

ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СТАРА ЗАГОРА
ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Катедра “Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести”
Секция “Ветеринарна микробиология”

МАРИЯНА ПЕТРОВА НИКОЛОВА

**Проучване на видовия състав и чувствителността към антимикробни
средства при бактериални щамове, изолирани от говеда с клиничен и
субклиничен мастит**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР”

Научна специалност: Ветеринарна Микробиология

Научен ръководител: Проф. дн Валентина Урумова

СТАРА ЗАГОРА

2023

Дисертационният труд е написан на 170 страници, онагледен с 19 таблици и 17 фигури. Библиографската справка включва 314 литературни източника, от които 6 са на кирилица и 308 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден на 29.06.2023 г. от Разширен катедрен съвет, определен със заповед № 28/19.06.2023 г. на Декана на ВМФ, Тракийски университет, Стара Загора и е насочен за защита пред научно жури.

Дисертантът е асистент в Катедра “Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести”, секция “Ветеринарна микробиология”.

Издавам сърдечна благодарност към:

- Научния си ръководител проф. дн Валентина Урумова
- Проф. д-р Михни Люцканов д-р
- Колектива на катедра “Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести”
- Проф. д-р Станимир Йотов и д-р Бояна Иванова от катедра “Акушерство, репродукция и репродуктивни нарушения”
- Моето семейство

Защитата на дисертационния труд ще се състои наотч.
в зала.....,
Ветеринарномедицински факултет при Тракийски университет, гр. Стара Загора.

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в „Научен отдел“ на ВМФ и на уебсайта на Тракийски университет.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

РНК - рибонуклеинова киселина

рРНК – рибозомна рибонуклеинова киселина

иРНК – информационна рибонуклеинова киселина

ЕС – Европейски съюз

САЩ – съединени американски щати

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CNS – коагулаза негативни стафилококи

MIC - минимална инхибираща концентрация

MRSA – метицилин резистентни *S. aureus*

PCR - полимеразно верижна реакция

qPCR – количествена полимеразно верижна реакция

rRNA – рибозомна рибонуклеинова киселина

TSST-1- токсин, предизвикващ синдром на токсичен шок

FAM – флуоресцеинов амидит

ROX – 6 – карбоксил - x – родамин

I. УВОД

Възпаленията на млечната жлеза са едни от най-честите и значими здравни проблеми при млекодайните крави. Това се определя от факта, че маститните заболявания носят огромни икономически загуби за фермерите. В световен мащаб производителите и индустрията като цяло понасят огромни щети от заниженото качество на млякото, намаления млекодобив, временното или трайното увреждане на млечните четвъртини или цялата жлеза, разходите за диагностика и лечение, ангажирането на персонал, загубата на време и ресурси.

От друга страна проблемът има и здравно-санитарен аспект, свързан с наличието на патогенни микроорганизми и техните токсини в млякото, както и присъствието на остатъчни количества антимикробни средства в него. Това от една страна крие риск за опазване на общественото здраве, свързан с развитието на инфекциозни заболявания при човека и особено при децата след консумация на мляко или млечни продукти. От друга страна се създава възможност за селектиране на бактериални щамове, резистентни към химиотерапевтици.

Възпалението на млечната жлеза е болестен процес, който има полиетиологичен характер, интензитет, продължителност и изисква различни терапевтични подходи. Независимо от характера на възпалителния процес в млечната жлеза, когато той протича с участието на патогенни микроорганизми, е необходимо прилагането на антимикробни средства.

Безразборното прилагане, неправилен избор, дозировка, продължителност или кратност на въздействие на антимикробното средство са причина за липса на лечебен ефект и път за селектиране на резистентни щамове микроорганизми.

Придобитата резистентност се разпространява чрез множество различни генетични и биохимични механизми - плазмиди, транспозони, инсерционни последователности, ензимно инактивиране и др. Преносимите гени за резистентност към антибиотици и химиотерапевтици могат да бъдат предавани не само между щамове от един вид, но и между микроорганизмите от различни видове. Това прави този процес трудно контролируем. А когато това касае и опазването на човешкото здраве и здравето на децата, проблемът става още по-значим.

II. СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

A. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия труд беше да проучим най-широко разпространените и актуални бактериални причинители на субклинични и клинични мастити при интензивно отглеждани млекодайки говеда, както и техните отнасяния към антимикробни средства и свързаната с това резистентност.

За постигането на тези цели си поставихме следните задачи:

1. Организиране и провеждане на скринингови проучвания във ферми с млекодайки говеда от различни географски райони в страната за наличие на мастити и получаване на проби от тях.

2. Микробиологични изследвания на проби от клинични мастити, или от такива с висок брой соматични клетки или латентна инфекция. Изолиране, идентифициране и типизиране на микробните изолати и формиране на микробна сбирка.

3. Лабораторно определяне броя на соматичните клетки в млечните проби и съотношението им с вида на изолираните микроорганизми.

4. Генотипна идентификация на някои от най-значимите причинители на мастити.

5. Изпитване на отнасянията на изолираните бактериални щамове към антимикробни средства и фенотипен анализ на наличната резистентност.

6. Проучване върху разпространението на *mesA* сред метицилин – резистентни стафилококи, изолирани от млечни проби.

Б. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Животновъдни обекти

През периода юни 2020г. до март 2022г. бяха изследвани общо 8 млечни говедовъдни ферми по отношение разпространението на клинични и субклинични мастити. От тях 4 бяха с локация в Северна България (областите Шумен – 2 ферми, Търговище и Добрич) и други четири в Южна България (областите Пловдив – 2 ферми,

Стара Загора и Хасково). Броят на изследваните животни по ферми и региони беше следния: Северна България - в област Шумен – с. Трем са изследвани 280 животни, във ферма с. Менгишево - 350 броя, в област Търговище - с. Камбурово – 114 и в област Добрич - с. Карапелит – 500 млекодайки крави. Разпределението в Южна България е както следва: област Стара Загора – 60 броя, област Пловдив – ферма с. Поповица – 96 крави, с. Борец – 270 броя и фермата в област Хасково – гр. Харманли – 61 животни. Всички изследвани животни бяха в период на активна лактация, като 75% от тях бяха от породата Черно-шарено говедо, а останалите бяха от породата Симентал.

2. Скринингово изследване във фермите

В тези стопанства като начало беше проведено скринингово изследване с бърз маститен тест (Kerba mastitis test, Albert Kerbl GmbH, Германия) за установяване наличието на проби с висок брой соматични клетки (Фигура 1). Манипулацията беше извършена по общоприетите правила – измиване, подсушаване и дезинфекция на вимето, дезинфекция на лопатката за маститен тест за всяка отделна крава, изхвърляне на първите няколко струйки мляко, последователност на издояване на млечните четвъртини (първо близките, после далечните цици от позицията на тествания). След вземане на пробите, към всяка паничка на лопатката се прибавяше от индикаторната субстанция на бързия маститен тест. След внимателно разклащане на лопатката се отчитаха резултатите.



Фигура 1. Теренни изследвания и скрининг с бърз маститен тест

Принципът на действие на бързите маститни тестове се състои в разрушаване на мембраните на соматичните клетки в млякото и образуване на флокули с различна консистенция в зависимост от количеството на тези клетки. Тестовите съдържат цветен индикатор за колориметрично определяне на рН на млякото. Нормалното мляко, получено от здраво виме съдържа до 200 000 клетки в 1mL и рН 6.4-6.8. Физиологично

увеличение на броя на соматичните клетки се установява по време на коластралния период и преди пресушаване.

Интерпретация на резултатите при използване на бърз маститен тест са представени в следващата таблица:

Таблица 3. Съдържание на соматични клетки в мляко с различна реакция при използване на бърз маститен тест

Реакция при тестването	Брой соматични клетки в 1mL мляко	Символ на резултата
Отрицателна	до 300 000	-
Съмнителна	до 500 000	+/-
Слабо положителна	до 1 500 000	+
Положителна	до 2 500 000	++
Силно положителна	над 5 000 000	+++

Отрицателна реакция (-) - в мляко от здрава четвъртина не се установяват промени в консистенцията и цвета на млечната проба.

Съмнителна реакция (+/-) – при разклащане на маститната лопатка се появяват тънки нишки, които изчезват след прекратяване на движението.

Слабо положителна реакция (+) – поява на слабо точеща се маса, която при продължително въртене на лопатката изчезва.

Положителна реакция (++) – поява на плътен флокул и точеща се маса, образува се веднага.

Силно положителна реакция (+++) – образува се плътна гелообразна маса, която се запазва във времето.

3. Вземане на проби

От реагиралите съмнително и положително млечни четвъртини, както и от случаите на констатиран клиничен мастит (макроскопски промени в млякото и клинични

признаци на възпаление на вимето), бяха взети проби при абсолютно спазване на правилата за асептика и антисептика – дезинфекция на ръцете на вземащия пробата, дезинфекция на всяка млечна папила, от чиято съответстваща четвъртина се взема проба, последователност при вземане на пробите – от проксимални към дистални засегнати четвъртини, отстраняване на първите няколко струйки мляко от засегнатата четвъртина в специален събирателен съд. Същинската проба мляко се вземаше в стерилен контейнер обозначен с номера на животното, реакцията от теста и съответната млечна четвъртина. Бяха събрани общо 346 проби. От тях 312 бяха от млечни четвъртини, реагирани съмнително или положително на бързия маститен тест и 34 от такива с клинично проявен мастит. Вземите проби се съхраняваха и транспортираха при хладилни условия до микробиологична лаборатория на катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести, секция “Ветеринарна микробиология“ на ВМФ при Тракийски университет, където се извърши бактериологичното изследване.

4. Автоматизирано изброяване на соматични клетки

Изброяването се извърши в лабораторни условия в катедра “Акушерство, репродукция и репродуктивни нарушения“ чрез специализирана автоматизирана система Ecoscope (Everest-Индия) – фигура 2. Дейността на тази система се базира на директен микроскопски метод на изброяване на соматичните клетки в краве мляко. Състои се от две работни секции:

ECOSCOPE – FPS1(автоматизиран вариант) – станция за подготовка на натривките;

ECOSCOPE – SCC1 – станция за микроскопско изследване на натривките;

Същността на методиката се състои в изследване под микроскоп на оцветена млечна натривка, софтуерно измерване, обработка и съхранение на данните, както и възможност за заснемане на изображението от екрана. Броят на соматичните клетки в 1mL от изследваното мляко се определя след изследване на 50 до 100 зрителни полета.



Фигура 2. Автоматизирана система Ecoscope

5. Бактериологични изследвания

Бактериологичните изследвания бяха извършени в микробиологична лаборатория на катедра “Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“ на ВМФ при Тракийски университет. Всички получени млечни проби първоначално бяха центрофугирани при 2000 оборота за 10 мин. За първоначална изолация от депото бяха приготвяни посежки върху кръвен агар (база за кръвен агар Himedia BioSinces, Индия и 5% дефибринирана овча кръв), както и върху агара на Мак Конки (Himedia BioSinces, Индия) – за отдиференциране на Грам-отрицателните бактерии. Инкубацията на посетите хранителни среди беше извършена при аеробни условия, в термостат при 37°C в продължение на 24 - 48 часа. Пробите бяха определени като контаминирани при наличието на повече от два изолирани морфотипа в отсъствието на специфичен растеж на основните етиологични агенти. Съмнителните колонии от двете хранителни среди бяха субкултивирани с оглед получаване на чисти култури. От последните бяха приготвени микроскопски препарати, които бяха оцветявани по метода на Грам. Чистите култури бяха подложени на допълнителни фенотипни изследвания. За предварително идентифициране на бактериите бяха взети предвид следните характеристики:

- *Морфология на колонииите и наличие на хемолиза върху кръвен агар*
- *Растеж или липса на растеж върху агара на Мак Конки*
- *Оцветяване по Грам*
- *Продукция на каталаза и цитохромоксидаза*
- *Тест за подвижност*
- *Тип на метаболизма чрез оксидативно-ферментативния тест на Хю Лайфсон*

5.1. Фенотипно определяне на щамове *Staphylococcus* spp.

При фенотипното определяне на стафилококовите изолати бяха взети предвид и морфологичните характеристики на колонииите - форма, големина, пигментация, експресията на хемолитична активност α -, β -хемолиза или наличие на двойна хемолитична зона. Съмнителните за стафилококи колонии не показаха растеж върху средата на Мак Конки. Бяха тествани за продукция на каталаза и оксидаза. Направени бяха и тестове за продукция на плазмокоагулаза и утилизиране на манитол.

