



РЕЦЕНЗИЯ

ОТ

проф. д-р Георги Кирилов Георгиев, Д.В.М.Н., Директор на ЦОРХВ при МЗХТ

Тема на дисертационния труд: *«Микробиологични и епидемиологични проучвания на шига-токсин продуциращи Escherichia coli при млекодайна говеда в Р България» за присъждане на образователната и научна степен „ДОКТОР“ на ас. Койчо Петков Коев, докторант на самостоятелна форма на обучение.*

Област на висше образование б. Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление б.4. Ветеринарна медицина,

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

Катедра: „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“ на ВМФ при ТрУ гр. Ст. Загора

Автобиографични данни за кандидата

Койчо Петков Коев е роден на 05.06.1980 г. в гр. Ст. Загора. Завършил е средното си образование в техникума по ветеринарна медицина гр. Стара Загора през 1998г., а висшето си образование по ветеринарна медицина във ВМФ при ТрУ гр. Стара Загора през 2005г. В периода 2006-2009 г. работи като ординатор към катедрата по заразни болести. От 2009 г. е асистент в секция „Епидемиология, инфекциозни болести и превантивна медицина“ към катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“ и до момента.

Структура на дисертационния труд

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е написан на 192 страници и съдържа следните раздели: Съдържание – 2 стр., Използвани съкращения – 2 стр., Въведение – 2 стр., Литературен обзор – 51 стр., Собствени изследвания (Цел и задачи, Материал и методи, Резултати) – 55 стр., Обсъждане и обобщение – 34 стр., Изводи, приноси и препоръки за практиката – 7 стр., Научни публикации, Участие в научни форуми и изследователски проекти, свързани с дисертационния труд – 5 стр., Литературен указател – 32 стр., съдържащ 3 авторски заглавия на кирилица и 295 на латиница. Участие в 1 научен форум и 2 изследователски проекти – 3 стр. Дисертационният труд е онагледен с 11 таблици и 24 фигури. Структуриран е по реда на озаглавените в съдържанието теми на проучванията. Авторът представя и заглавията на 3 публикации в които той е водещ автор, а една от тях е с импакт-фактор. Тази докторска дисертация отразява резултатите от няколко годишния изследователски труд на проучване на актуалните шига-токсин продуциращи инфекции с *E. coli* при млекодайна говеда в Р България. Липсва „Справка за цитиранията“.

Актуалност на разработвания проблем

Съгласно концепцията на Karmali et al. 2003 веротоксин продуциращите *E. coli* (VTEC) са групирани в серопатотипове. Само в периода 2007-2010 г. в страните от ЕС са потвърдени 13 345 случая на инфекции при хора от веротоксин продуциращи *E. coli* (VTEC) и 777 пациенти със заболяването хемолитичен уремичен синдром (HUS). В същото време 85% от изолатите на *E. coli* не са били напълно серотипирани, съгласно по-горе цитираната концепцията на Karmali за определяне на серопатотиповата им принадлежност. Серотиповете, отговорни за заболявания с проява на хеморагичен колит (HC) и хеморагичен уремичен синдром (HUS), O157:H7 and O157:NM, са определени като серопатотипове от група А. Щамовете от серопатотипова група В са асоциирани с взривове придружени със заболявания от т.н. HUS и се предивикват от щамове, които не са свързани със серопатотипова група А и към които принадлежат серотиповете O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19 и O145:NM. Щамовете *E. coli* от серопатотипова група С (серотипове O91:H21, O104:H21, O113:H21, O5:NM, O121:NM и O165:H25) също се свързват с спорадични случаи на HUS, но не са епидемични. Щамове *E. coli* от серопатотипова група D се свързват с диария, но не и със случаи на HUS. Коли щамове от серопатотипова група Е никога не са свързвани с заболяване по хората и са изолирани само от животни. Към днешна дата има повече от 200 различни серотипа *E. coli*, идентифицирани като шига-токсин продуциращи *E. coli* (STEC). Тези акроними - VT/STX, както и VTEC/STEC/ЕНЕС, се използват като взаимно заменяеми и се отнасят за един и същи патогенен тип *E. coli*. Коли бактерии, които произвеждат VT се наричат веротоксин-продуциращи *E. coli* (VTEC), а също и шигатоксин продуциращи *E. coli* (STEC).

