

СТАНОВИЩЕ

от професор д-р Румен Веселинов Караколев, от Националния диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт /НДНИВМИ/ – ИРЛ Велико Търново, относно дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по научна специалност «Ветеринарна микробиология»

**Тема: „ПРОУЧВАНЕ НА ВИДОВИЯ СЪСТАВ И ЧУВСТВИТЕЛНОСТТА КЪМ
АНТИМИКРОБНИ СРЕДСТВА ПРИ БАКТЕРИЙНИ ЩАМОВЕ, ИЗОЛИРАНИ ОТ
ГОВЕДА С КЛИНИЧЕН И СУБКЛИНИЧЕН МАСТИТ”**

Автор на дисертационния труд: Марияна Петрова Николова, секция „Ветеринарна микробиология” на ВМФ при Тракийски университет гр. Стара Загора.

Биографични данни за кандидата

Авторът на представения дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по научна специалност «Ветеринарна микробиология», Марияна Николова е родена на 21 май 1977 г. Завършва медицински колеж в гр. Пловдив през 1997 г. През периода 1998-2004 г. се обучава в Тракийски университет гр. Стара Загора и придобива квалификация Ветеринарен лекар, магистър.

През периода 2015 - 2019 г. постъпва в Тракийски университет гр. Стара Загора на длъжност главен специалист – медицински лаборант и по-късно старши експерт – ветеринарен лекар и сфера на дейност Организатор на упражнения по ветеринарна микробиология. От 14.10. 2019 г. до сега заема длъжност «асистент» и преподавател по ветеринарна микробиология и вирусология в катедра «Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести», секция «Ветеринарна микробиология» на ВМФ при Тракийски университет.

Оценка на дисертационния труд

Структура

Дисертационният труд на тема: „ПРОУЧВАНЕ НА ВИДОВИЯ СЪСТАВ И ЧУВСТВИТЕЛНОСТТА КЪМ АНТИМИКРОБНИ СРЕДСТВА ПРИ БАКТЕРИЙНИ ЩАМОВЕ, ИЗОЛИРАНИ ОТ ГОВЕДА С КЛИНИЧЕН И СУБКЛИНИЧЕН МАСТИТ” е написан на 170 страници, структуриран е по общоприетите изисквания и съдържа следните раздели: Увод - 3 стр., Литературен преглед - 46 стр., Цел и задачи - 1 стр., Материал и методи - 19 стр., Резултати – 30 стр., Дискусия - 21 стр., Обобщение – 1 стр., Изводи - 2 стр., Приноси - 1 стр., Препоръки за практиката – 1 стр., Литературен указател - 38 стр., Списък на публикациите във връзка с дисертацията и участия в научни форуми – 1 стр.

Дисертацията съдържа 17 фигури и 19 таблици. В литературния списък са включени 314 литературни източника.

Актуалност

Маститните заболявания причиняват огромни икономически загуби за фермерите. Те са едни от най-честите и значими здравни проблеми при млекодайнните крави. Здравно-санитарният аспект е 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 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. Ето защо, темата на настоящия дисертационен труд е особено актуална и засяга наболели въпроси относно здравния статус на млечната жлеза, хигиената на суровото изкупуваемо краве мляко, безопасността и качеството на млечните продукти.

Литературен преглед

В обем от 46 страници е извършен подробен преглед на литературни източници, свързани с разглежданите проблеми в дисертационния труд. Литературният обзор е целенасочен, обширен и аналитичен, като включва наши и чужди автори. Използвани са литературни източници предимно от последните 10 години, като не са пренебрегнати и публикации с основополагащи изследвания по отделните теми от по-стари автори.

Включени са публикации на български автори, работили върху диагностиката на субклиничните мастити и чувствителността към антибиотици на маститни причинители, изолирани от млечни ферми у нас. Подробно са проследени факторите, повлияващи появата и разпространението на бактериални мастити в говедовъдните ферми, бактерии, причиняващи мастити при говедата, класификацията на маститните заболявания, фармакодинамични и фармакокинетични характеристики на антимикробни средства, които се използват за терапия на маститните заболявания, отделено е внимание на механизмите на антимикробната резистентност, извършен е ретроспективен преглед на проучванията, свързани с резистентността към антибиотици на маститни причинители при млекодайните крави. Това показва широка литературна осведоменост, откроява се умение за анализ и интерпретация на литературни данни и създава необходимата база за собствените изследвания на автора.

