



До Председателя на Научно жури
определенено със заповед №
642/22.02.2024 г. на Декана на
Ветеринарномедицински факултет
при Тракийски университет (ТрУ)
гр. Стара Загора

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”

Автор: д-р Цветомир Геновелов Евстатиев, докторант в задочна форма на обучение към Катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести”, Секция „Епидемиология, инфекциозни болести и превантивна медицина” при Ветеринарномедицински факултет към ТрУ - Стара Загора, отчислен с право на защита по докторска програма „Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните”, професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина, област на висшето образование 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина към катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести”

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

Изготвил: чл.-кор. Христо Миладинов Найденски двмн, от Института по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН с компетентност по инфекциозна микробиология, молекулярна биология, имунология, епизоотология, експериментални животински модели.

Декларирам, че не съществуват условия за конфликт на интереси между мен и кандидата д-р Цветомир Геновелов Евстатиев по смисъла на ал. 1, точки 2а, 3, 4 и 5 от ДР на ЗРАСРБ. Предоставените ми дисертационен труд, автореферат и други документи по процедурата за защита са коректно подгответи и съответстват на ЗРАСРБ и на Правилника за неговото приложение в ТрУ – Стара Загора.

Заразната агалаксия е широко разпространено по целия свят инфекциозно заболяване по овцете и козите, причинявано от няколко вида микоплазми и протичащо катоmono- или смесена инфекция. За съжаление заболяването често е недиагностицирано, трудно лечимо, трудно за ерадикация в заразените стада и с големи икономически загуби в районите с интензивно отглеждане на дребни преживни животни. Тези характеристики, заедно с асимптомното носителство, многобройните източници на инфекция, клиничните рецидиви, увеличената употреба на антибиотици и други, подчертават неговата актуалност и значимост за ветеринарната медицина.

Констатирана в Европа преди повече от два века, първите системни проучвания върху заболяването в България започва акад. Стефан Ангелов през 30-те години на миналия век, като заедно с Куюмджиев (1958 г.) създават и ваксина с атенуиран щам на *Mycoplasma agalactiae* - Ag1. По-късно теренни и експериментални проучвания провежда колектив под ръководството на чл.-кор. Александър Тошков, доц. Шабанов, доц. Дачо Тодоров и др., които възпроизвеждат и изучават заболяването при дребните преживни - лактиращи овце, кози и агнета. След 80-те години на миналия век липсват данни за истинското разпространение на заразната агалаксия в стадата у нас, биологичните особености на причинителя, ефективността на диагностичните лабораторни тестове, подходите за контрол на заболяването и неговото икономическо значение. Ето защо настоящото проучване е много навременно и документира редица важни аспекти, повишавайки осведомеността на регулаторните органи, както за вземането на адекватни управленски решения, така и за справяне с предизвикателствата на инфекциозната патология при животните.

Представеният ми за рецензиране дисертационният труд е написан съгласно стандартните изисквания с основни раздели: Увод (1 стр.), Литературен преглед (42 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи

(18 стр.), Резултати 27 стр.), Обсъждане на резултатите (23 стр.), Изводи (1 стр.), Препоръки за практиката (1 стр.), Приноси (1 стр.) и Литературен указател (25 стр.). Най-важните получени резултати са обобщени в 9 извода, а научното и приложно значение е представено в 8 приноса. На база проведените проучвания и анализ на резултатите са представени 4 препоръки, 3 от които се отнасят до практикуващи ветеринарни лекари и 1 до компетентните органи. Научните факти са подходящо онагледени с 19 таблици и 19 цветни фигури, отразяващи резултатите от клиничните, епизоотологичните, молекулярно-биологичните и имунологичните изследвания. За изготвянето на дисертацията е използван широк набор от литературни източници – общо 202 заглавия, от които 51 (25%) са от последните 10 години, като от тях 26 (13%) са от последните 5. Публикациите във връзка с дисертацията са 3 и във всички д-р Евстатиев е първи автор, което е показателно за неговото водещо участие в разработването на темата.