От всички познати серотипове на *E. coli* продуциращи Shiga токсин, най-малко 100 са свързани със заболявания при хората. Токсините се наричат така, тъй като са близкородствени или идентични с токсина, продуциран от *Shigella dysenteriae*. Shiga токсините са едни от най-силните токсини, познати на хората и са включени в списъка на потенциалните агенти за биотероризъм от центъра за контрол и превенция на заболяванията (CDC) в Атланта, САЩ. Щамовете *E. coli*, свързани с HUS обикновено продуцират *stx* - гени. Доказано е, че не всички STEC могат да причинят заболяване при човека. От тях първостепенно значение има серотип O157:H7.

Доказано е, че преживните животни, особено говедата, са един от основните резервоари на ЕНЕС. Ентерохеморагичните *E. coli* се явяват сериозен проблем за общественото здравеопазване, поради връзката им с големи епидемични взривове на хеморагичен колит или с прояви на HUS. Последният се явява водеща причина за остра бъбречна недостатъчност при децата. Въпреки, че различни серотипове на ЕНЕС са свързани със заболявания при човека, по-голямата част от информацията за огнища и спорадични случаи на инфекция при хора са били свързани с щамове от серотип O157:H7.

В нашата страна има недостиг на данни по отношение на размера на изолиране на STEC в животински резервоари, появата на STEC при едрите преживни животни, както

и експресията им във фураж, млечни продукти и телета също е неизвестно. Задълбочени проучвания относно фенотипните вариации свързани с полизахаридните антигени при *E. coli* O157 извършва Паунова-Кръстева в дисертационния си труд през 2015 г. Млекодайнните говеда и особено телетата са идентифицирани като основни носители и отделители на STEC. Интензитетът на това носителство и излъчителство намалява с възрастово израстване на животното. По подобен начин, присъствието на шига-токсини и по-специално stx2 е също свързано с възрастта, като неговото установяване е много по-често при млади подрастващи телета. Ето защо детайлните проучвания и особено генетичните анализи на специфичните вирулентни фактори при STEC, изолирани от говеда на различна възраст е необходимо за познаването на риска за човешкото здраве. Щамове *E. coli* O157, които са били подложени на молекулярно-биологични изследвания най-често са показвали наличието на гени, продуциращи Shiga токсини (stx1 и stx2) и интимин. От казаното по-горе става ясно, че проблема е важен при проучвания на шига-токсин продуциращи *Escherichia coli* при животните и като зооантропоноза и за общественото здраве. **Така, че избраната тема е подходяща извършването на научни изследвания.**