Цел и задачи

Авторът си поставя целта да проучи обективното състояние у нас, свързано с най-широко разпространените и актуални бактериални причинители на субклинични и клинични мастити при интензивно отглеждани млекодайни говеда, както и техните отнасяния към антимикробни средства и свързаната с това резистентност.

За постигане на целта са определени за решаване осем отделни задачи, които са правилно поставени и ясно следват логиката на експерименталния дизайн на за реализиране на избраната цел.

Материали и методи

Изследванията са проведени с помощта на съвременни лабораторни методи, които включват скринингов бърз тест и автоматизирано изброяване на соматичните клетки, бактериологични изследвания на млечния секрет, методи за фенотипно определяне на *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp. и Грам-отрицателни микроорганизми, методи за определяне на чувствителността на изолатите към антимикробни средства, молекулярно-биологични методи за генетична идентификация на стафилококи, стрептококи и ген *tesA* при метицилин резистентни стафилококи. Извършена е статистическа обработка на резултатите. Методите са ясно и точно описани и дават обективна възможност за постигане на поставените цели и задачи и очакваните резултати.

Резултати, обсъждане, изводи и приноси

Получените резултати съответстват на поставените задачи, изложени са ясно и изчерпателно. Дисертационният труд е богато онагледен с достатъчен брой таблици и фигури с необходимата информационна стойност. Обсъждането на резултатите е компетентно и подробно извършено, отличава се с аналитично мислене и способност за сравнения, открояване на новите научни данни и приносите на автора.

По отношение на първата поставена цел, а именно – определяне на базови ферми с млекодайки говеда от различни географски и административни райони в страната, през периода юни 2020 г. до март 2022 г. са набелязани и изследвани 8 млечни говедовъдни ферми по отношение разпространението на клинични и субклинични мастити. От тях 4 са в Северна България (областите Шумен – 2 ферми, Търговище и Добрич) и други четири в Южна България (областите Пловдив – 2 ферми, Стара Загора и Хасково). Всички изследвани животни са били в период на активна лактация, като 75% от тях са от породата Черно-шарено говедо, а останалите - от породата Симентал.

За изпълнение на втората цел са проведени скринингови проучвания – теренни и лабораторни, за наличие на мастити при говедата.

По отношение на третата поставена цел – диференциране състоянията на субклиничен мастит от евентуално секреторно увреждане, авторът съпоставя резултатите за БСК в 1 мл мляко с резултатите от микробиологичния анализ, които дават информация за наличие или отсъствие на маститни причинители. Този подход е в съответствие с изискванията на Международната федерация по млекоарство и дава възможност за правилно поставяне на диагнозите латентна инфекция, секреторно увреждане и субклиничен мастит.

По отношение на четвъртата поставена цел - микробиологични изследвания на проби от клинични мастити, или от такива, които са от говеда с доказан субклиничен мастит или латентна инфекция, авторът извършва пълномащабни микробиологични анализи на получения от фермите материал, като се спира само на доказаните случаи на субклинични мастити.

За изпълнение на пета задача – авторът изолира и идентифицира микробни изолати от крави със субклинични мастити от род *Streptococcus* (54.5%) и род *Staphylococcus* (42.2%) и от крави с клинични мастити се изолират главно *S. agalactiae* (46.7%), *S. aureus* (23.3%) и *S. dysgalactiae* (13.3%). Извършена е генотипна идентификация на някои от най-значимите причинители на мастити. При генетичния анализ на

стафилококовите щамове е потвърдена фенотипната идентификация, респективно по отношение на вида *S. aureus* (32 щам - 100%), а по отношение на групата на коагулаза-негативните стафилококи от 78 щам са потвърдени 8, принадлежащи към вида *S. epidermidis*.

По отношение на седма и осма задача, е извършено изпитване на селектираните щамове към набор от клинично значими противомаститни антибиотици и синтетични антимикробни средства, както и отнасянията им към антимикробни средства и фенотипен анализ на наличната резистентност. Установена е чувствителността на стафилококовите щамове към гентамицин (100%), амоксицилин/клавулонова киселина (100%), цефалотин (99.1%), рифампин (99.1%), ципрофлоксацин (98.2%), цефокситин (94.6%), потенциранисулфонамиди (92.7%), оксацилин (86.4%) и ампицилин (75.5%). Най-висока е резистентността към линкомицин (50%) и тетрациклин (37.3%).

