



## СТАНОВИЩЕ

от проф. Райко Димитров Пешев, д.п., рък. секция „Епизоотология и инфекциозни болести по животните“ в НДНВМИ гр. София на дисертационен труд на тема: „ТЕРЕННИ И ЛАБОРАТОРНИ ПРОУЧВАНИЯ НА ЗАРАЗНАТА АГАЛАКСИЯ ПО ОВЦЕТЕ И КОЗИТЕ В БЪЛГАРИЯ“ за присъждане на научна и образователна степен „Доктор“ област на висше образование: 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина, Професионално направление: 6.4. Ветеринарна медицина, научна специалност: „Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните“, представен от Цветомир Генослов Евстатиев задочен докторант в катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“ от факултета по ветеринарна медицина към ТРУ гр. Стара Загора.

Представеният ми за изготвяне на становище дисертационен труд е написан на на 149 страници и включва: Увод -1 стр., Литературен преглед – 41 стр., Собствени изследвания -1 стр, Цел и задачи -1 стр., Материали и методи – 19 стр., Резултати – 28 стр., Обсъждане -14 стр., Изводи – 1 стр., Препоръки за практиката – 1стр., Приноси – 1 стр., Публикации, участия в научни форуми и научни проекти във връзка с дисертацията– 1 стр., литературен указател – 25 стр.

Дисертационният труд е онагледени с 19 фигури и 19 таблици. В библиографията са включени 202 литературни източника, от които 9 са на български автори и 193 на чужди автори.

Заразната агалаксия е заболяване, причинявано от няколко вида микоплазми, протичащо като моно- или поли инфекция и се характеризира с пневмония, септицемия, аборт, засягане на млечната жлеза, ставни и очни клинични симптоми.

В раздел литературен преглед докторанта дава исторически данни за заразната агалаксия и нейните причинители, еволюцията в таксономията на причинителите, обща характеристика на микоплазмите, метаболизъм и функционални особености на микоплазмите, факторите на патогенност, устойчивост в околната среда и чувствителност към антибиотици. Представени са епидемиологичните особености на заразната агалаксия, географското и разпространение, икономическото значение, възприемчиви видове, възрастови и технологични категории, източници на инфекция, пътищата и механизмите на предаване на инфекцията, количествените измерители на епидемичния процес. След това се дава информация за патогенезата на заболяването, клиничните признаци, инкубационният период, клиничните форми и изхода от заболяването. Във втората част на литературния преглед докторанта дава данни за лабораторната диагностика на заразната агалаксия, като се описват материалите за провеждане на диагностичните изследвания и начините за изолация и идентификация на причинителите. Отразени са молекулярно-генетичните и серологични методи за детекция на причинителите и антитела срещу тях. Представени са методи, средства и ефективност от лечението и контрол на заболяването, чрез ваксинации. От така представения литературен преглед се вижда, че докторанта е запознат с научната литература по проблема, правилно цитира и интерпретира резултатите на други автори

работили по заразната агалаксия, което е обосновка за провеждане на проучвания, които не са провеждани преди това.

В раздел собствени изследвания, цел и задачи, докторанта си поставя за цел да се проведат клинични проучвания при теренни взривове на заразна агалаксия в стада овце и кози и посредством qPCR да се установи геном на *Mycoplasma agalactiae* в млечни проби, както и да се проучи динамиката в изграждането на ваксиналния хуморален имунен отговор при дребни преживни животни. За постигане на тази цел си поставя и 5 задачи: Счита, че целта и задачите са правилно поставени, от което ще произтече и получаването на коректни резултати.