Литературна осведоменост и оценка на литературния материал

Литературният преглед е написан на 51 страници и обхваща цитирането на 295 литературни източници, от които 5 на кирилица и 290 на латиница. Поради натрупалите се в последните години нови знания в резултат от използваните съвременните молекулярни и генетични методи за изследвания Международният конгрес по инфекции, причинени от шига-токсин продуциращи *E. coli* в Буенос Айрес, през 2009г. възприе три вариантни форми на stx1 и седем вариантни форми на stx2, на Shiga токсин, като съответно са били описани и наименувани stx1a, stx1c и stx1d и stx2a до stx2g Shiga токсин гени. Щамове, продуциращи stx2a, stx2c и/или stx2d най-често са свързани с HUS. По-голямата част от stx се кодират от фагово медиранни гени, които могат да бъдат загубени или придобити от други *E. coli*, не само *in vitro*, но също така и *in vivo*. При щамове STEC, изолирани от хора е установено, че те продуцират минимум четири мощни бактериофаг-кодирани STs: ST1, ST2, ST2c, и ST2d. Всеки от тях може да присъства самостоятелно, или в комбинация от два или три различни шигатоксини. Резултатите от проучване на превалентността на *E. coli* от серотип O157:H7 в проби от млади говеда, показват че тя е относително ниска въпреки, че те се считат като важен биологичен резервоар на този агент. У нас, през 2015 г. Урумова и колектив изследват 1094 проби и установява 36 щамове (3,3%) колибактерии с принадлежност към серогрупа O157:H7 и също доказва, че сред млечните говеда този серотип все още е относително слабо разпространен. Както се съобщава в световната литература замърсеното сурово мляко и суровите млечни продукти и суровини са сред основните рискови фактори, разглеждани като „вектори“ на STEC. Към това те добавят и значението на контаминираната с *E. coli* от серотип O157:H7 вода, използвана за питейни или за нуждите на технологичния процес, а също неправилната и неадекватна подготовка на вимето, ролята на „мръсните ръце“ на доячите, както и пропуските в дезинфекцията на

доилните агрегати и общата хигиена на доенето в.т.ч измиване на вимето и самото доене. По този начин суровото мляко, контаминирано с ЕНЕС представлява сериозна заплаха за общественото здраве, тъй като млекодайните говеда и заобикалящата ги околна среда служат като потенциална екологична ниша за ЕНЕС. Сериозността и значимостта на този патоген, като обезпокоителен здравен риск, въпреки неговата относително ниска превалентност, е че той може да се предава по хранителната верига от животните към хората (зооантропоза). Богата литературна осведоменост и свободното и компетентно интерпретиране на резултатите и съпоставянето им с данните от световната и нашата научна литература показва, че ас. Коев познава в дълбочина научния проблем и може да се ориентира правилно за да избере целта на проучването, а то е да **извърши микробиологични и епидемиологични проучвания на шига-токсин продуциращи *Escherichia coli*, изолирани от клинично здрави млекодайни крави в Р България, като проучи и анализира основните закономерности на рисковете по хранителната верига и подобряване на контрола.**

Оценка на научно-изследователската дейност

За да реализират така дефинираната цел, докторантът и неговите научен ръководител и консултант си поставят за разрешаване следните задачи:

1. Установяване и апробиране на конкретен, научно обоснован микробиологичен **диагностичен алгоритъм** относно изолацията и първичната идентификация на ентерохеморагични *E. coli* от фецес на говеда с млекодайно направление.
2. Да определят принадлежността и генетичния профил на получените изолати, относно тяхната токсин продукция.
3. Да определят превалентността на STEC O157:H7 *E. coli* изолатите сред животинската популация едри преживни животни с млекодайно направление (и различните категории по възраст – телета сукалчета, подрастващи телета, отглеждани за разплод (възпроизводство), дойни крави и др.
4. Да проучат и анализират *in vitro* отнасянията към антимикробни средства на всички от изолираните щамове *E. coli* с принадлежност към серогрупа O157.
5. Да направят опити за изолация на STEC O157:H7 от сурово сборно мляко във всички позитивни за каузалния агент *E. coli* от серотип O157:H7 стопанства.

Проучванията на ас. Коев потвърждават напълно ролята на STEC като основен каузален агент в заболявания, предавани по хранителната верига. Доказана е доминиращата роля на гените *stx2* и *eae*, кодиращи продукцията на ентеротоксин и лезии на изглаждане на ентерочитните микровили, които се считат за основни атрибути на вирулентността на STEC щамовете.

