



СТАНОВИЩЕ

върху дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по научна област 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина, научна специалност „Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните“

Автор на дисертационния труд: Цветомир Генovelов Евстатиев, докторант в задочна форма на обучение към катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“ при Ветеринарномедицински факултет на Тракийски университет, гр. Стара Загора.

Тема на дисертационния труд: „Теренни и лабораторни проучвания на заразната агалаксия по овцете и козите в България“.

Член на научното жури: доц. д-р Роман Пепович, д-р от Катедра „Инфекциозна патология, хигиена, технология и контрол на храните от животински произход“ на Факултет „Ветеринарна медицина“ при Лесотехнически университет – София, съгласно Заповед № 642 / 22.02.2024 г. на Ректора на ТрУ.

Актуалност на тематиката

Заразната агалаксия е заболяване, причинявано от няколко вида микоплазми, протичащо като моно- или смесена инфекция. Освен класическата триада – засягане на млечната жлеза, ставни и очни симптоми, са описани и други клинични изяви – пневмония, септицемия, аборти, в зависимост от вида на животните (овце/кози), от микоплазмите причинители, както и от начина на отглеждането. Заразната агалаксия причинява големи икономически загуби поради намаляване производството на мляко, настъпването на аборти, висока заболяемост и смъртност, и разходи, свързани с диагностиката, лечението и профилактиката. Въпреки наличните диагностичните тестове, заболяването е недостатъчно диагностицирано и данните за разпространението му са непълни за повечето държави. Контролът на заразната агалаксия се базира на ваксинация, химиотерапия и добри практики за управление на стадното здраве. Наличието на асимптомни носители и многобройните източници на инфекции допринасят за бързото разпространение на болестта и компроментират усилията за превенция. Всичко това налага да идентифицираме пропуските в знанията, необходими за по-добро управление на заболяването, което определя и актуалността на разработваната тема.



Структура на дисертационния труд

Представеният дисертационен труд е написан на 149 стандартни страници и съдържа изискуемите при оформянето на такъв вид научни трудове раздели: увод – 1 стр.; литературен преглед – 42 стр.; цел и задачи – 1 стр.; материал и методи – 18 стр.; резултати – 27 стр.; обсъждане – 23 стр.; изводи – 1 стр.; приноси – 1 стр.; препоръки за практиката – 1 стр.; публикации във връзка с дисертацията – 1 стр.; литературен указател – 25 стр.

Литературна осведоменост

Литературния преглед съдържа голям обем добре подредена литературна информация, базирана на огромния брой от 202 литературни източници. Това показва, че докторантът е добре запознат с изследванията и научните публикации по проблема, както и неговите умения да анализира достъпната информация. Подробно са представени исторически данни за заразната агалаксия и нейните причинители. Направена е клинично-епидемиологична характеристика на заболяването и са очертани възможностите за диагностициране, като е обърнато внимание, че микробиологичната диагноза е бавна, трудна и несигурна. Това създава необходимост от разработване на нови алгоритми за скринингови и мониторингови изследвания. Въпреки, че етиологичните агенти засега остават чувствителни към повечето индицирани антимикробни средства, наблюдението на резистентността е важно, тъй като се появяват някои устойчиви клинични изолати. В много от ендемичните райони контролът на болестта се основава на активна имунизация. В литературния обзор за разгледани стратегиите за имунизация на овцете и козите срещу заразната агалаксия, като са посочени предимствата и недостатъците на атенуираните и инактивираните ваксини. У нас въпреки множеството задълбочени проучвания върху заразната агалаксия от различни научни колективи все още има редица нерешени въпроси, свързани с патогенезата, взаимодействието с имунната система, излъчването и различните предавателни механизми, което позволява на докторантът на мотивира избраната от него тема на проучване.

Цел, задачи и методи на изследване

Целта на настоящата работа е да се проведат клинични проучвания при теренни взривове на заразна агалаксия в стада овце и кози и посредством qPCR да се установява геном на *Mycoplasma agalactiae* в млечни проби, както и да се проучи динамиката в изграждането на ваксиналния хуморален имуноен отговор срещу този патоген при дребни преживни животни. За реализиране на тази цел са формулирани 5 задачи за изпълнение.

