

ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ

ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

**Катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и
паразитни болести”**

Цветомир Геновелов Евстатиев

**ТЕРЕННИ И ЛАБОРАТОРНИ ПРОУЧВАНИЯ НА
ЗАРАЗНАТА АГАЛАКСИЯ ПО ОВЦЕТЕ И КОЗИТЕ В
БЪЛГАРИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертация за присъждане на образователната и научна
степен „ДОКТОР”**

*Научна специалност „Епизоотология, инфекциозни болести и
профилактика на заразните заболявания по животните”*

Научен ръководител:

Доц. д-р Владимир Петров

СТАРА ЗАГОРА

2024

Дисертационният труд е написан на 149 страници, Представените резултати са 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.

Дисертационният труд беше обсъден на 29.01.2024 г. от Разширен катедрен съвет, определен със заповед № 81/15.12.2023 г. на Декана на ВМФ, Тракийски Университет и е насочен за защита пред научно жури.

Разработването на дисертационния труд е извършено в катедра “Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести” на Ветеринарномедицински факултет, Тракийски университет – Стара Загора.

Защитата на дисертационния труд ще се състои наот
..... ч. в,
ВМФ, при Тракийски Университет, Стара Загора. Материалите по
защитата на дисертационния труд са на разположение в отдел „Научен“ на
факултета и на интернет страницата на Университета: www.uni-sz.bg.

СЪДЪРЖАНИЕ	Страница
Увод.....	4
Ссобствени изследвания.....	6
Цел и задачи.....	6
Материали и методи.....	7
Стопанства.....	7
Проби.....	8
Клинични проучвания.....	9
Установяване ДНК на <i>M. agalactiae</i> в млечни проби чрез qPCR.	10
Теренни проучвания върху поствакциналния имуноен отговор....	12
<i>Ваксина</i>	12
<i>Опитна постановка</i>	12
<i>Изследвания чрез ензимсвързан имуносорбентен тест</i>	13
Статистически анализ.....	13
Резултати.....	14
Обсъждане.....	35
Изводи.....	44
Препоръки за практиката.....	45
Приноси	46
Публикации, участия в научни форуми и научни проекти във връзка с дисертацията	47
Abstract	48

УВОД

При преживните животни, отглеждани за мляко, възпалителните процеси на млечната жлеза се считат за състоянията с най-сериозни последици по отношение на икономическите загуби, които генерират.

Заразната агалаксия е заболяване, причинявано от няколко вида микоплазми при доминиращата роля на вида *Mycoplasma agalactiae*. Освен класическата триада – засягане на млечната жлеза, ставни и очни симптоми, са описани и други клинични изяви – пневмония, септицемия, аборти. Значението на това заболяване произтича от драстичните последствия върху производството на мляко, увеличената употреба на антибиотици за неговото лечение и много трудното изкореняване в заразените стада.

Дребните преживни животни се отглеждат по целия свят, включително в много страни с ниски доходи, някои от които в момента преминават от традиционни, екстензивни, семейни системи към полуинтензивно или интензивно отглеждане на овце или кози. Тази тенденция прогресивно увеличава риска от проникване и разпространение на заразната агалаксия в стадата. Необходимо е по-добро проучване и документиране на истинското разпространение на болестта в световен мащаб и свързаното с нея икономическо значение за отрасъла за да се подпомогне осведомеността на регулаторните органи и вземането на адекватни управленски решения.

Контролът на заболяването поставя редица предизвикателства по отношение на нарастващата загриженост на потребителите за хуманното отношение към животните. Заболяването засяга физическото състояние на животното (независимо от неговата клинична форма), афективно състояние (с хронично изтощение) и поведенчески нужди, които са компрометирани от мерките наложени с цел ограничаване и ликвидиране на заразната агалаксия.

Част от диагностичните тестове са скъпи и трудни за изпълнение, заболяването по всяка вероятност 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. Това изисква дългосрочна ангажираност, но ерадикацията в повечето случаи е неуспешна, с чести клинични рецидиви. Въпреки чувствителността на етиологичните агенти към определени групи антимикробни средства (макролиди, тетрациклини и др.) се установява продължителното им перзистирание в организма на заразените животни. Наличието на асимптомни носители и многобройните източници на инфекции допринасят за бързото разпространение на болестта и компроментират усилията за превенция.

Лабораторните тестове основани на изолиране и идентифициране на микоплазмите са недостатъчно ефективни за бърза, точна и достъпна диагностика поради високите понякога разходи и недостатъчен експертен опит, което създава необходимост от разработване на нови алгоритми за скринингови и мониторингови изследвания

Все още няма налична универсална ваксина, въпреки огромните усилия за разработването на такава, поне срещу *M. agalactiae*. Следователно все още има належаща нужда от стандартни ваксини с ниска цена и схема за приложение, подходяща за страни с ниски и средни доходи. С напредъка в методите на молекулярната биология, получаването на генетично модифицирани щамове дава надежди за получаването на ваксина, отговаряща на съвременните изисквания.

В заключение, „старата“ болест, появила се в началото на 19 век, ще продължи да изисква съвместни ангажименти от животновъдите, ветеринарните лекари, учените и регулаторните органи и през следващите десетилетия.

СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на изследванията беше 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 имунен отговор срещу този патоген при дребни преживни животни.

За постигане на тази цел си поставихме за разрешение следните задачи:

1. Да се опишат и сравнят по честота на проявление установените клинични признаци според биологичния вид, възрастта, пола и физиологичното състояние на засегнатите животни.

2. Да се изследват млечни проби получени от три категории животни: 1) клинично болни; 2) ваксинирани и 3) клинично здрави дребни преживни, отглеждани в заразени стада за наличие на ДНК на *M. agalactiae* чрез qPCR.

3. При теренни условия да се проследи динамиката в имунния отговор след ваксинация срещу заразна агалаксия в няколко последователни периода, при различни видове и възрасти дребни преживни животни, като се проучат разликите, обусловени от биологичния вид.

4. Да се сравни ваксиналния хуморален имунен отговор след ваксинация срещу заразна агалаксия при един и същи вид дребни преживни животни, отглеждани в различни стопанства, без клинична изява на заразна агалаксия.

5. Да се сравнят данните за ваксиналния хуморален имунен отговор след ваксинация срещу заразна агалаксия при подрастващи животни, отглеждани в различни стопанства, без клинична изява на заразна агалаксия ваксинирани еднократно и такива с реваксинация.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Стопанства

Теренните изследвания бяха проведени в 8 стопанства за дребни преживни животни. В първите 4 бяха проведени клинични и етиологични проучвания посредством qPCR. Други 4 стада дребни преживни животни, в които не бяха установени клинични признаци на заразна агалаксия, бяха включени в изследванията на поствакциналния имунен отговор. От животните в тях бяха получени общо 24 млечни проби, изследвани чрез qPCR и 1028 серумни проби за проследяване на поствакциналния имунен отговор.

Някои основни характеристики на отделните стопанства са представени в таблица 1.

Таблица 1. Някои основни характеристики на стопанствата с дребни преживни животни включени в изследванията.

	Вид на отглежданите животни	Начин на отглеждане	Хранене
Стопанство 1	1 200 кози	Изцяло оборен режим	Целодажбена смеска
Стопанство 2	82 овце 3 коча	Оборен режим и на паша	Паша, концентриран фураж и сено
Стопанство 3	200 кози 7 пръча 150 овце 6 коча	Оборен режим и на паша	Паша, люцерново, ливадно сено, концентриран фураж
Стопанство 4	300 кози 9 пръча	Оборен режим и на паша	Паша, сено, силаж, зърнени смеси
Стопанство 5	55 овце 10 кози	Оборен режим и на паша	Паша, люцерново сено, концентриран фураж
Стопанство 6	24 овце	Оборен режим и на паша	Паша, люцерново, ливадно сено, концентриран фураж
Стопанство 7	190 овце 60 кози	Оборен режим и на паша	Паша сено, концентриран фураж
Стопанство 8	35 овце 12 кози	Оборен режим и на паша	Паша, люцерново, ливадно сено, концентриран фураж

Проби

От стопанство № 1 бяха получени 20 млечни проби от клинично здрави кози, които при предходната лактация са били с мастит, хипо- или агалаксия.

След клинични прегледи от животните в стопанства от №№ 2, 3 и 4 бяха получени общо 23 млечни проби. Всички дребни преживни животни, от които бяха получени тези проби бяха с клинични признаци на мастит или хипогалаксия. Част от млечните секрети бяха с жълтенкав или кървав цвят, други бяха с водниста консистенция и наличие на утайка на дъното на контейнерите.

В стопанства №№ 5, 6, 7 и 8 бяха подбрани по 6 животни на възраст минимум 4 години, от които бяха получени общо 24 млечни проби.

Пробите бяха събирани в стерилни контейнери след асептична подготовка на млечната папила и изхвърляне на първите струйки мляко.

Всички, общо 67 млечни проби бяха изпозвани за молекулярно-генетична диагностика, базирана на qPCR. Пробите бяха транспортирани при 4-8°C до молекулярно-генетичната лаборатория на катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести” към Ветеринарномедицински факултет на Тракийски университет.

За серологичните изследвания на поствакциналния отговор бяха изследвани 1 028 кръвни проби, получени от югуларната вена на всички 68 опитни животни. Венозна кръв беше получавана с помощта на вакуумтейнери без антикоагулант. Серумът беше отделян чрез центрофугиране при 1000 г^m-1 за 5 минути и съхраняван при -20°C до извършването на анализите. Броят на тестваните проби по видове, възрасти и стопанства е представен в табл. 2.

Таблица 2. Разпределение на изследваните серумните проби по стопанства, видове дребни преживни животни и възрасти.

Стопанство №		Овце	Кози	Агнета	Ярета	Общо
5	Брой животни	8	8	6	6	28
	Брой проби	200	136	54	54	444
6	Брой животни	8	0	0	0	8
	Брой проби	136	0	0	0	136
7	Брой животни	12	8	0	0	20
	Брой проби	204	136	0	0	340
8	Брой животни	0	0	6	6	12
	Брой проби	0	0	54	54	108
Общо	Брой животни	28	16	12	12	68
	Брой проби	540	272	108	108	1 028

Клинични проучвания

Клиничните наблюдения бяха провеждани при спонтанни случаи. Бяха проследени по едно избухване на заболяване със симптоматика характерна за заразна агалаксия в 3 промишлено организирани ферми (стопанства 2, 3 и 4). Честотата на проявление на клиничните симптоми беше определена при 201 заболели животни (147 кози и 54 овце).

При всеки случай бяха отчитани промените в общото състояние, проявите от страна на млечната жлеза, опорно-двигателния апарат и очите.