При стрептококовите щамове сензитивността е 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 щамовете са чувствителни към гентамицин (67.5%), рифампицин (65.6%) и цефалотин (63.6%). Най-висока е резистентността към линкомицин (51.7%) и тетрациклин (73.5%).

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.

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

Публикации във връзка с дисертацията

Марияна Николова е представила три публикации във връзка с дисертацията. В тях, кандидатът е водещ автор, което показва самостоятелност и умения за работа в екип и свидетелства за целенасочена научноизследователска дейност при разработване на дисертационния труд. С резултати от проучванията са представени две участия в научни форуми.

Автореферат

Представеният автореферат е правилно структуриран, илюстриран е с необходимите фигури и таблици, съдържа 52 страници и ясно отразява

целта, задачите, резултатите, изводите и приносите от дисертационния труд.

Заклучение

Въз основа на констатациите в предишните раздели, считам че дисертационният труд на Марияна Николова, озаглавен „ПРОУЧВАНЕ НА ВИДОВИЯ СЪСТАВ И ЧУВСТВИТЕЛНОСТТА КЪМ АНТИМИКРОБНИ СРЕДСТВА ПРИ БАКТЕРИЙНИ ЩАМОВЕ, ИЗОЛИРАНИ ОТ ГОВЕДА С КЛИНИЧЕН И СУБКЛИНИЧЕН МАСТИТ” отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и представлява задълбочена научна разработка с голяма практическа стойност за контрола на изкупваемото сурово краве мляко и с актуални приноси към проблема за микробната резистентност към антибиотици, и безопасността на хранителните продукти от животински произход.

Това ми дава основание да изразя своята **положителна оценка** на дисертационния труд и да предложа на членовете на уважаемото научно жури да гласуват положително за присъждане на Марияна Николова на научната и образователна степен „Доктор” по научна специалност «Ветеринарна микробиология».

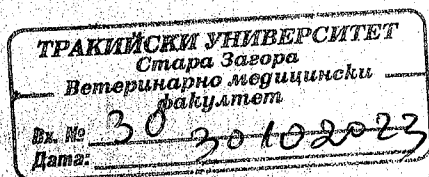
17.10.2023 г.
Велико Търново

Изготвил:
(проф. д-р

заличено съгл.

чл. 23 от ЗЗЛД

ВУ



STATEMENT

by professor Dr. Rumen Veselinov Karakolev, from the National Diagnostic Veterinary Medical Research Institute – Regional Testing Laboratory Veliko Tarnovo, concerning a dissertation paper for awarding PhD educational and scientific degree in the scientific specialty “Veterinary microbiology”

**Topic: „STUDY ON THE SPECIES COMPOSITION AND SENSITIVITY TO
ANTIMICROBIAL AGENTS IN BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM CATTLE
WITH CLINICAL AND SUBCLINICAL MASTITIS”**

Author of the dissertation paper: Mariyana Petrova Nikolova, Section of Veterinary microbiology at the Faculty of Veterinary Medicine at Trakia University, Stara Zagora.

Biographical data about the candidate

The author of the submitted dissertation paper for awarding PhD educational and scientific degree in the scientific specialty “Veterinary Microbiology”, Mariyana Nikolova, was born on 21 May 1977. She graduated the medical college in the town of Plovdiv in 1997. During the period 1998-2004 she studied at Trakia University, Stara Zagora, and acquired the qualification Veterinarian, Master.

During the period 2015 - 2019, she was admitted to Trakia University, Stara Zagora, as a chief specialist - medical laboratory assistant and later as a senior expert - veterinarian and field of activity Organizer of exercises in Veterinary microbiology. Since 14 Oct 2019 until now, she has held the position of Assistant professor and lecturer in Veterinary microbiology and virology at the Department of Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases, Section of Veterinary Microbiology at the Faculty of Veterinary Medicine at Trakia University.