➤ *Тест за цитохромоксидаза*

Тестът за оксидаза извършихме върху филтърна хартия, импрегнирана с реактив от равни части еднопроцентов воден разтвор на диметилпарафенилендиаминов хидрохлорид и еднопроцентов спиртен разтвор на алфа-нафтол. При положителна реакция индикаторната хартия се оцветява в синьо. Стафилококовите изолати реагираха отрицателно при теста за оксидаза - липса на индикативно оцветяване.

➤ *Тест за каталазна активност*

Тестът извършихме с 3% водороден пероксид. При наличие на каталазна активност се образуват мехурчета газ в следствие на разграждането на водородния пероксид. Съспектните стафилококови изолати реагираха с освобождаване на газови мехурчета в следствие продукцията на каталаза.

➤ *Тест за плазмокоагулаза*

Тестът за коагулаза извършихме с лиофилизирана заешка плазма (Himedia BioSinces, Индия), която разтворихме ex tempore със стерилна дестилирана вода според инструкциите на производителя. След инкубация при аеробни условия в термостат при 37°C, за 24 часа, коагулаза-позитивните стафилококи, за разлика от коагулаза-отрицателните, образуваха плътен коагулум в епруетката (фигура 3).



Фигура 3. Тест за плазмокоагулаза при щамове *Staphylococcus* spp. При положителна реакция се образува плътен коагулум.

➤ *Тест за разграждане на манитол*

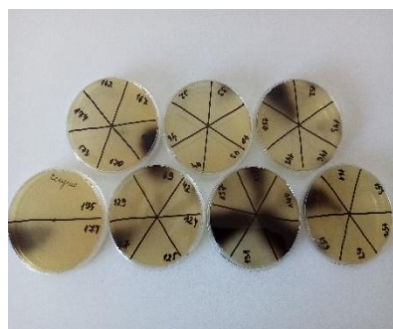
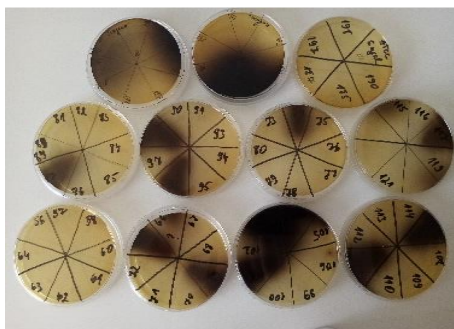
Утилизацията на манитол беше проверена след посевка върху Манитол-солев агар (Himedia BioSinces, Индия), която е и селективна среда за изолиране на някои патогенни стафилококи.

5.2. Фенотипно определяне на щамовете *Streptococcus* spp.

Фенотипното определяне на съмнителните за стрептококи колонии беше базирано освен на морфологията на колонииите, типа хемолиза, оцветяването по Грам, липсата на продукция на каталаза и оксидаза, а така също и по отношение на техните хидролитични отнасяния към ескулин (за първично диференциране на *S. uberis* и ентерококи), CAMP-тест (положителен за стрептококи от група В, респективно *S. agalactiae*) и латекс-аглутинационен тест за допълнително определяне на груповата принадлежност на стрептококите по класификацията на Lancefield.

➤ *Тест за хидролиза на ескулин*

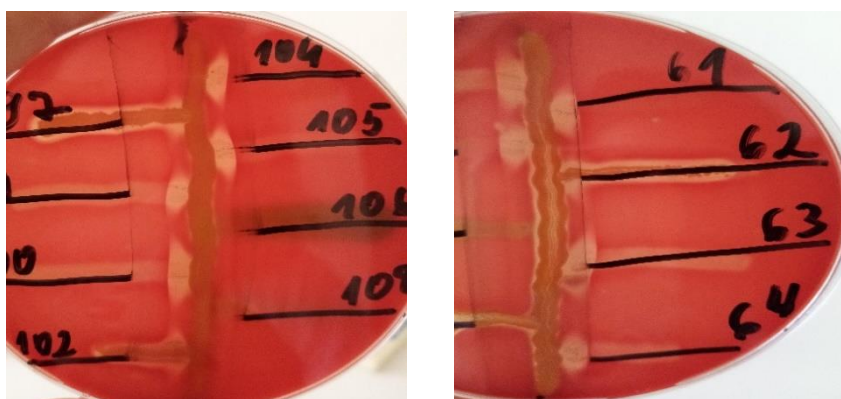
Продукцията на ензима ескулин хидролаза изпитахме чрез щриховане на изследваната бактериална култура върху Ескулин агар (Himedia BioSinces, Индия). Разграничаването на *S. uberis* и ентерококите (група D) от останалите стрептококи, се основава на тяхната способност да хидролизират ескулина. Образува се 6,7-дихидроксикумарин (ескулитин), който взаимодейства с желязни йони и образува черно-кафяв комплекс. Този цвят е индикатор за положителна реакция (фигура 4). В рецептурата на Ескулин агара присъства натриев азид, който инхибира растежа на Грам-отрицателните бактерии и жлъчни соли за потискане растежа на повечето Грам-положителни бактерии с изключение на горе споменатите.



Фигура 4. Тест за хидролиза на ескулин. Положителната реакция е съпроводена с образуване на черно-кафяв комплекс

➤ *Тест за продукция на САМР-фактор*

САМР-тестът (тест на Christie, Atkins и Munch-Petersen) се основава на продуцирането на САМР-фактор от стрептококите от група В. Този фактор подсилва хемолитичната зона на *S. aureus*, която е резултат от активността на бета-хемолитичния токсин (сфингомиелиназа). САМР-тестът направихме върху кръвен агар след перпендикулярно шриховане на референтен щам *S. aureus* ATCC 29213 и съответния изследван щам стрептокок. При положителна реакция в зоната на припокриване действията на САМР-фактора и бета-хемолизина се идентифицира появата на ясна хемолитична зона, която най-често е с формата на стрелка (фигура 5).

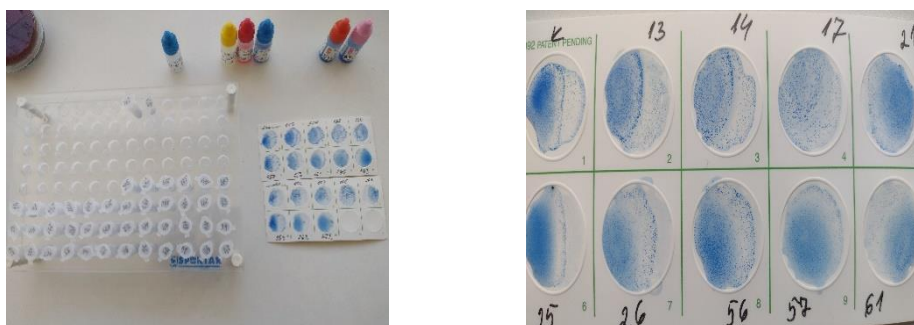


Фигура 5. Тест за продукция на САМР-фактор. При положителна реакция се образува ясна хемолиза в зоните на припокриване.

➤ *Тест за определяне на груповата принадлежност на стрептококовите изолати, съгласно класификационната система на Lancefield чрез латекс-аглутинационната реакция*

За определяне на груповата принадлежност по Lancefield, стрептококите бяха допълнително анализирани с помощта на кит за латекс-аглутинация Prolex Streptococcal Grouping Latex Kit (Pro-lab diagnostics, Canada). Методиката на работа с този тест включва химическо извличане на специфичните за всяка група полизахаридни антигени с помощта на специално разработени реагенти за екстракция с азотна киселина (екстракционен реагент 1 и 2). Реакцията се неутрализира с помощта на екстракционен

реагент 3. Получените екстракти се идентифицират със сини полистиролови латексни частици, сенсibiliзирани с пречистена група заешки имуноглобулини, специфични за съответната група стрептококи по класификацията на Lancefield (фигура 6). Като еталон за сравнение послужи поливалентна положителна контрола, която съдържа поливалентни антигени, извлечени от инактивирани стрептококи от различните групи. Латекса и екстракционните реагенти бяха тествани с референтни щамове за изпитваните групи (*S. agalactiae* ATCC 12386-група В, *S. dysgalactiae* ATCC 12388-група С) - екстрактът от тези щамове аглутинира хомоложния латекс.



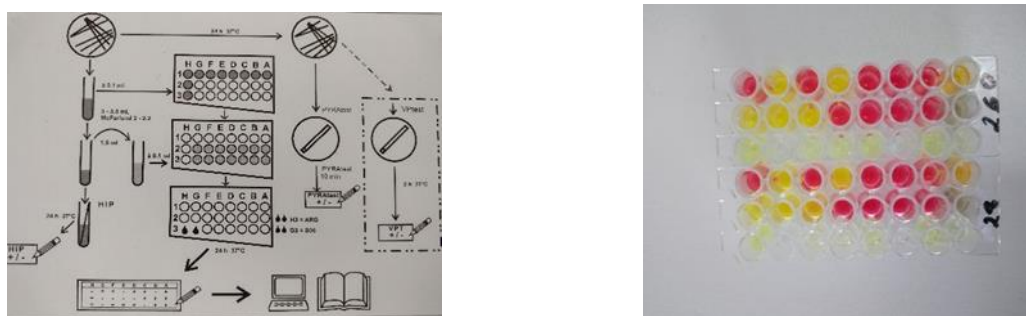
Фигура 6. Тест за латекс аглутинация.

Латекс-аглютинационният тест извършихме при стайна температура в следния ред:

1. Маркирахме по една епруветка за всеки отделен изолат
2. Добавихме по 1 капка екстракционен реагент 1 към всяка епруветка
3. Суспендирахме 1-4 колонии от изследвания щам в реагент 1
4. Добавихме 1 капка екстракционен реагент 2 и суспендирахме 5-10 секунди
5. Добавихме 5 капки от екстракционен реагент 3 и суспендирахме 5-10 секунди
6. Капка от груповият латексов реагент смесихме с капка от получения екстракт върху отделен кръг (гнездо) от специална тестова карта, обозначен за всеки тестван изолат
7. Тестовите карти бяха разклатени внимателно, позволявайки на суспензията да облива бавно целия тестови кръг
8. Аглютинационната реакция беше отчетена до 1 минута от смесването на груповия латексов реагент и получения екстракт.

➤ *STREPTO 24test (Erba Lachema, Чехия)*

Като краен етап в диагностичния алгоритъм за фенотипното определяне на щамовете използвахме STREPTO 24test, който включва 24 субстрата (таблица 4). За теста приготвихме суспензия от 24 часова бактериална култура в стерилен физиологичен разтвор, която определихме между 2-2.2 по McFarland, след което прехвърлихме 1.5 mL към суспензионната среда от кита. Накапахме по 100 μ L от бактериалната суспензия в ямките от първия ред на стрипа, а така също в Н - ямките, във втория и третия ред. Накапахме по 100 μ L от суспензията приготвена в суспензионната среда на STREPTO 24test в ямките от G- до A- в третия ред на стрипа. След инокулирането на ямките в стрипа, накапахме по две капки стерилен течен парафин в ямките с аминокиселините. Стриповете инкубирахме при 37⁰ за 24 часа при аеробни условия (фигура 7). За интерпретация на резултатите използвахме Erba Expert мануел.



Фигура 7. STREPTO 24test – схема на работа и инкубирани стрипчета

Таблица 4. Субстрати, включени в STREPTO 24test

N-ацетил- глюкозаминидаза	ескулин	аргинин
L-леуцин -аминопептидаза	инулин	6.5% NaCl
β -манозидаза	манитол	α -метилглюкозидаза
β -глюкоронидаза	сорбитол	тагатоza
β -глюкозидаза	мелибиоза	малтоза
β -галактозидаза	рибоза	рафиноза
α -галактозидаза	лактоза	трехалоза
фосфатаза	пулулан	сорбоза

5.3. Грам-отрицателни микроорганизми

При наличие на колониален растеж върху средата на Мак Конки се извърши допълнително фенотипно изследване. За целта се разделиха лактоза-положителните от лактоза-отрицателните колонии. Те бяха субкултивирани върху политропната среда на Клиглер за определяне продукцията на сероводород, ферментирането на глюкозата със или без продукция на газ и уреазната активност. Бяха направени тестове за индол и подвижност – в среда за индол и подвижност, тест за използването на цитрат като източник на въглерод в Симонс цитрат агар. Използваните среди са производство на Himedia BioSinces, Индия. Видовете от сем. *Enterobacteriaceae* бяха диференцирани допълнително чрез IMVIC теста.

