



СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Наско Йовчев Василев

катедра „Акушерство, репродукция и репродуктивни нарушения“, Ветеринарномедицински факултет, Тракийски университет, Стара Загора, назначен за член на научно жури със Заповед № 3252 от 25.09.2023 г. на Ректора на Тракийски университет, Стара Загора.

на материали по защита на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“, от докторант на самостоятелна форма на обучение ас. Марияна Петрова Николова в област на висше образование б. „Аграрни науки и Ветеринарна медицина“, Професионално направление 6.4. „Ветеринарна медицина“, научна специалност „Ветеринарна микробиология“, на тема „Проучвания на видовия състав и чувствителността към антимикробни средства при бактериални щамове, изолирани от говеда с клиничен и субклиничен мастит“ с научен ръководител проф. дн Валентина Стаматова Урумова.

Кратки биографични данни

Марияна Петрова Николова е родена на 21.05.1977 година. Дипломира се като Магистър по Ветеринарна медицина през 2004 г. в Тракийски университет, Ветеринарномедицински факултет, Стара Загора. Работи, като медицински представител и организатор упражнения по Ветеринарна микробиология. След успешно положен изпит през 2019 година е избрана за асистент по Ветеринарна микробиология и вирусология при катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“. В работата си ползва руски, английски, френски език и компютърни програми.

Актуалност на темата

Млечната индустрия търпи значителни загуби вследствие на понижено качество на произведено мляко, намалена средната продуктивност, трайно увреждане на млечни дялове, увеличени разходи за диагностика, лечение и персонал. Възпаленията на млечната жлеза са едни от значимите болестни състояния в млечното говедовъдство. Те са свързани с наличието на патогенни микроорганизми, техните токсини отделяни в млякото и наличието на остатъчни количества от използваните антибактериални средства. Това крие риск за опазване на общественото здраве, свързан с развитието на инфекциозни заболявания при човека след консумация на мляко или млечни продукти. Безконтролното прилагане, неправилния избор, дозировка, продължителност и краткост на използваните антимикробни средства са основна причина за недостатъчен лечебен ефект и възможност за селектиране на резистентни щамове микроорганизми. Този проблем има санитарно-

здравен аспект, защото циркулиращите резистентни и мултирезистентни щамове, които причиняват мастити, чрез млякото и млечните продукти могат да се предават и на човека.

Докторантът и неговия научен ръководител са си поставили за цел да извършат серия от изследвания за изясняване видовия състав на бактериите, причиняващи скрити и явни мастити при кравите за мляко, както и техните отнасяния към химиотерапевтиците, респективно наличната резистентност. На основание горе посоченото, избраната тема е актуална и заслужава проучване.

Степен на познаване състоянието на проблема

Изготвен е литературен преглед за състоянието на проблема, включващ данни за основните фактори, предизвикващи появата и разпространението на бактериалните мастити в говедовъдните ферми и най-често изолираните видове бактерии, причиняващи възпаление на млечната жлеза при кравите за мляко. Представена е подробна класификация на маститите при говедата. Разгледани са въпросите свързани с използваните антимикробни средства за терапия на маститите при говедата. Извършен е ретроспективен преглед на проучванията, свързани с отнасянията към антибактериални средства и наличието на антимикробна резистентност при бактериите, причиняващи мастити кравите. Включени са 313 литературни източници, от които 6 на кирилица и 307 на латиница. Приблизително 60% са от последните десет години.

Цел, задачи и методи на изследване.

За осъществяване на основната цел докторанта си поставя осем задачи чрез които да се проучат разпространението и актуалните бактериални причинители на субклинични и клинични мастити в кравеферми за мляко, техните отнасяния към антимикробни средства и свързаната с това резистентност.

Изследванията са проведени през периода юни 2020 г. до март 2022 г. в осем млечни говедовъдни ферми, по четири в Северна и Южна България. Броят на отглежданите животни във фермите е 1731 крави, като 75% от породата Черно-шарено говедо, а останалите от породата Симентал.

Изследванията за извършени с помощта на съвременна апаратура в клиничните лаборатории на Ветеринарномедицинския факултет. Използвани са рутинни и съвременни методи за оценка на клиничното състояние на кравите, определяне на броя на соматични клетки, бактериологично изследване на млечни проби и фенотипно определяне на изолираните щамове бактерии. Определяне на чувствителността на микроорганизмите към антимикробни средства посредством диск-дифузионния метод и методите за определяне на минималните инхибиращи конценрации (MIC). Генетичните анализи са извършени с qPCR апарат на STRATAGENE Mx3000P. Получените резултати са подложени на подходяща статистическа обработка.

