



ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ  
ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

## РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за  
получаване на образователна и научна степен "доктор" по

Докторска програма:

"Епизоотология, инфекциозни болести  
и профилактика на заразните заболявания  
по животните"

Професионално направление:

6.4 Ветеринарна медицина

Област на висше образование:

6. Аграрни науки и ветеринарна медицина

Тема на дисертация:

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

Автор:

**Цветомир Генелов Евстатиев**

задочен докторант към ВМФ, ТрУ – Стара Загора

От:

член на научно жури  
със Заповед 642 от 22-02-2024 г.

**проф. д-р Илия Цачев, д.в.м.**

Ветеринарномедицински факултет

Тракийски университет, Стара Загора

Научна специалност: „Епизоотология, инфекциозни  
болести и профилактика на заразните заболявания  
по животните"

### 1. Информация за дисертанта.

Цветомир Генелов Евстатиев е роден през 1991 г. Завършва средното си образование в град Лом - СОУ-ЧЕМИ с профил информационни технологии. През 2017 г. се дипломира в Тракийския университет в Стара Загора като ветеринарен лекар. По време на обучението си провежда практически стаж в Stiftung Tierärztliche Hochschule в град Ханوفر Германия. От 2017 г. до сега е практикуващ ветеринарен лекар в с. Сталийска махала, област Монтана и работи с продуктивни и животни за компания.

През 2018 г. Цветомир Евстатиев е приет за задочен докторант по докторска програма „Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните" във Ветеринарномедицинския факултет на Тракийския университет в Стара Загора - катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести" с научен ръководител доцент Владимир Петров. По време на обучението е участвал в два научни форума с международно участие. Изпълнил е всички дейности предвидени в индивидуалния учебен план и е успешно положил изпита по кандидатския минимум. Отчислен е с право на защита през 2023 г.

## **2. Обща характеристика на представения дисертационен труд.**

Дисертационният труд е написан на 149 страници и е структуриран традиционно: увод - литературен преглед - цел и задачи - материал и методи - резултати - обсъждане - изводи - препоръки за практиката - приноси - публикации във връзка с дисертацията/участия в научни форуми и научни проекти - литературен указател.

- ❖ **Становище.** Представеният дисертационен труд е структуриран много добре, като автора и неговия научен ръководител са се съобразили с някои от направените бележки от предишни обсъждания.

## **3. Актуалност.**

Заразната агалаксия по овцете и козите е особено актуално и проблемно заболяване за много страни, включително и за България. То е познато от преди повече от 200 г. – от 1816 г. в Италия като disease of the place. Ето защо изборът за неговото проучване е сполучлив и с подчертан практичен и научен интерес. Още повече и досегашните данни за него в българската литература са от 70-те години на миналия век и са оскъдни. За огромна изненада и през последните години в България липсват официални данни и научни съобщения за наличието му. Не е тайна, че и голям брой ветеринарни лекари и фермери от цялата страна съобщават за заболяване при овце и кози с признаци на заразна агалаксия. В никакъв случай не бива да се подценява и неговата значима икономическа значимост. Така например “цената” на едно огнище в смесени ферми за овце/кози може да варира от 7 000 до 130 000 € (Loria et al., 2018).

- ❖ **Становище.** Подбраната за разработване тема от докторанта Цветомир Евстатиев и научния му ръководител доц. Владимир Петров ТЕРЕННИ И ЛАБОРАТОРНИ ПРОУЧВАНИЯ НА ЗАРАЗНАТА АГАЛАКСИЯ ПО ОВЦЕТЕ И КОЗИТЕ В БЪЛГАРИЯ е изключително актуална и навременна.

## **4. Литературен обзор.**

В литературната справка са разгледани подробно: историческите данни за заболяването, много детайлно са осветлени етиологичните характеристики, обърнато е специално внимание на епидемиологията, отбелязана е и патогенезата, клиничните признаци са очертани релефно, споменати са патоанатомичните находки, изключително подробно и аналитично са представени диагностичните похвати, наличните тестове и интерпретацията от получените резултати; лечението е описано много детайлно, контрола на заболяването и ваксинациите са представени с последните новости за тях. В края на обзора Цветомир Евстатиев аналитично прави обобщение на представения литературен преглед.