5.4. Методи за определяне на чувствителността на щамовете към антимикробни средства

След идентификацията на установените в пробите бактериални щамове пристъпихме към изпитване на техните отнасяния към набор от антимикробни средства. Основните методи за фенотипно определяне на чувствителността на микроорганизмите към антимикробни средства са диск-дифузионния метод и методите за определяне на минималните инхибиращи концентрации (MIC) - чрез техниките на разреждания в бульон или в агарова среда, или чрез използването на градуирани ленти, натоварени със съответните концентрации на химиотерапевтиците, Е-тест.

За първоначално определяне на чувствителността работихме по диск-дифузионния метод, а за определяне на минималните инхибиращи концентрации с Е-тест и метода на разрежданията в агар (за линкомицин). Използваните антибиотични дискове, градуирани лентички на Е-теста и агара на Мюлер Хинтон бяха производство на Himedia BioSinces, Индия. Линкомицинът (суха субстанция), ни беше предоставен от завода за ветеринарно медицински препарати в гр. Завет, област Разград. Фенотипния анализ на резистентността контролирахме с референтен щам на *S. aureus* ATCC 29213 и *S. agalactiae* ATCC 12386. За интерпретацията на резултатите, съответно зоните на потискане на растежа, се базирахме на критичните стойности, препоръчани от EUCAST (2022) и CLSI (2018) .

Стафилококите бяха изследвани по отношение на тяхната чувствителност към единадесет химиотерапевтични средства, принадлежащи към няколко различни класове:

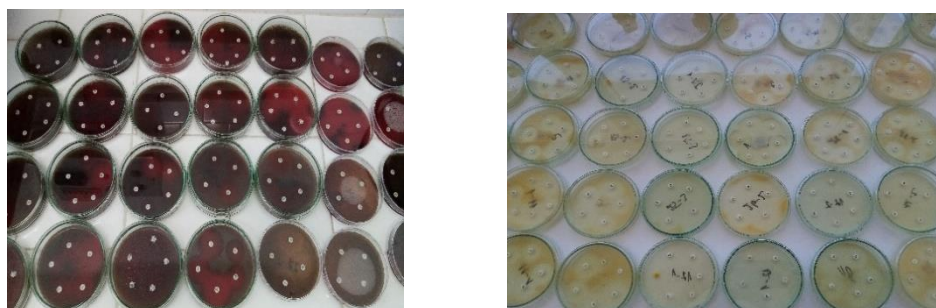
- ✓ Бета-лактамни химиотерапевтици – ампицилин, амоксицилин-клавуланова киселина, оксацилин, цефалотин, цефокситин
- ✓ Аминогликозид-аминоциклитоли – гентамицин
- ✓ Тетрациклини – тетрациклин
- ✓ Линкозамиди – линкомицин
- ✓ Флуорирани хинолони – ципрофлоксацин
- ✓ Рифамицини – рифампицин
- ✓ Антифолатни – триметоприм/сулфаметоксазол

При изпитване чувствителността на стрептококовите изолати, респективно при определяне на МИС, към агаровата среда на Мюлер Хинтон добавихме 5% дефибринирана овча кръв. В тестването на стрептококите бяха включени 9 антимикробни субстанции: ампицилин, амоксицилин-клавуланова киселина, цефалотин, еритромицин, линкомицин, гентамицин, тетрациклин, ципрофлоксацин и рифампицин.

Натовареността на използваните дискове с антибиотична субстанция от фирмата производител е както следва: ампицилин 10 µg, амоксицилин-клавуланова киселина - 20/10 µg, оксацилин 1 µg, цефокситин 30 µg, цефалотин 30 µg, линкомицин 15 µg, гентамицин 10 µg, тетрациклин 30 µg, еритромицин 15 µg, рифампицин 5 µg, ципрофлоксацин 25 µg, ко-тримоксазол 25 µg (триметоприм/сулфаметоксазол – 1.25 µg /23.75 µg).

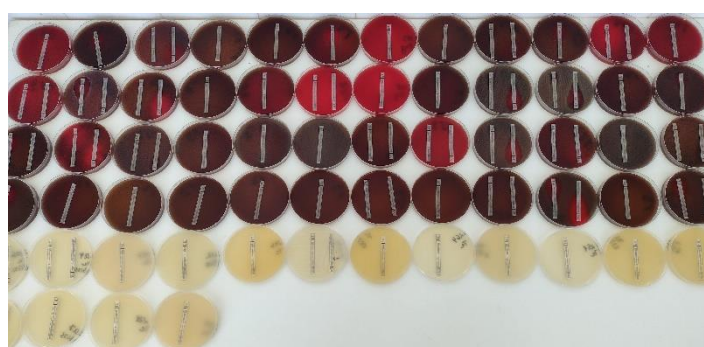
При провеждането на диск-дифузионния метод за определяне на чувствителността на изолатите, приготвихме суспензия от 24 часова бактериална култура, диспергирана в стерилен физиологичен разтвор. Бактериалната суспензия приготвихме до оптична плътност, съответстваща на гъстотата 0.5 по стандарта на Мак Фарланд. Със стерилен тампон щриховахме агара на Мюлер Хинтон в три равнини под ъгъл 60°C. След подсъхване на агаровата повърхност поставихме антибиотичните дискове и инкубирахме при аеробни условия, за 18 - 24 часа при 37°C. След измерване зоните на инхибиране на растежа, изолатите бяха определени като сензитивни, устойчиви и

интермедиерни, като последните се причисляват към резистентните от клинична гледна точка (фигура 8).



Фигура 8. Определяне на чувствителността на изолатите към химиотерапевтични средства по Диск-дифузионен метод

За определянето на MIC на проучваните химиотерапевтици чрез Е-тест приготвихме суспензия от 24 часова бактериална култура доведена до гъстота, отговаряща на по-горе споменатата оптична плътност. Върху щрихованите със стерилен тампон агарови повърхности на Мюлер Хинтон - агара бяха поставени градуираните ленти на Е-теста, така че цялата дължина на антибиотичния градиент да е в контакт с агара (фигура 9). Инкубацията се извърши при 37°C за 18 - 24 часа, при аеробни условия. При отчитането на резултатите се установи зона с елипсовидна форма по дължината на градуираната лента. Стойността на MIC определихме при крайната точка на най-тесната част, където ръбовете на инхибираната зона пресичат градуираната лента.



Фигура 9. Определяне на MIC на проучваните химиотерапевтици чрез Е-тест

МИС за линкомицин бяха определени по метода на серийните разреждания в агар. За целта предварително разтворихме сухата антибиотична субстанция в стерилна дестилирана вода за приготвяне на работен разтвор и след това разредахме с разтопен и охладен до 45 - 50°C агар на Мюлер Хинтон, така че да се получи концентрация на антибиотика в първия разтвор 64 µg/ml и двукратни падащи разреждания във всеки следващ. След застиване на петрите с така приготвения агар с линкомицин, щриховахме суспензия от изпитвания щам с гъстота приблизително 1x100 000 cfu/mL. Така, върху една петра с определена концентрация на антибиотика изпитвахме няколко щам. Инкубацията се извърши при същия температурен режим и време. При метода на разреждане в агар растежът на 1-2 колонии или едва видим растеж бяха пренебрегнати.

5.5. Генетична идентификация на стафилококи, стрептококи и ген *tesA* при метицилин резистентни стафилококи

За екстрахиране на ДНК от съспектните колонии използвахме DNeasy Blood Tissue kit (Qiagen Германия), а идентификацията извършихме с готови китове - Microbial DNA qPCR assay kits, произведени от Qiagen Германия. За генетичните изследвания използвахме TaqMan сонди за откриване на амплификационните области, детерминиращи видовата идентификация на изследваните бактерии, маркирани с FAM репортерно багрило и ROX пасивно референтно багрило. Амплификационните реакции извършихме в qPCR апарат на STRATAGENE Mx3000P (фигура 10), производство на Agilent Technologies (САЩ).

➤ Екстракция на ДНК

Методиката на екстракция на ДНК включва няколко етапа:

1. Лизиране на таргетните клетки
2. Селективно свързване на екстрахираната нуклеинова киселина към мембрана от силициев диоксид, която е прикрепена към лумена на колекторна епруветка
3. Промиване от наличните примеси
4. Елюиране на нуклеиновата киселина и събирането и в микроепруветка.

Процедурата по екстракцията направихме, следвайки протокола предложен от производителя:

1. Пригответихме суспензия от 24 часова бактериална култура в микроцентрифужна епруветка, която центрофугирахме за 10мин. при 7500 об/мин. и отстранихме супернатантата
2. Депото от бактериална маса ресуспендирахме в 180 µl ензимен лизиращ буфер (концентрация на лизозима 20mg/ml)
3. Суспензията инкубирахме на водна баня за 30мин. при 37°C
4. След инкубацията добавихме 25 µl протеиназа K и 200 µl буфер AL
5. Отново инкубирахме на водна баня, но при 56°C за 30мин.
6. След инкубацията добавихме 200 µl етанол и вортексирахме
7. Суспензията се отпипетира и се прехвърля в DNeasy Mini епруветка, поставена в колекторна епруветка от 2ml и отново центрофугирахме за 1мин. при 8000 оборота.
8. DNeasy Mini епруветката поставихме в нова колекторна епруветка, добавихме 500 µl AW1 разтвор (миещ буфер) и центрофугирахме отново за 1мин. при 8000 оборота
9. След нова смяна на колекторната епруветка и поставяне на DNeasy Mini епруветката в нова, добавихме 500 µl AW2 разтвор (миещ буфер) и отново центрофугирахме - за 3мин. при 14000 оборота
10. Прехвърлихме DNeasy Mini епруветката в микроцентрифужна епруветка, добавихме 200 µl AE буфер (елюирация буфер) и центрофугирахме за 1мин. при 8000 оборота

➤ *Протокол на амплификационната реакция*

За осъществяване на генетичните анализи използвахме валидиран протокол, съответно готови китове Microbial DNA qPCR assay kits, който включва следните компоненти:

- Microbial DNA – Positive control
- Positive PCR control

- Microbial DNA – Free water
- Microbial DNA qPCR Assay (хидролитична TaqMan сонда и двойка праймери)
- Microbial qPCR Master mix

Протокола на фирмата производител включва следните компоненти:

Таблица 5. Протокол на амплификационната реакция

Компоненти	n=1
PCR water	6.5 µl
Master mix	12.5 µl
qPCR assay	1 µl
Mastermix –общ обем	20 µl
Екстрахирана ДНК	5 µl
Общ обем	25 µl

След вортексиране на мастърмикса, добавихме екстрахираната ДНК в обем 5 µl, така че общия обем в една микроепруветка беше 25 µl. Амплификационната реакция се извърши в qPCR апарат. Термопрофилът на реакцията включваше следните етапи: начална стъпка на денатурация при 95°C за 10мин, следващата стъпка включваше два етапа, които се повтарят в 40 цикъла – денатурация (протича при 95°C за 15секунди) и анелинг/елонгация (протича при 60°C за 2 минути). Положителната контрола, съгласно указанията на производителя интерпретирахме със Ст< 34.



Фигура 10. Генетични анализи с qPCR апарат на STRATAGENE Mx3000P

6. Статистически методи - Статистическата обработка на данните беше извършена с помощта на GraphPad In Stad 3 software.

III. РЕЗУЛТАТИ

1. РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА СТАФИЛОКОКОВИТЕ И СТРЕПТОКОКОВИТЕ ЩАМОВЕ, ИЗОЛИРАНИ ОТ МЛЕЧНИ ПРОБИ ОТ КРАВИ В ИЗСЛЕДВАНИТЕ ОСЕМ ФЕРМИ

Настоящото проучване беше проведено за периода 2020г. - 2022г. в осем говедовъдни ферми от различни региони на страната.

1.1. Брой на изследваните ферми, брой на взетите проби за микробиологично изследване и брой на бактериалните щамове

Данните от проведените първични изследвания по ферми са представени в таблица 6. След клиничен преглед и изследване на място с бърз маститен тест (Kerba mastitis test), данни за мастити показаха общо 239 крави. От тях 34 (14.2%) бяха с клинично изявено възпаление. Положително или съмнително на бързия маститен тест реагираха 205 (85.8%) животни, от които бяха взети 312 млечни проби за микробиологично изследване. Към тях се прибавиха 34 проби от случаите на клинично проявен мастит. Микробиологично бяха изследвани общо 346 проби, от които бяха изолирани 272 бактериални щамове.