Представяне на получените резултати

Получените резултати са представени в 14 таблици и седем фигури. Възпаленията на млечната жлеза са регистрирани при 239 крави (13.8%). Клинични мастити при 2% (34/1731) и субклинични при 11.8% (205/1731), но в широки граници – от 8.8% до 40% за отделните ферми. Това показва значението на различни фактори, като условията за отглеждане на животните, нивото на хигиена - по време на доене, както и във фермата като цяло, и не на последно място - редовния скрининг и стратегиите при профилактиката на възпаленията на млечната жлеза.

При клиничните случаи на мастит са изолирани *S. agalactiae* (46.7%), следвани от *S. aureus* (23.3%). От субклинични мастити най-често са изолирани коагулаза-негативните стафилококи (31.8%), следвани от нетипизираните по Lancefield стрептококи (21.1%). Тези резултати показват, че *S. agalactiae* е основен причинител на клиничните мастити и широко разпространен във всички ферми. Необходимо е провеждане на регулярни изследвания за профилактика разпространението на възпаленията на млечната жлеза

Коагулаза-негативните стафилококи проявяват най-висок процент резистентност към линкомицин и тетрациклин, съответно 64.1% и 41%. Не е установена резистентност към комбинацията амоксицилин/клавуланова киселина и гентамицин. Щамове *S. aureus* са били резистентни на първо място към ампицилин, следвани от тетрациклин и линкомицин. Не са установени резистентни щамове *S. aureus* към комбинацията амоксицилин/клавуланова киселина, цефалотин, гентамицин, рифампицин, ципрофлоксацин и триметоприм/ сулфаметоксазол. При щамове *S. agalactiae* най-висок процент на резистентност е наблюдаван към тетрациклин, последван от гентамицин и цефалотин. Представените резултати са интересни и предоставят възможности за последващи изследвания. Те потвърждават нуждата от системни изследвания за да се минимизира появата на резистентност и селектирането на резистентни щамове, както и за недопускане на емперичен терапевтичен подход при избор на лечение на възпаленията на млечната жлеза. В повечето случаи резистентността е функция от неправилна антибиотична политика във фермите, поради не извършване на периодични изследвания. Получените резултати за разпространението на резистентността имат пряко отношение към общественото здраве и е актуален проблем с глобално значение.

При стрептококовите щамове изолирани от крави със субклинични и клинични мастити Най-високи стойности на MIC₉₀ са получени към тетрациклин, следвани от тези при гентамицин, цефалотин и ципрофлоксацин, а при линкомицина и еритромицин от порядъка на 1.5 µg/mL. Пониски стойности на MIC₉₀, са отчетени при ампицилин и при комбинацията амоксицилин/клавуланова киселина и рифампицин. Най-високи стойности за MIC₉₀, на изолираните стафилококови щамове, съответно 128 µg/mL и 2 µg/mL са регистрирани за тетрациклин и линкомицин, респективно най-ниски стойности за рифампицин и ципрофлоксацин.

Полирезистентност е установена при 29.1% от изследваните стрептококови щамове. В 15.9% от случаите е установена резистентност към еритромицин, линкомицин, тетрациклин. При 15.4% от мултирезистентните коагулазо-негативни стафилококи е установено наличие на резистентност към бета-лактамните химиотерапевтици и линкомицин. Обезпокоителни са резултатите за високите стойности на MIC₉₀ при стафилококовите щамове към тетрациклин.

Обсъждане на резултатите

Извършено е подробно обсъждане обобщаващо получените резултати, като ги сравнява с литературните данни. Добро впечатление прави извършеният анализ на получените резултати, което дава възможност на докторанта да формира впоследствие своите изводи и приноси по дисертационния труд.

Изводи и научно-приложни приноси

В резултат на получените резултати от разработения дисертационния труд са обобщени дванадесет извода, един оригинален и три потвърдителни приноса. За нуждите на ветеринарната практика са представени четири препоръки, които посочват какви критерии и съвременни молекулярни проучвания да се включат в извършвания мониторинг на млечната жлеза за да бъдат от значение за общественото здраве.

Оценка за степента на лично участие на докторанта

Изследванията са проведени добросъвестно поради което считам, че докторант Марияна Николова е обогатила своите теоретични познания и повишила практическите си умения.

Публикувани статии

Резултатите от разработените задачи са включени в три научни публикации. Две от тях отпечатани във вторични литературни източници и една в реферирано научно списание.

Представеният автореферат отразява обективно структурата и съдържанието на дисертационния труд.

Заклучение

На основание приложените от докторанта различни методи на изследване, правилно изведените експерименти, направените обобщения и изводи считам, че представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение, което ми дава основание да го оценя Положително.