В разделът **Литературен обзор** се представят подробности свързани със същността на заболяването и неговото ветеринарномедицинско и стопанско значение. Специално внимание е отделено на еволюцията в таксономията на причинителите, която бе ревизирана значително през годините, както и върху редица техни общи характеристики – метаболизъм, фактори на патогенност, устойчивост в околната среда, устойчивост към антибиотици и др. В обособен раздел са разгледани епизоотологичните особености на заболяването с акцент върху географското разпространение, възприемчивите видове и категории животни, източниците на инфекция, пътищата и механизмите на предаване на инфекцията, икономическата значимост на заболяването и важните количествени измерители на епизоотичния процес – заболяемост и смъртност. С голямо умение и вещина са описани клиничните форми на болестта и възможният изход. Много компетентно са изложени различните методи за лабораторна диагностика с фокус

върху молекуларно-генетичните методи. В контекста на проведеното изследване са представени и анализирани серологичните методи за диагностика, в т.ч. и тяхната диагностична стойност. Лечението, ваксиналните подходи и възможностите за контрол на заболяването са успешен завършек на цялостното описание на заболяването и показател за доброто познаване на най-новите научни достижения по темата. Тези познания позволяват не само да бъдат успешно изпълнени поставените **Цел и задачи** (общо 5), но и разкриват потенциалното практическо приложение на резултатите. Разделът **Материали и методи** представя богата комбинация от теренни и лабораторни проучвания, подбрани в съответствие с поставените цели и задачи. Обследвани са 8 стопанства с различни технологични, санитарно-хигиенни и епизоотологични параметри, от които са вземани, изследвани и анализирани съответните млечни и кръвни преби. Много добро впечатление прави и прилагането на съвременни молекуларни методи, които обогатяват и надграждат използваните диагностични подходи от една страна, а от друга осигуряват надеждни и сравними резултати. В разделът **Резултати** са представени стегнато и систематизирано получените експериментални данни от клиничните и лабораторни проучвания в 8-те обследвани ферми. Обобщени и анализирани са данните за заболяемост и честотата на проявление на основните клинични признания при отделните видове и възрастови категории животни. Компетентно са описани клиничните симптоми на заболяването от страна на млечната жлеза, ставите и очите, както и проведеното лечение. При най-голям процент от всички заболели овце (85%) бе установен мастит, последван от хипо- или агалаксия. Регистрирани са общо 5 животни с артрит и 14 с паренхиматозен кератит, което е съответно 19% със засягане на ставите и 54% с очни увреждания. Следва да се отбележи, че наблюдаваните очни и ставни симптоми засягат всички технологични и възрастови категории животни. Изследванията върху кози сочат, че в ≈ 92% се

наблюдава мастит, последван от хипо- или агалаксия. Ставни увреждания (най-често артрит) се наблюдава при 21.4%, а очни лезии (конюнктивит, паренхиматозен кератит и др.) при 25.0% от заболелите животни.

За доказване на геномни копия от *Mycoplasma agalactiae* в млечни преби е разработен и подробно описан количествен PCR (qPCR). Обобщените данни от този високо чувствителен и специфичен молекулярен метод показват, че % на положителните преби в стопанства 1-4 варира от 28.6% в стопанство 4 до 70% в стационарното за заразна агалаксия стадо (стопанство 1), като средната стойност е 53.5%.

С подчертано научно-практическо значение са и резултатите от проведените теренни проучвания върху постваксиналния имунен отговор, отчитайки факта, че използването на ваксини за контрол на заразната агалаксия в ендемичните райони е широко използвана практика. Значимостта на настоящата дисертация се подсилва и от факта, че данните от полеви изпитвания на комерсиални продукти са твърде осъкъдни, а още по-малко са и данните за сравнителен анализ на имунореактивността при овцете и козите след ваксинация срещу заразна агалаксия. Нещо повече, проучена е и динамиката на имунния отговор в няколко стада дребни преживни животни, както и различията в постваксиналния имунитет при различни възрастови категории, влиянието на технологията на отглеждане и идентифициране на отделните фактори, повлиявачи силата и продължителността на имунния отговор. Сравнявайки имунният отговор в стадо овце след извършване на противопаразитни третирания и оптимизиране на храненето се установява повишена антитялогенеза, с ясно изразено плато между 7-я и 60-я ден. Резултатите при овце, с предишни ваксинации срещу заразна агалаксия показват, че въпреки различните изходни нива, антителният отговор се повишава бързо през първите две седмици след ваксинацията, след което намалява прогресивно до към 4-я месец. От особен интерес са резултатите относно динамиката на постваксиналния имунен отговор при

овце през зимните периоди (ноември-април), което налага извода и предложението имунизационните програми да се коригират, като ваксинациите се извършват през 4 месеца. Проследявайки имунният отговор при кози се установява тенденция сходна на тази при овцете – наблюдава се бързо повишаване на антителния отговор през първите две седмици след ваксинацията, и прогресивно намаляване до изходните стойности на третия месец. Много сходен е и имунният отговор при козите в двата 6-месечни периода с достигане на съпоставими максимални нива на 14-я ден и последващо плавно понижение до 180-я ден след ваксинацията.