Таблица 6. Брой на изследваните ферми, брой на взетите проби за микробиологично изследване, брой на бактериалните щамове

Ферми	Брой на животните в изследваните ферми	Общ брой проби n=346	Проби от клинични мастити n=34	Проби с висок брой сомат. клетки n=312	Общ брой бактериални и щамове
Трем	280	30 (8.7%)	2 (5.9%)	28 (9%)	22
Камбурово	114	33 (9.5%)	10 (29.4%)	23 (7.4%)	24
Менгишево	350	103 (29.8%)	10 (29.4%)	93 (29.8%)	67
Карапелит	500	78 (22.5%)	3 (8.8%)	75 (24%)	64
Ст. Загора	60	31 (9%)	1 (2.9%)	30 (9.6%)	26

Поповица	96	35 (10.1%)	1 (2.9%)	34 (10.9%)	29
Харманли	61	6 (1.7%)	6 (17.6%)	-	4
Борец	270	30 (8.7%)	1 (2.9%)	29 (9.3%)	36
Общо	1731	346	34	312	272

Най-много проби с висок брой соматични клетки бяха изследвани от фермата в с. Менгишево (29.8%), след това от стопанство с. Карапелит (24%), а най-малко от стопанство с. Камбурово (7.4%). Респективно случаите на клиничен мастит бяха отново най-много в с. Менгишево, но и в с. Камбурово - по 29.4% от събраните млечни проби.

1.2. Резултати от фенотипната идентификация на бактериалните щамове и тяхното разпределение в изследваните осем ферми

При микробиологичното изследване на общо 346 млечни проби, микробна находка беше установена при 272 от тях (79.1%), като 30 изолата (11%) бяха от проби на животни с клинични мастити и 242 изолата (89%) бяха от проби на животни със скрити мастити. При 151 проби беше доказано наличието на изолати принадлежащи към *Streptococcus* spp., респективно 55.5%. На базата на биохимичните отнасяния и груповото типизиране на стрептококовите изолати по Lancefield, 40.4% (61 изолата) бяха определени като *S. agalactiae*, 34.4% (52 изолата) принадлежаха към вида *S. uberis* и 25.2% (38 изолата) бяха отнесени към вида *S. dysgalactiae*. На второ място по честота на изолиране бяха представителите на *Staphylococcus* spp. Те бяха установени при 110 от изследваните проби или 40.4% от тях. Като 70.9% (78 изолата) от тях бяха отнесени към групата на коагулаза-негативните стафилококи, а 29.1% (32 изолата) от тях към групата на коагулаза-позитивните стафилококи. Общо находката от Грам-положителните коки беше 96% от микробните видове. Останалите 4% (11 изолата) принадлежаха към други 6 таксона. Те включваха 4 щамове, които на база предварителна фенотипна идентификация, бяха определени като *Trueperella pyogenes*, 3 щамове като *E.coli*, и по 1 щам от видовете *Pasteurella multocida*, *Nocardia* spp., *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter* spp.

Разпространението на щамовете в отделните ферми варираше. Най-висок процент стрептококови щамове бяха изолирани във фермата с. Менгишево 91%, следван от

фермата в гр. Стара Загора – 57.7% и с. Трем – 54.5%, а най-нисък – 33.3% във фермата с. Камбурово. Стафилококовите щамове бяха най-много във с. Камбурово – 66.7%, след това в с. Поповица – 65.5% и с. Борец – 55.5%, а най-малко в с. Менгишево – 7.5%. Интересно е да се отбележи, че в с. Менгишево всички изолати от клинични мастити се оказаха принадлежащи към *Streptococcus* spp., като по-голямата част от тях бяха от вида *S. agalactiae*, докато във фермата с. Камбурово повечето клинични изолати принадлежаха към *Staphylococcus* spp., от вида *S. aureus*.

Резултатите от фенотипната идентификация на бактериалните щамове изолирани от изследваните млечни проби в изследваните ферми са представени в таблица 7.

Таблица 7. Разпределение на бактериалните щамове в изследваните осем ферми

Ферми	Бактериални щамове (клинични мастити)	Бактериални щамове (субклиничн и мастити)	<i>Streptococcus</i> spp.		<i>Staphylococcus</i> spp.		Други
Трем	2	20	12 (54.5%)	<i>S. agalactiae</i> -6 <i>S. dysgalactiae</i> -4 <i>S. uberis</i> -2	3 (13.6%)	<i>S. aureus</i> -2 CNS-1	<i>T. pyogenes</i> -3 <i>Pasteurella</i> spp.-1 <i>E.coli</i> – 3(2кл+1)
Камбурово	8	16	8 (33.3%) 3 кл	<i>S. agalactiae</i> -4 (3кл+1) <i>S. uberis</i> - 4	16 (66.7%) 5 кл	<i>S. aureus</i> -11 (4кл+7) CNS-5 (1кл+4)	
Менгишево	10	57	61 (91.1%) 10 кл	<i>S. agalactiae</i> -42 (9Кл+33) <i>S. dysgalactiae</i> -7 <i>S. uberis</i> -12 (1кл+11)	5 (7.5%)	CNS-5	<i>Klebsiella</i> spp.-1
Карапелит	3	61	30 (46.9%) 2 кл	<i>S. agalactiae</i> -7 (2кл+5)	34 (53.1%) 1 кл	<i>S. aureus</i> -5 (1кл+4)	

				<i>S. dysgalactiae</i> -8 <i>S. uberis</i> -15		CNS-29	
Ст. Загора	1	25	15 (57.7%) 1 кл	<i>S. dysgalactiae</i> -9 (1кл+8) <i>S. uberis</i> -6	11 (42.3%)	<i>S. aureus</i> -3 CNS-8	
Поповица	1	28	10 (34.5%) 1 кл	<i>S. dysgalactiae</i> -5 (1 кл+4) <i>S. uberis</i> -5	19 (65.5%)	<i>S. aureus</i> -1 CNS-18	
Харманли	4	-	2 (50%) 2кл	<i>S. dysgalactiae</i> -2	2 (50%) 2кл	<i>S. aureus</i> -2	
Борец	1	35	13 (36.1%)	<i>S. agalactiae</i> -2 <i>S. dysgalactiae</i> -3 <i>S. uberis</i> -8	20 (55.5%)	<i>S. aureus</i> -8 CNS-12	<i>T. pyogenes</i> -1 <i>Acinetobacter</i> spp.- 1кл <i>Nocardia</i> spp.-1
Общо	30	242	151	<i>S. agalactiae</i> -61 <i>S. dysgalactiae</i> - 38 <i>S. uberis</i> -52	110	<i>S. aureus</i> -32 CNS - 78	11

Легенда: CNS- коагулаза-негативни стафилококи

1.3. Съотношение между броя на соматичните клетки и изолираните бактериални щамове

Данните от броя на соматичните клетки в млечните проби, отнесен към изолираните видове микроорганизми са отразени в таблица 8.

Най-висок процент от вида *S. aureus* – 65.7%, както и от вида *S. agalactiae* – 75.4% бяха изолирани от млечни проби с концентрация на соматичните клетки над 5 млн./mL, а най-нисък – респективно 3.1% и 0 % при стойности – до 500 хил./mL. Най-висок беше процента на коагулаза-отрицателните стафилококи - 35.9% в пробите с брой на соматичните клетки около 500 хил./mL, а стойностите при щамове *S. uberis* и *S. dysgalactiae* показаха вариации.

Таблица 8. Съотношение между броя на соматичните клетки (mL) и изолираните бактериални щамове

Брой соматични клетки (mL)	<i>S. aureus</i> (n=32)	CNS (n=78)	<i>S. agalactiae</i> (n=61)	<i>S. uberis</i> (n=52)	<i>S. dysgalactiae</i> (n=38)
До 500 хил.	1 (3.1 %)	28 (35.9 %)	0 (0 %)	8 (15.4 %)	7 (18.4 %)
500 хил.-1.5 млн	5 (15.6 %)	24 (30.8 %)	7 (11.4 %)	17 (32.7 %)	9 (23.7 %)
1.5-2.5 млн	0 (0 %)	10 (12.8 %)	4 (6.6 %)	12 (23.1 %)	6 (15.8 %)
2.5-5 млн	5 (15.6 %)	4 (5.1 %)	4 (6.6 %)	3 (5.7 %)	4 (10.5 %)
над 5 млн	21 (65.7 %)	12 (15.4 %)	46 (75.4 %)	12 (23.1 %)	12 (31.6 %)

Легенда: CNS – коагулаза-негативни стафилококи

1.4. Видово разпределение на стафилококовите и стрептококовите щамове изолирани от клинични и субклинични форми на възпаление на млечната жлеза

В таблица 9 са представени обобщените данни за видовото разпределение на стафилококите и стрептококите, изолирани съответно от клинични и субклинични форми на възпаление.

Таблица 9. Обобщени данни за видовото разпределение на щамовете, изолирани от клинични и субклинични мастити

Клинични изолати (n=30)			Субклинични изолати (n=242)		
<i>S. agalactiae</i>	14	46.7%	CNS	77	31.8%
<i>S. aureus</i>	7	23.3%	<i>S. uberis</i>	51	21.1%
<i>S. dysgalactiae</i>	4	13.3%	<i>S. agalactiae</i>	47	19.4%
CNS	1	3.3%	<i>S. dysgalactiae</i>	34	14%
<i>S. uberis</i>	1	3.3%	<i>S. aureus</i>	25	10.3%

Легенда: CNS – коагулаза-негативни стафилококи

На първо място по честота на изолиране при клиничните случаи на мастит бяха представителите на *S. agalactiae* (46.7%), следвани от *S. aureus* (23.3%). От пробите от субклинични мастити най-често бяха изолирани коагулаза-негативните стафилококи (31.8%), следвани от *S. uberis* (21.1%).

От общо 242 щамата изолирани от субклинични мастити, 102 щамата (42.1%) бяха идентифицирани като стафилококи (таблица 10), като 75.5% от тях бяха коагулаза-отрицателни стафилококи, а 24.5% принадлежеха към вида *S. aureus*. При щамовете изолирани от клинични мастити, в 26.6% от случаите бяха изолирани стафилококи, като 87.5% от тях бяха *S. aureus* и 12.5% бяха коагулаза-отрицателни стафилококи.

Таблица 10. Разпределение на стафилококовите щамове при клиничните и субклинични форми на възпаление на млечната жлеза

Вид	Субклин. мастити		Клинични мастити		Общо	
	<i>Staphylococcus</i>		<i>Staphylococcus</i>		<i>Staphylococcus</i>	
	spp Брой	%	spp Брой	%	spp Брой	%
<i>S. aureus</i>	25/102	24.5	7/8	87.5	32/110	29.1
CNS	77/102	75.5	1/8	12.5	78/110	70.9
Общо	102		8		110	

От общия брой щамове изолирани от субклинични мастити, 132 щам (54.5%) бяха отнесени към *Streptococcus* spp (таблица 11).

От инкриминираните при субклиничните мастити стрептококови щамове бяха установени съответно 35.6% *S. agalactiae*, 38.6% *S. uberis* и 25.8% *S. dysgalactiae*. Висок процент на разпространение (63.3%) на стрептококите бе констатиран и при клиничните мастити (19 щам от общо 30). От установените стрептококи, изолирани от клинични мастити, 73.7% бяха *S. agalactiae*, 5.3% *S. uberis* и 21 % *S. dysgalactiae*.