Проучването е проведено в 8 стопанства за дребни преживни животни от различни райони на страната. В първите 4 са проведени клинични и етиологични проучвания посредством qPCR. От животните в тези обекти са изследвани 43 млечни проби за наличие ДНК на *M. agalactiae*. Други 4 стада дребни преживни животни, в които не са установени клинични признаци на заразна агалаксия, са включени в изследванията на поствакциналния имуноен отговор. От животните в тях



са получени 24 млечни проби, изследвани чрез qPCR и 1028 серумни проби за проследяване на поствакциналния имунен отговор. Отделните стопанства се различават по вида на отглежданите животни, начина на отглеждане и хранене. В изследванията са включени различни възрастови групи овце и кози. Използваните диагностични методи, тяхната чувствителност и специфичност са съобразени с целта на проучването. Получените резултати са анализирани с помощта на статистически софтуер GraphPad Prism 7.04.

Резултати

Разделът съдържа достатъчен обем фактологичен материал, който е представен последователно и точно, базирайки се на отделните задачи. Резултатите от проучванията са отразени в 19 таблици и са илюстрирани с 19 фигури. Изследванията върху честотата на проявление на клиничните признаци при заразната агалаксия потвърждават, че се засягат главно лактиращите животни, при които протича с мастит, последван от хипоагалаксия, агалаксия или атрофия на млечната жлеза. При нелактиращите заболяването се проявява с артрити и паренхиматозни кератити. Обобщавайки резултатите от проведените qPCR анализи за доказване на *M. agalactiae*, авторът посочва, че процента на положителни проби варира от 28.6% в стопанство 4 до 70% в стационарното за заразна агалаксия стадо, като средната стойност е 53,5%. Тези данни показват, че в ендемичните области, директният qPCR може да бъде ценен инструмент за диагностициране на заболяването, с оглед въвеждането на адекватна профилактика и контрол. Теренните проучвания върху поствакциналния имунен отговор при възрастните овце и кози, показват, че антителния отговор се повишава бързо през първите 2 седмици след поредната бустер ваксинация, и прогресивно намалява до изходните стойности най-често в периода около 3 - 4-ия месец. Установените стойности на OD при агнета и ярета на двумесечна възраст показват изчерпване на придобитите чрез коластрата антитела срещу *M. agalactiae*.

Осъждане

Направен е задълбочен и компетентен анализ на получените собствени резултати с наличните данни от литературата, което придава на раздела необходимия характер на научна дискусия и подчертава уменията на докторанта да борави с научни факти. Дискутирани са различията в поствакциналния имунитет при различни възрастови категории и влиянието на технологията на отглеждане, като е направен опит и за установяване на факторите, които имат основно влияние върху изграждането на специфичната защита след ваксинация срещу заразна агалаксия. Анализирайки и съпоставяйки получените резултати е установено, че продължителността на поствакциналния имунен отговор е сравнително краткотраен, поради което еднократната ваксинация в заразните огнища не е достатъчна за осигуряване на продължителна протекция, която да доведе до ограничаване на огнището. В тази връзка докторантът препоръчва в заразните огнища въвеждане на учестена схема на ваксинация, включваща приложение на поддържащи бустер дози на всеки 4 месеца (три пъти в годината). Извършеният анализ може да бъде предпоставка за разработване на национално утвърден



механизъм за диагностика и констатиране на заболяването, както и на национална стратегия за контрол на заболяването.

Изводи, приноси и препоръки за практиката

На базата на получените резултати от проведените изследвания са формулирани 9 извода. Приемам приносите, които са групирани като оригинални (4 бр.) и потвърдителни (4 бр.). Направени са 4 препоръки за практиката, които могат да бъдат полезни в диагностиката и контрола на заразната агалаксия.

Оценка на публикациите по дисертацията

Представени са 3 публикации (1 под печат) на английски език по темата на дисертацията в реферирани научни издания, като в тях докторантът е първи автор, което е доказателство за личното участие на докторанта в проведените изследвания. Част от резултатите са представени и на 2 национални научни форуми с международно участие.

Автореферат

Представеният автореферат към дисертацията е в обем 48 страници, изготвен е според изискванията и отразява основните резултати, постигнати в дисертацията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представеният дисертационен труд на тема: „Теренни и лабораторни проучвания на заразната агалаксия по овцете и козите в България“ съдържа достатъчно оригинални и потвърдителни научни приноси. Като се вземат в предвид големия обем на извършените научни изследвания, получените оригинални резултати и тяхното популяризиране в реферирани научни издания, покриването на всички изисквания на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и Правилника за развитие на академичния състав в ТрУ ми дават основание да го оценя **ПОЛОЖИТЕЛНО**.