Използвани са 202 литературни източници, от които 8 на кирилица и 194 на латиница. От последните 10-години са представени 45 нови заглавия (от 2013 г.), което е 22% от общия брой. За много добрата литературна осведоменост на дисертанта говорят и цитирани източници от тази година (Shookouh-Zangeneh et al., 2024).



Подчертано добро впечатление прави познаването на проучванията на родните автори Маждраков, Тошков, Шабанов, Тодоров и техните публикации от България свързани с темата на дисертацията. Всички те са отразени в литературната справка.

❖ **Становище.** Литературният обзор за заразната агалаксия по овцете и козите е съвременен осветлен, творчески представен и изискано научно интерпретиран. Съобразен е с направените бележки от предишни обсъждания в катедрата.

## **5. Цел/Задачи/Методи.**

Поставената цел в дисертацията е ясно заявена и точно формулирана:

“Да се проведат клинични проучвания при теренни взривове на заразна агалаксия в стада овце и кози и посредством qPCR да се установява генотип 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 решаването на поставената цел са поставени и изпълнени 5 конкретни задачи като: 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 заразни 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.

Теренните изследвания са проведени в 8 стопанства за дребни преживни животни от различни места в страната, които са описани подробно. Отбелязани са взетите проби за изследване от всяко едно от тях: общо 67 млечни са изпозвани за молекулярно-генетична диагностика и 1 028 кръвни проби за проследяване на имунния/ваксиналния отговор. Проучена е клиничната изява на болестта в три от фермите (2, 3 и 4), включително и заболяемостта. Подробно е описана методиката за установяване ДНК на *M. agalactiae* в млечни проби чрез qPCR с нейната интерпретация. Отрадени са ясно методичните теренни проучвания върху постваксиналния имунен отговор, включително ваксинациите, опитните постановки, серологичните изследвания (ELISA) и статистическия анализ.

❖ **Становище.** Подбраните методични постановки и диагностичния инструментариум са съобразени с целта и задачите на проучването.

## 6. Резултати.

Получените резултати от проучванията са отразени в дисертацията на 28 страници, визуализирани в 15 таблици и 18 фигури.

- Последователно и подробно са описани клиничните резултати и заболяемостта от стопанство 2, 3 и 4.
- Много добре са дадени и визуализирани ДНК резултатите на *M. agalactiae* в млечни проби чрез qPCR от стопанства 1,2,3 и 4.
- Най-многобройни са резултатите от теренните проучвания върху поствакциналния имунен отговор в стопанства 5,6,7 и 8. Направени са и необходимите сравнителни анализи на получените резултати.

❖ **Становище.** Поставените от мен в предварителните обсъждания въпроси, коментари, бележки и препоръки са взети под внимание в раздела и са представени коректно.

## 7. Обсъждане.

В обсъждането Цветомир Евстатиев сполучливо и убедително съпоставя и анализира получените резултати с известните от литературатурата у нас и в чужбина. На някои места дори дискусията се насочва извън целта и посочените задачи, като автора, макар и не университетски специалист, а практикуващ ветеринарен лекар, настойчиво и убедително изразява професионално ветеринарномедицинско мнение и становище, така необходими днес за науката и ежедневната ветеринарномедицинска практика. Това не омаловажава обсъждането, защото ОНС е не само научна, а и образователна степен. Стилът е строго научен и професионален.

❖ **Становище.** И тук голяма част от поставените в предварителните дискусии въпроси, коментари, бележки и препоръки са взети под внимание.

## 8. Изводи / Препоръки /Приноси.

Цветомир Евстатиев в своята дисертация формулира девет изводи и пет препоръки, които приемам.

В дисертационния труд са отбелязани и осем приноси, три от които са оригинални.

❖ **Бележка.** Смятам, че формулировката на първия:

- За първи път в България чрез qPCR е доказано присъствието на *M. agalactiae* при дребни преживни животни,  
би могло да се редактира така
- За първи път в България чрез qPCR е доказана *M. agalactiae* при дребни преживни животни

❖ **Мотив.** “Присъствието” не е подходящ термин за употреба в научната инфекциозна патология.

