

РЕЦЕНЗИЈА

ЗА ОЦЕНА НА ДОКТОРСКАТА ДИСЕРТАЦИЈА „ЕПИДЕМИОЛОГИЈА НА КУЧЕШКАТА ЛАЈШМАНИОЗА ВО КОСОВО И УЛОГАТА НА *PHLEBOTOMUS* SPP. ВО НЕЈЗИНОТО ШИРЕЊЕ“ ОД БЕТИМ ЦЕКАЈ, ПРИЈАВЕНА НА ФАКУЛТЕТОТ ЗА ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА ВО СКОПЈЕ

Наставно-научниот совет на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје, на петтата седница одржана на 4.6.2024 година, формираше Комисија за одбрана на докторскиот труд на кандидатот Бетим Цекај со наслов: „Епидемиологија на кучешката лајшманиоза во Косово и улогата на *Phlebotomus* spp. во нејзиното ширење“, во состав: проф. д-р Александар Цветковиќ (претседател), проф. д-р Јована Стефановска (ментор), проф. д-р Елена Атанаскова Петров (член), проф. д-р Куртеш Шерифи (член) и проф. д-р Белул Белули (член).

Комисијата во наведениот состав, со внимание го прегледа и го оцени докторскиот труд и на Наставно-научниот совет на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје му го поднесува следниов

ИЗВЕШТАЈ

АНАЛИЗА НА ТРУДОТ

Докторскиот труд на кандидатот Бетим Цекај, со наслов „Епидемиологија на кучешката лајшманиоза во Косово и улогата на *Phlebotomus* spp. во нејзиното ширење“, содржи 140 страници компјутерски обработен текст во фонт Times New Roman, со 1,5 проред и големина на букви 12, како и 118 библиографски единици во кои доминираат примарни научни публикации. Трудот е збогатен и со 31 слика, 16 табели и 3 анекси.

Докторскиот труд е структуриран во 7 поглавја, систематизирани во точки и потточки со наслови и поднаслови, со што се обезбедува соодветно следење на материјата која е обработена во истражувањето. Напишан е со висок академски стил на изразување и е форматиран согласно со начелата на изворен научен труд, со следниве делови: вовед, преглед на литература, предмет и цели на истражувањето, материјали и методи, резултати, дискусија, заклучоци, користена литература и додаток.

Во **воведот**, кандидатот дава сеопфатен преглед на лајшманиозата како значајна зооноза со глобално влијание. Кандидатот ефикасно ги истакнува сложеноста на преносот на причинителот, различните клинички манифестации и кај луѓето и кај кучињата и дијагностичките предизвици поврзани со супклиничките инфекции. Воведот е темелен и добро структуриран, поставувајќи силна основа за целите на истражувањето. Во него е јасно идентификувано непостоењето на детални податоци за присуството и раширеноста на лајшманиозата во Косово и улогата на песочните мушички во преносот на причинителот, кои би биле основа за дизајнирање на национална стратегија и акциски планови за борба со болеста. Напишаниот текст соодветствува со предметот и целите на истражувањето. Во овој дел, кандидатот ги изнесува и работните тези и хипотези кои биле поставени во предлог-проектот на докторскиот труд, и хронолошки, со по една реченица, ги презентира сите поглавја од докторскиот труд.

Прегледот на литература кандидатот го започнува со краток историјат на лајшманиозата. Напишаниот текст е концизен и нуди информативен преглед на историските моменти во откривањето и карактеризацијата на паразитите од родот *Leishmania* и болеста што ја предизвикуваат. Кандидатот ги истакнува придонесите на неколку клучни истражувачи кои независно ги идентификувале паразитите и го објасниле нивниот начин на пренесување и развојниот циклус. Текстот е добро структуриран и хронолошки ги прикажува главните откритија и достигнувања во областа.

Во втората потточка за етиологија на болеста, кандидатот навлегува во сложената таксономија на родот *Leishmania*, нагласувајќи ја тековната дебата околу класификацијата на видовите. Опишани се двата подрода на родот *Leishmania* и нивните различни развојни начини во песочните мушички кои се вектори на паразитот. Современата систематика на родот *Leishmania* кандидатот визуелно ја претставува со шематски приказ што значително го појаснува системот за класификација на паразитот. Фокусот на четирите главни комплекси на родот

Leishmania, релевантни за здравјето на луѓето и животните (*L. donovani*, *L. tropica*, *L. mexicana* и *L. braziliensis*) е особено информативен. Посебно е нагласено користењето на зборот „лајшманиоза“ кај животните, а со цел да се избегне премногу честото, и погрешно, користење на зборот „лајшманијаза“ кој што ја идентификува болеста кај луѓето. Во понатамошниот текст, кандидатот детално го опишува развојниот циклус на паразитот од амастиготи во макрофагите до промастиготи кај песочните мушички, а дополнителниот сликовит приказ го олеснува разбирањето на морфолошките разлики помеѓу овие фази.

