



РЕЦЕНЗИЯ

от

проф. д-р Грозданка Томова Лазарова, дм

Ръководител Катедра Микробиология, Тракийски Университет - Медицински факултет,
Стара Загора

на

Дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен **ДОКТОР** по научната специалност „Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните“, област на висшето образование 6.0 Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина ,

на

д-р Койчо Петков Коев на тема :“ Микробиологични и епидемиологични проучвания на шига-токсинпродуциращи *Escherichia coli* при млекодайки говеда в РБългария“.

1. Биографични данни и професионална активност

Д -р Койчо Петков , Коев придобива образователната и квалификационна степен „Магистър“ по специалност „Ветеринарна медицина“. във Ветеринарномедицинския факултет при Тракийския университет, Стара Загора през 2005 г. .

От 2006-2009г. е ординатор в Отделението по заразни и паразитни болести. От 2009 г. досега е редовен асистент в секция Епидемиология, инфекциозни болести и превантивна медицина към катедра Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести на Тракийски университет, Стара Загора.

Във Ветеринарномедицинския факултет д-р Коев води практически занятия по дисциплините : Епидемиология и превантивна медицина, Инфекциозни болести по продуктивните животни, Инфекциозни болести по животните за компания, Подвижни клиники. Извършва диагностична, терапевтична и -консултативна дейност.

Има завършени курсове за продължителна квалификация по специалността, както и педагогически курсове за квалификация по : теория и методика на обучението,

интерактивни техники на взаимодействие със студентите, педагогическа психология и др.

Владее английски език, ниво „B1+“

2. Анализ на дисертационния труд

Представеният ми за рецензия дисертационен труд е написан на **192** стандартни машинописни страници, правилно структуриран, с раздели както следва: **въведение, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, обобщение, изводи и препоръки, приноси, библиография, приложение и списък на научни публикации.** Дисертационния труд съдържа общо **12** таблици и **24** фигури.

Библиографията включва общо **298** източника, от които **3** на кирилица и останалите на латиница. Повече от половината от цитираните автори (**167**) са от последните 9 години, като **22** от тях - от последните 5 години.

Експерименталната работа по темата е извършена в катедра Епидемиология, инфекциозни болести и превантивна медицина към катедра Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести на Тракийски университет, Стара Загора и е лично дело на дисертанта.

Въведението съдържа данни за значението ЕНЕС., разпространението, генетичната вариабилност и фактори на вирулентност при патогенни щамове *E.coli*. Тези данни сочат като особено значими ЕНЕС., част от които са установени само при домашни животни, а други - причиняват зооантропонози. Най-добре проученият серотип: *E.coli* O157:H7, причинява тежки инфекции у човек: хеморагично-диаричен синдром, хемолитично-уремичен синдром, бъбречна недостатъчност и др. Представени са научни данни, сочещи стопанските животни като основен резервоар на *E.coli* O157, както и други серотипове на ЕНЕС. Тези факти правят проучваната тема изключително актуална и значима, както за ветеринарната, така и за хуманната медицинска практика. Въведението представя значимостта на проблема и обосновава необходимостта от допълнителни епидемиологични, микробиологични и генетични проучвания по темата на дисертационния труд.

Литературният обзор е представен на **54** страници и отразява отличната информираност и задълбочени познания на дисертанта по научната тема.

Представени са интересни данни за най-честите патовари на диарогенната група *E.coli*- на Разред *Enterobacteriales*: ЕРЕС, ЕТЕС, ЕИЕС, ЕНЕС, ЕАЕС, както и новите: DAЕС и NТЕС. Проследени са, в исторически план, възникването и първите

съобщения за епидемии от ЕНЕС. в Аржентина , по-късно в САЩ , Германия ; откриването на екзотоксин- подобен на *Shiga* –токсина на *S.dysenteriae 1* , изолирането му в през 1983г. , до създаването на отделен патовар сред диарогенните *E.coli* - ЕНЕС.– акроним (предложен от Navaro и Karer .) , обединяващ *SLT* (*Shiga –Like –Toxin*) продуциращи щамове *E.coli* -. Представени са подробни и интересни данни за ролята на Ентерохеморагичните (шига-токсинпродуциращите *E.coli* (ЕНЕС, STEC) в патогенезата на инфекциите у животните и хората.

E.coli O157:H7 щам е типов представител на ЕНЕС , с водеща роля - в епидемиологията и клиничните прояви сред хора и животни. *E.coli* O157:H7 се отнася към биорискова група 3 . и е включен в списъка на биологичните оръжия .