В раздел Материал и методи докторанта посочва използваните материали и методи за проучванията извършени в 8 стопанства, като се описват пробите, които са получени за извършване на изследванията, клиничните проучвания в стадата, лабораторните изследвания за екстрахиране и установяване ДНК на *M. agalactiae* в млечни проби чрез qPCR с интерпретация на резултатите от тези проучвания. Теренните проучвания върху поствакционалния имунен отговор са осъществени с ваксина Agalax-S, като са ваксинирани 68 животни от които 28 овце, 16 кози и по 12 агнета и ярета. От ваксинираните животни са взимани кръвни проби в продължение на 6 месеца, и са изследвани чрез ензимсвързан имуносорбентен тест (ELISA), чрез комерсиален *ID Screen Indirect Mycoplasma agalactiae* диагностичен кит. Извършена е и статистическа обработка на данните чрез статистически софтуер GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) чрез еднопосочна ANOVA, за определяне на средните стойности ( $\bar{x}$ ) и средните стандартни грешки на (SEM) на статистически значимите разлики в средните стойности на всички данни. Доверителните интервали (confidence limits 95%) са определени с помощта на статистически софтуер GraphPad InStat v. 3.00 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

В следващия раздел докторанта хронологично отразява резултатите от проучванията си в стопанствата в които има съмнение за заболяването с характерната за заразна агалаксия клиника и промени при животните. Посочени са и резултатите от лабораторните проучвания чрез qPCR и серологичните изследвания на кръвни проби от овце и кози ваксинирани след ваксинация с Agalax S.

В раздел обсъждане се обсъждат резултатите от изследванията, като се съпоставят с данните на други изследователи работили по проблема и се дава трактовка на получените данни. Счита, че резултатите са обсъдени коректно. От обсъждането личи, че докторанта дискутира правилно резултатите от изследванията си и познава добре литературата, може да интерпретира правилно получените резултати и да изказва собствено мнение по разработвания проблем.

Въз основа на проведените изследвания са направени 9 извода и 4 препоръки за практиката, които напълно отговарят на резултатите от изследванията. Има 8 приноса първите три от които приемам, останалите 5 са с потвърдителен характер и това са известни неща установени от други автори. Счита, че колежата се е съобразил с бележките на предварителните рецензенти и на другите колеги присъствали на предишното заседание. Във връзка с дисертационният труд са отпечатани 3 научни съобщения в които докторанта е водещ автор. Има и 2 участия в научни форуми и едно

участие в университетски научен проект. Така той изпълнява изискванията на ЗРАСРБ и правилника на ВМФ към ТРУ гр. Ст.Загора.

Към дисертационният труд имам и следните бележки: Литературния указател е от 202 автори, от които 8 са на кирилица, а останалите са на латиница. Част от българските автори са цитирани, но не е цитиран доц. Д. Тодоров от ЦНИВМИ, защитил последен дисертационен труд по проблема. Беше интересно да се видят резултатите от неговите проучвания извършени с по-стари методи и да се сравнят с данните получени от новите методи на изследване. Беше хубаво да има изолати от вътрешни органи на болни и преболеждали овце и кози, които също да бъдат изследвани чрез Rt PCR. По отношение на отрицателните резултати от Rt PCR има един абзац в който пишете, че при 13 проби, праговете нива варират от 29,4 до 36,9. Какво ниво на кт оф сте възприели за да можете да интерпретирате резултатите като положителни или отрицателни. В диагностичния кит пише, че кт офа е при 29 цикъл, вероятно това е кт офа който и Вие сте възприели. Хубаво е било да се направи калибрационна крива като при изследванията да се опишат получените данни за ефикасност (E%), коефициент на детерминиране (R2) и наклон на кривата, който трябва да е -3.9 до -3.0. Как ще обясните факта, че 24 проби от стопанства 5-8 са отрицателни при положение, че имате данни за заболяването. Аз разбирам, че сте се стремили да получавате пробите колкото е възможно по - малко инвазивно, но е било интересно да се вземат не само млечни проби, но и проби от очите, вътрешните органи или пунктат от ставите с оглед изолация и идентификация на причинителите.

При излъчителството на антителата с коластрата и млякото на стр. 110 дали това твърдение е правилно, че титрите на антителата през втория период са по-ниски. Как бихте интерпретирали факта, защо козите имат по-високи титри на антитела от овцете. Независимо от направените от мен бележки по отношение на дисертационния труд, считам, че той отразява напълно резултатите от извършените проучвания, които са лично дело на докторанта.