От общите признаци на боледуване бяха описвани наличието или отсъствието на апетит, фебрилитет, състоянието на охранеността, отклонения в поведението и др.

Акцентираще се още върху характера и тежестта на възпалителните процеси във вимето, наличието и развитието на хипо- или агалаксия, количество, цвят и консистенция на млечния секрет. Извършваше се палпаторно изследване за установяване образуването на абсцеси, плътни участъци в тъканта на жлезата и реакцията на регионалните лимфни възли.

Оценявано беше наличието и степента на куцота. При инспекцията на ставите се търеше оток, съпроводен с темперираност, болезненост, флукуация или фистулиране на една или повече стави, както и появата на синовити, и тендовагинити.

При клиничния преглед на очите бяха търсени признаци на хиперемия и едем на клепачите, конюнктивит и кератит със съответстващата им усилена лакримация, светлобоязън, и блефароспазъм.

За изчисляване на заболяемостта използвахме формулата:

$$\text{Заболяемост} = \frac{\text{Общ брой заболели животни}}{\text{Общ брой възприемчиви животни}} \times 100$$

Установяване ДНК на *M. agalactiae* в млечни проби чрез qPCR

За извличане на ДНК използвахме комплекта DNeasy Blood Tissue (Qiagen Германия) и технологията със въртяща се колона. Екстракцията на ДНК се извършва, както е описано в инструкциите на производителя с модификация, подобна на тази, използвана от Volk et al., (2014) за предварителна подготовка на пробите. Модификацията се състои в следното: първоначалната стъпка включва центрофугиране за 10 минути при 14 000 rpm на 1 ml от всяка проба от мляко. След това супернатантата се декантира. Пелетата, която остава, се използва като изходен пробен материал.

qPCR анализите за откриване на *Mycoplasma agalactiae* бяха извършени със Stratagene Mx3000P QPCR система (Agilent Technologies). Използвахме предварително валидирания MucAga dtec-qPCR комплект на компанията (Genetic PCR solutions™, Испания), следвайки препоръките на производителя. Термичният профил на реакцията на амплификация включваше следните стъпки - денатурация при 95°C за 10 минути и следващата стъпка включваше 3 етапа, повторени в 40 цикъла, както е представено в табл. 3.

Таблица 3. Етапи на амплификационната реакция

Стъпки	Време	Температура	
40 цикъла	Активиране	60 секунди	95°C
	Денатуриране	10 секунди	95°C
	Хибридизация/удължаване и получаване на резултат	60 секунди	60°C

При интерпретацията на резултатите използвахме C_t стойностите на позитивната контрола, която беше 29. За положителен резултат приемахме стойност на C_t на пробата \leq от тази на позитивната контрола. Проби, чиито стойностите на C_t бяха по-високи от тези на положителната контрола бяха определени като отрицателни (табл. 4).

Таблица 4. Критерии при интерпретация на резултатите.

Позитивна контрола	Проба	Отрицателна контрола	Отрицателна контрола за	Контрола за инхибиране на	Интерпретация
-	+/-	+/-	+/-	+/-	Изследването е провалено
+	+	+	+/-	+/-	PCR реагентите са контаминирани
		-	+	+/-	Възможна контаминация при екстрахирането
		-	-	+	Позитивни проби
+	-	-	-	+	Негативни проби
				-	Инхибиране на PCR реакцията

Теренни проучвания върху поствакциналния имунен отговор.

За изследването на поствакциналния отговор при различни възрастови категории дребни преживни животни бяха получени и изследвани 1 028 серумни проби (табл. 2), получени от 28 овце (общо 540 серумни проби), 16 кози (272 проби), 12 агнета (108 проби) и 12 ярета (108 проби).

Ваксина

Използвана беше комерсиална, инактивирана с фенол, комбинирана ваксина Agalax-S с адювант алуминиев хидроксид (Laboratorio SYVA), съхранявана при условия изискани от производителя. Схемата за ваксинация в проспекта на продукта предвижда първо приложение в доза 2 мл на животно, при мъжки и женски индивиди, предназначени за разплод на възраст 2-3 месеца. Ревакцинация в същата доза след 2-4 седмици и бустеримунизации на всеки 4-6 месеца, в зависимост от риска.

Опитна постановка

В изследването бяха включени общо **68** животни от които **28 овце, 16 кози и по 12 агнета и ярета**. Всички възрастни дребни преживни бяха от стада, в които се провеждаха профилактични ваксинации срещу заразна агалаксия. Изследваните възрастни овце и кози бяха част от основните стада на стопанства 5, 6 и 7. В периода преди започване на проучването всички те бяха получили поне по една бустер доза ваксина срещу заразна агалаксия. Агнетата и яретата от стопанство 5 бяха родени от ваксинирани майки. От стопанство 8 бяха включени 6 агнета и 6 яретата родени от неваксинирани овце.

Експерименталния период при възрастните овце и кози беше разделен на шест месечни сегменти, съобразно приетата в стопанството схема на ваксинация срещу заразна агалаксия.

От всички опитни животни бяха получавани кръвни проби от v. jugularis в деня на ваксинацията (0-ев ден), и още на 3, 7, 14, 30, 60, 90, 120, 180-ия ден след това. Нулевият ден на следващия 6 месечен период, съвпаднаше със 180-ия ден на предходния,

когато се извършваше поредната бустервакцинация в съответното стадо.

При агнетата и яретата в *Стопанство №5* на 14-ия ден от първата вакцинация беше извършена ревакцинация.

Изследвания чрез ензимсвързан имуносорбентен тест (ELISA)

Изследването на пробите беше извършено с комерсиален кит за индиректна ELISA – ID Screen Indirect *Mycoplasma agalactiae* (IDvet, 310, rue Louis Pasteur – Grabels – France), следвайки инструкциите на производителя.

Микроплаката четяхме при 450 nm с ELISA ридер LEDETEC LABEXIM PRODUKTS.

Интерпретацията на резултатите правихме, като за всяка проба калкулирахме S/P процент като използвахме следната формула:

$$S/P\% = \frac{OD \text{ на пробата} - OD \text{ на негативната контрола (NC)}}{OD \text{ на позитивната контрола (PC)} - OD \text{ NC}} \times 100$$

Проби със S/P% $\leq 50\%$ се считаха за негативни (отрицателни), проби със S/P% по висок от 50% и същевременно по-нисък от 60% се считаха за съмнителни, а проби със S/P% по-висок или равен на 60% бяха определяни като позитивни.

Статистически анализ

Данните бяха анализирани с помощта на 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. $P < 0,05$ се счита за статистически значим.

Доверителните интервали (confidence limits 95%) бяха определени с помощта на статистически софтуер GraphPad InStat v. 3.00 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

РЕЗУЛТАТИ

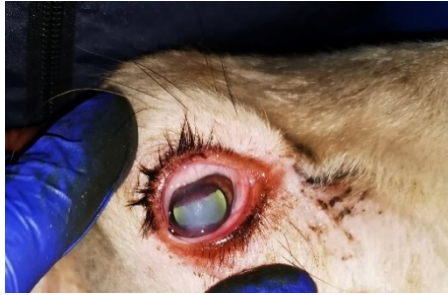
Клинични проучвания

Стопанство 2

За период от около 45 дни бяха засегнати 22 женски, лактиращи животни. При всички тях беше установено влошаване на общото състояние, наличие на оток, темперианост и болезненост на млечната жлеза. При 14 бяха засегнати и двата дяла, а при 8 болестния процес беше едностранен. Секретът от засегнатите дялове на млечната жлеза беше с жълтеникав оттенък, с млечни коагулуми, понякога кървав, но винаги в намалено количество. Общо при 4 овце болестния процес завърши с тотална агалаксия, а при 18 с хипогаксия. В млечните жлези на повечето животни бяха установени огнищни втвърдявания на тъканта и уголемяване на супрамамарните лимфни възли. В следствие беше установена атрофия на вимето с твърди, неболезнени, нефлукуиращи образувания в паренхима на жлезата.

Въпреки, че в предварителният разговор (преди посещение в стопанството) стопанинът не съобщаваше за артикуларни или очни симптоми, в следствие осем лактиращи женски овце, освен засягане на вимето показваха и паренхиматозен кератит, а четири бяха с артрити. При две от последните бяха увредени двете тарзални стави, една беше с едностранен гонартрит, четвъртата с увреждане на една от карпалните стави. Ставите на заболелите животни бяха топли, болезнени и отекли, поради натрупването на синовиална течност. Тежестта на симптомите варираше от лека куцота до тежко състояние, затрудняващо движението при една от овцете с артрит на двете тарзални стави). Това животното не можеше за стои изправено.

Очните симптоми варираха от лек, серозен конюнктивит до паренхиматозен кератит (фиг. 1) на едното или на двете очи. При 4 животни след отшумяване на острите признаци останаха трайни увреди в засегнатите очи.



Фигура 1. Паренхиматозен кератит при овца от стопанство 2

При 4 от ремонтните, нелактиращи овце беше наблюдаван кетатит, а при една и едностранен артрит на тарзална става. Мъжките, разплодни животни бяха без клинични признаци на заразна агалаксия.

При засегнатите животни беше започнато лечение с Lincomycin-Spectinomycin 5/10 (Alfasan, International; Holland), в доза 1 мл на 10 килограма живо тегло, инжектиран мускулно. Курсът на третиране беше до отшумяване на клиничните симптоми, но не по-малко от 7 дни. При контактните, метафилактията със същият химиотерапевтик беше с продължителност 5 дни.

Обобщените данни за заболяемост и честотата на проявление на основните клинични признаци при отделни възрастови категории са представени в таблици 5 и 6.

Мастит, последван от хипо- или агалаксия установихме при 22 от заболелите 26 овце. Това представляваше изява на този симптом при близо 85% от всички заболели. Ние регистрирахме общо 5 животни с артрит и 14 с паренхиматозен кератит - съответно 19% със засягане на ставите и 54% с очни увреждания. В това стадо симптоми от страна на вимето установихме при около 32% от всички 64 лактиращи животни. Нашите резултати показваха 6% честота на окуларните и 16.5% на артикуларните увреди сред всички 85 (64 лактиращи, 18 ремонти и 3 коча) възприемчиви животни.

Таблица 5. Заболяемост при овците от стопанство 2 по възрастови категории

Овце (n=82) на възраст	С клинични признаци	Заболяемост
< 1 година (n=18)	4	22.2%
1-4 години (n=38)	18	47.4%
> 4 години (n=26)	4	22.2%
Общо (n=82)	26	31.7%

Таблица 6. Клинични признаци на заразна агалаксия при овците в стопанство 2 и честота на проявлението им.