Представени са интересни данни за източниците на инфекцията , механизми на предаване, сезонност, възрастово разпределение . Подробно са описани факторите на патогенност и вирулентност . Значително място е отделено на токсините : *SLT -1* (с 3 варианта) , *SLT -2* (със 7 варианта) , като варианти : *SLT -2a, 2c* и *2d* най- често причиняват ХУС (хемолитично-уремичен синдром) , а *SLT 2e* - едемна болест у прасета. ;

Сред факторите на фактори на вирулентност , подробно е описана способността на STEC , подобно на ЕРЕС за образуване на „ лезии на прикрепянето и изглаждането (A/E attaching/effacing lesia) ,. Интересни са представените данни за механизмите на действие на *SLT* и A/E лезии, както и факта, че повечето от клиничнопроявените случаи на ХК (хеморагичен колит) , ХУС и ТТП (тромботична-тромбоцитопенична пурпура) у хора са причинени от токсинопродуциращи щамове (STEС) и A/E лезии (+)..

Друг фактор на вирулентност на *E.coli* O157:H7 е продукцията на плазмид- кодиран хемолизин , както и други фактори на патогенност : , кодирани от извънхромозомни генетични детерминанти : плаزمиди, фаги, транспозони, „патогенни острови“и др.

Представени са данни за клиничните прояви на инфекциите с STEC *E.coli* O157:H7 .

Разгледани са обстойно , в научен и практически аспект съвременните методи за диагностика на основните серотипове ЕНЕС. , както и данни за антибиотичната чувствителност на ЕНЕС- щамове.

. Много добро впечатление прави обобщението на данните от литературния обзор, което резюмира обширната литература по темата в няколко основни направления :

Целта на дисертационния труд е правилно подбрана и формулирана. Считам, че : би могла да бъде конкретизирана по- точно , например :“Изолиране и характеризирание на STEC , серогрупа O157, чрез микробиологични, епидемиологични и молекулярно-генетични методи.“

За реализирането на целта д-р Коев си поставя пет основни задачи, които считам за правилно формулирани и достатъчно конкретни . При оформяне на целите по - правилно е да се използват термините : *изолиране* , вместо „изолация“, *разпространение*, вместо „превалентност“ *антибиотична чувствителност*, вместо „отнасяния“ или „сензитивност“

В раздела **материали и методи** : , подраздел **Материали** прави впечатление огромният *брой проби* (1129 фекални проби от телета) , обхващащ 28 ферми от 16 области .

Това е колосална по обем работа по организация, събиране, изследване и анализиране на данните, с която д-р Койчо Коев успешно се е справил. Таргетната възрастова група телета (от 3 до 6 месеца) е подбрана в съответствие с данните за честотата на отделяне на STEC в научната литература.

Методите , използвани в дисертационния труд са прецизно подбрани и подробно описани. Считам , че за по-голяма яснота биха могли да бъдат групирани в 4 или 5 направления, например : **Микробиологични** (в това число и Латекс-аглутинационния тест и Антибиотична чувствителност) , **Молекулярно-генетични методи**, **Епидемиологични**. Би следвало да се добавят и **Статистически методи**, използвани за статистическа обработка на резултатите, както и Интернет – база данни за търсене на литература (напр. *pubmed/ scolar.google.bg*)

Към **Бактериологични методи** прави впечатление прецизно подбраните методи за първично изолиране (вместо „изолация“) , култивиране и идентификация на щамове *E.coli* серотип O157:H7 методи за и доказване на O157- антиген на *E.coli* чрез латекс-аглутинационен тест .

Методите за определянето на **антибиотичната чувствителност** (а не „отнасяния“) на щамове *E.coli* серотип O157:H7 чрез ДДМ на Бауер- Кърби и определяне на МПК са подробно описани. Считам, че не е необходимо да се споменават детайлно, още повече, че това са рутинни методи, широко използвани в практиката . Изборът на антибиотици е правилно, с изключение на тестване на чувствителност към *Cefalotin* и *Tetracyclin*, които не се прилагат за лечение на ХУС и други клинични форми на

инфекции , причинени от *E.coli* O157:H7 у хора.. Според мен, по-значимо би било тестване на чувствителност към други антибиотици, като Карбапенеми, Колистин , Фосфомицин и др. Към методите за определяне на **фенотипна резистентност** би трябвало да се включат и класически методи като : двойно-диск метод за синергизъм (DDSM) за доказване на широкоспектърни бета-лактамази (ESBLs) , AmpC- ензими и др. В тази група методи трябва да се впишат не само стандартите за интерпретация на данните за чувствителност (CLSI, EUCAST) , а и версията и годината на актуализирането им. Това е задължително, не само при интерпретация на зоните на задръжка на бактериалния растеж, но и натоварването на антибиотичните дискове, което може да породи и грешна интерпретация на данните.