Таблица 11. Разпределение на видовете стрептококи при клиничните и субклинични форми на възпаление на млечната жлеза

Вид	Субклинични мастити		Клинични мастити		Общо	
	<i>Streptococcus</i> spp. Брой	%	<i>Streptococcus</i> spp. Брой	%	<i>Streptococcus</i> spp. Брой	%
<i>S. agalactiae</i>	47/132	35.6	14/19	73.7	61/151	40.4
<i>S. uberis</i>	51/132	38.6	1/19	5.3	52/151	34.4
<i>S. dysgalactiae</i>	34/132	25.8	4/19	21	38/151	25.2
Общо	132		19		151	

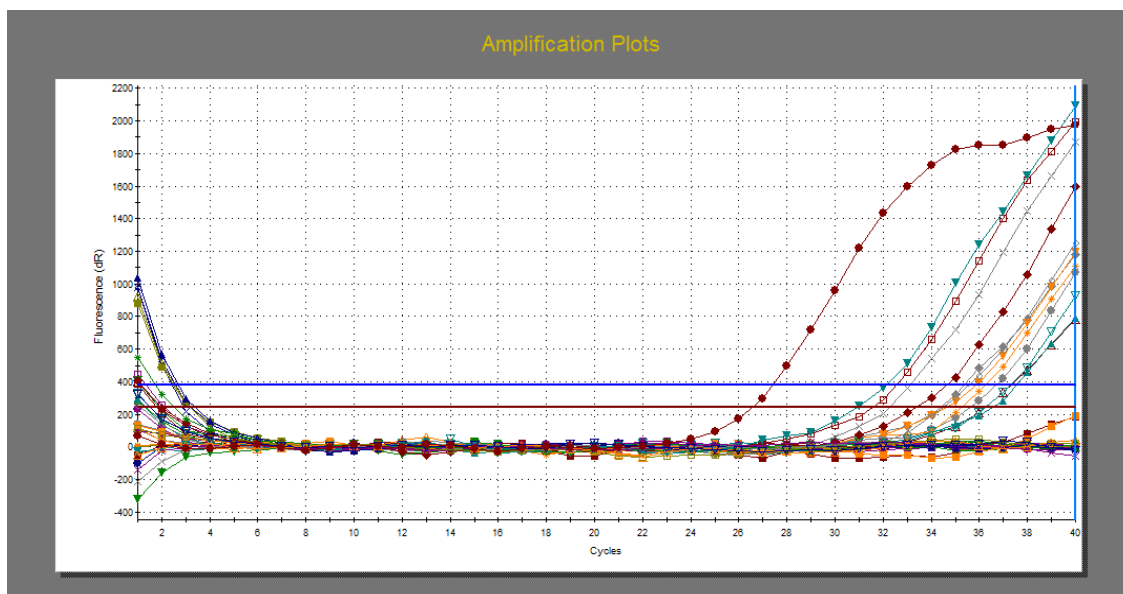
1.5. Генетични анализи

1.5.1. Генетични анализи за идентифициране на *S. aureus* и *S. epidermidis*

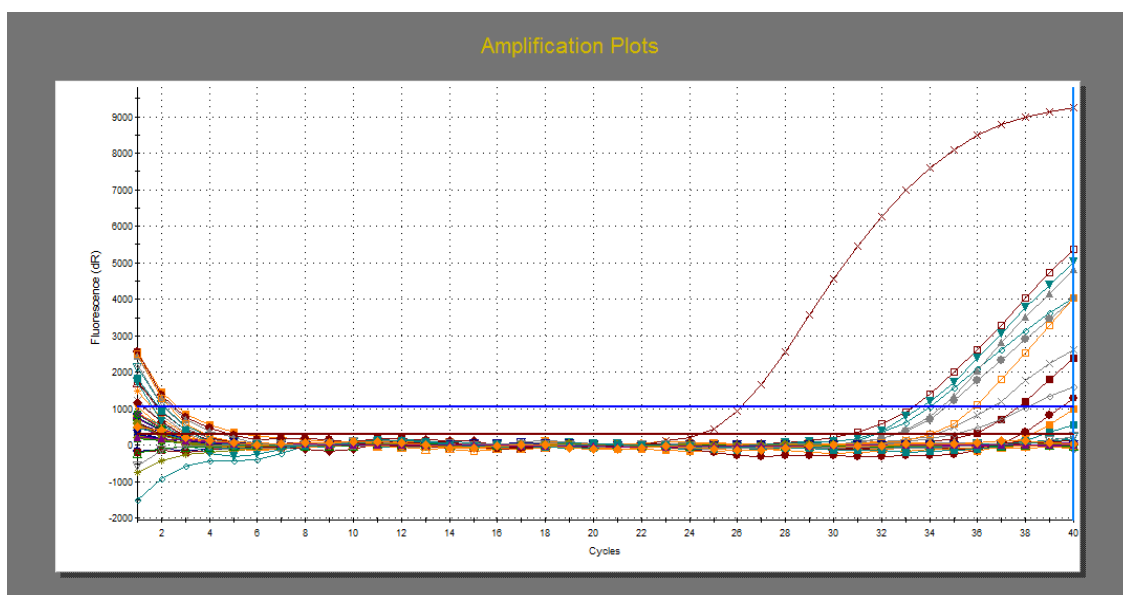
На фигура 11 са представени амплификационните плотове и Ст стойностите за идентифицираните *S. aureus* щамове изолирани от млечните проби. Положителната ДНК контрола експресира Ст < 34 съгласно протокола на DNA assay kits, Qiagen, Германия.

По аналогичен начин на фигура 12 са представени амплификационните плотове и Ст стойностите за идентифицираните *S. epidermidis* щамове изолирани от млечните проби.

При генетичния анализ на стафилококовите щамове беше потвърдена фенотипната идентификация, респективно по отношение на вида *S. aureus* (32 щам), а по отношение на групата на коагулаза-негативните стафилококи от общо 78 щам, при 8 щам (10.2%) беше идентифициран вида *S. epidermidis*.



Фигура 11. Амплификационни плотове и Ст стойностите за *S. aureus*

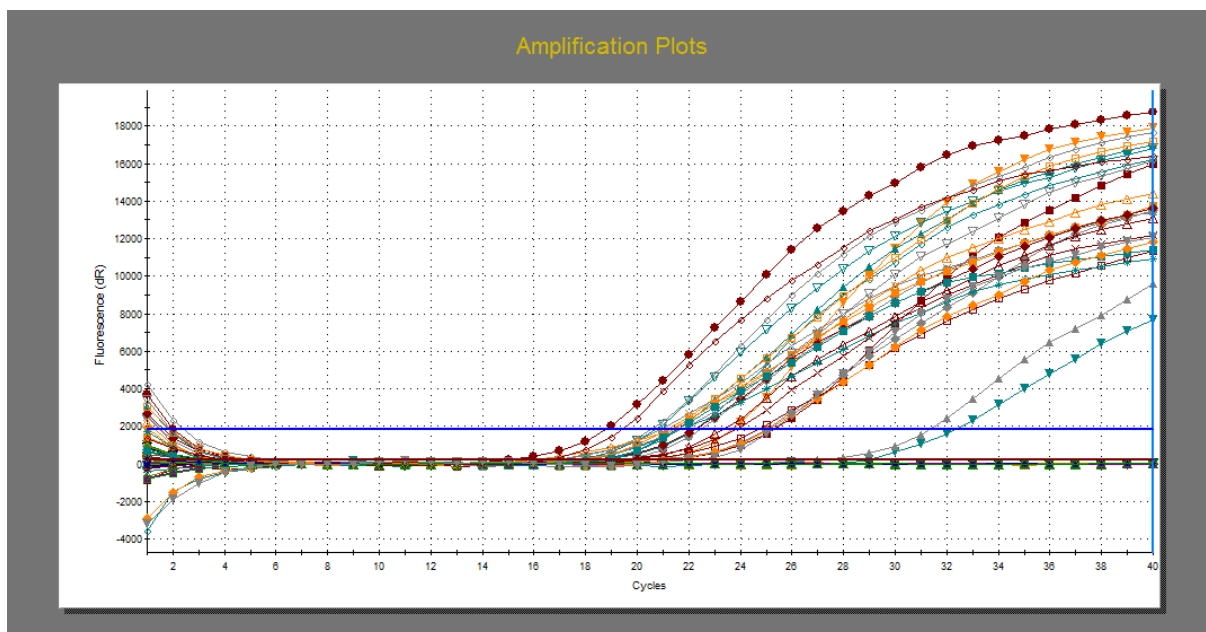


Фигура 12. Амплификационни плотове и Ст стойностите за *S. epidermidis*

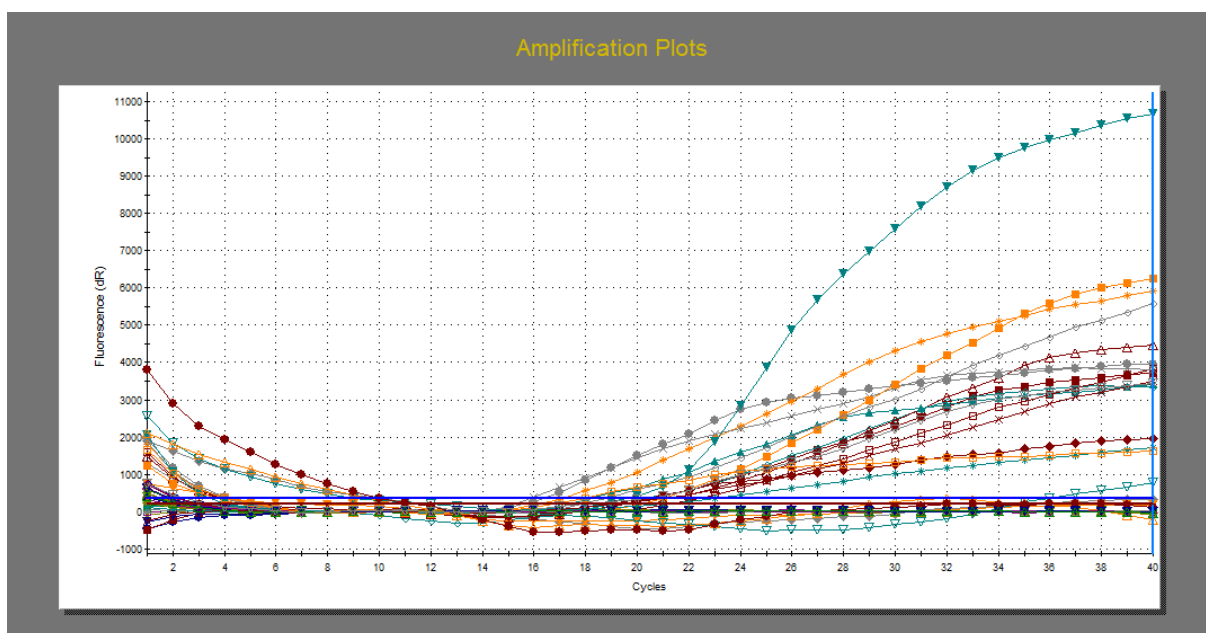
1.5.2. Генетични анализи за идентифициране на *S. agalactiae*

Амплификационните плотове и Ст стойностите за идентифицираните щамове *S. agalactiae* са представени на фигури 13 и 14.

Генетичната идентификация потвърди 100% от определените фенотипно 61 щам *S. agalactiae*.



Фигура 13. Амплификационни плотове и Ст стойностите за *S. agalactiae*



Фигура 14. Амплификационни плотове и Ст стойностите за *S. agalactiae*

2. ОТНАСЯНИЯ КЪМ РАЗЛИЧНИ КЛАСОВЕ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧНИ СРЕДСТВА ПРИ ИЗОЛИРАНИТЕ ОТ МЛЕЧНИ ПРОБИ СТАФИЛОКОКИ И СТРЕПТОКОКИ

2.1. Отнасяния на изолираните щамове *Staphylococcus* spp. към антимикробни средства в изследваните ферми

Данните за отнасянията на изолираните щамове към антимикробните средства са отразени в таблица 12. Видно е, че чувствителността на щамовете варира значително, както в отделните стопанства, така и по отношение на различните класове антимикробни средства.

От всички 110 щама *Staphylococcus* spp., които бяха тествани към оксацилин, чувствителни бяха 95 щама (86.4%). Останалите 15 щама (13.6%) показаха резистентност или интермедиерна чувствителност. Този предварителен резултат представлява интерес, тъй като е възможен индикатор, че тези 13.6% са рискови за селектиране на метицилин резистентни щамове. Разпространението на резистентността към ампицилин сред стафилококите беше 24.5%. Към комбинацията амоксицилин/клавуланова киселина не бяха установени резистентни стафилококови щамове.

Спрямо цефокситина, който е химиотерапевтик от втора генерация цефалоспорины и също може да бъде използван като индикатор за интерпретиране на фенотипа на оксацилиновата резистентност, изолираните при клинични и субклинични мастити стафилококови щамове, показаха висок процент на съхранена сензитивност (94.6%). Интерес представлява факта, че по-голяма част от намерените резистентни стафилококи са изолирани от проби, произхождащи от кравефермата в гр. Стара Загора.

Към цефалоспориновия антибиотик, представител на първа генерация цефалоспорины-цефалотин, беше установена почти 100% (с изключение на един щам) съхранена чувствителност сред *Staphylococcus* spp. Този резултат контрастира с установената чувствителност при стрептококовите щамове спрямо същия. Тази теза важи и за отнасянията към рифампицина сред стафилококовите щамове. Спрямо аминогликозидния антибиотик гентамицин беше регистрирана 100% запазена сензитивност при тестираните общо 110 стафилококови щамове.