❖ **Становище.** Приемам формулираните изводи, приноси и препоръки за практиката.



## 9. Оценка на публикациите по дисертацията.

Във връзка с дисертацията са публикувани три статии, чиито резултати са част от 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 sheep in two farms after vaccination against infectious agalactia – 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 sheep and goats from Bulgaria. Under

Видно е, че третата статия, открита в *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* е цитирана неправилно (непълно) в дисертацията и коректно в автореферата - Evstatiev, C., V. Urumova, L. Ivanov & V. Petrov, 2023. Molecular detection of *Mycoplasma agalactiae* by qPCR in sheep and goats from Bulgaria. *Bulg. J. Vet. Med.* (online first). При внимателния прочит на същата статия установявам грешка в резюмето, вероятно техническа по ясно видима.

- ❖ *Предложение.* Нека се поправи посочената грешка на страницата в авторитетното ни българско ветеринарномедицинско списание *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, което е в кuartил 3 (Q3)

## 10. Автореферат.

Представеният автореферат е написан на 48 страници и отразява обективно структурата и съдържанието на дисертационния труд.

- ❖ *Бележка.* Смятам, че английския текст на резюмето трябваше да бъде съпроводен и с английски превод на заглавието на дисертацията.

## З а к л ю ч е н и е

Дисертационният труд **ТЕРЕННИ И ЛАБОРАТОРНИ ПРОУЧВАНИЯ НА ЗАРАЗНАТА АГАЛАКСИЯ ПО ОВЦЕТЕ И КОЗИТЕ В БЪЛГАРИЯ** е актуален, навременен и добре реализиран. Научените и приложените от **Цветомир Геновелов Евстатиев** различни методи на изследване, изведените експерименти, получените резултати, направените препоръки и ценни приноси, ми дават основание да смятам, че представения дисертационен труд е защитим пред научно жури, отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и ПРАСТУ, и го **оценявам ПОЛОЖИТЕЛНО**.

*Завършвам своето становище с "правило от любим учител":*

***No single test is sufficient for diagnosing an infectious disease in a sick patient. EB***

12-03-2024

Стара Загора

Изготвил становището: .....

А А А А А А А А А А

проф. д-р Илия Мачев дмн



## REVIEW

On the dissertation by **Cvetomir Genovelov Evstatiev** on:

### **FIELD AND LABORATORY STUDIES OF CONTAGIOUS AGALACTIA IN SHEEP AND GOATS IN BULGARIA**

submitted for awarding PhD scientific and educational degree in the science specialty „Epizootiology, infectious diseases and prevention in animals“, professional area 6.4 “Veterinary medicine“, field of higher education 6.0. “Agricultural science and veterinary medicine”.

**Statement prepared by:** **prof. Iliia Tsachev, DSc**  
Faculty of Veterinary Medicine at Trakia University, Stara Zagora

#### **1. Brief biographical data about the candidate.**

Tsvetomir Genovelov Evstatiev was born in 1991. He completed his secondary education in the city of Lom. In 2017, he graduated from the Trakia University in Stara Zagora as a veterinarian. During his studies, he took part a practical internship at the Stiftung Tierärztliche Hochschule in Hannover, Germany. From 2017 until now, he is a practicing veterinarian in the village of Staliyska Mahala, Montana region and practices with productive and companion animals.

In 2018, Tsvetomir Evstatiev was accepted as a part-time PhD student in the program "Epizootology, infectious diseases and prevention in animals" at the Faculty of Veterinary Medicine of the Trakia University in Stara Zagora, Department "Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases" with a scientific supervisor associate professor Vladimir Petrov. During his studies, he participated in two scientific forums with international participation. He completed all the activities provided for in the individual study plan and successfully passed the minimum candidate exam. He is eligible for PhD defense (2023).

#### **2. General characteristics of the submitted dissertation.**

The dissertation is written on 149 pages and is structured traditionally: introduction - literature review - aim and tasks - material and methods - results - discussion - conclusions - recommendations for practice - contributions - publications related to the dissertation/participation in scientific forums and scientific projects - bibliography.

