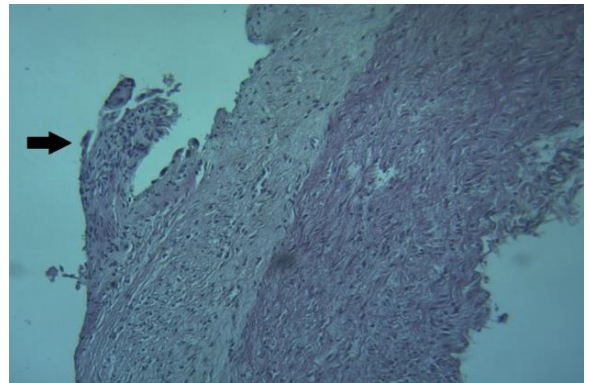
При извършените шест аутопсии основния брой имагинални форми бяха установени в *arteria pullmonalis* и дясната камера и предсърдие. В белодробната артерия - 37 мъжки и 32 женски диروفиларии. В дясната камера и предсърдие - 36 мъжки и 37 женски имагинални форми. Също така в *Sulcus vena cavae* - по един представител от двата пола. Сумарно - 74 мъжки и 70 женски или общо 144 имагинални форми.

При извършване на аутопсиите на диагностицираните животни със сърдечна диروفилария, патологоанатомично беше установена отчетлива кардиомегалия. Беше констатирано основно дясностранно уголемяване на сърцата, като белодробните артерии бяха ясно видими и разширени. При сецирането на сърцата се констатираше наличие на възрастни форми на *D. immitis*, както са описани.

Основните патологоанатомични изменения бяха констатирани в белодробните артерии. Макроскопски, стволите на съдовете бяха с уплътнена и гранулирана структура. Микроскопски, при всички изследвани животни беше установено удебеляване на артериалната стена, съпроводени с дегенеративни изменения по ендотела (фиг. 24). Установиха се признаци на хроничен продуктивен ендартерит изразяващ се в фиброзна-мускуларна пролиферация на интимата. Сходни лезии бяха наблюдавани и при нейните разклонения. При четири от шест животни по белодробна артерия бяха открити вилозни или папилоподобни разраствания по интимата (фиг. 25). Във вилозните протрузии беше констатирана фиброзна пролиферация с радиерно разположени фибробласти, фиброцити и колагенови отлагания. На отделни места разрастванията се разпростираха и засягаха медията на съда.

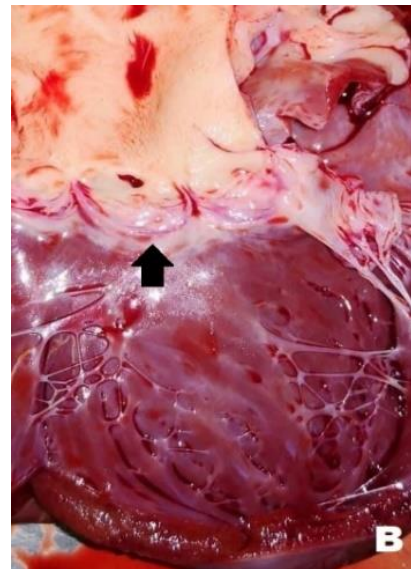
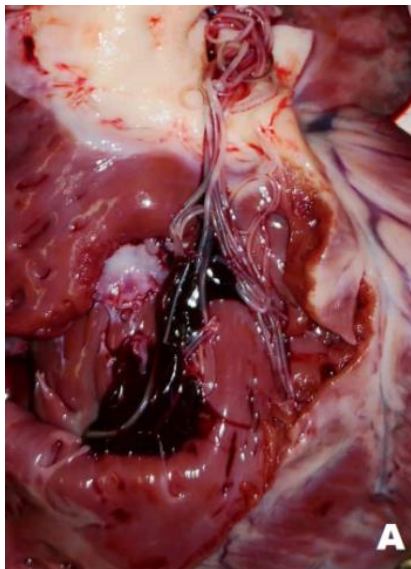


Фиг. 24. Ствол на белодробна артерия на куче със сърдечна диروفиларияза. Удебелена пулмонална артерия с дегенеративни изменения по ендотела (Увеличение x40; Оцветяване Н&Е).