Во потточката за епидемиологија на болеста, кандидатот ја истакнува клиничката и епидемиолошката разновидност на лајшманиозата, нагласувајќи ја нејзината широко распространета преваленца во 98 земји. Прикажаната географска дистрибуција е детална, со фокус на тропските и суптропските региони, како и на загрижувачкиот тренд на сè посеверното ширење на болеста во Европа. Кандидатот ефикасно ги пренесува јавноздравствените и економските импликации на лајшманиозата, особено во областите со низок степен на развој, и ја акцентира улогата на кучињата како примарен резервоар за зоонозните форми на болеста. Во текстот, детално е анализирана епидемиолошката состојба во Европа и се прикажани конкретни податоци за проценетата годишна инциденца на висцерална лајшманиоза и регионалната дистрибуција на автохтоните инфекции со *Leishmania infantum*.

Опишаниот начин на пренесување на паразитот ефикасно ги прикажува векторските, зоонозните и антропоноичните патишта на трансмисија. Текстот за развојниот циклус на паразитот, кој вклучува фази на промастигот и амастигот, е јасен и информативен. Кандидатот на многу едноставен начин ја објаснува улогата на домаќинот на паразитот, нагласувајќи го значењето на кучињата како примарен резервоар на *L. infantum*. Во текстот се спомнати и други животни, потенцијални резервоари и случајни домаќини на паразитот, а кандидатот акцентира дека нивната епидемиолошка важност е сеуште нејасна и имаат ограничена улога во одржувањето на развојниот циклус на паразитот. Освен векторскиот начин на пренесување, кандидатот ги опишува и алтернативните патишта на пренос, како што се трансфузијата на крв и трансплантација на органи. Кандидатот посебно ја нагласува важноста на сексуалната и трансплацентарната трансмисија на болеста, кои се особено значајни при отсуство на векторите. Во понатамошниот текст, кандидатот дава сеопфатен и детален преглед на развојот на паразитот во векторот – песочната мушичка. Текстот е добро структуриран и логично организиран, следејќи го развојот на паразитот од ингестија до трансмисија.

Во потточката за ентомологија и надзор на песочните мушички кандидатот дава сеопфатен преглед на биолошките особини на песочните мушички, опфаќајќи го нивното значење, животниот циклус, техниките на надзор и еколошките карактеристики. Текстот почнува со вовед за медицинското и ветеринарното значење на овие инсекти како вектори на различни патогени. Кандидатот јасно го објаснува нивниот развоен циклус, однесувањето при парење и навиките за хранење и потенцира дека надзорот на песочните мушички е клучен аспект за разбирање на нивната дистрибуција и контрола на болестите што ги пренесуваат. Во текстот се опишани различни методи на заловување, како што се светлосни стапици, лепливи стапици и аспиратори, а наведени се и нивните предности и недостатоци. Кандидатот препорачува при сеопфатни теренски студии да се комбинираат различни стапици за заловување. Текстот завршува со нагласување на важноста на идентификацијата на потенцијалните вектори и разбирање на екологијата на популациите на песочните мушички.

Потточката за патогенеза на болеста дава сеопфатен преглед на патогенезата на кучешката лајшманиоза. Кандидатот детално ги опишува имунолошките реакции, клиничките манифестации, макроскопските и микроскопските лезии и улогата на различните органи, со што прикажува холистички пристап кон разбирањето на процесот на болеста.

Во потточката за дијагностички методи кандидатот ги прикажува начините на дијагностика на болеста, истакнувајќи ги клучните достигнувања и предизвици. Кандидатот во текстот ги артикулира современите текови на дијагностиката, акцентирајќи го трендот на замената на златниот стандард со молекуларните техники. Молекуларната дијагностика има многу предности, меѓу кои доминираат неинвазивното земање на примероци и способноста за директна идентификација на сите видови од родот *Leishmania*. Во понатамошниот текст, кандидатот дава детален преглед на клиничките манифестации кај кучињата болни од лајшманиоза. Разновидноста на клиничките знаци е детално опишана, опфаќајќи ги сите форми

