

СТАНОВИЩЕ

От доц. д-р **Николина Велизарова Русенова**

Катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“ при
Ветеринарномедицински факултет на Тракийски Университет, гр. Стара Загора

относно дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“
научна специалност “Ветеринарна микробиология”
област на висше образование 6.0 „Аграрни науки и ветеринарна медицина“
професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина

Докторант: Марияна Петрова Николова

Катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“

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

Научен ръководител: проф. д-р Валентина Урмова

Представеният комплект материали на хартиен и електронен носител напълно съответства на Чл.48 от Правилника за Развитие на Академичния състав в Тракийски Университет (ПРАСТрУ) за придобиване на ОНС „Доктор“ и включва всички необходими документи, така както са изброени в заявлението.

Д-р Марияна Петрова Николова е завършила Ветеринарномедицински Факултет на Тракийски Университет със специалност магистър-ветеринарен лекар през 2004 г. През 2015 г. постъпва в катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“ като организатор упражнения по Ветеринарна микробиология. Солидната теоретична и практическа подготовка на д-р Николова е в основата на успешно положен изпит за асистент в катедрата (секция Ветеринарна микробиология), в която сега е преподавател по Микробиология и Вирусология.

Представеният дисертационен труд е написан на 170 страници. Структуриран е по стандартен начин и включва следните раздели: Съдържание (5 стр.), Използвани

съкращения (1 стр.), Увод (3 стр.), Литературен преглед (46 стр.), Собствени изследвания (19 стр.), Резултати (30 стр.), Дискусия (22 стр.), Изводи (2 стр.), Приноси (1 стр.), Препоръки за практиката (1 стр.), Литературен указател (38 стр.), Списък на публикациите във връзка с дисертационния труд и участия в научни форуми (1 стр.).

УВОД

В увода накратко са очертани проблемите, свързани с маститите в млечните говедовъдни ферми, в икономически и санитарно-здравен аспект. Акцентира се върху значението на видовия състав на бактериите, причиняващи възпаления на млечната жлеза и отнасянията им към антимикробни средства, което е база на дисертационния труд.

ЛИТЕРАТУРЕН ПРЕГЛЕД

Литературната справка по темата е представена подробно и изчерпателно. Авторът дава информация за икономическите загуби от маститите в световен мащаб, разглежда факторите, провокиращи появата и разпространението им, които са обусловени от една страна, от условията на средата, а от друга – от физиологичните особености на животните.

Направен е обстоен преглед на бактериите видове, инкриминирани в етиологията на маститите поотделно, като за всеки вид е отразена наличната научна информация касаеща екологични аспекти, антигенна структура, вирулентни фактори и тяхната характеристика, резистентност към антимикробни средства и резултатите от опитите за контрол.

Отредено е подобаващо място на класификацията на маститите, както и на критериите за диференциране от секреторно разстройство.

Д-р Николова обръща специално внимание на терапията на маститите с различни класове химиотерапевтични средства, както и на механизмите за изграждане на резистентност към тях. Теоретичната осведоменост на докторанта е предпоставка за сериозна научна работа и интерпретация на получените резултати.

Смятам че, обширният литературен обзор би могъл да завърши с Обобщение, в което да се резюмира известното в световен мащаб, извършените изследвания по темата в нашата страна и това, което предстои да се изясни в настоящия дисертационен труд.

СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

➤ ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е да се проучи разпространението на бактериите причинители на субклинични и клинични мастити при интензивно отглеждани млекодайки

говеда, както и на отнасянията им към антимикробни средства и свързаната с това резистентност. Целта е ясно формулирана и кореспондира със заглавието на дисертационния труд. За изпълнение на целта са заложили 6 задачи. Д-р Николова се е съобразила с направената препоръка на разширения катедрен съвет за редуциране броя на задачите чрез обединяване на такива със сходен характер.