По отношение на линкомицина при стафилококовите щамове беше установена 50% резистентност. Този факт беше анализиран при повечето от изследваните ферми, най-вече при щамове изолирани от животните в стопанствата в с. Менгишево, с. Карапелит и в с. Поповица. Спрямо тетрациклина също беше регистриран висок процент на резистентни щамове - 37.3%, респективно 41 от общо изследваните 110 щамове. Прави впечатление отсъствието на тетрациклинова резистентност при стафилококите, изолирани във фермите в с. Камбурово и в с. Трем. Сензитивността към ципрофлоксацина беше 98.2%, като само 2 щамове от фермата в Карапелит показваха резистентност.

При потенцираните с триметоприм сулфонамиди, устойчивост беше установена само при 8 стафилококови щамове, като 4 от тях произхождаха от фермата в с. Поповица.

Таблица 12. Отнасяния на щамовете *Staphylococcus* spp. към антимикробни средства (%) разпределени в изследваните осем ферми

Ферми	Бакт. щамове	Резултати	Amp	Aug	Ox	Cep	Fox	L	G	T	Rif	Cip	Cot
Трем	3	S	100	100	100	100	100	66.7	100	100	100	100	100
		R+I	0	0	0	0	0	33.3	0	0	0	0	0
Камбурово	16	S	37.5	100	75	100	100	100	100	100	100	100	93.75
		R+I	62.5	0	25	0	0	0	0	0	0	0	6.25
Менгишево	5	S	100	100	100	80	100	20	100	80	100	100	100
		R+I	0	0	0	20	0	80	0	20	0	0	0
Карапелит	34	S	91.2	100	91.2	100	97	44	100	44	100	94.1	97
		R+I	8.8	0	8.8	0	3	56	0	56	0	5.9	3
Ст.Загора	11	S	63.6	100	63.6	100	63.6	72.7	100	27.3	100	100	90.9
		R+I	36.4	0	36.4	0	36.4	27.3	0	72.7	0	0	9.1
Поповица	19	S	68.4	100	89.5	100	94.7	26.3	100	78.9	94.7	100	78.9
		R+I	31.6	0	10.5	0	5.3	73.7	0	21.1	5.3	0	21.1
Харманли	2	S	0	100	100	100	100	50	100	50	100	100	100
		R+I	100	0	0	0	0	50	0	50	0	0	0
Борец	20	S	90	100	90	100	100	35	100	60	100	100	95
		R+I	10	0	10	0	0	65	0	40	0	0	5
Общо	110	S	75.5	100	86.4	99.1	94.6	50	100	62.7	99.1	98.2	92.7
		R+I	24.5	0	13.6	0.9	5.4	50	0	37.3	0.9	1.8	7.3

Легенда: S-чувствителност; I-интермедиерна чувствителност; R-резистентност; Amp- ампицилин; Aug- амоксицилин+клавуланова киселина; Ox- оксацилин; Cep- цефалотин; Fox-цефокситин; L-линкомицин; G-гентамицин; T-тетрацилин; Rif – рифампицин; Cip-ципрофлоксацин; Cot- сулфаметоксазол/триметоприм

2.2. Отнасяния на изолираните щамове *Streptococcus* spp. към антимикробни средства в изследваните ферми

По-различни се оказаха данните за отнасянията към изпитваните химиотерапевтици при стрептококовите щамове (таблица 13). Те бяха тествани спрямо 9 антимикробни средства, като за разлика от стафилококите, при тях бяха пропуснати оксацилина, цефокситина и потенцираните с триметоприм сулфонамиди.

По отношение на ампицилина беше установено, че от всичките 151 тествани щамове, резистентност към този химиотерапевтик са показали 37 щамове, респективно 24.5%. Най-голям дял от тях са с произход фермата в с. Менгишево, следвана от тази в Карапелит и Стара Загора. Добавянето на бета-лактамазен инхибитор резултира с преодоляване на устойчивостта.

Спрямо цефалотина беше установена резистентност при 36.4% от щамове *Streptococcus* spp., като 50 броя от тях бяха изолирани от кравите в с. Менгишево. В останалите кравеферми такава устойчивост не беше регистрирана.

По отношение на еритромицина беше установено наличие на резистентност при 21.9% от стрептококовите щамове. Най-често такива щамове произхождаха от кравефермите в с. Карапелит, с. Трем и гр. Стара Загора. По отношение на линкомицина, делът на устойчивите щамове възлизаше на 51.7%, което показва едно много високо ниво на резистентност. Особено тревожно се оказва състоянието на този проблем в кравефермите в с. Менгишево, с. Карапелит, гр. Стара Загора и с. Поповица. Резистентност беше налице и при изолатите от с. Трем и с. Борец.

Към гентамицин резистентност беше установена при 49 от всичките 151 щамове *Streptococcus* spp., респективно 32.5%, като доминиращата част от тях отново произхождаха от кравите в с. Менгишево.

Поради широката употреба на тетрациклиновите антибиотици във ветеринарната практика в нашата страна, за нас беше любопитно какви са отнасянията към тетрациклин на стрептококовите щамове от клинични и особено от субклиничните мастити при кравите. Установено беше, че от всички тествани стрептококи 73.5% показваха устойчивост към тетрациклина. На практика по-голямата част от изолатите в с. Менгишево и с. Трем се оказаха устойчиви към тази група антимикробни средства.

Спрямо рифампицина устойчивост показаха 52 щамa (34.4%) от всички тeстирани стрептококи. Отново най-висок процент резистентност беше доказан при щамoвете, произхождащи от с. Менгишево.

Стрептококите са устойчиви към класическите групи флуорирани 4-хинолонови химиотерапевтици, но въпреки това ние включихме ципрофлоксацина в набора от подбрани антимикробни средства. Презумпцията беше, че това са едни от най-често употребяваните в практиката средства, особено срещу Грам-негативните бактерии, причиняващи системни, чревни, респираторни или уроинфекции при животните. При нашето изследване беше установено, че 29.1% от изследваните стрептококови щамове са устойчиви.

Таблица 13. Отнасяния на изолираните щамове *Streptococcus* spp. към 9 антимикробни средства (%) разпределени по отношение на изследваните осем ферми

Ферми	Бакт. щамове	Резултати	Amp	Aug	Cep	E	L	G	T	Rif	Cip
Трем	12	S	83.3	100	91.7	41.7	41.7	58.3	16.7	75	16.7
		R+I	16.7	0	8.3	58.3	58.3	41.7	83.3	25	83.3
Камбурово	8	S	100	87.5	100	87.5	75	75	50	87.5	62.5
		R+I	0	12.5	0	12.5	25	25	50	12.5	37.5
Менгишево	61	S	67.2	100	18	93.4	62.3	39.3	16.4	57.4	63.9
		R+I	32.8	0	82	6.6	37.7	60.7	83.6	42.6	36.1
Карапелит	30	S	73.3	100	93.3	70	36.7	90	50	70	76.7
		R+I	26.7	0	6.7	30	63.3	10	50	30	23.3
Ст.Загора	15	S	60	100	93.3	60	33.3	100	0	73.3	100
		R+I	40	0	6.7	40	66.7	0	100	26.7	0
Поповица	10	S	90	100	90	70	0	100	30	60	100
		R+I	10	0	10	30	100	0	70	40	0
Харманли	2	S	100	100	100	100	100	100	50	100	100
		R+I	0	0	0	0	0	0	50	0	0
Борец	13	S	100	100	100	76.9	46.2	84.6	38.5	61.5	84.6
		R+I	0	0	0	23.1	53.8	15.4	61.5	38.5	15.4
Общо	151	S	75.5	99.3	63.6	78.1	48.3	67.5	26.5	65.6	70.9
		R+I	24.5	0.7	36.4	21.9	51.7	32.5	73.5	34.4	29.1

Легенда: S-чувствителност; I-интермедиерна чувствителност; R-резистентност; Amp- ампицилин; Aug- амоксицилин+клавуланова киселина; Cep- цефалотин; E-еритромицин; L-линкомицин; G-гентамицин; T-тетрациклин; Rif – рифампицин; Cip-ципрофлоксацин.

2.3. Видово разпределение на резистентността сред изолираните стафилококови щамове и техните доверителни интервали

Разпределението на резистентността сред изолираните стафилококови щамове е отразено в следващата таблица 14. Коагулаза-негативните стафилококи показаха най-висок процент резистентност към линкомицин и тетрациклин, респективно 64.1% и 41%. Резистентни щамове не бяха наблюдавани към комбинацията амоксицилин/клавуланова киселина и гентамицин. Щамове *S. aureus* бяха резистентни на първо място към ампицилин (43.7%), след това към тетрациклин (28.1%) и линкомицин (15.6%). Не бяха установени резистентни щамове *S. aureus* към комбинацията амоксицилин/клавуланова киселина, цефалотин, гентамицин, рифампицин, ципрофлоксацин и триметоприм/сулфаметоксазол.

Таблица 14. Проценти на резистентни стафилококи към 11 химиотерапевтични средства и техните доверителни интервали

Химиотерапевтици	Коагулаза-негативни стафилококи (n=78)	<i>S. aureus</i> (n=32)	Общ брой стафилококи (n=110)	Доверителни интервали (CL)
Ампицилин	13 (16.7%)	14 (43.7%)	27 (24.5%)	17.8÷32.8
Амоксицилин /клавула-нова к-на	-	-	-	
Оксацилин	12 (15.4%)	3 (9.4%)	15 (13.6%)	7.8÷20.6
Цефалотин	1 (1.3%)	-	1 (0.9)	0÷3.5
Цефокситин	3 (3.8 %)	3 (9.4%)	6 (5.4%)	1.9÷10.3
Линкомицин	50 (64.1%)	5 (15.6%)	55 (50%)	40.7÷59.3
Гентамицин	-	-	-	
Тетрациклин	32 (41.0%)	9 (28.1%)	41 (37.3%)	28.5÷46.5
Рифампицин	1 (1.3%)	-	1 (0.9%)	0÷3.5
Ципрофлоксацин	2 (2.6%)	-	2 (1.8%)	0.1÷5.1
Триметоприм/сулфаметоксазол	8 (10.2%)	-	8 (7.3%)	3.1÷12.8

2.4. Видово разпределение на резистентността сред изолираните стрептококови щамове и техните доверителни интервали

Резултатите от установеното видово разпределение на резистентността сред представителите на *Streptococcus* spp. са отразени в таблица 15.

Таблица 15. Проценти на резистентни стрептококи към 9 химиотерапевтични средства и техните доверителни интервали

Химиотерапевтици	<i>S. agalactiae</i> (n=61)	<i>S. uberis</i> (n=52)	<i>S. dysgalactiae</i> (n=38)	Общ брой стрептококи (n=151)	Доверителни интервали
Ампицилин	20 (32.8%)	13 (25%)	4 (10.5%)	37 (24.5%)	18÷31.6
Амоксицилин /клавуланова к-на	1 (1.6%)	-	-	1 (0.7%)	0÷2.6
Цефалотин	35 (57.3%)	13 (25%)	7 (18.4%)	55 (36.4%)	29.9÷44.1
Еритромицин	7 (11.5%)	12 (23.1%)	14 (36.8%)	33 (21.9%)	16.7÷29.8
Линкомицин	13 (21.3%)	41 (78.8%)	24 (63.2%)	78 (51.7%)	42.6÷59.5
Гентамицин	43 (70.5%)	3 (5.8%)	3 (7.9%)	49 (32.5%)	25.3÷40.1
Тетрациклин	55 (90.2%)	30 (57.7%)	26 (68.4%)	111 (73.5%)	66.2÷80.2
Рифампицин	22 (36.1%)	26 (50%)	4 (10.5%)	52 (34.4%)	27.1÷42.1
Ципрофлоксацин	29 (47.5%)	10 (19.2%)	5 (13.1%)	44 (29.1%)	22.2÷35.6

При щамовете *S. agalactiae* най-висок процент на резистентност беше наблюдаван към тетрациклин (90.2%), след това към гентамицин (70.5%) и цефалотин (57.3%). По-слабо беше разпространението на резистентните стрептококи към комбинацията амоксицилин/клавуланова киселина – 1.6% и към еритромицин – 11.5%. *S. uberis* бяха най-устойчиви към линкомицин, тетрациклин и рифампицин, съответно 78.8%, 57.7% и 50%, като към комбинацията амоксицилин/клавуланова киселина не показаха резистентност, а в ниска степен - 5.8% демонстрираха такава към гентамицин. При щамовете *S. dysgalactiae* най-широко беше разпространението на резистентността към тетрациклин (68.4%) и линкомицин (63.2%), а след това и към еритромицин (36.8%), и гентамицин (7.9%). Не беше наблюдавана резистентност към комбинацията амоксицилин/клавуланова киселина.