Овце (n=26) на възраст	Клиничен признак											
	Мастит		Хипогалаксия		Агалаксия		Атрофия на млечната жлеза		Артрит		Паренхиматозен кератит	
	n	% (CL*)	n	% (CL)	n	% (CL)	n	% (CL)	n	% (CL)	n	% (CL)
< 1 година (n=4)	0	0 (0.0÷60.2)	0	0 (0.0÷60.2)	0	0 (0.0÷60.2)	0	0 (0.0÷60.2)	1	25 (0.6÷80.6)	4	100 (39.8÷100)
1-4 години (n=18)	18	100 (81.5÷100)	16	88.9 (81.5÷100)	2	11.1 (1.4÷34.7)	2	11.1 (1.4÷34.7)	3	16.7 (3.6÷41.4)	8	44.4 (21.5÷69.2)
> 4 години (n=4)	4	100 (39.8÷100)	2	50 (81.5÷100)	2	50 (81.5÷100)	2	50 (81.5÷100)	1	25 (0.6÷80.6)	2	50 (81.5÷100)

*CL - Confidence limit (доверителен интервал)

Стопанство 3

В това стопанство клинични симптоми характерни за зарзна аглаксия бяха установени при 64 кози и 28 овце. Заболяемостта съответно беше 32% и 18.7%.

Отново голяма част от животните показваха едновременно засягане на млечната жлеза, ставите и очите. Заболяемостта и честотата на проявление за отделните признаци при различните възрастови категории са обобщени в таблици 7 и 8.

Таблица 7. Заболяемост при овцете и козите от стопанство 3 по възрастови категории

Кози (n=200) на възраст	С клинични признаци	Заболяемост
< 1 година (n=30)	4	13.3%
1-4 години (n=90)	36	40.0%
> 4 години (n=80)	24	30.0%
Общо (n=200)	64	32%
Овце (n=150) на възраст	С клинични признаци	Заболяемост
< 1 година (n=25)	3	12.0%
1-4 години (n=70)	14	20.0%
> 4 години (n=55)	11	20.0%
Общо (n=150)	28	18.7%

Таблица 8. Клинични признаци незарзна агалаксия при овцете и козите в стопанство 3 и честота на проявлението им.

Кози (n=64) на възраст	Клиничен признак											
	Мастит		Хипоагалаксия		Агалаксия		Атрофия на млечната жлеза		Артрит		Паренхиматозен кератит	
	n	% (CL*)	n	% (CL)	n	% (CL)	n	% (CL)	n	% (CL)	n	% (CL)
< 1 година (n=4)	0	0 (0÷60.2)	0	0 (0÷60.2)	0	0 (0÷60.2)	0	0 (0÷60.2)	3	75 (18.4÷99.4)	4	100 (39.8÷100)
1-4 години (n=36)	18	100 (81.5÷100)	16	88.9 (81.5÷100)	2	11.1 (1.4÷34.7)	2	11.1 (1.4÷34.7)	3	16.7 (3.6÷41.4)	8	44.4 (21.5÷69.2)
> 4 години (n=24)	4	100 (39.8÷100)	2	50 (81.5÷100)	2	50 (81.5÷100)	2	50 (81.5÷100)	1	25 (0.6÷80.6)	2	50 (81.5÷100)
Овце (n=28) на възраст	Клиничен признак											
	Мастит		Хипоагалаксия		Агалаксия		Атрофия на млечната жлеза		Артрит		Паренхиматозен кератит	
	n	% (CL*)	n	% (CL)	n	% (CL)	n	% (CL)	n	% (CL)	n	% (CL)
< 1 година (n=3)	0	0 (0÷70.8)	0	0 (0÷70.8)	0	0 (0.0÷70.8)	0	0 (0.0÷70.8)	1	33.3 (0.8÷90.6)	3	100 (29.4÷100)
1-4 години (n=14)	14	100 (76.8÷100)	10	71.4 (41.9÷91.6)	4	28.6 (8.4÷58.1)	4	28.6 (8.4÷58.1)	8	57.1 (28.9÷82.3)	1	7.1 (0.2÷33.9)
> 4 години (n=11)	11	100 (71.5÷100)	6	54.6 (23.4÷83.3)	5	45.5 (16.8÷76.6)	2	18.2 (2.3÷51.8)	5	45.5 (16.8÷76.6)	2	18.2 (2.3÷51.8)

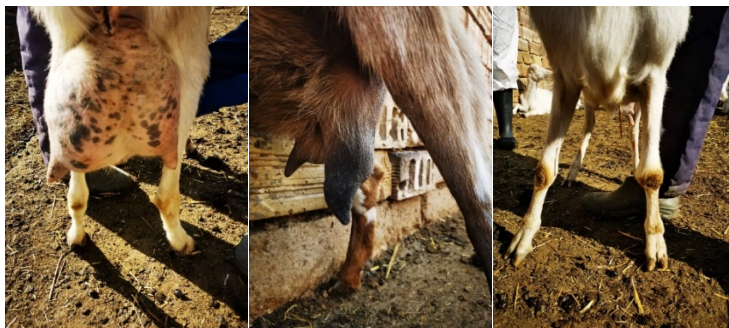
*CL - Confidence limit (доверителен интервал)

Първоначално симптоматика беше установена при козите, а след около 10 дни и при овцете. След констатиране на заболяването беше стартирано лечение с препарат съдържащ тилозин (Tylovet B 200, Biovet) в доза 3 мл на 50 на килограм живо тегло приложен мускулно. Курсът на лекуване беше до отшумяване на клиничните симптоми, но не по-малко от 7 дни. При контактните метафилактичното третиране беше 5 дни.

Клинични признаци – артрити и конюнктивити при мъжките разплодни животни не бяха установени.

От заболелите 64 кози, мастит, последван от хипо- или агалаксия беше установен при 60 животни (93.8%). Ставни уреждания (артрит) наблюдавахме при 12 (18.8%), а очни лезии при 8 (12.5% от заболелите). Съответно симптоми от страна на вимето установихме при около 35% от всички 170 лактиращи животни, артрити при 6% и кератит при 4% от всички възприемчиви (фиг. 2)..

Въпреки, че заболяемостта при овцете беше по-ниска 25 (89.3%) от 28 животни с клиника бяха с мастит, 14 (50%) с артрит и 6 (21.4%) с кератит. От Възприемчивите това представляваше 14,3%, 9.3% и 4%.



Фигура 2. Мастит, атрофия на млечната жлеза с огнищни втвърдявания на тъканта и двустранен артрит на карпалните стави при кози от стопанство 3

Стопанство 4

И в това стопанство клиничната симптоматика включваше признаци от страна на млечната жлеза, ставите и очите. От общо 300 кози, с явна инфекция бяха 83 женски животни, а заболяемостта беше 27.7%. Отново част от животните показваха едновременно засягане на млечната жлеза, ставите и очите. Заболяемостта и честотата на проявление за отделните признаци и при различните възрастови категории са обобщени в таблици 10 и 11. В това стопанство при един от пръчовецете беше установен едностранен паренхиматозен кератит.

След констатиране на боледуване при първите животни беше стартирано лечение с Tylovet B 200, Biovet в доза 4 мл на 50 на килограма живо тегло, приложен мускулно. Курсът на лечение беше до отшумяване на клиничните симптоми, но не по-малко от 7 дни. При контактните метафилактичните теретиране беше 5 дни.

От заболелите 83 кози, мастит, последван от хипо- или агалаксия беше установен при 76 (91.6%). Ставни увреждания (артрит) наблюдавахме при 18 (21.4%), а очни лезии при 21 (25.0%) от заболелите. Съответно симптоми от страна на вимето установихме при 29.2% от всички 260 лактиращи животни, артрити при 5.8% и кератит при 6.8% от всички възприемчиви (табл. 9 и 10).

Таблица 9 .Заболяемост при козите от стопанство 4 по възрастови групи.

Кози (n=300) на възраст	С клинични признаци	Заболяемост
< 1 година (n=40)	7	17.5%
1-4 години (n=140)	41	29.3%
> 4 години (n=120)	35	29.2%
Общо (n=300)	83	27.7%

Таблица 10. Клинични признаци на заразна агалаксия при козите в стопанство 4 и честота на проявлението им.

Кози (n=83) на възраст	Клиничен признак											
	Мастит		Хипогалаксия		Агалаксия		Атрофия на млечната жлеза		Артрит		Паренхиматозен кератит	
	n	% (CL*)	n	% (CL)	n	% (CL)	n	% (CL)	n	% (CL)	n	% (CL)
< 1 година (n=7)	0	0 (0.0÷41.0)	0	0 (0.0÷41.0)	0	0 (0.0÷41.0)	0	0 (0.0÷41.0)	3	42.9 (9.9÷81.6)	5	71.4 (29.0÷96.3)
1-4 години (n=41)	41	100 (91.4÷100)	19	46.3 (30.7÷62.6)	22	53.7 (37.4÷69.3)	13	31.7 (18.1÷48.1)	7	17.1 (7.2÷32.1)	6	14.6 (5.6÷29.2)
> 4 години (n=35)	35	100 (90.0÷100)	22	62.9 (44.9÷78.5)	13	37.1 (21.5÷55.1)	8	22.9 (10.4÷40.1)	8	22.9 (10.4÷40.1)	11	31.4 (16.9÷49.3)

*CL - Confidence limit (доверителен интервал)

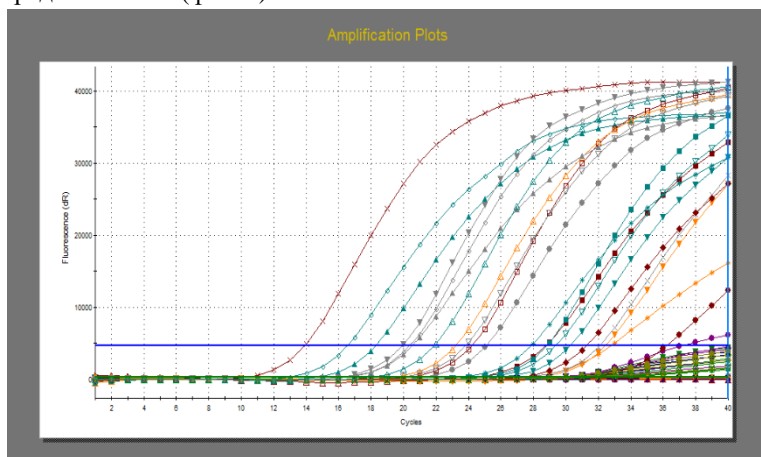
Установяване ДНК на *M. agalactiae* в млечни проби чрез qPCR

Стопанство 1

От изследваните 20 млечни проби 14 (70%) показаха Ct стойности по-малки от тези на позитивната контрола и бяха определени като положителни. Останалите 6 (30%) бяха отрицателни. Амплификационни плотове и Ct стойностите са представени на (фиг. 4).