Assessment of the dissertation paper

Structure

The dissertation paper on: "STUDY ON THE SPECIES COMPOSITION AND SENSITIVITY TO ANTIMICROBIAL AGENTS IN BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM CATTLE WITH CLINICAL AND SUBCLINICAL MASTITIS" is written on 170 pages, structured according to generally accepted requirements and contains the following sections: Introduction - 3 pages, Literature review - 46 pages, Objective and tasks - 1 page, Material and methods - 19 pages, Results - 30 pages, Discussion - 21 pages, Summary - 1 page, Conclusions - 2 pages, Contributions - 1 page, Recommendations for practice - 1 page, Literature index - 38 pages, List of publications in relation to the dissertation paper and Participation in scientific forums - 1 page.

The dissertation paper contains 17 figures and 19 tables. The reference list includes 314 literature sources.

Relevance

Mastitis diseases cause huge economic losses for farmers. They are one of the most common and significant health issues in dairy cows. The health and sanitary aspect is related to the presence of pathogenic microorganisms and their toxins in milk, as well as the presence of residual amounts of antimicrobial agents in it. On the one hand, this poses a risk to public health related to the development of infectious diseases in humans and especially in children after consumption of milk or dairy products. On the other hand, it creates an opportunity to select bacterial strains resistant to chemotherapeutics. Therefore, the topic of the current dissertation is particularly relevant and tackles pressing questions regarding the health status of the mammary gland, the hygiene of raw milk for sale, the safety and quality of dairy products.

Literature review

In a volume of 46 pages, a detailed review of literature sources related to the problems discussed in the dissertation paper has been carried out. The literature review is purposeful, extensive and analytical, including Bulgarian and foreign authors. Literature sources were used mainly from the last 10 years, and publications with fundamental studies on individual topics by older authors were not neglected. There are publications by Bulgarian authors who worked on the diagnostics of subclinical mastitis and the sensitivity to antibiotics of mastitis agents isolated from dairy farms in our country. Factors influencing the onset

and spread of bacterial mastitis in cattle farms, bacteria causing mastitis in cattle, the classification of mastitis diseases, pharmacodynamic and pharmacokinetic characteristics of antimicrobial agents used for therapy of mastitis diseases have been traced in detail, attention has been paid to the mechanisms of antimicrobial resistance, a retrospective review of studies related to antibiotic resistance of mastitis agents in dairy cows has been performed. This shows a broad literature awareness, the ability to analyse and interpret literature data stands out, and this creates the necessary basis for the author's own research.

Objective and tasks

The author sets herself the objective to study the objective situation in our country related to the most widespread and relevant bacterial causes of subclinical and clinical mastitis in intensively bred dairy cattle, as well as their relation to antimicrobial agents and the related resistance.

To achieve this objective, eight individual tasks have been defined for solving, which are correctly set and clearly follow the logic of the experimental design for the implementation of the selected objective.

Materials and methods

The research has been carried out using modern laboratory methods, which include a screening rapid test and automated counting of somatic cells, bacteriological studies of milk secretion, methods for phenotypic determination of *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp. and Gram-negative microorganisms, methods for determining the sensitivity of isolates to antimicrobial agents, molecular biological methods for genetic identification of staphylococci, streptococci and the *mecA* gene in methicillin-resistant staphylococci. Statistical processing of the results has been made. The methods have been clearly and accurately described and provide an objective opportunity to achieve the set objectives and tasks and the expected results.

Results, discussion, conclusions and contributions

The obtained results correspond to the tasks set, they have been presented clearly and comprehensively. The dissertation paper is richly illustrated with a sufficient number of tables and figures with the necessary informational value. The discussion of the results is competent and detailed, distinguished by

analytical thinking and the ability to make comparisons, highlighting the new scientific data and the contributions of the author.

With regard to the first objective set, namely - determination of base farms with dairy cattle from different geographical and administrative regions in the country, during the period from June 2020 to March 2022, 8 dairy cattle farms were identified and investigated in terms of the prevalence of clinical and subclinical mastitis. Of them, 4 are in North Bulgaria (Shumen region - 2 farms, Targovishte and Dobrich) and other four in South Bulgaria (Plovdiv region - 2 farms, Stara Zagora and Haskovo). All studied animals were in the period of active lactation, 75% of them being from the Black-and-White Cattle breed, and the rest - from the Simmental breed.

In order to fulfil the second objective, field and laboratory screening studies were carried out for the presence of mastitis in cattle.