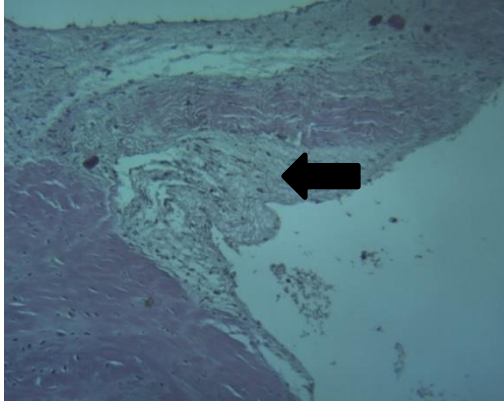
Фиг. 25. Лява белодробна артерия на куче със сърдечна диروفиларияза. Удебеляване на съда с вилозни разраствания на интимата (Увеличение x100; Оцветяване Н&Е)

При четири от кучетата бяха констатирани отчетливи изменения на пулмоналната клапа. При макроскопското им изследване беше установено уплътняване и гранулирана структура на кусписите (фиг. 26А и 26В).

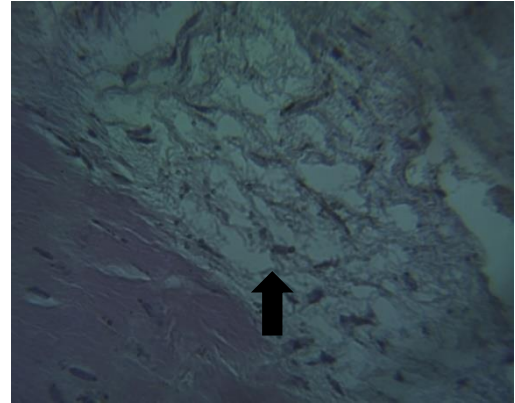


Фигура 26. Патологоанатомично изследване на сърце на куче с Дирофиларияза. А. Високостепенна инвазия с възрастни форми на *D. immitis*, локализирана в белодробната артерия и дясната сърдечна камера; В. Удебелени кусписи на пулмоналната клапа (стрелка).

Микроскопски се установи удебеляване на клапата (фиг.27), на базата на съединителнотъканни разраствания. При две от животните във фиброзните пролиферации се констатира миксомна метаплазия (фиг. 28).



Фиг.27. Пулмонлана клапа на куче с диагностицирана сърдечна диروفилариоза. Удебеляване на клапанната структура (увеличение x100; оцветяване Н&Е).

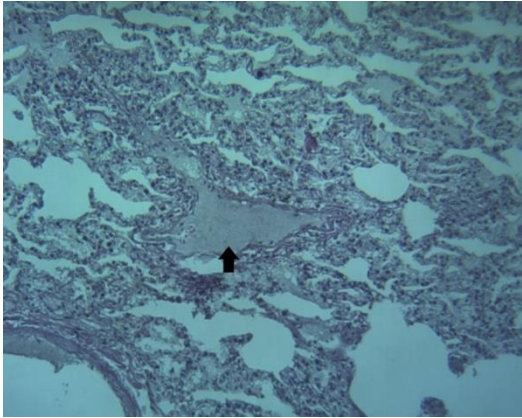


Фиг. 28. Фрагмент от Фиг. 103. Наличие на миксомна метаплазия (увеличение x400; оцветяване Н&Е).

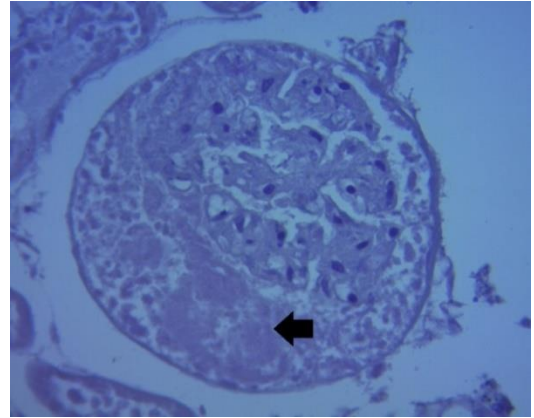
При патоморфологичното изследване на белите дробове, не бяха установени макроскопски видими изменения, с изключение на петехиални кръвоизливи. Паренхимът беше с еластична консистенция и влажна разрезна повърхност.

При хистологичното проучване, при пет от животните бяха констатирани дифузни интерстициални реакции с инфилтрация на мононуклеарни клетки, фиброзна пролиферация и акумулиране на течност в някои от алвеоларните пространства. Удебеляването на алвеоларните стени беше също и на базата на пролиферацията на тип II пневмоцити. (фиг. 29).