➤ МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Разделът съдържа важна информация относно произхода на пробите и техния анализ. Млечните проби са получени в 8 млечни говедовъдни ферми – по 4 локализирани в Северна и Южна България, съответно. Описан е подходът за получаване на проби във фермите. Изброяването на соматични клетки е извършено в лаборатория към катедра “Акушерство, репродукция и репродуктивни нарушения“, а микробиологичните изследвания в лаборатории към катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“ на Ветеринарномедицински Факултет при Тракийски Университет. Основната част от изследванията са лично дело на докторанта в продължение на 4 г.

Представен е в детайли диагностичния алгоритъм за изолация, първична и разгърната биохимична идентификация на изолатите *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. и Грам-отрицателните бактерии. Генетичната идентификация на някои от представителите, детекцията на *tesA* гена при метицилин-резистентните стафилококи, както и отнасянията на изолатите към химиотерапевтици чрез диск- дифузионен метод и комерсиален E-тест, също са подробно описани. Докторантът познава и борави както с класически микробиологични методи, така и със съвременни молекулярни методи за идентификация и детекция на гени, детерминиращи резистентност.

РЕЗУЛТАТИ

Резултатите са онагледени с 14 таблици и 7 фигури, като последните представят амплификационни плотове от генетичните анализи и визуализация на E-теста на Мюлер-Хинтон агар, респективно на Мюлер-Хинтон агар суплементиран с 5% овча кръв за стрептококовите изолати. Прави добро впечатление последователното презентиране на резултатите, следвайки хода на поставените задачи.

Изследванията са извършени върху 346 млечни проби, от които са получени 272 изолата – 30 от клинични мастити и 242 от животни със скрити мастити. Фенотипният анализ отрежда водещо място на *Streptococcus* spp. (*S. agalactiae*, *S. uberis* и *S. dysgalactiae*).

На второ място по честота са изолирани представители на *Staphylococcus* spp., от които преобладават коагулаза-негативните стафилококи (CNS), следвани от *S. aureus*. Установена е връзка между броя на соматичните клетки в млечните проби и вида на бактериалните изолати, както и между вида на маститите (клинични и субклинични) със съответните причинители. Прецизна молекулярна идентификация е направена на видовете *S. aureus*, *S. epidermidis* от групата на CNS, както и на *S. agalactiae*.

Резултатите от отнасянията на изолатите към химиотерапевтични средства (ХТС) сочат вариращи нива в отделните ферми и спрямо отделните класове ХТС. При стафилококите най-висок процент резистентност е констатиран към линкомицин, следван от тетрациклин. Обратна тенденция е документирана за стрептококовите щамове. И при двата доминиращи вида, мултирезистентният профил се допълва с макролиди и бета-лактамни химиотерапевтици. Изследванията на докторанта показват още съхранена чувствителност на стафилококите към оксацилин и цефокситин, което е от значение за общественото здраве. Данните за разпространението на гена *mecA* сред стафилококовите изолати показват по-висок процент на разпространение сред щамовете *S. aureus*.

ДИСКУСИЯ

Разделът съдържа подробен и последователен анализ на резултатите от собствените изследвания на д-р Николова, които тя компетентно съпоставя с тези на други автори в световен и национален мащаб. Отново проличава добрата теоретична подготовка и литературна осведоменост на докторанта, базирана на най-съвременните научни данни по изследвания проблем.

Въз основа на получените резултати авторът формулира 12 извода, 4 приноса и 4 препоръки за практиката, които приемам.

Във връзка с дисертационния труд са посочени 3 публикации, от които една в списание с импакт ранг (Scopus). И в трите публикации д-р Николова е водещ автор, което потвърждава водещата ѝ роля в научната работа. Резултатите са представени на два научни форума с международно участие.

ЛИТЕРАТУРЕН УКАЗАТЕЛ

Д-р Николова е включила 314 литературни източника, от които 6 на кирилица и 308 на латиница.

ПРЕПОРЪКИ

Д-р Николова се е съобразила с болшинството от направените от мен препоръки на разширения катедрен съвет.