Позволявам си да предложа на почитаемото Научно жури също да гласува положително и да присъди на Цветомир Геновелов Евстатиев образователната и научна степен „доктор“ по научната специалност „Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните“.

30.04.2024 г.

Изготвил становището:

ИГНА А

/ доц. д-р Роман Пепович, Двм /



OPINION

of a dissertation work for awarding the educational and scientific degree "Doctor" field of higher education 6. Agricultural sciences and veterinary medicine, professional field 6.4.

Veterinary medicine, in the scientific specialty "Epizootology, infectious diseases and prevention of infectious diseases in animals"

Author of the PhD thesis: Tsvetomir Genovelov Evstatiev, PhD student in part-time study at the Department of "Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases" at Trakia University, Stara Zagora.

Title of the PhD thesis: "Field and laboratory studies of contagious agalaxia in sheep and goats in Bulgaria".

Member of the scientific jury: Assoc. Prof. Roman Pepovich, DVM, PhD, from the department of „Infectious Pathology, Hygiene, Technology and Control of Foods from Animal Origin“, Faculty of Veterinary Medicine, University of Forestry, Sofia, according to Order № 642 / 22.02.2024 of the Rector of Trakia University.

Actuality of the topic

Contagious agalactia is a disease caused by several types of mycoplasmas, occurring as a mono- or mixed infection. In addition to the classic triad - involvement of the mammary gland, joint and eye symptoms, other clinical manifestations have also been described - pneumonia, septicemia, abortions, depending on the type of animals (sheep/goats), the causative mycoplasmas, as well as the method of husbandry. Contagious agalactia causes great economic losses due to reduced milk production, occurrence of abortions, high morbidity and mortality, and costs associated with diagnosis, treatment and prevention. Despite available diagnostic tests, the disease is underdiagnosed and prevalence data are incomplete for most countries. Control of contagious agalactia is based on vaccination, chemotherapy and good herd health management practices. The presence of asymptomatic carriers and multiple sources of infection contribute to the rapid spread of the disease and compromise prevention efforts. All this requires us to identify the knowledge gaps necessary for a better management of the disease, which also determines the relevance of the developed topic.

Structure of the dissertation

The presented dissertation work is written on 149 standard pages and contains the sections required for the design of this type of scientific work: Introduction - 1 page; Literature review - 42 pages; Purpose and tasks - 1 page; Material and methods - 18 pages; Results - 27 pages; Discussion - 23 pages; Conclusion - 1 page; Contributions - 2 page; Recommendations for practice - 1 page; Publications related to the dissertation - 1 page; Bibliography - 25 pages.



Literary awareness

The literature review contains a large volume of well-arranged literature information based on the vast number of 202 literature sources. This demonstrates that the PhD student is well-versed in the research and scientific publications on the issue, as well as his skills in analyzing the available information. Historical data on contagious agalactia and its causes are presented in detail. A clinical-epidemiological characterization of the disease was made and the possibilities for diagnosis were outlined, paying attention to the fact that microbiological diagnosis is slow, difficult and uncertain. This creates a need to develop new algorithms for screening and monitoring studies. Although the etiological agents thus far remain susceptible to most of the indicated antimicrobials, resistance monitoring is important as some resistant clinical isolates are emerging. In many of the endemic areas, disease control is based on active immunization. In the literature review, strategies for immunization of sheep and goats against contagious agalactia are discussed, with the advantages and disadvantages of attenuated and inactivated vaccines indicated. In our country, despite the many in-depth studies on contagious agalactia by various scientific teams, there are still a number of unsolved questions related to pathogenesis, interaction with the immune system, radiation and various transmission mechanisms, which allows the PhD student to motivate his chosen research topic.

Own Research

The aim of the present work is to conduct clinical studies in field outbreaks of contagious agalactia in flocks of sheep and goats and, by means of qPCR, to establish the genome of *Mycoplasma agalactiae* in milk samples, as well as to study the dynamics in the construction of the vaccine humoral immune response against this pathogen in small ruminants. To realize this goal, 5 tasks have been formulated. The study was conducted in 8 farms for small ruminants from different regions of the country. In the first 4, clinical and etiological studies were performed using qPCR. From the animals in these sites, 43 milk samples were examined for the presence of *M. agalactiae* DNA. Another 4 herds of small ruminants, in which no clinical signs of contagious agalactia were found, were included in the post-vaccination immune response studies. From the animals in them, 24 milk samples were obtained, examined by qPCR and 1028 serum samples to monitor the post-vaccination immune response. The individual farms differ in the type of animals raised, the way of farming and feeding. Different age groups of sheep and goats were included in the studies. The used diagnostic methods, their sensitivity and specificity are consistent with the purpose of the study. The obtained results were analyzed using statistical software GraphPad Prism 7.04.