на болеста, а даден е и одличен акцент на нивното значење за поставување на сомнеж за болеста. Приказот е информативен и клинички релевантен, со што кандидатот обезбедува јасна слика за промените кај заболениите кучиња. Освен најчестите знаци, кандидатот ги опишува и поретките манифестации на болеста, потенцирајќи ги и долготрајните последици од инфекцијата. Кандидатот не заборавил и да ја нагласи хроничната природа на лајшманиозата и можноста за релапси и покрај третманот. Во текстот се опишани и паразитолошките методи за дијагностика (имунофлуоресценцијата како златен стандард, аспирационата цитологија со фина игла, хистолошката анализа, културата на паразитите и ксенодијагнозата) на кучешката лајшманиоза заедно со нивните добри и лоши страни. Кандидатот успеал да ги избалансира нивните предности и недостатоци и успешно да ја пренесе комплексноста на изборот при секој клинички случај. Серолошките, квалитативни и квантитативни, методи се сеопфатно дискутирани, а кандидатот нагласува дека е важно да се знаат ограничувањата на секој тест. Во текстот се опишани предностите и недостатоците на тестовите, а посебно се елаборирани карактеристиките на IFA и ELISA како најчесто применувани серолошки методи за дијагностика на лајшманиозата. Молекуларните методи на дијагностика се темелно опишани, заедно со предностите и ограничувањата на различните типови примероци кои треба да се селектираат согласно имунолошкиот одговор на кучето и фазата на болеста. Кандидатот ја истакнува вредноста на PCR методот посебно кога цитолошките и хистолошките анализи се негативни, иако постои изразено клиничко сомневање за лајшманиоза. Објаснувањето на трите примарни PCR-методи (конвенционален, вгnezден, и во реално време) е јасно и концизно. Споредбата на нивната сензитивност, специфичност и потенцијал за контаминација е јасна и доволно информативна. Акцентирањето на способноста на PCR во реално време да го квантифицира присуството на паразитите во организмот го олеснува следењето на одговорот на третманот.

Потточката за третман на лајшманиозата кај кучињата е концизно напишана со нагласени предизвици за лекување на болеста, варијабилноста на клиничките презентации и критичната улога на имунолошкиот одговор. Кандидатот е детален во описот и табеларно ги сумира различните опции за третман, вклучувајќи ги најчесто користените лекови и протоколи. Посебен акцент е даден на ограничувањата на сегашните третмани, со напомена дека ниту еден третман не може целосно да ја елиминира инфекцијата. Нагласено е дека инфекцијата е многу упорна и често има рецидиви, дури и по третманот. Кандидатот ја нагласува и важноста на раното откривање и редовен скрининг на кучињата во ендемските области.

Во потточката за превентива на болеста се опишани тековните превентивни мерки против инфекцијата со *L. infantum* кај кучињата. Кандидатот ефикасно ги презентира двата главни пристапи: контрола на векторите и имунопрофилакса. Текстот за методите за контрола на векторите е темелен и поддржан со релевантни литературни податоци. Во однос на имунопрофилаксата, кандидатот е особено детален и дава јасно објаснување за четирите достапни вакцини, нивниот состав, протоколите за вакцинација и статусите на лиценцирање.

На крајот од прегледот на литературата, во потточката за „Едно здравје“, кандидатот го опишува глобалното присуство на лајшманиозата, воедно нагласувајќи ја нејзината класификација како занемарена тропска болест од страна на Светската здравствена организација. Распространетоста и влијанието на болеста врз јавното здравје се одлично елаборирани. Кандидатот го нагласува значењето на болеста со конкретни податоци за бројот на случаи и засегнатите земји, со што ја потенцира итноста за изнаоѓање на интегриран пристап кон управувањето со болеста.

Предметот и целите на истражувањето се добро дефинирани и релевантни за областа на паразитните болести и јавното здравје. Предложените цели се сеопфатни и се однесуваат на пополнување на клучните празнини во постојните податоци за епидемиологијата, векторите и етиолошките агенси на кучешката лајшманиоза во Косово.

Поглавјето **Материјали и методи** кандидатот го започнува со опис на географската локација на Косово, вклучувајќи ја неговата географска широчина, должина и позиција на Балканскиот Полуостров, што е основа за разбирање на контекстот на истражувањето. Кандидатот дава и визуелна претстава за поделеноста на Косово на седум области. Описот на континенталната клима со медитеранско и алпско влијание е многу значаен од причина што климата може да биде значаен фактор во дистрибуцијата и распространетоста на болестите. Во следната потточка, кандидатот дава јасен и сеопфатен преглед на методологијата за земање