Резултатите от микробиологичните и епидемиологичните проучвания на автора показват ниска превалентност на *E. coli* O157:H7 в млекодайните ферми, в които предварително е било установено наличие на животни, носители и излъчители на *E. coli* O157:H7 при клинично здрави индивиди. В периода 2012-2016 година са получени и

анализирани общо 1129 проби от подрастващи телета на възраст 3-6 месеца, произхождащи от 28 говедовъдни ферми. Само 7,02% или 80 от доказаните *E. coli* щамове са показали липса на бета глюкоконидазна активност и от тях по-малко от половината (37,5%) са показали принадлежност към серогрупа O157. MacConkey agar, съдържащ сорбитол вместо лактоза следва са използвани като основна диференцираща среда за откриване на *E. coli* O157:H7 в проби от фецес. Така от изследваните общо 1129 фекални тампон-проби, 30 от сорбитол-негативните изолати (2,63%) са показали положителен аглутинационен тест със антисерум *E. coli* O157. Тези проби са били подложени на по-нататъшно генетично изпитване за наличие на ген, кодиращ H7 антиген. Откриването на гени кодиращи *stx1*, *stx2* *eaeA* и H7 чрез полимеразно верижна реакция се оказва успешно при използването на къси праймерни двойки за доказване на шигатоксин продукция след предварителната изолация. При щамове, които са изолирани от две стопанства се отчита присъствието на амплификони с размери големина 584 bp и 482 bp, които са еквивалентни съответно на гени *stx2* и *eaeA*. Големината на фрагментите е установена и сравнена чрез ДНК ледер 100 bp и чрез амплификация на положителна контрола от референтен щам ATCC (геномна DNA) с праймерни двойки специфични за гени *eaeA*, *stx1*, *stx2*.

Резултатите от представеното проучване показват, че *E. coli* O157 циркулира сред стопанствата от млечни говеда в нашата страна и, че суровото мляко от говеда от ферми с интензивно направление е високо рисков продукт за общественото здраве, поради потенциалното му контаминиране с *E. coli* O157:H7, тъй като млекодайните говеда, младите подрастващи телета и съпътстващата ги околна среда се оказват обективна ниша за циркулация на STEC щамове на *E. coli* O157.

Резултатите от епидемиологичните проучвания показват необходимост от задължително извършване на анализ за ентеро-хеморагични *E. coli* O157:H7 от клинични изолати при хора и сравнителен, задълбочен анализ на фенотипни и генетични характеристиките на тези изолати съпроводено с търсене на епидемиологична връзка с изолатите, получени от теренните изследвания.

Резултатите от фенотипния анализ за определяне на антимикробната резистентност сочат за съхранена сензитивност към всички тествани представители на цефалоспорини от първа и трета генерация. Запазена е и чувствителността към представителите на аминокликозидната група, а също така и към тетрациклин, енрофлоксацин и комбинацията сулфаметоксазол/триметоприм. Сравнително висока остава чувствителността към и към групата на аминопеницилините и амоксицилин, потенциран с клавуланова киселина. Относително съхранена е чувствителността към ампицилина, макар и в по-ниска степен.

Направените препоръки от мен за предварителното обсъждане на дисертационния труд са взети под внимание. Наблегнато е на съвременните молекулярно-биологични и генетични методи, използвани днес за разкриване интимните механизми и същност на функциониране на гените, кодиращи токсин продуциране и механизмите на патогенност и вирулентност на STEC щамове на *E. coli* O157, както и разкриване на механизмите на лекарствената им устойчивост. Въвеждането на молекулярно-

генетичен скрининг на суровото мляко, получавано в говедовъдните стопанства за наличие на гени детерминиращи продукцията на шигатоксини мове да послужи като „алармен“ сигнал за корективни действия в процеса на добиване и съхранение, с оглед препоръчване и извършване на корективни действия.

Със справката за приносите по принцип съм съгласен.