Results

The section contains a sufficient volume of factual material, which is presented consistently and accurately, based on the individual tasks. The results of the studies are reflected in 19 tables and illustrated with 19 figures. Studies on the incidence of clinical signs in contagious agalactia confirm that lactating animals are mainly affected, with mastitis followed by hypogalaxia, agalaxia or atrophy of the mammary gland. In non-



lactating animals, the disease manifests itself with arthritis and parenchymatous keratitis. Summarizing the results of the qPCR assays performed for the detection of *M. agalactiae*, the author indicated that the percentage of positive samples ranged from 28.6% in farm 4 to 70% in the stationary herd for contagious agalactia, with a mean value of 53.5%. These data indicate that in endemic areas, direct qPCR can be a valuable tool for disease diagnosis, with a view to introducing adequate prophylaxis and control. Field studies on the post-vaccination immune response in adult sheep and goats have shown that the antibody response rises rapidly during the first 2 weeks after the next booster vaccination, and progressively decreases to baseline values, most often around the 3-4th month. The OD values determined in two-month-old lambs and kids indicate depletion of colostrum-acquired antibodies against *M. agalactiae*.

Discussion

A thorough and competent analysis of the obtained own results with the available data from the literature has been made, which gives the section the necessary character of a scientific discussion and emphasizes the skills of the PhD student in handling scientific facts. Differences in post-vaccination immunity in different age categories and the influence of breeding technology are discussed, and an attempt was made to establish the factors that have a major influence on the establishment of specific protection after vaccination against contagious agalactia. Analyzing and comparing the obtained results, it was found that the duration of the post-vaccination immune response is relatively short-lived, therefore, a single vaccination in infectious outbreaks is not sufficient to provide long-term protection that would lead to outbreak containment. In this regard, the PhD student recommends introducing an accelerated vaccination scheme in infectious outbreaks, including the administration of maintenance booster doses every 4 months (three times a year). The performed analysis can be a prerequisite for the development of a nationally approved mechanism for diagnosis and detection of the disease, as well as a national strategy for disease control.

Conclusions, contributions and recommendations for practice

Based on the results obtained from the conducted research, 9 conclusions were formulated. I accept contributions that are grouped as original (4 pcs.) and confirmatory (4 pcs.). Recommendations for practice (4 pcs.) are made that may be helpful in the diagnosis and control of contagious agalactia.

Evaluation of the personal participation and publication activity of the PhD student

There are 3 publications (1 in print) in English on the topic of the dissertation in refereed and indexed scientific publications, in which the PhD student is the lead author, which I take as evidence of the personal participation of the PhD student in the conducted research. The research results were presented by the PhD student at two international scientific forums.



Abstract

The presented abstract for the dissertation is 48 pages long, prepared according to the requirements and reflects the main results achieved in the dissertation.

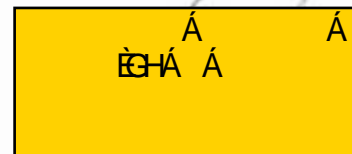
CONCLUSION

The presented dissertation on the topic: "Field and laboratory studies of contagious agalaxia in sheep and goats in Bulgaria" contains enough original and confirmatory scientific contributions. Taking into account the large volume of scientific research carried out, the original results obtained and their promotion in refereed scientific publications, the fulfillment of all the requirements of Law of development the academic staff of Republic of Bulgaria, its Rules, as well as the Regulations for the development of the academic staff at the Trakia University give me reason to evaluate it **POSITIVELY**.

I take the liberty of proposing to the honorable Scientific Jury to also vote positively and award Tsvetomir Genovelov Evstatiev the educational and scientific degree "Doctor" in the scientific specialty "Epizootology, infectious diseases and prevention of infectious diseases in animals".

30.04.2024

Opinion prepared by:



/ Assoc. Prof. Roman Pepovich, DVM, PhD /