Стопанство 2

От изследваните 6 млечни проби 4 (66.7%) показаха Ct стойности по-малки от тези на позитивната контрола и бяха определени като положителни. Останалите 2 (33.3%) бяха отрицателни. Амплификационни плотове и Ct стойностите са представени на (фиг. 3).



Фигура 3. Амплификационни плотове и Ct стойностите установени при млечни проби от стопанства 1 и 2

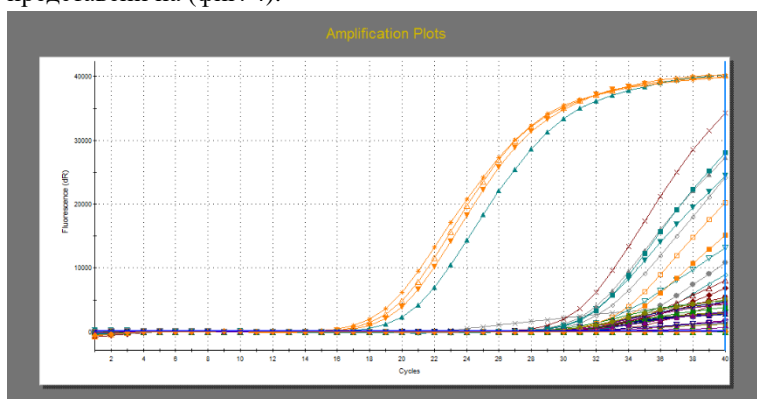
Стопанство 3

От изследваните 10 млечни проби 3 (30%) показаха Ct стойности по-малки от тези на позитивната контрола и бяха

определени като положителни. Останалите 7 (70%) бяха отрицателни. Амплификационни плотове и Ct стойностите са представени на (фиг. 5).

Стопанство 4

От изследваните 7 млечни проби 2 (28.6%) показаха Ct стойности, по-малки от тези на позитивната контрола и бяха определени като положителни. Останалите 5 (71.4%) бяха отрицателни. Амплификационни плотове и Ct стойностите са представени на (фиг. 4).



Фигура 4. Амплификационни плотове и Ct стойностите установени при млечни проби от стопанства 3 и 4

Обобщените данни от qPCR изследването за *M. agalactiae* показаха, че процента на положителни проби варира от 28.6% в стопанство 4 до 70% в стационарното за заразна агалаксия стадо. Средната стойност беше 53.5%. Броят на положителните и отрицателните проби, процентното разпределение и доверителните интервали са представени в табл. 11.

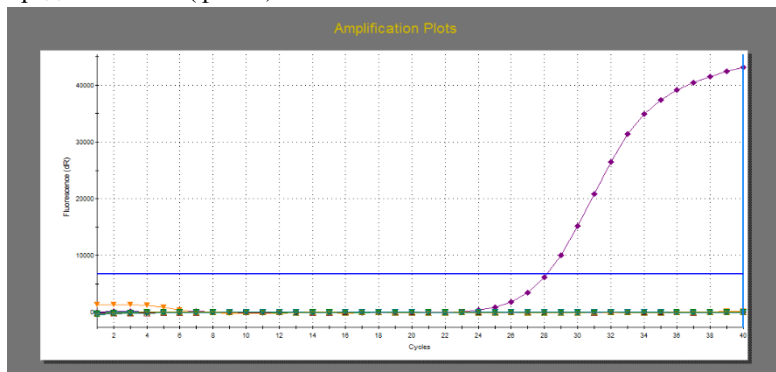
Табл. 11. Брой на положителните и отрицателни проби, и тяхното процентно разпределение при изследването с qPCR за *M. agalactiae* на млечните проби от стопанства 1-4.

Стопанство	Тествани проби	qPCR (+)	% (CL*)	qPCR (-)	% (CL)
1	20	14	70 (47.7÷88.1)	6	30 (11.9÷54.3)
2	6	4	66.7 (22.3÷95.7)	2	33.3 (4.3÷77.7)
3	10	3	30 (6.7÷65.3)	7	70 (34.8÷93.3)
4	7	2	28.6 (3.7÷71.0)	5	71.4 (29.0÷96.3)
Общо	43	23	53.5 (37.7÷68.8)	20	46.5 (31.2÷62.3)

*CL - Confidence limit (доверителен интервал)

Двадесетте отрицателните по qPCR за геном на *M. agalactiae* проби показаха Ct стойности по-високи от тези на позитивната контрола. При 13 Ct варираше от 29.43 до 36.92, а при останалите 7 до 40-тия цикъл Ct не беше установена.

Всички 24 проби от стопанства 5-8 (мониторинг на пост ваксиналният имунитет) бяха отрицателни. При никоя от тях не установихме наличие на амплификационни продукти до 40-тия цикъл. Амплификационни плотове и Ct стойностите са представени на (фиг. 5).



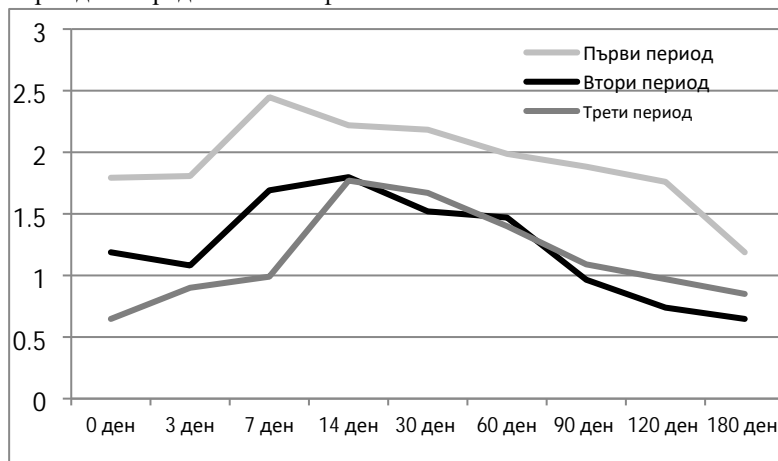
Фигура 5. Амплификационни плотове и Ct стойностите установени при млечни проби от стопанства 5-8

Теренни проучвания върху поствакциналния имунен отговор.

Стопанство 5

Резултатите от серологичното изследване при овцете (n=8) показаха плавно повишение имунния отговор до 14 ден след ваксинацията, последвано от понижение. Стойности близки до изходните бяха достигнати на 120-ия ден след ваксинацията. През първия период (11.2018-04.2019) максималните нива бяха достигнати още на 7-ия ден, без да са статистически достоверно по-високи от тези през втория период (05.2019-10.2019) на същия ден (фиг. 6). Статистически достоверна разлика установихме само на 7-ия ден между първия и третия период (11.2019-04.2020) на изследването ($P<0.05$). Всички OD стойности през първите 6 месеца от изследването бяха по-високи от тези на съответните дни, през останалите два 6 месечни сегмента.

Обобщените резултати за овцете от трите експериментални периода са представени на фиг. 6.



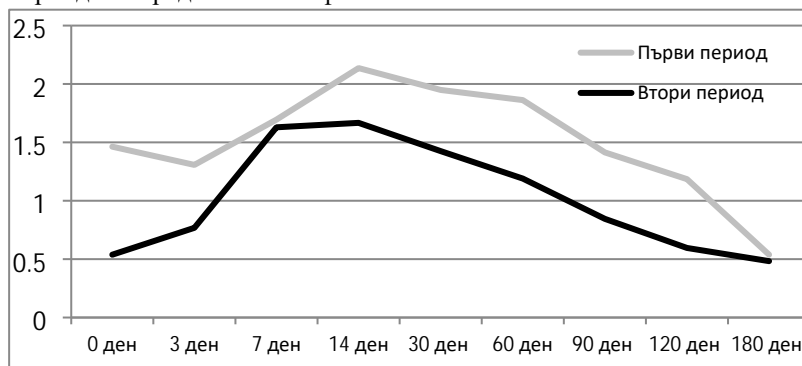
Фигура 6. Динамика в стойностите на OD при овцете (n=8) в стопанство 5.

При изследване на пробите от кози (n=8) тенденциите в динамиката на антителния отговор също бяха сходни – повишение

през първите седмици след ваксинаци, последвано от плавно понижение, с достигане на изходните нива около 90 дни след ваксинацията. На 180-ия ден от експерименталния период стойностите на OD бяха около два пъти по-ниски от изходните. Не бяха установени статистически достоверни разлики при сравнение на отделните резултати през този период (11.2018-04.2019).

През втория 6 месечен период (05.2019-10.2019), въпреки по-ниските изходни нива имунният отговор се повиши рязко след ваксинацията, достигайки максимум отново на 14-ия ден. Повишението беше статистически достоверно при сравняването на 0-ев със 7-ия и 14-ия ден ($P < 0.05$) и 3-ия със 7-ия и 14-ия ден ($P < 0.05$). Последва понижение, като стойности близки до началните за първия период бяха достигнати на 90-ия ден (80.5 ± 14.7) от втория период.

Обобщените резултати за козите от двата експериментални периода са представени на фиг. 7.



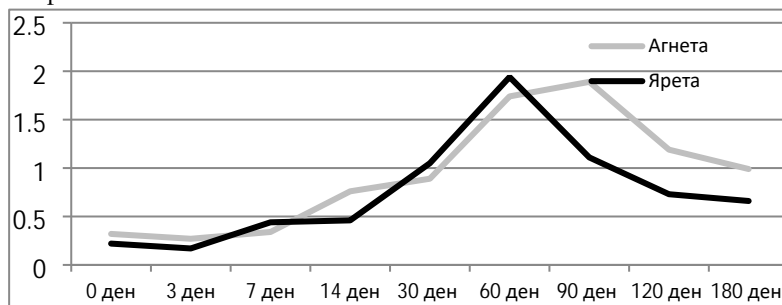
Фигура 7. Динамика в стойностите на OD при козите ($n=8$) в стопанство 5.

Изследванията при подрастващите дребни преживни показваха, че нива максималните стойности при агнетата бяха установени на 90-ия ден след второто приложение на ваксиналния продукт, докато при яретата това се случи на 60-ия ден. Последва рязък спад на 90-ия и по-плавно понижение до 180-ия ден. Стойностите на OD в края на периода бяха близки до тези при възрастните животни, от съответния вид в стопанството.

Статистически достоверни разлики, при агнетата (n=6) бяха установени при сравняването на резултатите от 14-ия и 30-ия ден, с тези на 0-ия, 3-ия и 7-ия при P<0.05. Стойностите след 60-ия ден бяха статистически достоверно по-високи от тези през първите две седмици при P<0.001. Достоверно по-високи стойности при агнетата, спрямо яретата бяха установени само на 90-ия ден от експерименталния период с P<0.001, и на 120-ия с P<0.05.