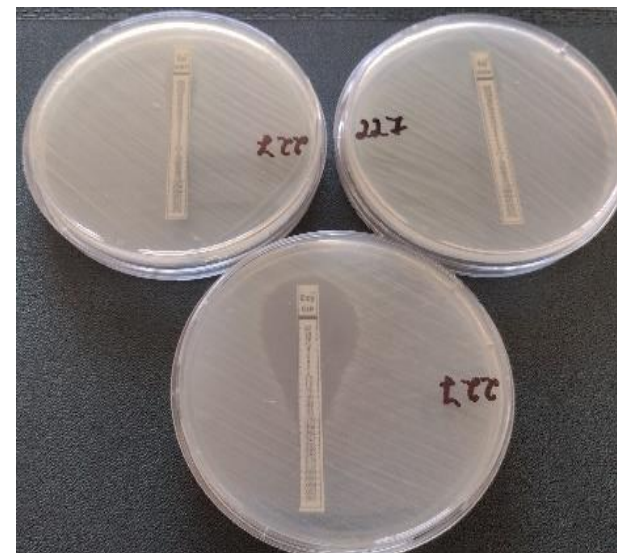
2.5. Резултати, отнасящи се до определените MIC₉₀ при щамовете *Staphylococcus* spp.

В таблица 16 са представени резултатите отнасящи се до определените MIC₉₀ към девет от проучените химиотерапевтици при стафилококите, а на фигура 15 са показани резистентни щамове стафилококи, идентифицирани чрез E-тест. Най-високи стойности за MIC₉₀, съответно 128 µg/mL и 2 µg/mL бяха анализирани за тетрациклин и линкомицин, респективно най-ниски стойности 0.001µg/mL бяха наблюдавани за рифампицин и ципрофлоксацин. По отношение на оксацилин MIC₉₀ беше 0.125µg/mL, за комбинацията триметоприм/сулфаметоксазол бяха определени стойности 1.5µg/mL, респективно за ампицилин, цефалотин и цефокситин 1µg/mL.

Таблица 16. MIC за 9 химиотерапевтични средства определени при стафилоки, изолирани от субклинични и клинични мастити при говеда (n=110)

Химиотерапевтици	MIC ₉₀	MIC µg/mL																
		0.001	0.125	0.5	0.75	1	1.5	2	3	4	6	8	16	32	64	96	128	192
Ампицилин	1.0		85	2*	5	8	2	4	1	2					1			
Оксацилин	0.125		98	6*		2	1	3*										
Цефалотин	1.0			32	30	20		27			1*							
Цефокситин	1.0					54		50		2*		1	1	2				
Линкомицин	2.0			5	45	5		55*										
Тетрациклин	128										69*			1	9	1	4	26
Рифампицин	0.001	109	*								1							
Ципрофлоксацин	0.001	108	*											2				
Триметоприм/сулфа метоксазол	1.5					30	40	32		3*		1		4				

Легенда: Критичните стойности на MIC са маркирани със звездички



Фигура 15. Резистентност при щамове *Staphylococcus* spp., идентифицирана при определяне на MIC по метода на Е-тест

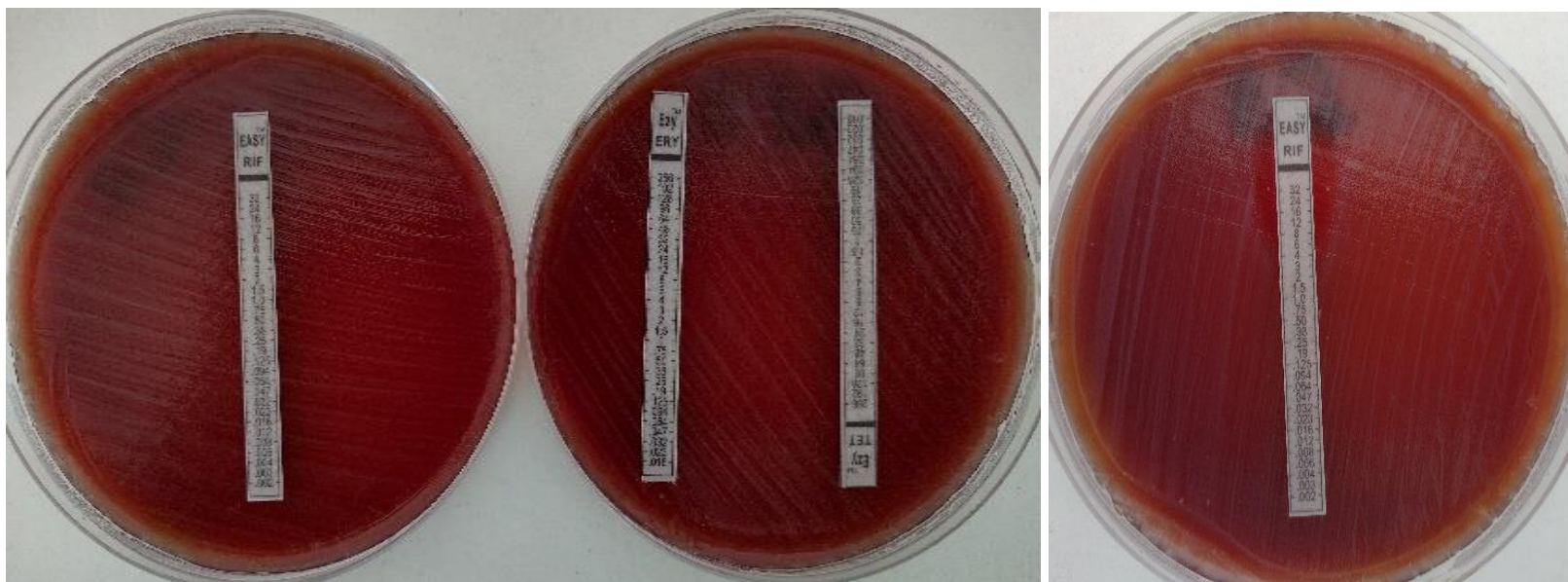
2.6. Резултати, отнасящи се до определените MIC₉₀ при щамовете *Streptococcus* spp.

На таблица 17 са представени MIC₉₀ стойностите на 9 химиотерапевтични средства при стрептококовите щамове изолирани от крави със субклинични и клинични мастити, а на фигура 16 е показана резистентност по метода Е-тест. Най-високи стойности на MIC₉₀ 128 µg/mL бяха определени към тетрациклин, след това бяха наблюдавани стойности на MIC₉₀, 4 µg/mL при гентамицин. MIC₉₀ от порядъка на 2 µg/mL бяха намерени при цефалотин и ципрофлоксацин, а при линкомицина и еритромицин бяха определени стойности от порядъка на 1.5 µg/mL. По-ниски стойности на MIC₉₀, бяха анализирани при ампицилин - 0.250 µg/mL, а след това и при комбинацията амоксицилин/ клавуланова киселина и рифампицин - 0.19 µg/mL.

Таблица 17. MIC на 9 химиотерапевтични средства при стрептококови щамове изолирани от субклинични и клинични мастити при говеда (n=151)

Химиотерапевтици	MIC µg/mL															
	MIC ₉₀	0.06	0.125	0.19	0.25	0.5	1	1.5	2	4	8	16	32	64	128	192
Ампицилин	0.25			97	17*	28	6	2				1				
Амоксиклав	0.19		16	97	37*				1							
Цефалотин	2			24	31	32	9*	23	24	4	3	1				
Еритромицин	1.5		25	75	18*	7	4	7			3		2			10
Линкомицин	1.5		73*				6	5	59	8						
Гентамицин	4	4	53		45*		5			28	9	6	1			
Тетрациклин	128		31				9*					1	29	48	15	18
Рифампицин	0.19	99*	33	1		6	6			1	1	4				
Ципрофлоксацин	2		2	9	21	75*			27	12	3	1				1

Легенда: Със звездички са отбелязани критичните стойности на MIC



Фигура 16. Резистентност при щамове *Streptococcus* spp., идентифицирана при определяне на MIC по метода на Е-тест

2.7. Картини на резистентност при полирезистентни стафилококи, изолирани от млечни проби

В следващата таблица 18 са представени мултирезистентните фенотипни профили при стафилококите изолирани от млечни проби. При 15.4% от мултирезистентните коагулаза-негативни стафилококи беше установено наличие на резистентност към бета-лактамите химиотерапевтици и линкомицин. При 9.4% от коагулаза-позитивните стафилококи мултирезистентните профили се отнасяха до бета-лактамите оксацилин, ампицилин, цефокситин и тетрациклин.

Таблица 18. Картини на резистентност при полирезистентни стафилококи, изолирани от млечни проби при говеда (n=110)

Картини на резистентност	Брой резистентни щамове	Резистентни стафилококи (%) и доверителни интервали (CL)
	Коагулаза-негативни стафилококи (n=78)	
Ох, Amp, L, T	6	7.7% (2.8÷14.5)
Ох, Amp, Fox, L	2	2.6% (0.3÷7.2)
Ох, Amp, L	2	2.6% (0.3÷7.2)
Ох, Amp, Ceph, L	1	1.3% (0÷4.9)
Ох, Amp, AMC, Ceph, Fox, L, T	1	1.3% (0÷4.9)
	Коагулаза-позитивни стафилококи (n=32)	
Ох, Amp, Fox, Te	3	9.4% (1.9÷21.7)

Легенда: Легенда: Ох- оксацилин, Амр- ампицилин, АМС- амоксицилин/клавуланова к-на, Серф- цефалотин, Фох- цефокситин, L- линкомицин, Т- тетрациклин, RIF- рифампицин

2.8. Картини на резистентност при полирезистентни стрептококи, изолирани от млечни проби

В таблица 19 са представени мултирезистентните фенотипни профили при стрептококите изолирани от млечни проби. Картини на полирезистентност бяха установени при 29.1% от изследваните стрептококови щамове. В 15.9% (24 броя) от случаите беше демонстрирана резистентност към еритромицин, линкомицин, тетрациклин. При 7.3% (11броя) от стрептококите беше наблюдавана комбинирана резистентност към цефалотин, гентамицин, тетрациклин. При 5.3% (8 броя) от щамовете беше определена полирезистентност към цефалотин, еритромицин и линкомицин. Най-широко разпространение на полирезистентни щамове установихме сред вида *S. agalactiae* - 29.5%, като най-широко разпространение имаха резистентните щамове към цефалотин, гентамицин и тетрациклин (8.2%). След това при 28.9% от щамовете *S. dysgalactiae* наблюдавахме полирезистентни профили, като с най-голяма честота на разпространение бяха щамовете показали резистентност към еритромицин, линкомицин и тетрациклин (13.1%). При *S. uberis* беше наблюдавана сходна честота на разпространение на щамове с полирезистентен профил - 28.8%, като най-висока честота на разпространение интерпретирахме при щамовете, показали резистентност към еритромицин, линкомицин, цефалотин и тетрациклин (7.7%).