- ❖ **Opinion.** The presented PhD dissertation is structured very well, and the author and his supervisor have complied with some of the notes made from previous discussions.

### 3. Relevance of the problem.

Contagious agalactia in sheep and goats is a particularly topical and problematic disease for many countries, including Bulgaria. It has been known for more than 200 years - since 1816 in Italy as the "Disease of the place". That is why the choice for research is successful and of marked practical and scientific interest. Moreover, the current data about contagious agalactia in sheep and goats in Bulgarian literature are from the 70s of the last century and are scarce. To a huge surprise, official data and scientific announcements about its presence are missing in Bulgaria in recent years as well. It is no secret that a large number of veterinarians and farmers around the country are reporting illness in sheep and goats with signs of contagious agalactia. In no case should its significant economic importance be underestimated. For example, the "cost" of an outbreak in mixed sheep/goat farms can vary from €7 000 to €130 000 (Loria et al., 2018).

- ❖ **Opinion. The topic selected for study by the PhD student Tsvetomir Evstatiev and his scientific supervisor Assoc. prof. Vladimir Petrov FIELD AND LABORATORY STUDIES OF CONTAGIOUS AGALACTIA IN SHEEP AND GOATS IN BULGARIA is extremely relevant and timely.**

### 4. Literature awareness.

The literature review discusses in detail: the historical data on the disease, the etiological characteristics are illuminated in great detail, special attention is paid to the epidemiology, the pathogenesis is also noted, the clinical signs are outlined in relief, the pathological findings are mentioned, the diagnostic concepts are presented in extremely detailed and analytical fashion, the tests available and the interpretation of the results obtained; treatment is described in great details, disease control and vaccinations are presented with the latest news. At the end of the review, Tsvetomir Evstatiev analytically summarizes the presented literature review.

Two hundred and two literary sources were used, of which 8 in Cyrillic and 194 in Latin. In the last 10 years, 45 new titles have been noted (since 2013), which is 22% of the total. Cited sources from this year (Shookouh-Zangeneh et al., 2024) also speak for the PhD dissertation student's very good literary awareness.

A very good impression is made by the knowledge of the studies of native authors Majdrakov, Toshkov, Shabanov, Todorov and their publications from Bulgaria related to the topic of the dissertation. All of them are reflected in the literature reference.

- ❖ **Opinion. The literature review on contagious agalactia in sheep and goats is modernly illuminated, creatively presented and sophisticatedly scientifically**



interpreted. It is consistent with the notes made from previous discussions in the department.

## 5. Aim/Objectives/Methods.

The aim set in the PhD dissertation is clearly stated and precisely formulated:

"To conduct clinical trials in field outbreaks of infectious agalactia in sheep and goat herds and to detect the genome of *Mycoplasma agalactiae* in milk samples by qPCR, as well as to study the dynamics of the vaccine humoral immune response against this pathogen in small ruminants".

To solve the set goal, 5 specific tasks were set and fulfilled, such as: 1. To describe and compare the established clinical signs according to the frequency of manifestation according to the biological species, age, sex and physiological state of the affected animals. 2. To examine milk samples - obtained from three categories of animals: 1) clinically ill; 2) vaccinated and 3) clinically healthy small ruminants raised in infected herds - for the presence of *M. agalactiae* DNA by qPCR. 3. Under field conditions, to follow the dynamics in the immune response after vaccination against infectious agalactia in several consecutive periods, in different species and ages of small ruminants, studying the differences determined by the biological species. 4. To compare the vaccine humoral immune response after vaccination against contagious agalactia in the same species of small ruminants raised on different farms without clinical manifestation of contagious agalaxia. 5. To compare the data on the vaccine humoral immune response after vaccination against infectious agalactia in adolescent animals raised in different farms, without clinical manifestation of infectious agalactia, vaccinated once and those with revaccination.

Field research was conducted in 8 small ruminant farms from different locations in the country, which are described in detail. The samples taken from each of them were noted: a total of 67 milk samples were used for molecular genetic diagnosis and 1 028 blood samples for monitoring the immune/vaccine response. The clinical manifestation of the disease in three of the farms (2, 3 and 4) was studied, including morbidity rate. The methodology for detecting *M.agalactiae* DNA in milk samples by qPCR with its interpretation is described in detail. Methodological field studies on the post-vaccination immune response, including vaccinations, experimental setups, serological tests (ELISA) and statistical analysis, are clearly reflected.