примероци. Рандомизираниот пристап што бил користен за собирање примероци од кучиња од различни средини, обезбедил разновидна застапеност на популацијата на кучиња во Косово. Големината на примерокот од 285 серуми од сите области е доволна за статистички значајна анализа, а деталното собирање на податоците за кучињата укажува на висок степен на посветеност на кандидатот. Собирањето на песочните мушички било, исто така, одлично осмислено и реализирано. Бројот на локации и последователните заловувања обезбедуваат темелна претстава за потенцијалните живеалишта на песочните мушички во Косово. Локациите биле бирани по случаен избор, а вклучувале различни типови на фарми за одгледување на животни. За секоја локација и фарма, кандидатот водел детална евиденција што дополнително ја потврдува неговата сериозност и посветеност на истражувањето. Дијагностичките методи кои се користеле за откривање на антитела на *Leishmania infantum* во серумите од кучињата се детално опишани. Кандидатот употребил комерцијални китови за два различни методи, ELISA и IFAT, што е правилен пристап за подобрување на точноста и веродостојноста на резултатите. Во текстот се прикажани деталните постапки за дијагностика на болеста согласно со комерцијалните упатства на производителите на китовите. По собирањето на песочните мушички, кандидатот применил различни методи за морфолошка и молекуларна идентификација, како и скрининг на патогени. На почетокот, мушичките биле индивидуално идентификувани врз основа на морфолошките карактеристики, по што биле потврдени со баркодирање, што е стандард и воспоставена пракса во лабораториите. Со овој двоен пристап, кандидатот се осигурил дека направил точна идентификација. Детекцијата на ДНК на *Leishmania* во песочните мушички била направена со сензитивен PCR. Она што е за посебна пофалба на кандидатот е одлуката за дополнителна карактеризација на позитивните примероци што е од клучно значење за разбирање на епидемиологијата на лајшманиозата. Кандидатот поглавјето го завршува со приказ на применетите статистички методи за обработка на добиените податоци. Методите се соодветно избрани за направените споредби и ја гарантираат релевантноста на добиените резултати.

Во **резултатите**, кандидатот ги прикажува сите добиени и обработени податоци од истражувањето на многу јасен и темелно структуриран начин. Текстот почнува со приказ на резултатите од тестираните серуми, со посебна поделба на резултатите од различните тестови и нивна споредба. Во продолжение се прикажани резултатите од анализираните песочни мушички, вклучувајќи ја нивната дистрибуција, детекција на ДНК и молекуларна карактеризација на позитивните примероци.

Дискусијата кандидатот ја започнува со главната порака на неговото истражување а тоа е дека неговата студија дава увид во серопревалентата на лајшманиозата кај кучињата на целата територија на Косово и дека за прв пат била детектирана *Leishmania infantum* во песочните мушички од Косово. Раширеноста на болеста во шест од седум области укажува на воспоставен циклус на инфекцијата помеѓу кучињата. Истражувањето за песочните мушички е воедно и најекстензивното истражување за нивната видова дистрибуција и раширеност направено до сега. Кандидатот ги анализира, ги споредува и детално ги дискутира неговите наоди во контекст на претходните наоди во соседните држави, регионот и светот. Во текстот е нагласен зоонотскиот потенцијал на лајшманиозата и важноста на контролните мерки за нејзино успешно контролирање.

Во **заклучоците**, кандидатот наведува шест јасни и недвосмислени заклучоци, произлезени од детално планираното и реализирано истражување и добиените резултати. Посебно внимание заслужува заклучокот дека постои ендемски циклус на пренесување на лајшманиозата во Косово, особено во областа на главниот град, Приштина. На крајот од овој дел, кандидатот предлага да се вклучат и други домашни и диви животни во надзорот на болеста и да се анализираат и автохтони хумани случаи.

Користената литература е претставена со 118 библиографски единици, од кои најголем дел се оригинални истражувачки трудови, публикувани во меѓународни научни списанија со импакт-фактор.

Во **додатокот** се прикажани три анекси: 1. Табеларен приказ на сите кучиња вклучени во истражувањето, 2. Табеларен приказ на анализираните песочни мушички и 3. Дополнителен приказ на подредувањето на секвенците на *Leishmania*.

Предмет на истражување

Предмет на истражување во докторскиот труд се епидемиолошките карактеристики на кучешката лајшманиоза во Косово, присуството на компетентните инсекти вектори од родот *Phlebotomus* и детекцијата на етиолошкиот агенс (*Leishmania* spp.) во компетентните вектори. За таа цел, епидемиологијата на кучешката лајшманиоза кандидатот ја проценил со серолошко тестирање на кучиња во сите седум области на Косово. Идентификацијата на инсектите вектори од родот *Phlebotomus* и детекцијата на етиолошкиот агенс во векторите биле направени од страна на кандидатот, со цел утврдување на нивната улога во ширењето на болеста во Косово и проценка на ризикот од ширење на лајшманиозата меѓу кучињата и човечката популација.