Изследванията при подрастващи дребни преживни показват, че положителен антитялов отговор се достига едва две седмици след реваксинацията. Максимални стойности при агнетата са установени на 90-я ден след второто приложение на ваксината, докато при яретата това настъпва на 60-я ден. Впоследствие се наблюдава понижение, като стойностите в края на периода са близки до тези за възрастните животни от съответния вид в стопанството.

Получените оригинални научни резултати са интерпретирани компетентно и задълбочено в раздела **Обсъждане на резултатите**. Тук се разкриват и уменията на докторанта да анализира резултатите от много комплексни експерименти и същевременно на базата на доброто познаване на темата и световната литература по нея да прави компетентни обсъждания, изводи и заключения. Умелата съпоставка на собствените резултати с тези на други автори от страната и чужбина очертават още по-добре важните приноси на този дисертационен труд за диагностиката, терапията и профилактиката на заразната агалаксия.

Приемам направените 9 извода, които имат фундаментално епизоотологично значение, както и представените приноси на дисертационния труд, разкриващи актуалността на заразната агалаксия като нозологична единица, възможностите на qPCR за надеждна

диагностка, основните клинични прояви при овце и кози, динамиката на антителния отговор след ваксинация с Agalax-S, вкл. при агнета и ярета.

Като участник в разширения Катедрен съвет бях направил някои забележки и препоръки, които са взети под внимание при изготвянето на окончателният вариант на дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е цялостна, логично поставена и прецизно изпълнена работа, с използването на редица добре усвоени класически и съвременни методи. В него ясно се открояват редица оригинални научни и научно-приложни приноси по едно актуално и важно за ветеринарната медицина заболяване.

С това дисертационният труд за присъждане на ОНС и научна степен „Доктор“ на тема „Теренни и лабораторни проучвания на заразната агалакция по овцете и козите в България“ отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и на ПРАСТрУ, поради което препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да гласуват единодушно с положителен вот за присъждане на ОНС „Доктор“ на д-р Цветомир Геновелов Евстатиев по професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина, област на висшето образование 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина.

30.04.2024 г.

София

чл.-кор. Христо Найденски, двмн

Á Á
ЕНА



To the Chairman of the Scientific Jury
determined by order No.
642/22.02.2024 of the Dean of the
Faculty of Veterinary Medicine
at Trakia University (TrU)
Stara Zagora

REVIEW

Author: Dr. Tsvetomir Genovelov Evstatiev, PhD student in part-time study at the Department of "Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases", Section "Epidemiology, Infectious Diseases and Preventive Medicine" at the Faculty of Veterinary Medicine at the Trakia University - Stara Zagora, appointed with the right to defense in the doctoral program "Epizootiology, infectious diseases and prevention of infectious diseases in animals", professional direction 6.4. Veterinary medicine, field of higher education 6. Agricultural sciences and veterinary medicine at the department "Veterinary microbiology, infectious and parasitic diseases".

Topic of the PhD thesis: "Field and laboratory studies of contagious agalactia in sheep and goats in Bulgaria"

Prepared by: Prof. Hristo Miladinov Najdenski, from the "Stephan Angeloff" Institute of Microbiology at the BAS with expertise in infectious microbiology, molecular biology, immunology, epizootology, experimental animal models.

I declare that there are no conditions for a conflict of interest between me and the candidate Dr. Tsvetomir Genovelov Evstatiev within the meaning of paragraph 1, points 2a, 3, 4 and 5 of the Additional Provisions of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria (LDASRB). The dissertation work, author's abstract and other documents for the defense procedure provided to me are correctly prepared and correspond

to the LDASRB and the Regulations for the Development of the Academic Staff in the TrU – Stara Zagora.