**Заключение:** Представеният ми за становище дисертационен труд на тема: "ТЕРЕННИ И ЛАБОРАТОРНИ ПРОУЧВАНИЯ НА ЗАРАЗНАТА АГАЛАКСИЯ ПО ОВЦЕТЕ И КОЗИТЕ В БЪЛГАРИЯ за получаване на академичната длъжност „Доктор“ от Цветомир Геневелов Евстатиев задочен докторант, представлява актуален научен труд с важно значение за ветеринарната медицина. Целите и задачите са правилно поставени и изпълнени, като резултатите и направените изводи са достоверни. Считам, че тези данни ще са важни за ветеринарните и други специалисти, борещи се с това актуално за овцевъдството и козевъдството заболяване. Считам, че дисертационният труд напълно изпълнява критериите на ЗРАСРБ и правилника на ВМФ към ТРУ гр. Ст.Загора и давам положително становище.

София

29.04.2024 г.

Проф. Р.Пешев, д.н.

участие в университетски научен проект. Така той изпълнява изискванията на ЗРАСРБ и правилника на ВМФ към ТРУ гр. Ст.Загора.

Към дисертационният труд имам и следните бележки: Литературния указател е от 202 автори, от които 8 са на кирилица, а останалите са на латиница. Част от българските автори са цитирани, но не е цитиран доц. Д. Тодоров от ЦНИВМИ, защитил последен дисертационен труд по проблема. Беше интересно да се видят резултатите от неговите проучвания извършени с по-стари методи и да се сравнят с данните получени от новите методи на изследване. Беше хубаво да има изолати от вътрешни органи на болни и преболедали овце и кози, които също да бъдат изследвани чрез Rt PCR. По отношение на отрицателните резултати от Rt PCR има един абзац в който пишете, че при 13 проби, праговете нива варират от 29,4 до 36,9. Какво ниво на кѓт оф сте възприели за да можете да интерпретирате резултатите като положителни или отрицателни. В диагностичния кит пише, че кѓт офа е при 29 цикъл, вероятно това е кѓт офа който и Вие сте възприели. Хубаво е било да се направи калибрационна крива като при изследванията да се опишат получените данни за ефикасност (E%), коефициент на детерминиране (R<sup>2</sup>) и наклон на кривата, който трябва да е -3.9 до -3.0. Как ще обясните факта, че 24 проби от стопанства 5-8 са отрицателни при положение, че имате данни за заболяването. Аз разбирам, че сте се стремили да получавате пробите колкото е възможно по - малко инвазивно, но е било интересно да се вземат не само млечни проби, но и проби от очите, вътрешните органи или пунктат от ставите с оглед изолация и идентификация на причинителите.

При излъчителството на антителата с коластрата и млякото на стр. 110 дали това твърдение е правилно, че титрите на антителата през втория период са по-ниски. Как бихте интерпретирали факта, защо козите имат по-високи титри на антитела от овцете. Независимо от направените от мен бележки по отношение на дисертационния труд, считам, че той отразява напълно резултатите от извършените проучвания, които са лично дело на докторанта.

**Заключение:** Представеният ми за становище дисертационен труд на тема: "ТЕРЕННИ И ЛАБОРАТОРНИ ПРОУЧВАНИЯ НА ЗАРАЗНАТА АГАЛАКСИЯ ПО ОВЦЕТЕ И КОЗИТЕ В БЪЛГАРИЯ за получаване на академичната длъжност „Доктор” от Цветомир Геновелов Евстатиев задочен докторант, представлява актуален научен труд с важно значение за ветеринарната медицина. Целите и задачите са правилно поставени и изпълнени, като резултатите и направените изводи са достоверни. Считам, че тези данни ще са важни за ветеринарните и други специалисти, борещи се с това актуално за овцевъдството и козевъдството заболяване. Считам, че дисертационният труд напълно изпълнява критериите на ЗРАСРБ и правилника на ВМФ към ТРУ гр. Ст.Загора и давам положително становище.