Главните цели на овој докторски труд, кои се и реализирани во текот на неговата изработка, биле:

- да се изврши серолошки преглед на кучиња за присуство на антитела против кучешка лајшманиоза во Косово;
- да се изврши епидемиолошка анализа на кучешката лајшманиоза во Косово;
- да се идентификуваат инсектите вектори од родот *Phlebotomus* присутни во Косово;
- да се детектира етиолошкиот агенс во инсектите вектори со молекуларни техники;
- да се утврди кои видови од родот *Leishmania* циркулираат во Косово;
- да се идентификува компетентниот вектор на кучешка лајшманиоза во Косово;
- да се процени улогата на *Phlebotomus* spp. во ширењето на кучешката лајшманиоза во Косово;
- да се изврши проценка на ризикот за јавното здравје.

Податоци за состојбата на подрачјето во кое е работен трудот

Лајшманиозата е зооноза или антропоноза предизвикана од протозоарни паразити од родот *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), кои се пренесуваат со песочни мушички – флеботомини од родот *Phlebotomus* (во Стариот Свет) и *Lutzomyia* (во Новиот Свет). *Leishmania infantum* е главен етиолошки агенс и на кучешката и на хуманата лајшманиоза и е, главно, распространета во медитеранскиот регион. Причинителот има дигенетски развоен циклус, кој се одвива помеѓу домаќините цицачи, како што се луѓето, кучињата итн., и женките на песочните мушички како вектори. Од околу 800 регистрирани видови песочни мушички, приближно 10 % се сомнителни или потврдени вектори за пренесување на *Leishmania* spp. Спротивно на тоа, само 31 од 53 идентификувани *Leishmania* spp. ги инфицираат цицачите, при што 20 од нив доведуваат до различни клинички презентации кај луѓето. Како потврдени или потенцијални резервоари на болеста, досега во светот се идентификувани 70 видови на диви и домашни животни. Освен преку убојот на песочните мушички, *Leishmania infantum* може да се пренесе и преку алтернативни патишта, како што се од мајка на дете, од женско куче на потомството и др.

Кучешката лајшманиоза предизвикана од *Leishmania infantum* е зооноза којашто може да биде опасна по живот и за луѓето и за кучињата. Кучињата служат како примарен резервоар на инфекција за луѓето. Кучешката лајшманиоза е ендемична болест во над 70 земји на глобално ниво, вклучително и региони во јужна Европа, Азија, Африка и Јужна и Централна Америка, а е присутна и во Соединетите Американски Држави. Дополнително, ширењето на болеста предизвикува загриженост во неендемичните земји каде што увезените болни или заразени кучиња претставуваат ветеринарен и јавноздравствен ризик. Хуманата лајшманиоза претежно се јавува во земјите во развој и се смета за една од најзанемарените болести во светот. Годишната инциденца на хумана лајшманиоза предизвикана од различни видови на *Leishmania* spp. се движи од 700.000 до 1.000.000 случаи. Во Медитеранскиот Регион, *Leishmania infantum* е главниот вид одговорен за предизвикување кожна и висцерална лајшманиоза кај луѓето. Овој вид заразува и над 2,5 милиони кучиња годишно. Меѓу занемарените тропски болести, висцералната лајшманиоза е една од најсмртоносните паразитни болести во поновата историја. На глобално ниво, тоа резултира со приближно 300.000 нови и околу 20.000 смртни случаи кај луѓето. Лајшманиозата е белег на болестите поврзани со сиромаштијата и тропските инфекции кај луѓето принудени да мигрираат во и од конфликтните зони.

За присуството на хуманата лајшманиоза во Косово нема податоци, а не постојат нови податоци ниту за раширеноста на кучешката лајшманиоза ниту за присуството на причинителот во песочните мушички. Состојбата со популацијата на кучиња е предизвик да се утврди поради големиот број на бездомни кучиња и отсуството на податоци во системот за регистрација на животни во Косово. Претходните истражувања за присуството и раширеноста на кучешката лајшманиоза во Косово првенствено биле фокусирани на неколку области или општини, а првите податоци биле објавени во 2008 година и биле фокусирани само на 3 области. Кандидатот, во негово претходно истражување објавено во 2020 година утврдува присуство на антитела против *Leishmania infantum* кај бездомни кучиња во една област во Косово. Од достапните литературни податоци може да се утврди дека не постојат податоци за дистрибуцијата на инфекцијата со *Leishmania infantum* кај кучињата во сите области на Косово. Понатаму, информациите за дистрибуцијата на песочните мушички во Косово се, исто така, ограничени на неколку студии кои известуваат само за присуството на векторите без докази за детекција на *Leishmania infantum* во нив. Непостоењето на податоците биле доволен мотив на кандидатот да даде придонес кон разбирањето на динамиката на кучешката лајшманиоза во Косово и регионот и во својот докторски труд ја утврдил серопреваленцата на лајшманиозата кај кучињата во сите седум области на Косово, го утврдил видовиот состав на песочните мушички во Косово и за прв пат го детектирал причинителот на болеста во инсектите вектори.