With regard to the third objective set - differentiation of subclinical mastitis from possible secretory damage, the author compares the results for ure somatic cell count in 1 ml of milk with the results of the microbiological analysis, which provide information on the presence or absence of mastitis agents. This approach is in compliance with the requirements of the International Dairy Federation and enables the correct diagnosis of latent infection, secretory damage and subclinical mastitis.

With regard to the fourth objective set - microbiological studies of clinical mastitis samples, or of those from cattle with proven subclinical mastitis or latent infection, the author carried out full-scale microbiological analyses of the material obtained from the farms, focusing only on proven cases of subclinical mastitis.

To fulfill the fifth task, the author isolated and identified microbial isolates from cows with subclinical mastitis from the genus *Streptococcus* (54.5%) and the genus *Staphylococcus* (42.2%), and from cows with clinical mastitis, mainly *S. agalactiae* (46.7%), *S. aureus* (23.3%) and *S. dysgalactiae* (13.3%) have been isolated. Genotypic identification of some of the most important causative agents of mastitis has been carried out. In the genetic analysis of the staphylococcal strains, the phenotypic identification has been confirmed, respectively in relation to the species *S. aureus* (32 strains - 100%), and in relation to the group of coagulase-negative staphylococci out of 78 strains, 8 belonging to the species *S. epidermidis* have been confirmed.

Regarding the seventh and eighth tasks, testing of the selected strains against a range of clinically relevant anti-mastitis antibiotics and synthetic antimicrobial agents, as well as their antimicrobial affinities and phenotypic analysis of available resistance, have been performed. The sensitivity of the staphylococcal strains to gentamicin (100%), amoxicillin/clavulanic acid (100%), cephalothin (99.1%), rifampin (99.1%), ciprofloxacin (98.2%), cefoxitin (94.6%), potentiated sulfonamides (92.7 %), oxacillin (86.4%) and

ampicillin (75.5%) has been established. The highest is the resistance to lincomycin (50%) and tetracycline (37.3%).

Among the streptococcal strains, sensitivity is preserved to the highest degree with regard to amoxicillin/clavulanic acid (99.3%), erythromycin (78.1%), ampicillin (75.5%) and ciprofloxacin (70.9%). Over 60% of the strains are sensitive to gentamicin (67.5%), rifampicin (65.6%) and cephalothin (63.6%). The highest is the resistance to lincomycin (51.7%) and tetracycline (73.5%).

With regard to the multi-resistant profile in coagulase-positive staphylococci (*S. aureus*), the most widespread is the phenotypic profile including ampicillin, oxacillin, cefoxitin and tetracycline (9.4%), in coagulase-negative - oxacillin, ampicillin, lincomycin and tetracycline (7.7%), and in polyresistant streptococci - a phenotypic profile including erythromycin, lincomycin and tetracycline.

Staphylococci showing resistance to oxacillin and cefoxitin expressed *mecA* in 4 strains of coagulase-negative staphylococci (5.1%) and in 3 strains of the *S. aureus* species (9.4%).

Publications related to the dissertation paper

Mariyana Nikolova has presented three publications in relation to the dissertation paper. In them, the candidate is the leading author, which shows independence and teamwork skills and testifies to purposeful research activity in the development of the dissertation paper. With the results of the studies, two participations in scientific forums are presented.

Self-abstract

The presented abstract is properly structured, illustrated with the necessary figures and tables, contains 52 pages and clearly reflects the objective, tasks, results, conclusions and contributions of the dissertation paper.

Conclusion

Based on the findings in the previous sections, I hereby reckon that Mariyana Nikolova's dissertation paper entitled "STUDY ON THE SPECIES COMPOSITION AND SENSITIVITY TO ANTIMICROBIAL AGENTS IN BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM CATTLE WITH CLINICAL AND SUBCLINICAL MASTITIS" complies with the requirements of the Law on Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria and represents a thorough scientific development of great practical value for the

control of purchased raw cow's milk and with up-to-date contributions to the issue of microbial resistance to antibiotics and the safety of food products of animal origin.

This gives me the reason to express my **positive assessment** of the dissertation paper and to suggest to the members of the esteemed scientific jury to vote positively for awarding Mariyana Nikolova with PhD scientific and educational degree in the scientific specialty "Veterinary Microbiology".

17 Oct 2023
Veliko Tarnovo

Prepared by:
(prof. Dr.

заличено съгл.
чл. 23 от ЗЗЛД

3
v)