София

29.04.2024 г.

А А ЕН А А

Проф. Р.Пешев, д.н.



## OPINION

by Prof. Rayko Dimitrov Peshev, Ph.D., head of Dept. "Epizootology and Infectious Animal Diseases" in NDNIVMI, Sofia for a dissertation on the topic: "FIELD AND LABORATORY STUDIES OF CONTAGIOUS AGALAXIA IN SHEEP AND GOATS IN BULGARIA" for the award of a scientific and educational degree "Doctor" in the field of higher education: 6. Agricultural sciences and veterinary medicine, Professional direction: 6.4. Veterinary Medicine, Science Specialty: "Epizootology, infectious diseases and prevention of infectious diseases in animals", presented by Tsvetomir Genovelov Evstatiev part-time doctoral student in the Department of "Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases" from the Faculty of Veterinary Medicine at Trakian University, Stara Zagora.

The dissertation work presented to me for drafting an opinion is written on 149 pages and includes: Introduction -1 page, Literature review - 41 pages, Own research -1 page, Aim and tasks -1 page, Materials and methods - 19 pages ., Results – 28 p., Discussion -14 p., Conclusions – 1 p., Recommendations for practice – 1 p., Contributions – 1 p., Publications, participation in scientific forums and scientific projects in connection with the dissertation – 1 p., bibliography – 25 pages. The dissertation work is illustrated with 19 figures and 19 tables. The bibliography includes 202 literary sources, of which 9 are by Bulgarian authors and 193 by foreign authors.

Infectious agalaxia is a disease caused by several species of mycoplasmas, occurring as a mono- or poly infection and characterized by pneumonia, septicemia, abortions, involvement of the mammary gland, joint and eye clinical symptoms.

In the literature review section, the doctoral student provides historical data on infectious agalaxia and its causative agents, the evolution in taxonomy of causative agents, general characteristics of mycoplasmas, metabolism and functional features of mycoplasmas, pathogenicity factors, resistance in the environment and sensitivity to antibiotics. Epidemiological features of contagious agalaxia, geographical and distribution, economic importance, susceptible species, age and technological categories, sources of infection, routes and mechanisms of infection transmission, quantitative indicators of the epidemic process are presented. Then information is given on the pathogenesis of the disease, clinical signs, incubation period, clinical forms and the outcome of the disease. In the second part of the literature review, the doctoral student provides data on the laboratory diagnosis of contagious agalaxia, describing the materials for conducting the diagnostic tests and the methods of isolation and identification of the causative agents. The molecular-genetic and serological methods for detection of the causative agents and antibodies against them are reflected. The effectiveness of the treatment and control of the disease through vaccinations are presented.

From the literature review presented in this way, it can be seen that the doctoral student is familiar with the scientific literature on the problem, correctly cited and interprets the results from other authors who worked on contagious agalaxia, which is a justification for conducting studies that have not been conducted before.

In the section own research, aim and objectives, the PhD student aims to conduct clinical studies in field outbreaks of contagious agalaxia in sheep and goat herds and to detect *Mycoplasma agalactiae* genome in milk samples by qPCR, as well as to study the dynamics in the construction of the vaccine humoral immune response in small ruminants. To achieve this goal, the authors set 5 tasks: I believe that the goal and tasks are correctly set, which will result in obtaining correct results.