Краток опис на применетите методи

Кандидатот истражувањето го спровел на целата територија на Косово во текот на 2021 и 2022 година. Примероците од кучиња биле собрани со рандомизиран пристап, а биле опфатени кучиња од приватни домаќинства, бездомни кучиња во прифатилишта и овчарски кучиња. Почитувајќи ги основните етички принципи, кандидатот земал вкупно 285 примероци серум од кучиња од сите седум области на Косово. Сите серуми биле означени со името на кучето или бројот на чипот, локацијата, возраста, расата, полот и здравствената состојба.

Примероците од песочни мушички биле собрани од 114 локации (323 заловувања) во сите седум области на Косово. Локациите биле избрани по случаен избор, а вклучувале прифатилишта за кучиња, фарми за крави, фарми за кокошки, фарми за кози, фарми за овци и фарми за гулаби. За секоја од локациите, кандидатот водел евиденција за координатите, типот на фармата и поставеноста на стапцата (на отворено и внатрешно во објектите).

За тестирање на серумите биле користени две серолошки методи. Серумите биле тестирани на присуство на антитела против *Leishmania infantum* со компетитивна ELISA (ензимски поврзан имуносорбентен тест), а биле потврдувани со IFAT (индиректен тест на флуоресцентни антитела).

Собраните песочни мушички кандидатот ги идентификувал врз основа на нивните морфолошки особености, а идентификацијата ја потврдувал со молекуларни техники (PCR) за баркодирање преку таргетирање на фрагментот од поединицата I на цитохром c оксидазата (COI).

За детекција на ДНК на *Leishmania* во песочните мушички, кандидатот ги тестирал сите идентификувани мушички со многу сензитивен, вгнезден PCR-протокол, таргетирајќи го генот на малата поединица на рибозомалната рибонуклеинска киселина ((ssu) rRNA). На примероците од песочни мушички кои биле позитивни на ДНК на *Leishmania*, кандидатот правел дополнителна молекуларна карактеризација на секвенците со цел за понатамошно разјаснување на границите на видовите и да се одреди дискриминаторската моќ на применетите PCR-методи.

За утврдување на статистичката значајност на добиените резултати од тестираните кучешки серуми, кандидатот направил две различни статистички анализи. За утврдување на зависностите помеѓу различните области, пол, возраст, здравствена состојба и раса, кандидатот ја применил хи-квадрат анализата ((Пирсон или Фишеров точен тест) (SPSS, IBM®). Втората статистичка анализа кандидатот ја базирал на споредба на резултатите, користејќи Капа статистика на двата користени дијагностички метода (ELISA и IFAT), а со цел да го одреди нивото на усогласеност помеѓу методите и да ја процени валидноста и веродостојноста на овие тестови.

Краток опис на резултатите од истражувањето

Резултатите од студијата кандидатот ги поделил на два дела: резултати од тестирани серуми од кучиња и резултати од анализирани песочни мушички.

Вкупната преваленца на лајшманиозата кај кучињата во сите седум области на Косово била 4,21 % (95 % CI: 2,42-7,21%) со ELISA-тестот и 3,51 % (95 % CI: 1,92-6,34 %) со IFAT-тестот. Од 285 тестирани кучиња, 141 (49,47 %) биле машки и 144 (50,53 %) женски. Дополнително, 176 (61,75 %) биле мешани раси, а 109 (38,25 %) биле расни кучиња. Од нив, 245 (85,96 %) биле здрави кучиња без клинички знаци, додека 40 (14,04 %) покажале знаци на болест како што се дерматитис, артритис, тумори, васкулитис итн. Од 285 кучиња, 41 биле на возраст од 1 до 2 години (14,39 %), 64 биле на возраст од 2 до 3 години (22,46 %), 60 биле на возраст од 3 до 4 години (21,05 %), 67 биле на возраст помеѓу 4 – 6 години (23,51 %), 23 биле на возраст помеѓу 6 – 8 години (8,07 %), 14 биле на возраст помеѓу 8 – 10 години (4,91 %) и 16 биле на возраст над 10 години (5,61 %). Највисока преваленца на болеста имало во областа на Приштина (33 %), а само во областа на Митровица сите тестирани примероци биле негативни. Во однос на полот, 70 % од тестираните кучиња биле машки. Серопозитивните примероци по возраст биле дистрибуирани на следниов начин: 50 % и 60 % за 4 - 6 години, 17 % и 20 % за 8 – 10 години, 17 % и 10 % за 3 – 4 години, 8 % и 10 % за 6 – 8 години, 8 % и 0 % за групата >10 години и 0 % за 1 – 2 и 2 – 3 години, соодветно за ELISA и IFAT. Од сите серопозитивни кучиња, 90 % биле здрави, додека останатите 10 % биле со нарушена здравствена состојба.