При яретата (n=6) стойностите на 30-ия, 60-ия и 90-ия ден бяха статистически достоверно по-високи от изходните при P<0.001, а тези от 120-ия и 180-ия при P<0.05

Обобщените резултати за агнетата и яретата са представени на фиг. 8.

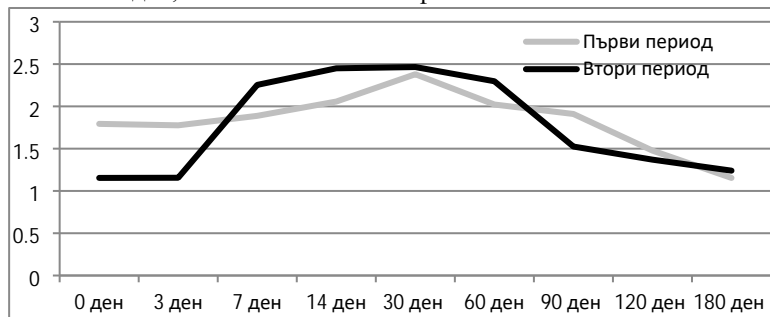


Фигура 8. Сравнение в стойностите на ОД при агнета (n=6) и ярета (n=6) след вакцинация срещу заразна агалаксия.

Стопанство 6

При това стадо през първия 6 месечен период (11.2018-04.2019) повишението в ОД стойностите беше по-плавно и максимум беше достигнат на 30-ия след вакцинацията. Понижение до началните нива беше установено на 120-ия ден. Статистически достоверна разлика, спрямо изходните нива установихме в периода 30-60-ия ден (P<0.05). Малко по-различни бяха резултатите през втория период (05.2019-10.2019). Началните нива на ОД бяха пониски от тези през първия период. Установените от 14-ия до 90-ия ден стойности, бяха достоверно по-високи (P<0.05) от началните. До края на експерименталния период ОД стойностите останаха по-

високи от изходните. При сравняване на имунния отговор се наблюдаваха сходни тенденции - достигане на максимални, нива на 30-ия ден и последващо плавно понижение до близки стойност на шестия месец след имунизацията, през втория период повишението в OD стойностите беше по-бързо и с по-изравнено плато, между 7-ия и 60-ия ден, както е показано на фиг. 9.



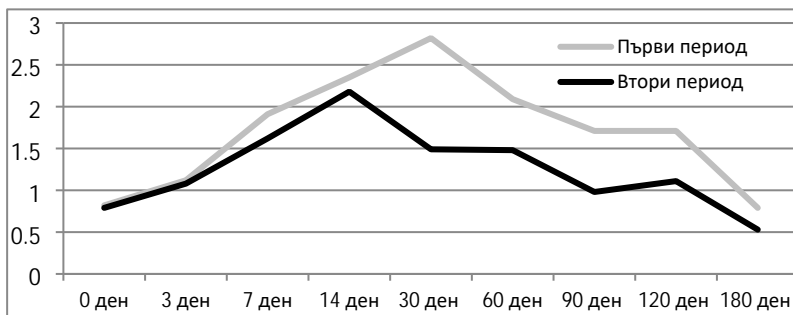
Фигура 9. Динамика в стойностите на OD при овцете (n=8) в стопанство 6.

Стопанство 7

При това стадо през първия 6 месечен период (11.2018-04.2019) повишението в OD стойностите при овцете (n=12) беше рязко и достоверно по-високи нива бяха достигнати още на 7-ия ден ($P < 0.01$), а максималните стойности регистрирахме на 30-ия ден след ваксинацията. Началните нива бяха достигнати на 180-ия ден. Статистически достоверна разлика, спрямо изходните нива установихме в периода 7-120-ия ден ($P < 0.0001$ за 30-ия, 60-ия и 90-ия ден и $P < 0.001$ за 90-ия и 120-ия ден).

Малко по-различни бяха резултатите през втория период (05.2019-10.2019). Повишението в OD стойностите достигна максимум на 14-ия ден. Установените от 14-ия до 120-ия ден стойности, бяха достоверно по-високи от началните.

При сравнението между двата периода, достоверно по-ниски резултати бяха установени само на 30-ия и 60-ия ден през втория период спрямо тези през първия ($P < 0.05$) (фиг.10).

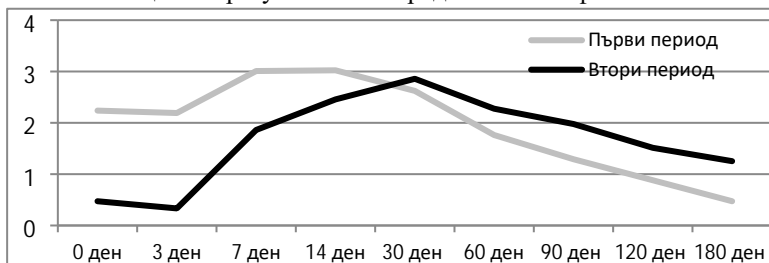


Фигура 10. Динамика в стойностите на OD при овците (n=12) в стопанство 7.

Резултатите от серологичното изследване при козите (n=8) отново показаха плавно повишение в OD стойности до 14-ия ден след ваксинацията. Въпреки много високите изходни нива през първия (11.2018-04.2019) период, достоверно повишение до беше отчетено на 7-ия и 14-ия ден след ваксинацията ($P < 0.05$). Отново последва понижение, особено отчетливо след 60-ия ден на експерименталния период, когато стойностите бяха 2-3 пъти по-ниски от изходните.

През втория 6 месечен период (05.2019-10.2019), въпреки по-ниските изходни нива, имунния отговор се повиши рязко след ваксинацията, достигайки максимум отново на 14-ия ден. Последва понижение, като стойности след 60-ия ден бяха достоверно по-високи от тези през предходния 6 месечен период ($P < 0.05$).

Обобщените резултати а са представени на фиг. 11.

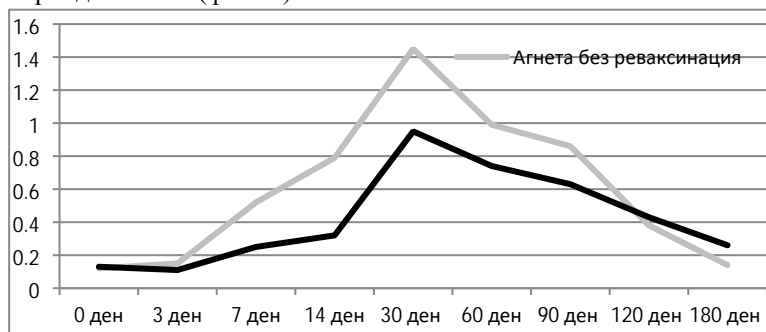


Фиг. 11. Динамика в стойностите на OD при козите (n=8) в стопанство 7.

Стопанство 8

Изследванията при подрастващите дребни преживни с еднократна ваксинация показаха, че максималните стойности на OD се достигат на 30-ия ден. Отново последва понижение, като стойностите в края на периода бяха близки до изходните.

Статистически достоверни разлики бяха установени при агнетата след сравняването на резултатите на 7-ия, 14-ия и 120-ия ден, с тези на 0-ия и 3-ия при $P < 0.05$. Стойностите между 30-ия и 90-ия ден бяха статистически достоверно по-високи от началните при $P < 0.01$. При яретата стойностите на 14-ия, 60-ия, 90-ия, 120-ия, 180-ия ден бяха статистически достоверно по-високи от изходните при $P < 0.05$, а тези от 30-ия ден и при $P < 0.01$. При сравнителен анализ на данните за агнетата и яретата с еднократна ваксинация, се установи, достоверна разлика между двата вида дребни преживни животни от 14-ия до 90-ия ден от експерименталния период с $P < 0.05$ (фиг.12).

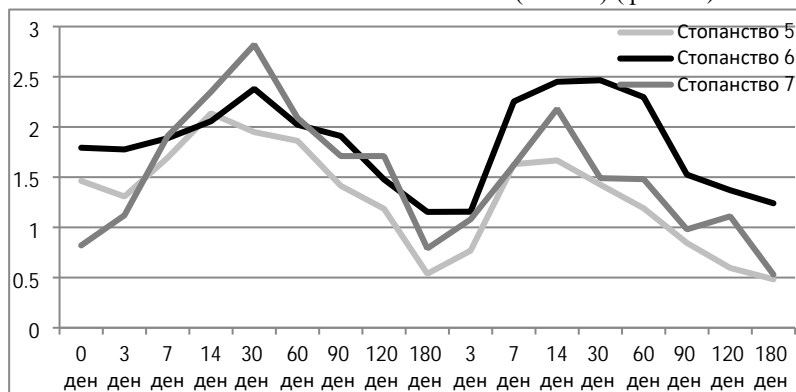


Фигура 12. Сравнение на имунния отговор (OD value) при агнета и ярета след еднократна ваксинация срещу заразна агалаксия.

Сравнителен анализ на резултатите

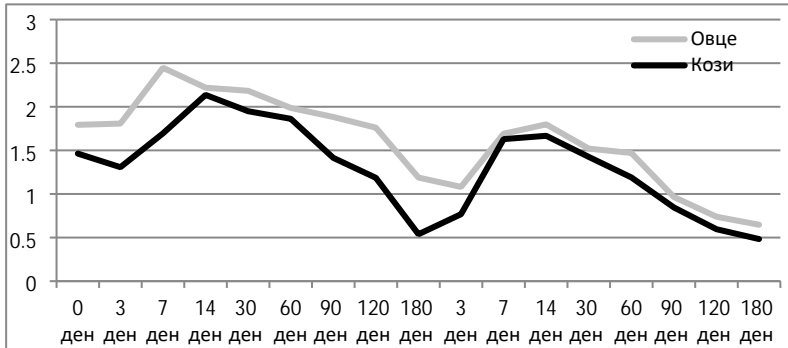
При сравняване на данните за овце от стопанство 5, 6 и 7 през първия 6 месечен период, установихме много сходни модели в динамиката на антителния отговор след ваксинация. Въпреки, че през целия този период на изследване резултатите от стопанство 7 превишаваха тези от стопанство 5, достоверно значими разлики между трите обекта на проучване не бяха установени (фиг. 14).

През втория 6 месечен период тенденциите за повишение до 14-ия ден, последвано от понижение бяха установени отново и в трите стопанства. Разликата беше в по-бързо покачване, с ясно изразено плато, между 7-ия и 60-ия ден в стопанство 6. През втория шест месечен период наблюдавахме значително по-високи нива при стадо 6 ($P < 0.05$) в периода 7-60-ия ден, в сравнение със стадо 5. На 30-ия и 60-ия ден резултатите от стопанство 7 бяха значително по-ниски от тези в стопанство 6 ($P < 0.05$) (фиг. 13).