При патологоанатомичното изследване на бъбреците, не се установяват макроскопски видим лезии. Микроскопски при половината от животните в част от нефроните се констатират дегенеративни изменения, съчетани с еозинофилни, протеинови отлагания в гломерулните сплетения (фиг. 30).



Фигура 29. Бял дроб на куче с диروفилариоза. Интерстициална реакция с инфилтрация на мононуклеарни клетки и акумулация на течност в алвеоларно пространство (стрелка) (увеличение x100; оцветяване Н&Е).



Фигура 30. Бъбрек на куче с диагностицирана на диروفилариоза. Акумулация на белтъчни структури в гломерулните пространства (стрелка) (увеличение x100; оцветяване Н&Е).

ИЗВОДИ

1. Направеното комплексно проучване върху разпространението на сърдечната дирофилариоза показва, че заболяването се среща във всички райони на страната, като доминира в южните по-топли части на България.
2. Териториалното повсеместно разпространение на сърдечната дирофилариоза вероятно се дължи на климатични промени и глобално затопляне, като основният абиотичен фактор за разпространението на установените комари е температурата.
3. Скрининговото проучване за антигени от *D. immitis* показва превалентност от 11.12% при кучетата в нашата страна.
4. Най-широко разпространение на положителни за паразита кучета се установява в определения като Централен южен район.
5. Основен резервоар на паразита са безстопанствените кучета, като при тях екстензитетът на инвазия е 24.75%, вероятно поради липсата на прилагане на ефективни средства за профилактика на заболяването.
6. Не е установена зависимост между пола на кучетата и превалентността на инвазията.
7. По-висок е процентът на инвазирани кучета от породите Кавказка овчарка (36.84%), Акита ину (33.33%), Бийгъл (23.53%), Дратхаарт (23.08%), Курцхар (20.00%) и Българско овчарско куче (20.00%).
8. По-голям е броя на установените инвазии при „Овчарски и пастирски кучета“ и „Ловни кучета“.
9. С най-висок риск от заболяване са животните между 2- и 7-годишна възраст, предимно от едрите породи.
10. Чрез конвенционален PCR се постига прецизно отдиференциране на ларвите на *D. immitis* от тези на *D. repens*.
11. Чувствителността и специфичността на бързия антигенен тест IDEXX SNAP 4Dx Plus спрямо конвенционален PCR към *D. immitis* е съответно 90.0 и 94.5%, а спрямо коинвазия между *D. immitis* и *D. repens* е 75.0 и 91.5%. Чувствителността и специфичността на метода на Knott спрямо конвенционален PCR към *D. immitis* е съответно 80.0 и 100.0%, а спрямо коинвазия между *D. immitis* и *D. repens* е 50.0 и 100.0%.
12. В нашата страната са идентифицирани следните видове комари: *C. pipiens*, *Ae. albopictus*, *Ae. cinereus*, *Ae. vexans*, *Ae. caspius*, *An. maculipennis complex* и *Culiseta sp.* С най-висока честота се установява видът *C. pipiens*.

13. Най-висока численост на уловите от комари се постига при дни с висока температура и малко валежи.

14. Установява се правопрпорционална корелация между броя на заловените комари и положително тестваните от тях сборни Real time PCR проби през летните месеци от годината.

ПРИНОСИ

I. С оригинален характер:

1. Направено е комплексно проучване на разпространението на сърдечната дирофилариоза по райони в България като са установени видовете комари-вектори и зависимостта между разпространението им и температурните и сезонните особености.

2. Установено е присъствието на микрофиларии от вида *D. immitis* в комари от нашата страна чрез Real time PCR.

3. Установено е наличието на микрофиларии от паразита *D. immitis* в следните видове комари: *Ae. albopictus*, *C. pipiens*, *Ae. cinereus*, *Ae. vexans* и *An. maculipennis complex*.

4. Установен е периодът на ефективно заразяване на комарите през летните месеци в девет града на страната.

II. С потвърдителен характер:

1. Проведеното скринингово изследване за антиген от паразита при кучета потвърждава наличието на вида *D. immitis* в определените шест района на страната.

2. Потвърдено е, че комари от родовете *Culex*, *Anopheles* и *Aedes* са междинни гостоприемници и преносители на *D. immitis*.

ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА

1. За постигане на обективен резултат в диагностиката на заболяването сърдечна дирофилариоза може да се постигне при комбинирано прилагане на конвенционален PCR, IDEXx SNAP 4Dx тест и метода на Knott.
2. Необходимо е образната диагностика и патологоанатомичното изследване да бъдат насочени предимно към пулмоналните артерии и дясната част на сърцето, където се установяват най-голям брой екземпляри от паразита.
3. Характерните макроскопски изменения при сърдечната дирофилариоза са дилатация и удебеляване на съдовата стена на белодробните артерии.
4. Основни патохистологични промени са лезиите на белодробните артерии изразяващи се в пролиферативни реакции в съдовата стена.
5. Често срещани изменения в белите дробове са дифузни пролиферативни, моноклеарни акумулации в интерстициума на органа.
6. Типични изменения в бъбреците са дегенеративни изменения съчетани с протеинови отлагания в гломерулите.
7. В микрорайони на нашата страната с доказана сърдечна дирофилариоза при кучета е наложително предприемането на профилактични мерки преди края на месец май за ефективното ограничаване на инвазии при кучета.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Rafailov, R. 2020. Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Bulgaria. Tradition and Modernity in Veterinary Medicine, 5, 57-64.
2. Rafailov, R., G. Popov, K. Kanchev & V. Manov. 2022. Pathomorphological findings in dogs with spontaneous heartworm disease. Tradition and Modernity in Veterinary Medicine, 7, 53-59.

НАГРАДИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Първо място в постерна сесия на секция „Инфекциозна патология“ Tradition and Modernity in Veterinary Medicine, Yndola 2021 г. с тема “Pathomorphological findings in dogs with spontaneous heartworm disease” с колектив Radoslav Rafailov, Georgi Popov, Kostadin Kanchev, Vasil Manov.

2. Първо място в постерна сесия на секция „Инфекциозна патология“ Tradition and Modernity in Veterinary Medicine, Yndola 2022 г. с тема “Първо проучване върху идентификацията на *Dirofilaria immitis* в комари от България чрез real time pcr“ с колектив Radoslav Rafailov, Simona Chakarova, Kostadin Kanchev.

**УСТАНОВЕНИ ЦИТИРАНИЯ НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С
ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

1. Rafailov, R. 2020. Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Bulgaria. Tradition and Modernity in Veterinary Medicine, 5, 57-64.

Цитирана от:

1.1. Marincheva, V., 2021. Control of vector-borne diseases in a dog shelter. Experience from Bulgaria. Tradition and modernity in veterinary medicine, 6, 56–63.

1.2. Morchón, R.; Montoya-Alonso, J.A.; Rodríguez-Escolar, I.; Carretón, E. 2022. What Has Happened to Heartworm Disease in Europe in the Last 10 Years? Pathogens, 11, 1042.

2. Rafailov, R., G. Popov, K. Kanchev & V. Manov. 2022. Pathomorphological findings in dogs with spontaneous heartworm disease. Tradition and Modernity in Veterinary Medicine, 7, 53-59.

Цитирана от:

1.3. Gouvêa de Almeida¹, G., M. Barbosa de Almeida, A. Carolina, M. dos Santos, S. Ballot, Â. Vargas, V. Diniz de Campos & T. Rodrigues de Oliveira. 2023. Serological evidence of canine vector-borne diseases caused by *Anaplasma spp.*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* and *Dirofilaria immitis* in dogs from Governador island, Rio de Janeiro, Brazil. Tradition and modernity in veterinary medicine, 8, 52–58.

БЛАГОДАРНОСТИ

Искрени благодарности към научния ми консултант доц. Костадин Кънчев за възможността за съвместна работа през изминалите години, за съветите и препоръките по време на докторантурата.

Благодарности към цялата катедра, „ИПХТКХЖП“ с ръководител доц. Станислав Радански за безрезервната подкрепа, спазване на процедурата и оказваната помощ през изминалите години.

На доц. Красимира Генова, декан на ФВМ към ЛТУ за подкрепата и съдействието по време на докторантурата.

Искрени благодарности към човека, приятеля, гл. ас. Георги Попов, който беше неотлъчно до мен и ми помагаше при всяко едно изпитание през тези години (*Amicus certus in re incerta cernitur*).

Специални благодарности към доц. Надя Златева-Панайотова и д-р Панайот Панайотов за помощта, съветите, куража и моралните напътствия, които получавах от тях във всеки един труден етап от докторантурата.