Позволявам си да предложа на почитаемото научно жури да гласува положително и да присъди научната и образователна степен „Доктор“ на ас. Марияна Петрова Николова по научна специалност „Ветеринарна микробиология“, професионално направление 6.4. „Ветеринарна медицина“ и област на висше образование 6. „Аграрни науки и Ветеринарна медицина“,

25.10.2023 г.

Изготвил становището :.....

(прс

заличено съгл.

чл. 23 от ЗЗЛД

STATEMENT

by prof. Dr. Nasko Yovchev Vasilev

department of Obstetrics, reproduction and reproductive disorders, Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora, appointed as member of the scientific jury by Order No. 3252 dated 25 Sep 2023 of the Rector of Trakia University, Stara Zagora.

on materials for defense of a dissertation paper for acquiring PhD educational and scientific degree, by a PhD student in individual form of studies Assist.prof. Mariyana Petrova Nikolova in field of higher education 6. „Agrarian sciences and veterinary medicine”, Professional area 6.4. „Veterinary medicine”, scientific specialty „Veterinary microbiology”, on „Studies on the species composition and sensitivity to antimicrobial agents in bacterial strains isolated from cattle with clinical and subclinical mastitis” with scientific supervisor prof. Valentina Stamatova Urumova, DSc.

Brief biographical data

Mariyana Petrova Nikolova was born on 21 May 1977. She graduated as a Master in Veterinary Medicine in 2004 at Trakia University, Faculty of Veterinary Medicine, Stara Zagora. She worked as a medical representative and organizer of exercises in Veterinary Microbiology. After successfully passing the exam in 2019, she was elected an assistant professor in Veterinary microbiology and virology at the Department of Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases. In her work she uses Russian, English, French and computer programs.

Relevance of the topic

The dairy industry suffers significant losses due to reduced quality of the milk produced, reduced average productivity, permanent damage to milk units, increased costs for diagnostics, treatment and personnel. Inflammation of the mammary gland is one of the significant disease conditions in dairy cattle breeding. They are related to the presence of pathogenic microorganisms, their toxins released in the milk and the presence of residual amounts of the antibacterial agents used. This poses a public health risk related to the development of infectious diseases in humans after consumption of milk or dairy products. Uncontrolled application, incorrect selection, dosage, duration and frequency of the antimicrobial agents used are the main reason for insufficient therapeutic effect and possibility for selecting resistant strains of microorganisms. This problem has a sanitary health aspect because the circulating resistant and multi-resistant strains that cause mastitis can be transmitted to humans through milk and dairy products.

The PhD student and her scientific supervisor set out to carry out a series of studies to clarify the species composition of the bacteria causing hidden and overt mastitis in dairy cows, as well as their relation

to chemotherapeutics, respectively the available resistance. Based on the above, the chosen topic is relevant and deserves research.

Degree of awareness of the current status of the problem

A literature review has been prepared on the state of the problem, including data on the main factors causing the occurrence and spread of bacterial mastitis on cattle farms and the most frequently isolated types of bacteria causing inflammation of the mammary gland in dairy cows. A detailed classification of bovine mastitis has been presented. The questions related to the antimicrobial agents used for the therapy of mastitis in cattle have been considered. A retrospective review of studies related to antibiotic treatment and the presence of antimicrobial resistance in the bacteria causing mastitis in cows has been performed. A total of 313 literature sources have been included, of which 6 are in the Cyrillic and 307 are in the Latin alphabet. Approximately 60% are from the last ten years

Objective, tasks and methods of research.

In order to achieve the main objective, the PhD student sets herself eight tasks through which to study the spread and the current bacterial agents of subclinical and clinical mastitis on dairy farms, their relation to antimicrobial agents and the related resistance.

The research was conducted in the period from June 2020 to March 2022 on eight dairy cattle farms, four each in North and South Bulgaria. The number of farmed animals is 1,731 cows, 75% of which are of the Blackand-White Cattle breed, and the rest are of the Simmental breed.

The research was carried out using modern equipment in the clinical laboratories of the Faculty of Veterinary Medicine. Routine and modern methods were used to assess the clinical condition of the cows, determine the somatic cell count, bacteriological testing of milk samples and phenotypic determination of the isolated bacterial strains. Determining the sensitivity of microorganisms to antimicrobial agents by means of the disk-diffusion method and the methods for determining the minimum inhibitory concentrations (MIC). Genetic analyses were performed with a qPCR device on STRATAGENE Mx3000P. The results obtained were subjected to appropriate statistical processing.