In the section Material and methods, the PhD student indicates the materials and methods used for the studies carried out in 8 farms, describing the samples that were obtained to carry out the investigations, the clinical studies in the herds, the laboratory studies for the extraction and detection of *M. agalactiae* DNA in milk samples by qPCR with interpretation of the results of these studies. The field studies on the post-vaccination immune response were carried out with vaccine Agalax-S, and 68 animals were vaccinated, of which 28 sheep, 16 goats and 12 lambs and kids. Blood samples were taken from the vaccinated animals during period of 6 months, and were examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using a commercial ID Screen Indirect Mycoplasma agalactiae diagnostic kit. Data were also statistically processed using GraphPad Prism 7.04 statistical software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) by one-way ANOVA to determine the means ( $\bar{x}$ ) and standard errors of the mean (SEM) of statistically significant differences in means values of all data. Confidence intervals (confidence limits 95%) were determined using statistical software GraphPad InStat v. 3.00 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

In the next section, the doctoral student chronologically reflects the results of his studies in the farms where the disease is suspected with the characteristic clinic of contagious agalaxia and changes in the animals. The results of laboratory studies by qPCR and results of serological tests of blood samples from sheep and goats after vaccination with Agalax S are also indicated.

In the discussion section, the research results are discussed, comparing them with the data of other researchers working on the problem and giving an interpretation of the obtained data. I believe that the results have been discussed correctly. From the discussion, it is clear that the doctoral student correctly discusses the results of the research and knows the literature well, can correctly interpret the obtained results and express his own opinion on the problem being developed.

Based on the conducted research, 9 conclusions and 4 recommendations for practice were made, which fully correspond to the results of the research. There are 8 contributions, the first three of which I accept, the remaining 5 are of a confirmatory nature and these are known things established by other authors. I believe that the collegue has complied with the notes of the preliminary reviewers and the other colleagues present at the previous meeting. In connection with the dissertation work, 3 scientific reports were printed in which the doctoral student was the lead author. There are also 2 participations in scientific forums and one participation in a University scientific project. In this way, he fulfills the requirements of Law for developing of scientific staff and the regulations of the VMF at the TRU St. Zagora.

The following notes I have to the dissertation work: The literature index is of 202 authors, of which 8 are in Cyrillic and the rest are in Latin. Some of the Bulgarian authors are cited, but Associate Professor D. Todorov from the National Institute of Medical Research, in Sofia who defended the last dissertation on the micoplasma problem, was not cited. It was interesting to see the results of his studies done with older methods and compare them with the data obtained by the new research methods. From sick and recovered sheep and goats it was good to have isolates from internal organs which also can be tested by Rt PCR.

Regarding the negative Rt PCR results, there is a paragraph where you write that in 13 samples, the threshold levels ranged from 29.4 to 36.9. What cut off level did you adopt to be able to correct interpret the results as positive or negative. In the diagnostic kit, it says that the cut-off point is at cycle 29, probably this is the cut-off point that you have also adopted. It would have been nice to make a calibration curve as in the studies to describe the data obtained for efficacy (E%), coefficient of determination ( $R^2$ ) and slope of the curve, which should be -3.9 to -3.0. How do you explain the fact that 24 samples from farms 5-8 are negative when you have data on the disease. I understand that you aimed to obtain the samples as little invasively as possible, but it was interesting to take not only milk samples,

but also samples from the eyes, internal organs or punctate from the joints with a view to isolation and identification of the causative agents.

In colostrum and milk antibody emission on page 110, is this statement correct that antibody titers in the second period are lower. How would you interpret the fact why goats have higher antibody titers than sheep. Despite of the remarks I made regarding the dissertation work, I believe that it fully reflects the results of the studies carried out, which are the personal work of the doctoral student.

**Conclusion:** The dissertation work submitted to me for opinion on the topic: "FIELD AND LABORATORY STUDIES OF INFECTIOUS AGALAXIA IN SHEEP AND GOATS IN BULGARIA" for obtaining the academic position "Doctor" by Tsvetomir Genovelov Evstatiev part-time doctoral student, is an up-to-date scientific work of importance for veterinary medicine . The goals and tasks are correctly set and fulfilled, and the results and conclusions drawn are credible. I believe that these data will be important for veterinarians and other specialists fighting this actual disease for sheep and goat farming. I believe that the dissertation work fulfills the criteria of the Law for developing of scientific staff and the regulations of the VMF at the TRU St. Zagora and I give a positive opinion.

Sofia  
29/04/2024

Á Á ÈÁ Á

Prof. R. Peshev, Ph.D.