Сърдечни благодарности към проф. Васил Манов за подкрепата и насоката към завършването на дисертационния труд.

Искрени благодарности към проф. Теодора Попова за отзивчивостта и препоръките, които получавах от нея.

Благодарности към гл. ас. Георги Маринов за съветите и помощта по оформлението на научния труд.

Искрени благодарности към доц. Николай Лалковски ръководител секция "Патология, паразитология и паразитни болести по животните, болести по водни животни и пчели" и проф. Валентин Радев член на секция "Патология, паразитология и паразитни болести по животните, болести по водни животни и пчели" към Национален диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт "Проф. д-р Г. Павлов" – София, за помощта, съветите и корекциите по дисертационния труд.

Благодарности към целия екип на Ветеринарна клиника „Свети Георги“ гр. София за помощта и възможността за извършване на голяма част от изследванията си.

Специални благодарности към д-р Симона Чакърва - ръководител национална референтна лаборатория Син език и национална референтна лаборатория Африканска чума по конете към изпитателна лаборатория - Екзотични и особено опасни инфекции към

Национален диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт "проф. д-р Г. Павлов" – София, за възможността за извършване на PCR изследванията.

Сърдечни благодарности на гл. ас. Огнян Миков към отдел „Паразитология и тропическа медицина“, Национален център по заразни и паразитни болести, за безвъзмездно предоставените от него капани за комари и за помощта при видовото определяне на комарите.

Благодарности към старши експерт Ивелина Катеринова в секция “Патология, паразитология и паразитни болести по животните, болести по водни животни и пчели” към Национален диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт "Проф. д-р Г. Павлов" – София, за предоставените капани за комари и моралната подкрепа към мен.

Специални благодарности към Иван Панайотов за направата и изработването на снимковия материал в дисертационния труд.

Искрени благодарности към Любомир Венков за съдействието и помощта при залагането на капаните и събирането на комарите по време на докторантурата.

Сърдечни благодарности към инж. Георги Вълев за помощта при изработването на фигурите и таблиците в научния труд.

Благодарности към младши инспектор Генади Стефанов, за подкрепата и за това, че нито за миг не се осъмни в успеха на начинанието.

Не на последно място искам да благодаря на семейството си, на баба ми и дядо ми. Те са хората, които ежедневно изразяваха безрезервната си подкрепа. Хората, които нито за миг не си помислиха, че това начинание няма да бъде завършено успешно.

Благодарности на жената до мен за напътствията, съветите, куража и вярата в мен.

Благодарности на всички допринесли пряко или косвено за завършването на дисертационния труд.

ABSTRACT

Heartworm disease continues to be one of the most significant helminthic diseases in canids in the country. The specific localization and the complex biological cycle of the nematodes make them an interesting subject for study.

The results on disease screening by region showed somewhat expected values. The central southern region remains the most risky for the final hosts. Dog prophylaxis should be intensified there and owners should be as informed and familiar with the disease as possible. Stray dogs are a major reservoir of the disease. They should be targeted for future preventive measures, however difficult this task may be. Sheepdogs and hunting dogs continue to be at greatest risk of heartworm infestation for a number of reasons related to their purpose and husbandry.

Several diagnostic methods are necessary to accurately diagnose the disease. The use of conventional PCR to detect microfilariae greatly reduces the chance of error in co-invasions with *D. repens*. IDEXX SNAP 4Dx Plus tests give satisfactory results regarding *D. immitis* in monoinvasion, whereas in co-invasion with *D. repens* the sensitivity drops significantly. When using the Knott's test in co-invasion, the specificity is maintained and the sensitivity decreases.

This study also showed that the species occurrence of mosquitoes in Bulgaria is diverse. We identified five mosquito species, one genus and one complex. Of these, four genera and complexes can transmit the disease to hosts. Based on the calculations made regarding the period of effective infestation of mosquitoes, a prophylactic scheme for dogs can be made for each city in relation to the specific disease. The observed seasonal (summer months) orthogonal correlation between the number of captured mosquitoes and their vectors determines a significant risk of invasion of the final hosts.

Pathomorphological findings reinforce the view that the main changes are found in the heart, lungs and kidneys. These are the organs at highest risk of the disease.

Key words: *Dirofilaria immitis*, dogs, mosquitoes, PCR, Real time PCR.