Presentation of the results obtained

The results obtained are presented in 14 tables and seven figures. Inflammation of the mammary gland was registered in 239 cows (13.8%). Clinical mastitis in 2% (34/1731) and subclinical in 11.8% (205/1731), but within wide limits – from 8.8% to 40% for individual farms. This shows the importance of various factors, such as the conditions for rearing the animals, the level of hygiene - during milking as well as on the farm as a whole, and last but not least - regular screening and strategies in the prevention of the mammary gland inflammation.

In the clinical cases of mastitis, *S. agalactiae* (46.7%) have been isolated, followed by *S. aureus* (23.3%). From subclinical mastitis, coagulase-negative staphylococci have most often been isolated (31.8%), followed by non-typed by Lancefield streptococci (21.1%). These results indicate that *S. agalactiae* is a major cause of clinical mastitis and widespread on all farms. It is necessary to carry out regular examinations for prevention of the spread of mammary gland inflammation.

Coagulase-negative staphylococci show the highest rate of resistance to lincomycin and tetracycline, 64.1% and 41%, respectively. No resistance has been found to the combination of amoxicillin/clavulanic acid and gentamicin. *S. aureus* strains were resistant first to ampicillin, followed by tetracycline and lincomycin. No resistant *S. aureus* strains have been identified to the combination of amoxicillin/clavulanic acid, cephalothin, gentamicin, rifampicin, ciprofloxacin and trimethoprim/sulfamethoxazole. In the *S. agalactiae* strains, the highest rate of resistance has been observed to tetracycline, followed by gentamicin and cephalothin. The presented results are interesting and provide opportunities for further research. They confirm the need for systematic research to minimize the emergence of resistance and the selection of resistant strains, as well as to avoid an empiric therapeutic approach when choosing the treatment of mammary gland inflammations. In most cases, resistance is a function of incorrect antibiotic policy on farms due to failure to perform periodic testing. The results obtained on the spread of resistance have a direct relevance to public health and this is a relevant problem of global importance.

In streptococcal strains isolated from cows with subclinical and clinical mastitis, the highest MIC₉₀ values have been obtained for tetracycline, followed by those for gentamicin, cephalothin and ciprofloxacin, and for lincomycin and erythromycin of the order of 1.5 µg/mL. Lower MIC₉₀ values have been reported for ampicillin and for the combination of amoxicillin/clavulanic acid and rifampicin. The highest values for MIC₉₀, of the isolated staphylococcal strains, 128 µg/mL and 2 µg/mL, respectively, have been recorded for tetracycline and lincomycin, respectively, the lowest values for rifampicin and ciprofloxacin. Polyresistance was found in 29.1% of the tested streptococcal strains. In 15.9% of the cases, resistance to erythromycin, lincomycin, tetracycline has been found. A total of 15.4% of the multiresistant coagulase-negative staphylococci were found to be resistant to beta-lactam chemotherapeutics and lincomycin. The results for the high MIC₉₀ values of staphylococcal strains to tetracycline are disturbing.

Discussions of the results

A detailed discussion has been carried out summarizing the results obtained, comparing them with the literature data. A good impression is made by the analysis of the obtained results, which gives the PhD student the opportunity to subsequently form her conclusions and contributions for the dissertation paper.

Conclusions and scientific applied contributions

As a result of the results obtained from the developed dissertation paper, twelve conclusions, one original and three affirmative contributions have been summarized. For the needs of the veterinary practice, four recommendations have been presented, which indicate what criteria and modern molecular studies

should be included in the performed monitoring of the mammary gland in order to be relevant for public health.

Assessment of the degree of personal involvement of the PhD student

The research has been conducted in good faith, which is why I do reckon that PhD student Mariyana Nikolova has enriched her theoretical knowledge and increased her practical skills.

Published articles

The results of the developed tasks have been included in three scientific publications. Two of them are printed in secondary literature sources and one is in a referenced scientific journal.

The submitted self-abstract reflects objectively the structure and content of the dissertation paper.

Conclusion

On the basis of the various research methods applied by the PhD student, the correctly conducted experiments, the generalizations and conclusions made, I do consider that the submitted dissertation paper complies with the requirements of the Law on Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Rules on its implementation, which gives me the ground to assess it Positively.

I take the liberty to propose to the esteemed scientific jury to vote positively and award PhD scientific and educational degree to Assist.prof. Mariyana Petrova Nikolova in the scientific specialty "Veterinary Microbiology", professional area 6.4. "Veterinary Medicine" and field of higher education 6. "Agrarian sciences and veterinary medicine".

25 Oct 2023

Statement prepared by:.....

(pr

ЗАЛИЧЕНО СЪГЛ.

ЧЛ. 23 ОТ ЗЗЛД