Много прецизно и подробно са описани **Методите за епидемиологично проучване**, наблюдение и анализ.

Изключително съм впечатлена от прецизно подобрите и описани **генетичните методи** за определяне на гени, кодиращи продукция на токсини – *stx-1, stx-2 eaeA* , *Hu* . чрез **multiplex PCR** техники.

В раздела: „**Резултати и обсъждане**“ прави впечатление огромния брой изследвани проби : **1129 фекални проби** от телета, от които са изолирани **30 щама *E.coli* серотип O157:H7**. Извършен е генетичен анализ за присъствие на гени, кодиращи H7 флагеларен (а не „камшичест“) антиген , *eaeA, stx1, stx2* . Изследвани са **22 проби от сурово сборно мляко** от 4 стопанства чрез multiplex PCR техники за наличие на токсинпродуциращи *E.coli* .

Бактериологичните изследвания

Използвани са стандартни (класически) методи за първично **набогатяване** на фекални проби, **изолиране** и **идентификация** и доказване на O157 –антиген (чрез латекс-аглутинационен тест) . Използването на този диагностичен алгоритъм е „златен стандарт“ в практиката, позволяващ **изолиране на *E.coli* O157:H7 до 100% във фекални проби през първите 2 дни от началото на инфекции с ЕНЕС.**

Използването на ЛА (латекс-аглутинационен тест) е с изключителна стойност , особено при лекувани пациенти, където културелните методи често са отрицателни, поради ниска концентрация на патогена, или отсъствието му във фекални проби (след 2 ден от началото на клиничните симптоми).

Резултатите от **генетичния анализ** (**или молекулярнобиологичната идентификация**) на **30 щама *E.coli* серотип O157:H7** е впечатляващ. Лично аз

считам, че това е и най- голямото достижение на този дисертационен труд, и лично на д-р К. Коев.

Тези щамове са подложени на генетичен анализ за наличие на ген, кодиращ флагеларния *H7- антиген* на *E.coli* серотип O157:H7.

При всички изпитани **30 щам**а е доказан ампликон с големина **625bp**, еквивалентен на ген, кодиращ **H7 антиген**. на *E.coli* серотип O157.

Направена е генетичен анализ (чрез PCR амплификация) на **30 щам**а *E.coli* O157 , от фекални проби за наличие на таргетни гени, кодиращи **токсинна продукция: stx2 , eaeA** . При 28 от 30 щам а е доказано наличие на ампликони (584 bp и 482 bp), съответстващи на **продукция на stx2 и A/E лезии**.

Извършен е генетичен анализ на токсинопродуциращи *E.coli* от сурово мляко (чрез PCR амплификация) . Пробите са подбрани от ферми с високо носителство на *E.coli* O157:H7 във фекални проби. Изпитани са **22 проби** за наличие на гени , кодиращи токсинопродуциране и за ген H7. При **15 проби** (от 22) е доказано наличие на гени : *eaeA, stx1, stx2* , а при **13 проби** (от 22) е доказан **H7 ген**, кодиращ флагеларен антиген на *E.coli* серотип O157:H7.

Тези резултати са впечатляващи и показват , че молекулярногенетичните методи са изключително точни и ценни методи за идентификация на *E.coli* серотип O157:H7. (а и на не- O157:H7.) изолати от болни и носители, за епидемиологичното маркиране на щамове ЕНЕС , изследване на продукти от животински произход, фураж и носителство.