Фигура 13. Сравнение на имунния отговор (OD value) при овцете от 3-те стопанства след ваксинация срещу заразна агалаксия.

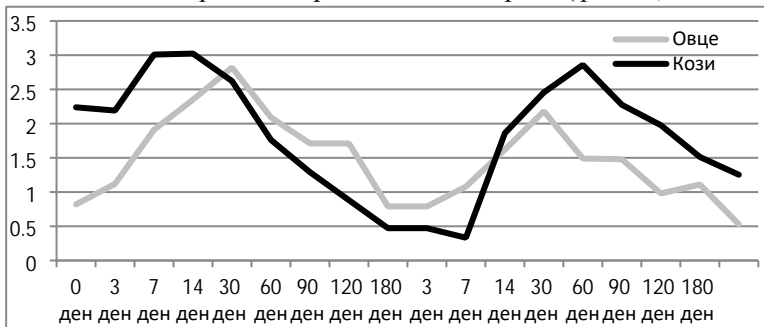
При сравнителен анализ на данните в стопанство 5 за двата вида дребни преживни беше установено, че OD стойностите при овце са по-високи, но без статистическа достоверност. Въпреки по-ниските начални нива при козите през втория период, още на 7-ия ден след ваксинацията те достигат стойности много близки на тези при овцете и се задържат така до края на изследването (фиг. 14)



Фигура 14. Сравнение на имунния отговор (OD value) срещу *M. agalactiae* при овците (n=8) и кози (n=8) в стопанство 5

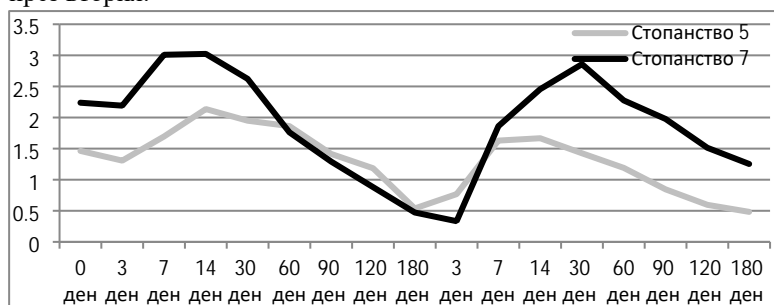
Сходни тенденции установихме при сравнителен анализ на данните в стопанство 7 за овците (n=12) и козите (n=8). В тази ферма обаче, максималните OD стойности при козите превишаваха тези при овците и в двата периода. Трябва да се отбележи, че началните нива при козите бяха много по-високи от тези при овците, и останаха така до 14 ден. Достоверна разлика в полза на резултатите от кози установихме от 0-ев до 14-ия ден на първия период ($P < 0.05$). От 30-ия до 180-ия ден стойностите при овце бяха по-високи, но без статистическа достоверност. (фиг. 15).

Въпреки по-ниските начални нива при козите през втория период, още на 7-ия ден след ваксинацията те надвишиха тези при овците и се задържат така до края на изследването. Обаче статистически достоверно, в полза на козите превишаването беше от 60-ия ден до края на втория 6 месечен период (фиг. 15).



Фигура 15. Сравнение на имунния отговор (OD value) срещу *M. agalactiae* при овцете (n=12) и козите (n=8) в стопанство 7.

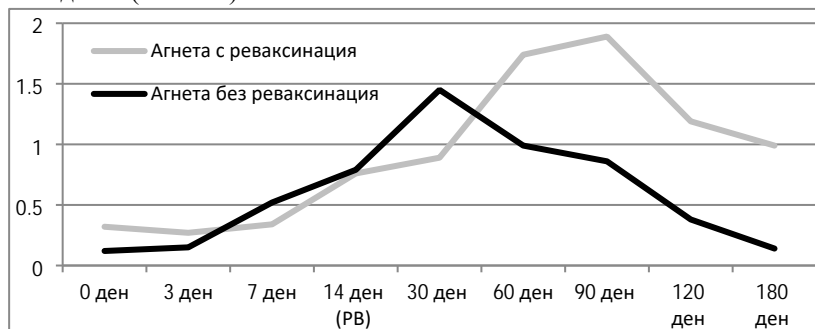
Сравняването на имунния отговор при козите в двете включени в проучването стопанства – 5 и 7 (фиг. 16) показва по-високи максимални стойности на OD в групата от ферма 7 и в двата 6 месечни периода, които бяха достоверно по-високи ($P<0.001$) от тези във ферма 5. Статистически достоверни разлики, в полза на резултатите от стадо 7 бяха установени от 0-ев до 14-ия ден в първия времеви период ($P<0.05$), и от 14-ия до 180-ия ден през втория.



Фигура 16. Сравнение на имунния отговор (OD value) срещу *M. agalactiae* при козите в стопанство 5 и 7.

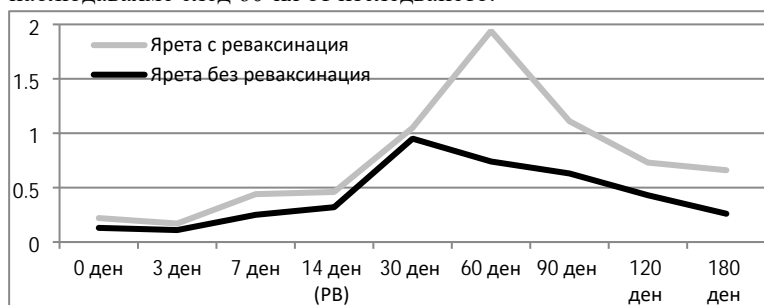
Проучването на отговора при дребни преживни животни, ваксинирани за първи път, в млада възраст показва много ниски изходни стойностите на оптичната плътност (OD). В следващите дни те се покачваха бързо, достигайки максимум на 30-ия ден при еднократно ваксинираните агнета, когато бяха по-високи ($P<0.05$) в сравнение с тези с реваксинация, при които най-високи резултати отчетохме на 90-ия ден (75 дни след реваксинирането) (фиг. 17). При последните повишението беше по-рязко, до по-ниски максимални стойности и беше последвано от по-бързо снижение до стойности съпоставими с изходните на 180-ия ден. Агнетата с реимунизация показаха достоверно по-високи резултати ($P<0.001$), в сравнение с тези с еднократна ваксинация от 60-ия до 180-ия ден,

а OD стойността в края на периода беше трикратно по-голяма от изходната ($P < 0.001$).



Фигура 17. Сравнение на имунния отговор (OD value) срещу *M. agalactiae* при агнета с реваксинация (стопанство 5) и без реваксинация (стопанство 8).

Резултатите от яретата с еднократна имунизация и такива с реваксинация показаха плавно покачване на антителата през първите две седмици, с рязко повишаване след реваксинацията при животните от стопанство 5. При тях установихме максимални стойности 45 дни след реваксинирането (фиг. 18). При еднократно приложение на ваксината пик беше установен на 30-ия ден. Достоверни разлики, полза на реимунизирани ярета наблюдавахме след 60-ия от изследването.



Фигура 18. Сравнение на имунния отговор (OD value) срещу *M. agalactiae* при ярета с реваксинация (стопанство 5) и без реваксинация (стопанство 8).

ОБСЪЖДАНЕ

Клинични проучвания

Проникването на микоплазмите, причиняващи заразна агалаксия, в благополучно до този момент стадо се характеризира с бързото повишаване в броя на клинично изявените случаи и обикновено съвпада с периода на раждането и началото на лактацията (Dhaugude et al., 2022). Подобно, относително бързо разпространение наблюдавахме в стопанство 2, където за 45 дни бяха засегнати около 32% от женските животни. Установените от нас клинични признаци бяха свързани основно със засягане на млечната жлеза. Мастит, последван от хипо- или агалаксия установихме при 22 от заболелите 26 овце. Това представляваше близо 85% от всички заболели животни. В това стадо болестни симптоми от страна на вимето установихме при около 32% от всички 64 лактиращи животни. Този процент е по-нисък от описваните при други взривове 60-80% (Migliore et al., 2021), но е близък до обобщените данни на Bergonier et al., (1997) за заболяемост до 50% при лактиращите овце. В същото време нашите данни за честотата на мастита като клиничен признак са много близки до най-често регистрираните в други огнища на заразна агалаксия. Според Loria & Nicholas (2013) в 90% от случаите основният признак е интерстициален мастит.

В стопанство 3 заболяването първоначално беше регистрирано при козите. Засегнати бяха 32% от животните. Отново доминиращ клиничен признак беше мастит, последван от хипо- или агалаксия наблюдаван при 94% от възприемчивите животни. Тези симптоми бяха установени при 60 (35.3%) от всички 170 лактиращи кози. Резултатите почти напълно съвпадаха с установените от Шабанов и кол. (1973), Тошков и кол. (1974) и представените от Bergonier et al., (1997) и Loria & Nicholas (2013).

За по-тежко протичане на заразната агалаксия при кози съобщават Azevedo et al., (2006). Те проучват избухване на заболяването в стадо от 156 възрастни животни (89 от които лактиращи) и 109 бозаещи ярета. Авторите установяват

заболяемост от 100% в рамките на три седмици при лактиращи кози (като 48.3% са имали артрит или полиартрит) и яретата. Според авторите всички 109 ярета са били засегнати от болестта и 4 (3,7%) са починали, а три (2,7%) са били евтаназирани от хуманни съображения. Високата заболяемост изследователите обясняват с въвеждането на болестта във ферма, където *M. agalactiae* не е съществувала преди това, т. е. животните са с висока чувствителност. Тези измерители за напрегнатост и тежест на епидемичната ситуация значително превишават установените от нас в стопанство 3, където нямаше умрели животни, а заболяемостта при козите под 1 година беше 13.3%.

При овцете заболяемостта беше с по-ниски измерители в сравнение с тази при козите от същото стопанство. Клиника показва 18.7% от животните, мастит беше констатиран отново при близо 90% от засегнатите овце. По-бързото овладяване на ензоотията при овцете отдаваме на вече започналото лечение при козите и готовността на фермерите за реакция. Допълнително свидетелство за ефективността на предприетите мерки беше по-ниският процент на животни достигнали до агалаксия – 48% за овцете, докато при козите това бяха 85%. За ефекта на лечението, довело до понижение на заболяемостта, съответно и върху тежестта на клинична изява и изхода от заболяването съобщава Lambert още през 1987 г., подкрепен по-късно от Bhaumik et al., (1990), Vergonier et al., (1997).