Анализата на моќноста која кандидатот ја направил со цел проценка на хи-квадрат тестот, покажала дека нема значајни разлики меѓу различните области, полот, возраста, здравствената состојба и расите. Капа тестот утврдил одлична согласност помеѓу ELISA и IFAT-тестовите, што сугерира дека добиените резултати за серопреваленцата на лајшманиозата кај кучињата во Косово со помош на горенаведените комерцијални тестови се веродостојни и валидни. Од сите тестирани серуми, 3 примероци (1,05 %) биле позитивни на ELISA, но негативни на IFAT, и 1 примерок (0,35 %) бил позитивен на IFAT, но негативен на ELISA-тестот. И двата теста дале идентични резултати за 281 примерок (98,5 %), што резултирало со согласност од 0,986 и Капа коефициент од 0,81.

Резултатите за серопреваленцата на лајшманиозата кај кучињата во Косово кандидатот ги објавил во 2023 година во едно од најпрестижните списанија за паразитологија во светот, *Parasitology Research*.

Од сите 114 локации каде што кандидатот ги поставувал стапиците за песочните мушички, 77 (67,5 %) биле позитивни. Најниска стапка на заловување била забележана во Феризај 05 (7/15, 46,6 %), додека највисока била забележана во Ѓаковица 07 (14/16, 87,5 %). Од 3272 заловени песочни мушички, 2930 (89,5 %) биле женки, а 342 (10,5 %) биле мажјаци. Од сите женки, 497 (17 %) биле со крвен оброк. Кандидатот идентификувал 1149 примероци (од сите локации со помалку од 100 мушички), коишто припаѓале на седум видови во два рода, и тоа: *Phlebotomus perfiliewi* (715, 62,2 %), *Phlebotomus neglectus* (368, 32,0 %), *Phlebotomus tobbi* (27, 2,3 %), *Phlebotomus simici* (22, 1,9 %), *Phlebotomus balcanicus* (8, 0,7 %) *Phlebotomus papatasi* (2, 0,2 %) и *Sergentomyia minuta* (7, 0,6 %). Останатите 2123 примероци потекнувале од само пет локации. Меѓу нив, 372 примероци биле поединечно идентификувани како *Ph. perfiliewi* и *Ph. neglectus*. *Ph. perfiliewi* бил доминантен вид. *Ph. perfiliewi* и *Ph. neglectus* биле единствените видови пронајдени во сите седум области, додека *Ph. balcanicus* бил присутен само во Ѓаковица, а *Ph. papatasi* само во Пеќ.

Од 2930 тестирани женки на песочни мушички (915 поединечно и 2015 во 74 пулови), само три мушички (0,1 %) биле позитивни на ДНК на *Leishmania*: една мушичка од *Ph. neglectus* и две мушички од *Ph. perfiliewi*. Молекуларните анализи (ssu rRNA (321 bp) и ITS1 (276 bp)) биле позитивни за сите три примероци, а фрагментот на генот *cpb* (665 bp, 702 bp со прајмери) можел да се амплифицира само од *Ph. neglectus*. Кинетопластидниот qPCR покажал гранични вредности од 24,9, 32,5 и 28,5 за *Ph. neglectus* и двата *Ph. perfiliewi* примероци, соодветно. Сите три примероци на песочни мушички позитивни на ДНК на *Leishmania* (3/828; 0,4 %) потекнувале од една иста локација. За дополнителна карактеризација на добиените ДНК секвенци, кандидатот од GenBank базата презел 17 (ssu rRNA), 17 (ITS1) и 15 (*cpb*) референтни секвенци кои биле порамнети и подложени на анализа на парно растојание (pd). Средните растојанија изнесувале