❖ **Opinion. The selected methodological approaches and the diagnostic toolkit are tailored to the purpose and tasks of the study.**

## 6. Results.

The obtained results of the studies are reflected in the dissertation on 28 pages, visualized in 15 tables and 18 figures.

- The clinical results and morbidity from farms 2, 3 and 4 are described consistently and in detail.



- DNA results of *M. agalactiae* in milk samples from farms 1,2,3 and 4 are very well given and visualized.

- The most numerous are the results of the field studies on the post-vaccination immune response in farms 5, 6, 7 and 8. The necessary comparative analyzes of the obtained results were also made.

❖ **Opinion.** The questions, comments, notes and recommendations raised by me in the preliminary discussions have been taken into account in the section and presented correctly.

## **7. Discussion.**

In the discussion, Tsvetomir Evstatiev successfully and convincingly analyzes and compares the obtained results with those known from the literature at home and abroad. In some places, the discussion even goes beyond the purpose and stated tasks, as the author, although not a university specialist, but a practicing veterinarian, persistently and convincingly expresses a professional veterinary medical opinion, so necessary today for science and daily veterinary medical practice. This does not detract from the discussion because the PhD degree is not only a scientific degree, but also an educational one. The style is strictly scholarly and professional.

❖ **Opinion.** And here a large part of the placed in preliminary discussions questions, comments, notes and recommendations are taken into account.

## **8. Conclusions / Recommendations/ Contributions.**

In his dissertation, Tsvetomir Evstatiev formulates nine conclusions and five recommendations, which I accept.

Eight contributions are also noted in the dissertation, three of which are original.

❖ **Note.** I believe that the wording of the first:

- For the first time in Bulgaria, the presence of *M. agalactiae* in small ruminants was proven by qPCR, *it could be edited like this*

- For the first time in Bulgaria, *M. agalactiae* was detected by qPCR in small ruminants

❖ **Opinion.** I accept the formulated conclusions, contributions and recommendations for practice.

## **9. Evaluation of publications on the dissertation.**

In connection with the dissertation, three articles were published, the results of which are part of the dissertation.

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 sheep in two farms after vaccination against infectious agalactia – a field study. *Thrace 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 sheep and goats from Bulgaria. Under

It can be seen that the third article found in the *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* is cited incorrectly (incompletely) in the PhD dissertation and correctly in the abstract - Evstatiev, C., V. Urumova, L. Ivanov & V. Petrov, 2023. Molecular detection of *Mycoplasma agalactiae* by qPCR in sheep and goats from Bulgaria. *Bulgaria J. Vet. Med.* (online first). On careful reading of the same article I find an error in the abstract, probably technical but clearly visible.

❖ **Proposal.** Let the stated error in our authoritative *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* be corrected, which is in quartile 3 (Q3)

#### 10. Dissertation abstract.

The presented abstract is written on 48 pages and objectively reflects the structure and content of the dissertation.

❖ **Note.** I believe that the English text of the abstract should have been accompanied by an English translation of the title of the dissertation.

#### CONCLUSIONS

The PhD dissertation FIELD AND LABORATORY STUDIES OF INFECTIOUS AGALACTIA IN SHEEP AND GOATS IN BULGARIA is up-to-date, timely and well implemented. The various research methods learned and applied by Tsvetomir Genovelov Evstatiev, the experiments carried out, the results obtained, the recommendations made and valuable contributions, give me reason to believe that the presented dissertation is defensible before a scientific jury; meets the requirements of the Law on development of academic staff in the Republic of Bulgaria and the Rules of Trakia University, and I rate it POSITIVELY.

I conclude my statement with a "rule from a favorite teacher":

*No single test is sufficient for diagnosing an infectious disease in a sick patient. EB*

12-03-2024

Stara Zagora

Statement prepared by: .....

Prof. Dr. Ilia Tsachev, DSc