Установяване на ДНК на M. agalactiae в млечни проби чрез qPCR

В настоящото проучване от изследваните 67 млечни проби установихме 23 PCR положителни за *M. agalactiae* проби. Това само по себе си е важно доказателство за наличието на микоплазмена инфекция с този микробен вид.

Отрицателните резултати от qPCR при 20 от тестваните млечните проби, получени от животни с клиника, описана при заразна агалаксия може да се обяснят с ниско ниво на екскреция при изследваните животни (Corrales et al., 2007). Amores et al. (2011b) установяват положителен резултат чрез PCR, когато *M.*

agalactiae присъства в млечните проби в количество по-високо или равно на 10^3 CFU/ml. Tatay-Dualde et al. (2015) съобщават, че откриването на ДНК на *M. agalactiae* е неуспешно когато в проби от 50 мл. се съдържат 10^1 клетки (0,2 клетки/mL). Тези автори предполага, че първоначалното количество микоплазми не е достатъчно, за да се конкурира по време на етапа на обогатяване с всички останали микробиоти, присъстващи в пробите от мляко. При нашето изследване 13 проби бяха Ct варираще от 29.43 до 36.92, което предполага недостатъчно количество ДНК за да бъде определен резултатът като полжителен. Фалшиви отрицателни резултати могат да бъдат получени в следствие от използването на малки обеми (1–10 μ l) от пробите (Schaad & Frederick 2002).

Трябва да се отчита и факта, че заразната агалаксия не е единственото заболяване съпроводено с възпалителни процеси в млечната жлеза (Bergonier et al., 2003). В заразените с *M. agalactiae* стада е възможно да има животни показващи мастит с друга етиология и от получените тях млечни проби ще бъдат отрицателни при PCR изследванията.

Друга възможна причина е присъствието на инхибитори. Калциевите йони са пример за неорганични вещества с инхибиращ ефект върху PCR. Повечето от известните инхибитори обаче са органични съединения, например жлъчни соли, урея, фенол, етанол, полизахариди, натриев додецил сулфат, хуминови киселини, танинова киселина, меланин, както и различни протеини, като колаген, миоглобин, хемоглобин, лактоферин, имуноглобулин G (IgG) и протеинази (Schradler et al., 2007).

Получените от нас резултатите от qPCR изследванията са първи за България, тъй като в нашата страна целенасочени етиологични проучвания върху заразната агалаксия почти не са провеждани от края на 70-те години на 20-ти век (Шабанов и кол., 1973; Тошков и кол., 1975; 1976b; Шабанов и кол., 1976).

През последните години заразната агалаксия е докладвана в редица балкански страни - Гърция, Албания и Северна Македония. Други като България, Хърватия, Словения, Черна гора, Босна и Херцеговина и Сърбия не са докладвали за наличие и

разпространение на заболяването (Jaÿ & Tardy, 2019). Въпреки това, научната литература съдържа клинични случаи или проучвания на заразната агалаксия за няколко от тези страни. В Босна и Херцеговина, при изследване на проби мляко, ушни и очни секрети са били установени 9 положителни за вида *M. mycoides* subsp. *capri* проби, 2 за *M. capricolum* subsp. *capricolum* и 1 за *M. putrefaciens* (Maksimović et al., 2016). Авторите не съобщават за установяване на вида *M. agalactiae*, въпреки че са представени 58 проби, определени като положителни за *Mycoplasma* spp. Използван е PCR анализ за *Mycoplasma* spp, но не и за *M. agalactiae*, което може да обясни отсъствието на положителни проби за този микроорганизъм (Maksimović et al., 2016).

Данни за подобен диагностичен алгоритъм ни бяха предоставен и при обследването на стопанство 1. След като през 2021 г., въпреки ваксинацията срещу заразна агалаксия са били наблюдавани клинични признаци характерни за заболяването са били изпратени млечни проби до лаборатория в Нидерландия. Полученият резултат е бил положителен за *Mycoplasma* spp. и отрицателен за *M. capricolum*. Това е дало основание да се предположи, че животните са болни от заразна агалаксия, а етиологичен агент е *M. agalactiae*. Получените 14 положителни резултата от това стопанство потвърждават съмнението за етиологичната диагноза изказано от фермерите. Откриването на *M. agalactiae* в 70% от пробите, въпреки провежданите ваксини срещу заразна агалаксия с две, различни комерсиални ваксини потвърждава перзистирането на етиологичните агенти в стадата, въпреки въведените ваксинационни програми.

Нашите резултати показват, че в ендемичните области, каквато несъмнено е и територията на България, ДНК на *M. agalactiae* може да бъде доказана чрез PCR анализ на млечни проби. Директният qPCR е ценен инструмент за диагностициране на заболяването в стада дребни преживни животни от млечно направление. Този метод позволява получаване на резултати за 1-2 дни, минимизиране на манипулациите и не се влияе от консервирането на пробите чрез замразяване.

Теренни проучвания върху поствакциналния имунен отговор

Предназначението на ваксинациите е да се стимулира имунен отговор срещу определен патоген, така че бъдещ контакт със същия да не провокира клинична изява на болестта. Използването на ваксини за контрол на заразната агалаксия в ендемичните райони е широко използвана практика (Dudek et al., 2022). Различни, атенуирани или инактивирани ваксини са лицензирани за превенция на заразната агалаксия и се използват широко в страни, където болестта е ендемична. Съобщава се, че атенуираните ваксини имат по-добра ефикасност поради което те осигуряват подобрена защита (Agnone et al., 2013; Ozdemir et al., 2019). Въпреки това, живи атенуирани ваксини за заразна агалаксия не са разрешени в Европейския съюз (WOAH, 2019a).

Резултатите от нашето изследване при овце, с предишни ваксинации срещу заразна агалаксия показват, че въпреки различните изходни нива, антителния отговор се повишаваше бързо през първите две седмици след ваксинацията, и намаляваше прогресивно след това. В повечето случаи около 4-ия месец на наблюдавания период стойностите на OD бяха близки до началните. Подобни резултати са представени при тестове на различни експериментални ваксини. Така например при изпитването на инактивирана ваксина в Турция проведено от Erdag, антителата се появяват 2 седмици след ваксинацията достигат пик на 4-та седмица от експерименталния период и прогресивно спадат до 10-та седмици след ваксинацията (Erdag, 1989).

В по-скорошно изследване (El-Yazid et al., 2019) при изпитването на няколко експериментални ваксини се установява пик в антителния отговор при инактивираната с фенол и съдържаща алуминиев хидроксид ваксина на 8-та седмица след прилагането. Този резултат, който се различава от нашия се дължи на това, че тези изследователи използват животни, които не са ваксинирани преди това, докато включените в нашето изследване овце и кози имат история за няколко предишни ваксинации.

Няколко други проучвания на експериментални и комерсиални ваксини представят данни за максимални нива на антитела в периода 14-30 ден след ваксинацията (Buonavoglia et al., 2008; Buonavoglia et al., 2010; Campos et al., 2013; Botuș et al., 2017), резултати, които съвпадат с получените от нас.

Проследявайки имунния отговор при кози ние установихме тенденции сходни с тези при овцете. В стопанство 5 наблюдавахме бързо повишаване на антителния отговор през първите две седмици след ваксинацията, и прогресивно намаляване до изходните стойност на третия месец. При нашето изследване установихме статистически незначителни разлики при козите и овцете, след ваксинация срещу заразна агалаксия. В същото време много ясно се очертава тенденцията за понижение в S/P% стойностите на 3-4 месец след прилагането на ваксината. На 180-ия ден те бяха под 50%, което се преценява като отрицателен резултат, предполагащ липса на защита при заразяване (El-Yazid et al., 2019).

По-различни бяха нашите резултати обаче в стопанство 7. В началото на проучването OD стойностите при козите бяха достоверно по-високи от тези при овцете, но след 30-ия ден от изследването те бяха по-ниски, а на 180-ия ден S/P% беше под 50%, което се преценява като отрицателен резултат, т. е. липса на протекция. През втория период в това стопанство наблюдавахме по-рязко повишение, отново до по-високи максимални стойности при козите, които след 7-ия ден превишиха тези при овцете. Статистически достоверно, в полза на козите, превишаването беше от 60-ия ден до края на втория 6 месечен период.

Сравнителни изследвания на имунния отговор при овце и кози са провели и Sotoodehnia et al. (2005). Тези изследователи проучват собствена инактивирана ваксина срещу заразна агалаксия при дребни преживни. Ваксиналната схема включва две приложения на продукта през 3 седмичен интервал. Те установяват максимални нива на антителата 1 месец след първата ваксинация (1 седмица след реваксинацията), а минимални средни титри съответно на третия месец. В същото време авторите намират по-

ниски стойности при козите в сравнение с тези при овцете. Тези резултати, напълно съвпадат с получените от нас в стадо 5. Обяснението което авторите представят е, че разликата в антителния отговор между групи овце и кози, вероятно се дължи на произхода на използвания щам, който е изолиран от овце.

Подобно на Sotoodehnia et al. (2005), Campos et al. (2013) също изпитват няколко вида инактивирани ваксини. Те обаче установяват малко по-високи нива на антитела при козите в сравнение с овцете, без статистически достоверна разлика между двата вида ($P > 0.05$) за ваксината инактивирана с формалин и с адювант алуминиев хидроксид. Както при нашето изследване, така и при това на Campos et al. (2013) стойностите на OD при овцете и козите спадат прогресивно и достигат изходни нива 3-4 месеца след началото на експерименталния период.

При подрастващите агнета и ярета на двумесечна възраст, очаквано стойностите на OD бяха много ниски, което показва изчерпване на евентуално придобитите чрез коластрата антитела. Според проучванията на Abdollahi et al., (2022) стойностите на S/P% при ярета родени от двукратно ваксинирани по време на бременността майки спадат от 63.4 ± 3.0 на третия ден след раждането до 8.9 ± 1.2 на 56-ия ден, стойност напълно съпадаща с установената от нас 8.43 ± 2.78 за агнетата и 8.27 ± 2.72 за яретата.

До 30-ия ден след имунизирването получените резултати при агнета и ярета бяха много сходни при тези с последваща реваксинация и онези, които не бяха имунизирани повторно. Потвърдено беше, че стойност на S/P% над 60% (приемана за осигуряваща протекция, El-Yazid et al., 2019) за всички опитни групи се достига на 30-ия ден. За животните от стопанство 8, това беше денят с максимални нива, след което последва рязко понижаване. При яретата още на 60-ия ден стойността на S/P% спадна под 60%, а при агнетата на 120-ия ден беше под 40%. Тези резултати подсказват много късия период на протекция от еднократно приложение на ваксината.