0,2 % (S.E. = 0,2), 6,6% (S.E. = 0,9) и 8,0% (S.E. = 0,8) за ssu rRNA, ITS1 и cpb гените, соодветно. Растојанијата во пар биле најниски помеѓу *L. infantum* и *L. donovani* за сите три генски фрагменти (0,06 %/0,3 %/0,8 %). За ssu rRNA бил забележан низок *pd*, кој се движел од 0,06 до 0,5 %. За ITS1 и cpb, *pd* бил низок помеѓу *L. infantum* и *L. donovani* (0,3 % и 0,8 %), но споредливо висок помеѓу другите видови (4,7 до 22,0 % за ITS1, 8,5 до 13,4 % за cpb). Сите секвенци користени за *pd* пресметките биле вклучени во ML анализата, а *L. mexicana* била искористена како надворешна група за сите три гени. Анализата покажала мала дискриминаторска моќ на ssu rRNA генот, бидејќи биле забележани само две главни клади: клата I во која биле вклучени *L. infantum* и *L. donovani*, и клата II во која влегувале сите други секвенци на *L. tropica*, *L. major* и *L. mexicana*. ML анализата на ITS1 секвенците утврдила четири клади, и тоа: *L. donovani/infantum* (клата I), *L. tropica* (клата II), *L. major* (клата III) и *L. mexicana* (клата IV), со што се дискриминирале сите видови освен *L. infantum* и *L. donovani*. Анализата покажала највисока дискриминаторска моќ за cpb генот, кој ги поделил вклучените секвенци на пет клади, вклучувајќи ја и дискриминацијата на *L. infantum* и *L. donovani* поддржана од високите bootstrap-вредности. Секвенцата на cpb генот добиена во оваа студија се групирала со сите други секвенци на *L. infantum* (клата I), а кандидатот утврдил и бришење од 39 bp за сите секвенци на *L. infantum* во порамнувањето помеѓу позициите 406 и 444, што е специфично за *L. infantum*.

Резултатите од направените анализи на песочните мушички кандидатот ги објавил во 2023 година во едно од најреномираните списанија за патогени во светот, *Pathogens*.

За идентификација на домаќинот кој бил извор на храна за песочните мушички, кандидатот дополнително анализираше 179 женки со крвен оброк кои припаѓале на *Phlebotomus perfiliewi*, *Phlebotomus neglectus*, *Phlebotomus simici*, *Phlebotomus tobbi* и *Sergentomyia minuta*. Идентификуваните домаќини припаѓале на *Bos taurus*, *Ovis ammon*, *Homo sapiens*, *Canis lupus*, *Capra hircus*, *Gallus gallus* и *Lepus europeus*.

ОЦЕНА НА ТРУДОТ

Докторскиот труд на кандидатот Бетим Џекај, со наслов: „Епидемиологија на кучешката лајшманиоза во Косово и улогата на *Phlebotomus* spp. во нејзиното ширење“, претставува истражување во областа паразитни болести од подрачјето на земјоделските и ветеринарните науки. Во процесот на изработката на трудот се запазени главните методолошки принципи на една пресечна студија, темелно се анализирани сите податоци и добиените резултати во целост одговараат на поставениот предмет и целите на истражувањето. Од резултатите се изведени јасни и недвосмислени заклучоци кои даваат оправданост на студијата. Изработката на овој докторски труд дала нови и вредни сознанија за преваленцата и дистрибуцијата на лајшманиозата кај кучињата во Косово. Дополнително, идентификацијата на векторите од родот *Phlebotomus* и детекцијата на причинителот, *Leishmania* spp., во нив, придонесува за разбирање на динамиката на пренесувањето на болеста и потенцијалниот ризик за здравјето на животните и луѓето. Проценката на ризикот за јавното здравје е особено важна, и ќе помогне да се имплементираат стратешки планови за превенција и контрола на лајшманиозата.

Докторскиот труд на кандидатот Бетим Џекај, со наслов: „Епидемиологија на кучешката лајшманиоза во Косово и улогата на *Phlebotomus* spp. во нејзиното ширење“, според мислењето на Комисијата за одбрана, ги исполнува основните услови и стандарди за подготовка на докторски труд.

ИСПОЛНЕТОСТ НА ЗАКОНСКИТЕ УСЛОВИ ЗА ОДБРАНА НА ТРУДОТ

Кандидатот, пред одбраната на докторскиот труд, ги објавил (како прв автор во меѓународни научни списанија со импакт-фактор) следниве рецензирани истражувачки трудови:

- [1]. Betim Xhekaj, Jovana Stefanovska, Kurtesh Sherifi, Agim Rexhepi, Bejo Bizhga, Ljubica Rashikj, Martin Nikolovski, Edwin Kniha, Aleksandar Cvetkovikj. Seroprevalence of canine leishmaniosis in asymptomatic dogs in Kosovo. *Parasitology Research* 122, 607–614 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07762-7>. Impact factor 2.0.

- [2]. Betim Xhekaj, Ina Hoxha, Katharina Platzgummer, Edwin Kniha, Julia Walochnik, Kurtesh Sherifi, Agim Rexhepi, Behlul Behluli, Vit Dvořák, Hans-Peter Fuehrer, Adelheid G. Obwaller, Wolfgang Poepl, Jovana Stefanovska, Aleksandar Cvetkovikj. First detection and molecular analysis of *Leishmania infantum* DNA in sand flies of Kosovo. *Pathogens* 12 (10), 1190 (2023). <https://doi.org/10.3390/pathogens12101190>. Impact factor 3.7.