Анализът на антибиотичната чувствителност на 30 щама *E.coli* серотип O157:H7 по е извършен по ДДМ на Бауер-Кърби . За интерпретация на данните са използвани EUCAST/ CLSI стандарти. Не става ясно от коя година и коя версия на споменатите стандарти е използвана за определяне чувствителността на изпитваните щамове. Понастоящем е в сила EUCAST, версия 9.0 / 01.01.2019г. , в която са определени , както зоните на задръжка, така и антибиотиците , които се прилагат при лечение на представители на разред *Enterobacteriales* , вкл. и *E.coli* серотип O157:H7 . Ретроспективният характер на изследването (за 6 годишен период) допуска използването на различни стандарти , но задължително трябва да се уточнят тези данни в раздел : **Методи на изследване**. В табл.11 на стр.112 са обединени в една графа резистентни и интермедиерни щамове. (R+I) . Отбелязани са висок процент

чувствителност на *E.coli* серотип O157:H7 към Cefalotin и Tetracyclin . (96,6%). Тези данни не би следвало да се интерпретират като чувствителни толкова категорично, при положение че **Цефалоспори**ни от първа генерация (ЦС-1) и **Тетрацикли**ни не се използват за терапия на тези инфекции. По тази причина , в действащия за момента EUCAST / 2019 г. стандарт липсват зони (в мм) за тези антибиотици . Това прави интерпретацията невъзможна , а използването им - излишно. Интересни и обнадеждаващи са данните , представени от Д-р К.Коев за запазена чувствителност на щамове и *E.coli* O157:H7 към ЦС-3 генерация (Цефтазидим, Цефтриаксон и Цефотаксим) . Широкото им използване в хуманната медицинска практика (в доболничната и болничната медицина) доведе до висока устойчивост на представители на *Enterobacterales*, вкл. и Широкото им използване в хуманната медицина, доведе до индуциране на множествена устойчивост на *Enterobacterales*, вкл. и *E.coli* O157:H7 (широкоспектърни бета-лактамази) , а употребата на Карбапенеми – и на устойчивост към т.нар. резервни антибиотици, с най-широк спектър, наречени :“тежката артилерия „ в антимикробната терапия.

От изпитаните 30 щамове *E.coli* O157:H7 д-р Коев не установява резистентни към ЦС-3 щамове. При интерпретация на антибиотичната чувствителност не би следвало да се употребява термин“ релативно висока“ чувствителност . Не става ясно дали тези данни са отнесена към друг период от време, или спрямо друг антибиотик.? В случая се анализират данни за чувствителност към *Ampicillin* и *Amoxicillin/Clavulanic acid* . Съобщават се 20 % (6 бр.) от *E.coli* O157:H7 щамове са резистентни едновременно и на двата антибиотика, което вероятно се дължи на *AmpC* ензимна устойчивост. Не става ясно дали са тествани за този тип устойчивост. В този смисъл , данните от МПК на щамове, показали устойчивост към по ДДМ към *Ampicillin* и *Amoxicillin/Clavulanic acid* , (табл 412/ стр.114) не дава допълнителна информация и би могла да се спести., още повече че става дума за 6 изолата (20 %?) Същото се отнася за **фиг.21** и **фиг. 22** ,, Кумулативни криви на *Ampicillin* и *Amoxicillin/Clavulanic acid*“, както и за **фиг.24** / стр.117 ,, Кумулативни криви на *Tetracyclin* .“ , който не се прилага за лечение на инфекции , причинени от разред *Enterobacterales* . Аминоглюкозидните антибиотици (без *Streptomycin*) , са с обичайна чувствителност , както е установил и Д-р Коев. Би следвало да се има предвид, че те се прилагат обикновено като синергистични антибиотици на аминопеницилините. , и то във високи дози (HE-high exposition), според EUCAST/ 2019.

Собствените резултати са изключително подробно и прегледно илюстрирани със снимков материал, с 12 таблици и 24 цветни фигури .

Те отразяват и онагледяват , в голямата си част , резултатите от този обширен , актуален ,прецизно изработен и интересен дисертационен труд.

3.Обсъждане

Хранителните интоксикации (каквито са и тези от *E.coli* O157:H7) и техните усложнения заемат важно място в инфекциозната патология у хора и животни, поради възможността от предаване по хранителната верига и ниската ИД (< 50 кл.) Доказателство са епидемичните взривове в Аржентина, Америка, Германия и др.

ЕНЕС /STEC са причина за около 2,8 млн. заболявания годишно по цял свят. В РБългария липсват мащабни проучвания и данни за разпространението им сред едри преживни животни , фураж и мляко . Липсват данни за подробна характеристика на циркулиращи щамове *E.coli* O157:H7 сред човешката популация. , както и за носителство във фецес на здрави говеда. Оскъдни са данните и за токсините, продуцирани от щамове *E.coli* O157:H7. По тази причина , мониторирането им в животински резервоари, както и контрола за наличието им в хранителната верига е от изключителна важност.