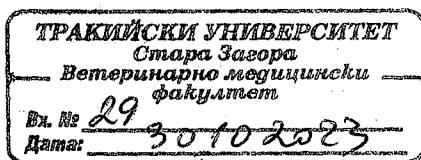
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на гореизложеното смятам, че дисертационният труд на д-р Марияна Петрова Николова съдържа достатъчно научни и научно-приложни резултати и отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на Тракийски Университет. Дисертационният труд показва, че докторантът притежава задълбочени теоретични знания и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване, обработка на резултати и тяхната интерпретация. Поради това, давам положителна оценка за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“ в професионално направление „Ветеринарна Медицина“.

20.10.2023 г.

Изготвил:
/доц. д-р Н

заличено съгл.
чл. 23 от ЗЗЛД



STATEMENT

From Assoc.prof. Dr. Nikolina Velizarova Rusenova

Department of Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases at the Faculty of
Veterinary Medicine at Trakia University, Stara Zagora

concerning a dissertation paper for awarding PhD educational and scientific degree
scientific specialty "Veterinary microbiology"
field of higher education 6.0 „Agrarian sciences and veterinary medicine”
professional area 6.4. Veterinary medicine

PhD student: Mariyana Petrova Nikolova

Department of Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases

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

Scientific supervisor: prof. Valentina Urumova, DSc

The submitted set of materials on paper and in electronic format complies with Art. 48 of the Rules for Development of the Academic Staff at Trakia University for acquiring PhD educational and scientific degree and includes all the necessary documents, as listed in the application.

Dr. Mariyana Petrova Nikolova graduated from the Faculty of Veterinary Medicine at Trakia University with Master's degree in Veterinary medicine in 2004. In 2015, she joined the Department of Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases as an organizer of exercises in Veterinary Microbiology. Dr. Nikolova's solid theoretical and practical training is the basis of successfully passing the exam for an assistant professor at the department (Veterinary Microbiology section), where she is now an assistant professor in Microbiology and Virology.

The submitted dissertation paper is written on 170 pages. It is structured in a standard way and includes the following sections: Contents (5 pages), Abbreviations used (1 page), Introduction (3 pages), Literature review (46 pages), Own research (19 pages), Results (30 pages), Discussion

(22 pages), Conclusions (2 pages), Contributions (1 page), Recommendations for practice (1 page), Bibliographic reference (38 pages), List of publications related to the dissertation paper and participation in scientific forums (1 page).

INTRODUCTION

The introduction briefly outlines the problems associated with mastitis in dairy cattle farms from an economic and sanitary-health perspective. Emphasis is placed on the significance of the species composition of the bacteria causing inflammation of the mammary gland and their relation to antimicrobial agents, which is the basis of the dissertation work.

LITERATURE REVIEW

The literature reference on the subject is presented in detail and comprehensively. The author provides information on the economic losses from mastitis worldwide, examines the factors provoking their onset and distribution, which are determined on the one hand by the environmental conditions, and on the other - by the physiological characteristics of the animals.

A comprehensive review of the bacterial species incriminated in the etiology of mastitis has been made separately, and for each species the available scientific information regarding ecological aspects, antigenic structure, virulence factors and their characteristics, resistance to antimicrobial agents and the results of control attempts has been reflected.

A proper place is given to the classification of mastitis, as well as to the criteria for differentiation from a secretory disorder.

Dr. Nikolova pays special attention to the therapy of mastitis with different classes of chemotherapeutic agents, as well as the mechanisms for building resistance to them. The theoretical awareness of the PhD student is a prerequisite for serious scientific work and interpretation of the results obtained.

I think that the extensive literature review could end with a Summary rounding up what is known worldwide, the research carried out on the subject in our country and what is to be clarified in the current dissertation paper.

OWN RESEARCH

➤ OBJECTIVE AND TASKS

The objective of the dissertation paper is to study the spread of the bacterial causes of subclinical and clinical mastitis in intensively reared dairy cattle, as well as their relation to antimicrobial agents and the related resistance. The objective is clearly formulated and corresponds

to the title of the dissertation work. To fulfil the goal, 6 tasks have been set. Dr. Nikolova complied with the recommendation made by the expanded departmental council to reduce the number of tasks by combining those of a similar nature.