Таблица 19. Картини на резистентност при полирезистентни стрептококи изолирани от млечни проби при говеда (n-151)

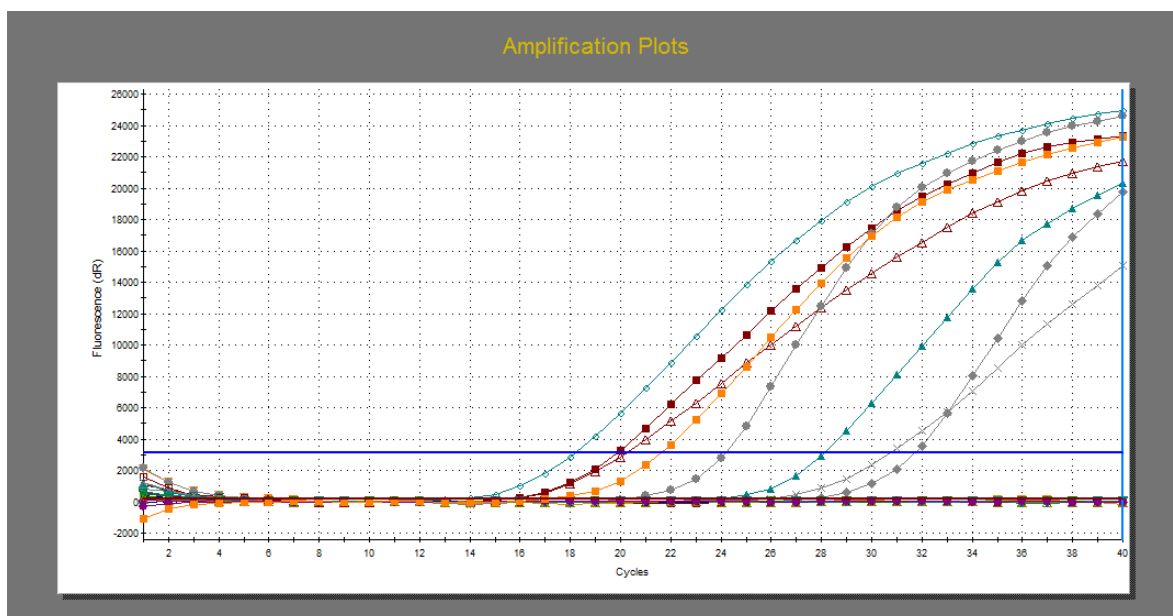
Картини на резистентност	<i>S. agalactiae</i> (n=61)	<i>S. uberis</i> (n=52)	<i>S. dysgalactiae</i> (n=38)	Брой резистентни щамове	Резистентни стрептококи (%) и доверителни интервали (CL)
E, L, T	3(4.9%)	4(7.7%)	5(13.1%)	12	7.9% (4.1÷12.7)
Ceph, L, T	3(4.9%)	4(7.7%)	-	7	4.6% (1.8÷8.4)
Ceph, Gen, T	5(8.2%)	-	-	5	3.3% (1.0÷6.7)
Ceph, Gen, L, T	4(6.6%)	-	-	4	2.6% (0.6÷5.7)
E, L, Gen, T	1(1.6%)	1(1.9%)	1(2.6%)	3	2% (0.3÷4.8)
Ceph, E, L, T	-	1(1.9%)	2(5.3%)	3	2% (0.3÷4.8)
E, L, T, Rif	-	1(1.9%)	2(5.3%)	3	2% (0.3÷4.8)
Ceph, E, L	-	1(1.9%)	-	1	0.7% (0÷2.6)
AMC, Gen, T	1(1.6%)	-	-	1	0.7% (0÷2.6)
Ceph, E, L, Rif	-	1(1.9%)	-	1	0.7% (0÷2.6)
Ceph, L, Gen	-	-	1(2.6%)	1	0.7% (0÷2.6)
Ceph, E, L, Gen, T	1(1.6%)	-	-	1	0.7% (0÷2.6)
Ceph, E, L, T, Rif	-	1(1.9%)	-	1	0.7% (0÷2.6)
Ceph, E, Gen, T, L, Rif	-	1(1.9%)	-	1	0.7% (0÷2.6)
Общо:	18 (29.5%)	15(28.8%)	11(28.9%)	44	29.1%

Легенда: Амр- ампицилин, AMC- амоксицилин/клавуланова к-на, Ceph-цефалотин, L- линкомицин, T- тетрациклин, RIF-рифампицин

2.9. Генетичен анализ за определяне на *mecA* при *Staphylococcus* spp. изолирани от млечни проби при говеда

Амплификационните плодове и Ст стойностите за *mecA* при *Staphylococcus* spp. са представени на фигура 17.

Генетичният анализ показва, че при коагулаза-негативните щамове, показали резистентност към оксацилин и цефокситин (12 щамове резистентни към оксацилин и 3 щамове резистентни към цефокситин), 4 щамове са носители на *tesA*, а при вида *S. aureus* бяха определени 3 щамове (3 щамове резистентни към оксацилин и цефокситин).



Фигура 17. Амплификационни плотове и Ст стойностите за *tesA* при *Staphylococcus* spp.

ИЗВОДИ

1. Основните миробни видове изолирани от крави със субклинични мастити са представители на род *Streptococcus* (54.5%) и род *Staphylococcus* (42.2%).
2. От млечни проби, получени от крави с клиничен мастит се изолират главно *S. agalactiae* (46.7%), *S. aureus* (23.3%) и *S. dysgalactiae* (13.3%).
3. Най-често изолираният представител на род *Streptococcus* е *S. agalactiae* (40.4%), следван от *S. uberis* (34.4%) и *S. dysgalactiae* (25.2%).
4. Най-често изолираните представители на род *Staphylococcus* са коагулаза-негативните стафилококи - 70.9%. *S. aureus* беше установен в 29.1% от пробите.
5. Най-висок процент стрептококови щамове бяха изолирани във фермата с. Менгишево - 91%. Стафилококовите щамове бяха най-широко разпространени в с. Камбурово - 66.7%.

6. Концентрацията на соматичните клетки над 2.5 млн./mL в млечните проби е свързана с възпалителен процес предизвикан от *S. agalactiae* (82% от всички изолирани представители на вида) или *S. aureus* (83.3% от всички изолирани представители на вида), докато в тези с брой на соматичните клетки до 500 хил/mL, в 63.6 % от пробите, се установяват коагулаза-отрицателни стафилококи.

7. При генетичния анализ на стафилококовите щамове беше потвърдена фенотипната идентификация, респективно по отношение на вида *S. aureus* (32 щам - 100%), а по отношение на групата на коагулаза-негативните стафилококи от общо 78 щам, при 8 щам -10.2%, беше идентифициран вида *S. epidermidis*.

8. При генетичния анализ на стрептококовите щамове беше потвърдена фенотипната идентификация, по отношение на вида *S. agalactiae* при 61 щам (100%).

9. Сензитивността на стафилококовите щамове беше съхранена към гентамицин (100%), амоксицилин/клавулонова киселина (100%), цефалотин (99.1%), рифампин (99.1%), ципрофлоксацин (98.2%), цефокситин (94.6%), потенцирани сулфонамиди (92.7%), оксацилин (86.4%) и ампицилин (75.5%). Най-висока е резистентността към линкомицин (50%) и тетрациклин (37.3%).

10. При стрептококовите щамове сензитивността беше съхранена в най-висока степен по отношение на амоксицилин/клавулонова киселина (99.3%), еритромицин (78.1%), ампицилин (75.5%) и ципрофлоксацин (70.9%). Над 60% от щамове са чувствителни на гентамицин (67.5%), рифампицин (65.6%) и цефалотин (63.6%). Най-висока е резистентността към линкомицин (51.7%) и тетрациклин (73.5%).

11. По отношение на мултирезистентния профил при коагулаза-позитивните стафилококи (*S. aureus*), най-широко е разпространението на фенотипен профил включващ ампицилин, оксацилин, цефокситин и тетрациклин (9.4%), при коагулаза-негативните – оксацилин, ампицилин, линкомицин и тетрациклин (7.7%), а при полирезистентните стрептококи - фенотипен профил, включващ еритромицин, линкомицин и тетрациклин.

12. Стафилококите, показали резистентност към оксацилин и цефокситин експресират *mecA* при 4 щам от коагулаза-негативните стафилококи (5.1%) и при 3 щам от вида *S. aureus* (9.4%).

ПРИНОСИ

1. Извършено е сравнително изследване относно присъствието на най-често срещаните бактериални видове, причиняващи мастити при кравите в осем ферми, разположени в различни региони на страната и е направена аналитична оценка.

Потвърдителен принос

2. Извършен е комплексен фенотипен анализ и оценка на резистентността към няколко антимикробни средства при стрептококови и стафилококови щамове, изолирани от млечни проби, от крави със субклинични и клинични мастити.

Потвърдителен принос

3. Извършена е генетична идентификация на някои от стрептококовите (*S. agalactiae*) и стафилококовите щамове (*S. aureus*, *S. epidermidis*) изолирани от млечни проби, от крави със субклинични и клинични мастити, като са използвани протоколи за qPCR в диагностичния алгоритъм.

Оригинален принос

4. Извършен е генетичен анализ при стафилококовите щамове (присъствие на ген *mecA*), експресиращи фенотипен профил на метицилинова резистентност.

Потвърдителен принос

ПРЕПОРЪКИ КЪМ ПРАКТИКАТА

1. Да се осъществява периодичен мониторинг на резистентността към антимикробните средства по отношение на най-често изолираните от млечни проби бактериални видове, изолирани от говеда.

2. В мониторинговите програми да бъде поставен акцент върху чувствителността на стафилококовите щамове от млечни проби, изолирани от говеда, към бета-лактамите химиотерапевтици, в контекста на тяхното значение за общественото здраве.

3. В мониторинговите програми да бъде поставен акцент върху чувствителността на стрептококовите щамове от млечни проби, изолирани от говеда, към бета-лактамните химиотерапевтици и макролидите, предвид тяхното значение за общественото здраве.
4. Да се създадат предпоставки от страна на отговорните държавни институции, на базата на съществуващите базови познания за микробиологичния анализ на щамовете изолирани от говеда с маститни заболявания, в мониторинговите програми да се включват съвременни молекулярни проучвания върху епидемиологичното типизиране на щамовете и съвременни анализи, свързани с участието на различни генетични платформи, детерминиращи резистентността към химиотерапевтичните средства.

Списък на публикациите във връзка с дисертационния труд:

1. **Nikolova M.**, Urumova V., Liuzkanov M., Sabev S. (2021). Studies on the causes of bacterial mastitis in two dairy bovine farms in northeastern Bulgaria and their sensitivity to antimicrobial products. *Tradit. Mod. Vet. Med.* 6, 2,11, 21–27
2. **Nikolova M.**, Urumova V, Liuzkanov M.(2022) *Streptococcus spp.* as etiological agent of subclinical and clinical mastitis of dairy cows in Republic of Bulgaria. *Trakia Journal of Sciences*. 20,2,113-118. doi:10.15547/tjs.2022.02.005
3. **Nikolova M.**, Urumova V.(2022). Microbiological studies on the prevalence of *Staphylococcus spp.*, involved in the etiology of mastitis in cattle and their susceptibility to antimicrobial agents. *Veterinarija ir Zootechnika*, 80, 2, 29-36.

ABSTRACT

Mammary gland inflammations are one of the most common and significant diseases in dairy cows, bringing huge economic losses and posing a risk to public health, as well as having the possibility of selecting resistant bacterial strains.

The aim of the present work was to study the objective situation in Bulgaria related to the most widespread and current causes of subclinical and clinical mastitis in dairy cattle, their attitudes to antimicrobial agents and the related resistance.

Eight dairy cattle farms from different regions of the country were investigated regarding the prevalence of clinical and subclinical mastitis and their bacterial causative agents. After clinical examination and on-site examination with a rapid mastitis test, mastitis data showed a total of 239 cows, of which 34 (14.2%) were with clinically evident inflammation

and 205 (85.8%) were with evidence of latent mastitis. A total of 346 samples were microbiologically examined, from which 272 bacterial strains were isolated. From them 30 strains (11%) were from samples of animals with clinical mastitis and 242 strains (89%) were from samples of animals with latent mastitis.

The leading place in the etiology of subclinical mastitis was occupied by coagulase-negative staphylococci, followed by representatives of the genus *Streptococcus*, and in the first place among them untyped streptococci according to the Lancefield scheme were observed, and then the strains assigned to the species *S. agalactiae*. In clinical mastitis, the species *S. agalactiae* and *S. aureus* were preferentially differentiated.

In the present study, the highest prevalence rate showed the strains assigned to *Streptococcus* spp., respectively 55.5% and next to those assigned to *Staphylococcus* spp., 40.4%. Among streptococci, the highest prevalence was observed for strains assigned to the species *S. agalactiae*, 40.4%, followed by the untyped according to the Lancefield scheme, 34.4%, and those assigned to the species *S. dysgalactiae*, 25.2%. Among the staphylococcal strains, the strains assigned to the group of coagulase-negative staphylococci predominated, 70.9%.

Data from the phenotypic analysis of resistance in staphylococci isolated from bovine milk samples showed a primary role of resistance to lincomycin (50%), followed by tetracycline (37.3%), while the phenotypic expression of resistance in streptococci was primarily related to tetracycline (73.5%), and then to lincomycin (51.7%). Staphylococcal strains had preserved sensitivity - 100% to gentamicin and amoxicillin/clavulanic acid, and streptococci showed the highest sensitivity to amoxicillin/clavulanic acid (99.3%) and to erythromycin (78.1%).

Regarding the multi-resistant profile of the isolated strains, both streptococci and staphylococci include in addition to tetracycline and lincomycin, macrolides and beta-lactam chemotherapeutics.

Also of interest data on the prevalence of *mecA* among staphylococcal isolates, with the higher percentage of prevalence being determined among *S. aureus* isolates (9.4%).