Настоящият дисертационен труд е първото, всеобхватно , клинично-значимо проучване върху разпространението, епидемиологията, изолирането , идентификация и генетичен анализ на щамове *E.coli* O157:H7 от здрави говеда (носители) и от сурово мляко. Тези проучвания са изключително актуални и издържани в методично отношение , Методите , използвани в дисертационния труд са съвременни, включващи „ златен стандарт „ в областта на микробиологията и инфекциите и в съответствие с поставената цел и задачи

В раздела Изводи , приемам изводите като логични , резултат от приложените методики. Считаю, че Извод № 2 е част от предлагания от автора алгоритъм за първоначално изолиране и идентификация. Би следвало да се оформи като извод за приложимостта на този диагностичен алгоритъм, което е и едно от основните достижения на дисертационния труд и заслуга на автора. Намираю за особено значими : **Изводи 3, 4 , 5 и 6.** Приветстваю д-р К. Коев за **Извод 7** , отнасящ се за необходимостта от бъдещи съвместни проучвания на щамове *E.coli* O157:H7 от носители и клинични изолати от животни и хора. Това е сериозен подход към инфекции със зооантропонозност, касаещ общественото здраве.

Считам, че в Извод 8, отнасящ се до интерпретация на антибиотичната чувствителност на щамове *E.coli* O157:H7 не трябва да се интерпретират данните за антибиотици, които не се прилагат за лечение на тези инфекции. Считам, че работата би придобила още по-завършен вид и научна стойност при изпитване на антибиотичната чувствителност / механизми за резистентност на *E.coli* O157:H7 (а и на не- *E.coli* O157 STEC) към антибиотици като : карбапенеми, колистин, Фосфомицин и др.

В раздел :Приноси . Изцяло приемам приносите , като определено считам, че биха могли да се изброят още приноси с оригинален , научен и научно-приложен характер, особено в собствените проучвания на генетичния профил на изолирани токсигенни щамове във фекални проби и доказване на stx-1 в сурово мляко.

Настоящият дисертационен труд е изключително актуален, мащабен , издържан в методиките , получените резултати и приносите. Дисертационният труд отговаря на всички формални и неформални изисквания за дисертационен труд.

Проблемите, поставени в настоящия мащабен труд са изключително интересни , а резултатите- впечатляващи. Настоящият дисертационен труд е методична основа в диагностиката и терапията на инфекции от *E.coli* O157:H7, но също така създава предпоставки за разширяване на проучванията за останалите серотипове ЕНЕС.

В заключение , считам , че дисертационният труд на д-р Койчо Коев представлява колосално по обем и задачи проучване , с използване на съвременни научни методи и значими резултати за науката и клиничната практика .

Поради : актуалност на проблема, пряка връзка с общественото здраве, обем на проучената литература , собствена интерпретация и анализ на литературата от страна на автора, добре развито и структурирано съдържание на темата, грамотно представяне на текста, аргументация и добросъвестно цитиране., посочените резултати могат да се определят като основни достойнства на представената дисертация

4. Заключение :

Оценявам положително избора на темата, анализа на използваните материали и литература, съвременните методи за микробиологичен, молекулярногенетичен и епидемиологичен анализ на данните, постигнатите резултати и оригиналните интерпретации . Оценявам като изключително съществен принос предложения комплексен диагностичен алгоритъм и молекулярнобиологични методи за идентификация на *E.coli* O157:H7 във фекални проби и в сурово мляко., които считам като оригинални приноси в разработената тема.

Дисертационният труд и материалите по темата показват, че д-р Койчо Коев притежава задълбочени теоретични познания и професионални умения по научната специалност, както и възможности за самостоятелно провеждане на научни изследвания. Дисертационният труд е лично дело на дисертанта.

Предвид на всичко казано, **давам своята категорично положителна оценка за представения ми за рецензия труд, постигнатите резултати и приноси, автореферата, както и комплексната преценка за преподавателската, диагностична и научна дейност, езикова и обща култура, и предлагам на почитаемите членове на научното жури да присъдят на Д-р Койчо Петков Коев образователна и научна степен „Доктор „ област на висшето образование 6.0 Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина, по научна специалност :“ Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните „**

26 .08. 2019 г.

Стара Загора

Рецензент:

/.....

Проф. Д-р Грозданка Т.Лазарова, д.м.
Р-л катедра Микробиология
Мед. факултет, ТУ-Стара Загора