➤ MATERIAL AND METHODS

The section contains important information about the origin of the samples and their analysis. The milk samples have been obtained from 8 dairy cattle farms - 4 each located in North and South Bulgaria, respectively. The on-farm sampling approach has been described. The counting of somatic cells has been carried out in the laboratory of the Department of Obstetrics, Reproduction and Reproductive Disorders, and the microbiological studies - in the laboratories of the Department of Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases at the Faculty of Veterinary Medicine at Trakia University. The main part of the research is the personal work of the PhD student in the course of 4 years.

The diagnostic algorithm for isolation, primary and extended biochemical identification of *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. isolates and Gram-negative bacteria is presented in detail. The genetic identification of some of the representatives, the detection of the *mecA* gene in methicillin-resistant staphylococci, as well as the behaviour of the isolates to chemotherapeutics by a disk-diffusion method and commercial E-test, have also been described in detail. The PhD student knows and handles both classical microbiological methods and modern molecular methods for the identification and detection of resistance-determining genes.

RESULTS

The results have been illustrated with 14 tables and 7 figures, the latter presenting amplification plots of the genetic analyses and visualization of the E-test on Muller-Hinton agar, respectively on Muller-Hinton agar supplemented with 5% sheep blood for the streptococcal isolates. The consistent presentation of the results, following the course of the assigned tasks, makes a good impression.

The studies have been performed on 346 milk samples, from which 272 isolates have been obtained - 30 from clinical mastitis and 242 from animals with hidden mastitis. The phenotypic analysis assigns a leading position to *Streptococcus* spp. (*S. agalactiae*, *S. uberis* and *S. dysgalactiae*). The second most frequently isolated representatives of *Staphylococcus* spp. are coagulase-negative staphylococci (CNS), followed by *S. aureus*. A relationship has been established between the number of somatic cells in the milk samples and the type of bacterial

isolates, as well as between the type of mastitis (clinical and subclinical) and the respective causative agents. Precise molecular identification has been made of the *S. aureus*, *S. epidermidis* species from the CNS group, as well as of *S. agalactiae*.

The results of referring isolates to chemotherapeutic agents (CTAs) indicated varying levels between individual farms and to individual classes of CTAs. In staphylococci, the highest percentage of resistance has been found to lincomycin, followed by tetracycline. An opposite trend has been documented for streptococcal strains. In both dominant species, the multidrug resistance profile is complemented by macrolides and beta-lactam chemotherapeutics. The PhD student's research also shows staphylococci to have retained sensitivity to oxacillin and cefoxitin, which is of public health concern. Data on the prevalence of the *mecA* gene among staphylococcal isolates showed a higher prevalence rate among *S. aureus* strains.

DISCUSSION

The section contains a detailed and coherent analysis of the results of Dr. Nikolova's own research, which she competently compares with those of other authors on a global and national scale. Again, the good theoretical background and literary awareness of the PhD student, based on the most modern scientific data on the researched problem, is evident.

Based on the obtained results, the author formulates 12 conclusions, 4 contributions and 4 recommendations for practice, which I accept.

In relation to the dissertation paper, 3 publications have been cited, one of which is in a journal with an impact rank (Scopus). In all three publications, Dr. Nikolova is the lead author, which confirms her leading role in the scientific work. The results were presented at two scientific forums with international participation.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCE

Dr. Nikolova has included a total of 314 literature sources, of which 6 in the Cyrillic and 308 in the Latin alphabet.

RECOMMENDATIONS

Dr. Nikolova has taken into consideration the majority of recommendations made by me at the expanded departmental council meeting.

CONCLUSION

Based on the above, I do reckon that Dr. Mariyana Petrova Nikolova's dissertation paper contains sufficient scientific and scientific-applied results and complies with the requirements of

the Law on Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria, the Rules for the Implementation of Law on Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the relevant Rules of Trakia University. The dissertation paper shows that the PhD student has in-depth theoretical knowledge and skills for independent conduct of a scientific research, processing of results and their interpretation. Therefore, I give a positive assessment for acquiring a PhD educational and scientific degree in the professional area “Veterinary Medicine”.

20 Oct 2023

Prepared by:..

/Assoc. prof. E

заличено съгл.

чл. 23 от ЗЗЛД

ya/