1. За първи път в България е проведено теренно проучване относно комплексния генетичен профил на шигатоксин продуциращи *E. coli* O157:H7 при млекодайни говеда от интензивен тип – **оригинален за страната принос.**
2. Апробиран е диагностичен алгоритъм за първична изолация, идентификация и верификация на *E. coli* O157:H7, чрез използването на селективни и диференциращи хранителни среди - mTSB суплементиран с новобиоцин, SMAC със цефиксим и калиев телурит и 4 метиллумбелиферил- β -D-глюкоронид (MUG) с последващо слайд аглутинационно тестване за серотипна принадлежност – **потвърдителен принос.**
3. Доказано е, че използването на SMAC за детекция и първична идентификация на *E. coli* O157:H7 е проста, евтина, бърза и надеждна среда и се препоръчва за рутинна употреба – **потвърдителен принос.**
4. За първи път е осъществено скринингово изследване при телета в интензивните ферми у нас за носителство на STEC, като е анализиран техния вирулентен потенциал, което позволява научно-аргументиран подход при разработване на моделни програми за превенция и контрол - **принос с научно теоретично и приложно значение.**
5. Доказано е, че при телета, се регистрират преимуществено присъствието на амплификати реципрочни на *stx2*, последния е основен патогенетичен фактор при инфекциите при хора и в пряка корелативна връзка с възрастта животните – **потвърдителен принос.**
6. Потвърдено е, че изолирането и характеризирането на STEC от говеда е от есенциално значение за формирането на диагностични алгоритми и инструменти за контрол, за да се предотврати успешно преноса на STEC на хората чрез консумация на контаминирани храни от говеда по хранителната верига – **потвърдителен принос.**

Авторефератът правдиво отразява най-важните постижения и резултати от научното дирене на автора и считам, че може да се отпечати в този си вид.

Заклучение:

В представеният ми за рецензия дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“, ас. Койчо Петров Коев постига достатъчно оригинални научни и научно-приложни приноси за ветеринарната медицина. Те са с насоченост към извършването на епидемиологични и микробиологични проучвания на шига-токсин продуциращи *Escherichia coli* при млекодайни говеда в Р България. Коев анализира основните закономерности и рисковете по хранителната верига за намаляване контаминацията на суровото краве мляко с STEC щамове на *E. coli* O157 и подобряване на контрола, и ограничаване рисковете за общественото здраве. Приноси,

които обогатяват познанията ни и разкриват широки хоризонти за нови още по-задълбочени научни и научно - приложни проучвания. Основна характеристика на дисертацията е обемът на извършената работа и може би най ценното – използването на молекулярно-биологични методи за охарактеризиране и откриване на гени, кодиращи шига-токсини stx1, stx2 eaeA и H7 чрез полимеразно верижна реакция (PCR). Разработеният диагностичен алгоритъм се оказва успешен за доказване на шигатоксин продуциращи *E. coli* O157 след предварителна изолация и първична идентификация на ентеро-хеморагични *E. coli* от фецес на говеда с млекодайно направление. Установени са *E. coli* STEC O157:H7 в сурово сборно мляко във всички позитивни за каузалния агент стопанства. Определена е принадлежността и генетичния профил на получените изолати, относно тяхната токсин продукция. Определена е превалентността на STEC O157:H7 сред животинската популация от едри преживни животни с млекодайно направление (и различните категории по възраст) – телета сукалчета, подрастващи телета, отглеждани за разплод и възпроизводство, дойни крави и др.

Въз основа на по-горе изложеното определено считам, че представената ми за рецензиране дисертация за присъждане на образователната и научна степен „ДОКТОР“ по научната специалност „Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните“ на ас. Койчо Петков Коев от катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести, на ВМФ при ТрУ гр. Ст. Загора напълно покрива изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение, както и Вътрешния правилник за развитието на академичния състав на ТрУ гр. Ст. Загора и за това давам положителната си оценка. Препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да оценят по достойнство дисертационният труд на ас. Койчо Петков Коев и гласуват с **положителен вот за присъждането на научната степен „Доктор“.**

14.08.2019 г.
София

Рецензент:.....
(проф. д-р Георги Георгиев, д.в.м.н.)