Contagious agalaxia is a widespread worldwide infectious disease of sheep and goats, caused by several species of mycoplasma and occurring as a mono- or mixed infection. Unfortunately, the disease is often undiagnosed, difficult to treat, difficult to eradicate in infected herds and with high economic losses in areas with intensive breeding of small ruminants. These characteristics, together with asymptomatic carriage, multiple sources of infection, clinical recurrences, increased use of antibiotics, and others, highlight its relevance and importance for the veterinary medicine.

Established in Europe more than two centuries ago, the first systematic studies on the disease in Bulgaria were started by Academician Stephan Angeloff in the 1930s, and together with Kuyumdzhev (1958) they created a vaccine with an attenuated strain of *Mycoplasma agalactiae* - Ag1 . Later, field and experimental studies were conducted by a team under the leadership of Corr. Member Alexander Toshkov, Assoc.Prof. Shabanov, Assoc.Prof. Dacho Todorov and others, who reproduce and study the disease in small ruminants - lactating sheep and goats, and lambs. Since the 1980s, there has been a lack of data on the true spread of contagious agalaxia in herds in our country, the biological characteristics of the causative agent, the effectiveness of diagnostic laboratory tests, disease control approaches and its economic importance. The present study is therefore very timely and documents a number of important aspects, raising the awareness of regulatory authorities, both for making adequate management decisions and for addressing the challenges of infectious pathology in animals.

The PhD thesis submitted to me for review is written according to the standard requirements with main sections: Introduction (1 page), Literature review (42 p.), Aim and objectives (1 p.), Materials and methods (18 p.), Results 27 p.), Discussion of results (23 p.), Conclusions (1 p.), Recommendations for practice (1 p.), Contributions (1 p.) and References (25

p.). The most important results obtained are summarized in 9 conclusions, and the scientific and applied significance is presented in 8 contributions. Based on the conducted studies and analysis of the results, 4 recommendations are presented, 3 of which refer to practicing veterinarians and 1 to the competent authorities. Scientific facts are appropriately illustrated with 19 tables and 19 color figures reflecting the results of clinical, epizootological, molecular-biological and immunological studies. A wide range of References was used for the preparation of the dissertation - a total of 202 titles, of which 51 (25%) are from the last 10 years, of which 26 (13%) are from the last 5. The publications related to the dissertation are 3 and in all of them, Dr. Evstatiev is the first author, which is indicative of his leading participation in the development of the topic.

In the Literature review section, details related to the nature of the disease and its veterinary medical and economic importance are presented. Special attention is paid to the evolution in the taxonomy of the causative agents, which has been significantly revised over the years, as well as to a number of their common characteristics - metabolism, pathogenicity factors, resistance in the environment, resistance to antibiotics, etc. In a separate section, the epizootological features of the disease are discussed with an emphasis on the geographical distribution, susceptible species and categories of animals, the sources of infection, the ways and mechanisms of infection transmission, the economic significance of the disease and the important quantitative measures of the epizootic process - morbidity and mortality. The clinical forms of the disease and the possible outcome are described with great skill and professionalism. The different methods for laboratory diagnostics are very competently presented with a focus on molecular genetic methods. In the context of the conducted research, the serological methods for diagnosis are presented and analyzed, including their diagnostic value.

Treatment, vaccine approaches and disease control options are a successful completion of the overall description of the disease and an indicator of good knowledge of the latest scientific achievements on the subject. This knowledge allows not only to successfully fulfill the set **Goals and Tasks** (5 in total), but also reveals the potential practical application of the results. The **Materials and Methods** section presents a rich combination of field and laboratory studies, selected in accordance with the set goals and objectives. Eight farms with different technological, sanitary-hygienic and epizootological parameters were surveyed, from which the relevant milk and blood samples were taken, examined and analyzed. A very good impression is also made by the application of modern molecular methods, which enrich and upgrade the used diagnostic approaches on the one hand, and on the other hand provide reliable and comparable results.

In the **Results** section, the obtained experimental data from the clinical and laboratory studies in the 8 investigated farms are presented in a concise and systematized manner. The data on morbidity and the frequency of manifestation of the main clinical signs in individual species and age categories of animals were summarized and analyzed. The clinical symptoms of the mammary gland, joints and eyes disease, as well as the treatment carried out, are competently described. Mastitis followed by hypo- or agalaxia was found in the largest percentage of all affected sheep (85%). A total of 5 animals with arthritis and 14 with parenchymal keratitis were registered, which is respectively 19% with joint involvement and 54% with eye damage. It should be noted that the observed eye and joint symptoms affect all technological and age categories of animals. Studies in goats indicate that mastitis followed by hypo- or agalaxia occurs in ≈ 92%. Joint damage (most often arthritis) was observed in 21.4%, and eye lesions (conjunctivitis, parenchymatous keratitis, etc.) in 25.0% of the affected animals.