Тези наши резултати показват, че практиката на някои стопани да ваксинират еднократно младите, подрастващи животни,

особено ако не са предназначени за ремонт на стадото, не осигурява достатъчно протекция. Няколко проучвания на експериментални, инактивирани ваксини представят данни за плавно покачване в титъра на антителата, след първо приложение на ваксиналния продукт, последвано от рязко повишение 30-45 дни след реваксинация. Така например Campos et al. (2013), установяват максимални стойности 30 дни след реваксинацията. Авторите установяват, че и трите ваксини (използвани са различни адюванти) индуцират производството на антитела, които прогресивно се увеличават след първата доза, при всички ваксинирани групи, с по-високи нива 30 дни след втората доза (51-ви ден от началото на експерименталния период). Резултатите на Campos et al. (2013), корелират почти напълно с тези от нашите проучвания. Техните заключения също подкрепят необходимостта от прилагането на втора доза от ваксината.

Обобщените резултати от това изследване очертават тенденцията за понижаване в OD стойностите около изходните нива 4 месеца след прилагането на ваксината. Това означава, че имунизационните програми за тези стада е наложително да се корегират и ваксинациите трябва да се извършват през 4 месеца. Такава позиция застъпва и Regalla (1987), който препоръчва имунизация три пъти годишно, въпреки че счита, ефикасността на ваксинацията за противоречива и незадоволителна, когато животните обитават среда с много висока контаминация с микоплазми. León-Vizcaíno et al. (1995) също препоръчват да се прилагат три дози ваксина преди и една доза след раждане за да се контролира заболяването.

Понастоящем в България няма стратегия за диагностика и контрол на заразната агалаксия по овцете. Националната програма за профилактика, надзор, контрол и ликвидиране на болестите по животните и зоонозите в България, в раздела за имунопрофилактични мероприятия, заплащани от собствениците е споменато, че ваксинацията срещу заразна агалаксия по овцете и козите е еднократна, през сухостойния период ежегодно, до пълно

прекратяване на заболяването в стада с констатирано заболяване (Анонимен, 2022).

За разлика от България в редица ендемични за заразна агалаксия страни се прилагат национални програми за профилактика, диагностика и контрол на заболяването. Така например във Франция, многобройните огнища през 90-те години са наложили въвеждането на превантивна здравна програма, стартирала през 1998 г. Към 2018 г. заболяването, причинено от *M. agalactiae*, до голяма степен е изкоренено в тази страна, с изключение на югозападния регион на Франция, където все още се установяват отделни огнища (Loria et al., 2019).

Докато в България заразната агалаксия все още остава пренебрегвана от националните ветеринарни служби, в съседна Гърция още през 2006 г. беше въведено законодателство за намаляване на честотата на заразната агалаксия (Anonymous, 2010). Собствениците на засегнати от заразна агалаксия стада получават компенсация за стойността на принудително закланите животни, нереализираните приходи от мляко и всички други свързани с контролните мерки разходи за периода на възбрана във фермата (Loria et al., 2019).

В Италия ситуацията е подобна на тази в България. Въпреки ендемичността, потвърдена от масовите продажби на ваксини и антибиотици, насочени към микоплазмени инфекции, броят на официално обявените огнища в Южна Италия е нисък. Невъзможността заразната агалаксия да се контролира в някои части на Италия до голяма степен е резултат от ненужно стриктно местно ветеринарно законодателство, което обезсърчава фермерите и ветеринарните лекари да докладват огнища. Резултатът е прикриване на огнищата (Loria et al., 2019).

Представените от нас резултати и опита на редица ендемични за заразна агалаксия страни налага стартирането на национална диагностична програма за установяване разпространението на заболяването и идентифициране на заразените стада, както и разработването система от мерки за ограничаване и контрол на това заболяване в България

ИЗВОДИ

1. Заразната агалксия, предизвикана от *M. agalactiae* е заразно заболяване, актуално за България.
2. Заразната агалксия засяга главно лактиращите животни, при които протича с мастит, последван от хипогалаксия, агалаксия или атрофия на млечната жлеза. При нелактиращите заболяването се проявява с артрити и паренхиматозни кератити.
3. qPCR позволява бързо откриване на *M. agalactiae* инфекцията в заразените стада.
4. При възрастните овце и кози, максимални нива на антитела след ваксинация с Agalax-S се достигат в периода 14-30 дни след поредната бустер ваксинация.
5. Количеството на антителата при овцете и козите, изградени след бустер ваксинация с Agalax-S спада до изходните нива най-често в периода 90^{ти}-120^{ти} ден.
6. В условията на практиката не се установяват статистически значими разлики в динамиката на антителния отговор след ваксинация с Agalax-S между овцете и козите.
7. Установените стойности на OD при агнета и ярета на двумесечна възраст показват изчерпване на придобитите чрез коластрата антитела срещу *M. agalactiae*.
8. Агнета и ярета ваксинирани с Agalax-S показват сходен модел на изграждане на имунитет с достигане на максимални нива на антитела 45 дни след реваксинация.
9. При агнета и ярета ваксинирани еднократно с Agalax-S максимални нива на антитела се достигат 30 дни след приложението на ваксината, но стойностите на S/P% спадат под 50% на 120-ия ден при агнетата и още на 90-ия ден при яретата. При младите дребни преживни с реваксинация S/P% е над 50% до 180-ия ден.

ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА

1. При констатиране на заболяване при овце или кози, съпроводено с мастити, хипо- или агалаксия, атрофия на млечната жлеза, артрити и/или паренхиматозни конюнктивити да се извърши целенасочено диагностично изследване за заразна агалаксия.
2. За изграждане на оптимален имунен отговор при ваксинация срещу заразна агалаксия на дребни преживни животни от всички възрасти стартовата ваксинация задължително трябва да се последва и от реваксинация през период, указан от производителя на ваксината.
3. В стационарните огнища или ендемичните райони е препоръчително ваксинациите срещу заразна агалаксия да се извършват през 4 месеца (три пъти в годината).
4. Наложително е разработване и стартиране на национална скринингова и диагностична програма за установяване разпространението на заболяването и идентифициране на заразените стада, както и такава за ограничаване и контрол на заразната агалаксия при овцете и козите.

ПРИНОСИ

1. За първи път в България чрез qPCR е доказано присъствието на *M. agalactiae* при дребни преживни животни – оригинален принос.
2. При теренни условия е установена динамиката в антителния отговор при различни възрастови категории овце и кози след ваксинация с комерсиална ваксина Agalax-S – оригинален принос.
3. При теренни условия е проследена динамиката в антителния отговор при агнета и ярета ваксинирани еднократно с комерсиална ваксина Agalax-S, и такива с реваксинация – оригинален принос.
4. Установени са основните клинични признаци на заразната агалаксия по овцете и козите - потвърдителен принос.
5. Установена е честотата на проявление на клиничните признаци при боледуване от заразната агалаксия по овцете и козите - потвърдителен принос.
6. Установено е, че при агнета и ярета след двумесечна възраст антителният отговор срещу *M. agalactiae* е много нисък - потвърдителен принос.
7. Еднократната ваксинация с комерсиална ваксина Agalax-S при агнета и ярета не осигурява продължителен антителен отговор - потвърдителен принос.
8. Антителният отговор срещу *M. agalactiae* при агнета и ярета ваксинирани с комерсиална ваксина Agalax-S е сходен - потвърдителен принос.

ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Evstatiev, C.,** Gospodinova, K., Petrov, V. (2020). Comparative analysis of immune response in goats and sheep after vaccination against contagious agalactia – a field study. *Tradition And Modernity In Veterinary Medicine*, 5, 2(9), 3–9.
2. **Evstatiev, C.,** Gospodinova, K., Petrov, V. (2021). Comparative analysis of the postvaccinal immune response in sheeps in two farms after vaccination against infectious agalacia – a field study. *Trakia Journal of Sciences*, 19(1), 29-34.
3. **Evstatiev, C.,** Urumova, V., Ivanov, L., Petrov, V. (2023). Molecular detection of *Mycoplasma agalactiae* by qPCR in sheeps and goats from Bulgaria. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, Online First, ISSN 1311-1477; DOI: 10.15547/bjvm.2023-0014

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Online international scientific conference “Tradition and modernity in veterinary medicine, 24-26.04.2020, Yundola, Bulgaria.
Evstatiev C., Gospodinova K., Petrov V. Comparative analysis of immune response in goats and sheep after vaccination against contagious agalactia - a field study.
2. Юбилейна научна конференция с международно участие – „25 години Тракийски университет“, 15.05.2020, Стара Загора
Evstatiev C., Gospodinova K., Petrov V. Comparative analysis of the postvaccinal immune response in sheeps in two farms after vaccination against infectious agalacia – a field study

УЧАСТИЕ В УНИВЕРСИТЕТСКИ НАУЧНИ ПРОЕКТИ

НП 2/2019 „Теренни проучвания върху постваксиналния имунен отговор след приложение ваксини срещу заразна агалаксия в интензивно и екстензивно отглеждани стада дребни преживни животни“.

ABSTRACT

Contagious agalaxia is an infectious disease caused by several species of mycoplasmas. The importance of this disease stems from the drastic consequences on milk production, the very difficult control and eradication. Currently, the disease occurs in most countries in the Mediterranean region and the Balkan Peninsula, but in Bulgaria targeted etiological studies have not been carried out since the 1980s.

For these reasons, we set out to conduct clinical studies in field outbreaks of infectious agalaxia in flocks of sheep and goats and to detect, by qPCR, the genome of *Mycoplasma agalactiae* in milk samples, as well as to study the dynamics of the establishment of the vaccinal, humoral immune response against this pathogen in adult sheep and goats, as well as in lambs and kids.

Outbreaks of disease with symptoms characteristic of contagious agalaxia were traced in 3 farms. The clinical symptoms were determined in 201 affected animals. We found that the morbidity was highest in the age group 1-4 years, varying between 20 and 47% in sheep and 30-40% in goats. The main symptom in lactating ewes was mastitis, followed by hypogalaxia in 70-90% and agalaxia in 10-30%. In non-lactating animals, the incidence varied between 12 and 20%, with parenchymal keratitis and arthritis.

A total of 67 milk samples were examined by QPCR for the detection of *M. agalactiae*. Of these, 23 were positive and the remaining 44 were negative.

For the post-vaccination response study, 1 028 serum samples were obtained and tested with a commercial kit for indirect ELISA. Results in sheep and goats showed a gradual increase in antibody up to day 14 post-vaccination, followed by a decline to baseline levels most commonly 120 days post-vaccination. We found no statistically significant differences between the two small ruminant species.

The results for the revaccinated lambs and kids showed that by the 60th day from the start of the experiment (45 days after the revaccination), the OD values were almost the same in both species. Studies in juvenile small ruminants with a single vaccination have shown that maximum levels are reached on day 30. In lambs, they were above the cut-off for a positive result by day 90, while in goats this happened as early as day 30.