Quantitative PCR (qPCR) has been developed and described in detail to detect genomic copies of *Mycoplasma agalactiae* in milk samples. Pooled data

from this highly sensitive and specific molecular method showed that the percent of positive samples in farms 1-4 ranged from 28.6 % in farm 4 to 70% in the stationary herd for contagious agalaxia (farm 1), with a mean value of 53.5 %.

The results of the conducted field studies on the post-vaccination immune response are also of marked scientific and practical importance, taking into account the fact that the use of vaccines to control contagious agalaxia in endemic areas is a widely used practice. The importance of the present thesis is also strengthened by the fact that data from field trials of commercial products are very scarce, and even less are data for comparative analysis of immunoreactivity in sheep and goats after vaccination against infectious agalaxia. Moreover, the dynamics of the immune response in several herds of small ruminants, as well as differences in post-vaccination immunity in different age categories, the influence of husbandry technology and the identification of individual factors influencing the strength and duration of the immune response were also studied. Comparing the immune response in a flock of sheep after performing antiparasitic treatments and optimizing nutrition, an increased antibody genesis was established, with a clear plateau between the 7th and 60th day. Results in sheep with previous vaccinations against infectious agalaxia show that, despite different baseline levels, the antibody response rises rapidly in the first two weeks after vaccination, then declines progressively until around 4 months. Of particular interest are the results regarding the dynamics of the post-vaccination immune response in sheep during the winter periods (November-April), which necessitates the conclusion and the proposal to adjust the immunization programs, with vaccinations being carried out every 4 months. Tracking the immune response in goats shows a trend similar to that in sheep - a rapid increase in the antibody response in the first two weeks after vaccination, and a progressive decrease to baseline values in the third month. The immune response in goats was also very similar in the two 6-month periods, reaching comparable

maximum levels on day 14 and then gradually declining until day 180 post-vaccination.

Studies in adolescent small ruminants show that a positive antibody response is reached only two weeks after revaccination. Maximum values in lambs were found on the 90th day after the second administration of the vaccine, while in kids this occurred on the 60th day. Subsequently, a decrease was observed, with the values at the end of the period being close to those of the adult animals of the respective species on the farm.

The original scientific results obtained are competently and thoroughly interpreted in the **Results Discussion** section. Here, the skills of the PhD student to analyze the results of very complex experiments and at the same time, based on the good knowledge of the subject and the world literature on it, to make competent discussions and conclusions are revealed. The skillful comparison of the own results with those of other authors from the country and abroad outline even better the important contributions of this PhD thesis to the diagnosis, therapy and prevention of contagious agalaxia.

I accept the 9 conclusions made, which have a fundamental epizootological significance, as well as the presented contributions of the dissertation, revealing the relevance of infectious agalaxia as a nosological unit, the possibilities of qPCR for reliable diagnosis, the main clinical manifestations in sheep and goats, the dynamics of the antibody response after vaccination with Agalax-S, incl. in lambs and small goats.

As a participant in the expanded Departmental Council, I had made some remarks and recommendations, which were taken into account when preparing the final version of the dissertation work.

CONCLUSION: The PhD thesis submitted for review is a complete, logically laid out and precisely executed work, using a number of well-learned classical and modern methods. It clearly highlights a number of original

scientific and scientific-applied contributions on a topical and important disease for veterinary medicine.

With this, the PhD thesis for the award of the Educational and Scientific Degree "PhD" on the topic "Field and laboratory studies of infectious agalactia in sheep and goats in Bulgaria" meets the requirements of LDASRB and the Regulations for the Development of the Academic Staff in the TrU, therefore I recommend to the respected members of the Scientific Jury to vote unanimously with a positive vote to award the PhD degree to Dr. Tsvetomir Genovelov Evstatiev in professional direction 6.4. Veterinary medicine, field of higher education 6. Agricultural sciences and veterinary medicine.

А
Б
Г

30.04.2024 г.

Sofia

чл.-кор. Христо Найденски, двМН