



ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ

ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“

Секция „Ветеринарна микробиология“

Радостина Димитрова Стефанова

**ФЕНОТИПНИ И ГЕНОТИПНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ
РЕЗИСТЕНТНОСТТА КЪМ АНТИМИКРОБНИТЕ
СРЕДСТВА ПРИ ЩАМОВЕ *E. coli*, ИЗОЛИРАНИ ОТ
КОКОШЕВИ И ВОДОПЛАВАЩИ ПТИЦИ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по научна специалност “Ветеринарна микробиология”

**Научен ръководител: проф. дн Валентина
Стаматова Урумова**

Стара Загора
2026 година

Дисертационният труд е написан на 150 страници, съдържа 21 фигури и 21 таблици. Списъкът с цитираната литература съдържа 580 източника.

Дисертационният труд е обсъдена на Разширен катедрен съвет към катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“ при Ветеринарномедицински факултет на Тракийски университет, Стара Загора, състоял се на 17.10.2025 година и е насочен за защита пред специализирано научно жури.

Най-искрени благодарности изразявам към моя научен ръководител проф. дн Валентина Урумова, за нейния професионализъм, задълбочените научни насоки и непрестанната подкрепа през целия период на работа върху дисертацията. Нейните съвети, конструктивна критика бяха в основата на реализирането на това изследване.

Благодаря на всички собственици на стопанства, които ни позволиха достъп за получаване на необходимите проби!

Благодаря на колегите и служителите в обектите на нашето изследване, които ни съдействаха през цялото време!

Материалите по защитата можете да намерите на Интернет страницата на Тракийски университет (www.trakia-uni.bg) и в Научен отдел на Ветеринарномедицински факултет към Тракийски университет, Стара Загора.

Използвани съкращения

ABC – АТФ-свързващи касети

AMR – антибиотична резистентност

CTX – Цефотаксимаза

ECDC - Европейски център за контрол на инфекциозните заболявания

ECOFF – Епидемиологична гранична стойност

EFSA – Европейски орган по безопасност на храните

EMA – Европейска медицинска агенция

ESBL – бета-лактамази с разширен спектър на действие

EUCAST – Европейск комитет по тестване на антимикробна чувствителност

FDA – Агенция за контрол на храните и лекарствата на Съединените Американски щати;

MATE – мултилекарствени ефлуксни помпи, които елиминират токсините от клетката

MDR – множествена резистентност

MIC – минимални инхибиторни концентрации

MRSA – метицилин-резистентни *Staphylococcus aureus*

OIE/WOAH – Световна организация по здравеопазване на животните

OXA – оксацилиназа

PBPs – пеницилин-свързващи протеини

PMQR – плазмид-медирана резистентност към хинолони

Qnr – гени, етерминиращи резистентност към хинолони

QRDR – генетичен регион, детерминиращ резистентност към хинолони

SMR – малки мултилекарствени ефлуксни помпи

VRE – ванкомицин-резистентни ентерококи

WHO – Световна здравна организация

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Разпространението на антимикробната резистентност (AMP) представлява актуален и сериозен казус, засягащ както хуманната, така и ветеринарната медицина. Неправилната и прекомерна употреба на антимикробни средства в животновъдството създава предпоставки за селектиране и перзистирание на резистентни бактериални щамове, които могат да се предават по хранителната верига и да застрашат общественото здраве. Резистентните бактерии могат да се разпространяват сред хората, животните и в различни екологични ниши в околната среда. Особено значение имат коменсалните коли бактерии (*Escherichia coli*), които са приемат за индикаторни микроорганизми при оценката на разпространението на антимикробна резистентност сред животните и околната среда.

Птицевъдството е сектор от животновъдството, в който употребата на антибиотици е традиционно широка, поради необходимостта от профилактика и лечение на бактериални инфекции, както и за подобряване на продуктивността. Това обаче води до повишен риск от развитие на мултирезистентни коли щамове, които могат да съдържат плазмидно-медиирани гени, пренасящи се хоризонтално между различни бактериални популации. В последните години редица международни организации като WHO, OIE и EFSA насочват усилията си към ограничаване на антимикробната употреба при животните и засилване на мониторинга на антибиотичната резистентност. Световната Организация за Здравеопазване на Животните определя като “критично-значими” антимикробни средства за употреба във ветеринарната медицина (VCIA) цефалоспорините от 3-та и 4-та генерации, флуорираните хинолони и полимиксините (OIE, 2020).

Настоящата дисертация има за цел да изследва фенотипните и генотипните характеристики на резистентността към основни групи антимикробни средства при коменсални коли щамове, изолирани от различни видове стопански птици и от торова постеля. Получените резултати имат значение за по-задълбоченото разбиране на механизмите на разпространение на антибиотичната резистентност във ветеринарната практика и за прилагането на ефективни стратегии за нейното ограничаване в птицевъдния сектор.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ПРОУЧВАНЕТО

ЦЕЛ

Целта е да се направи проучване, анализ и оценка на някои фенотипни и генотипни характеристики на резистентността към антимикробни средства при коменсални коли бактерии, изолирани от различни видове стопански птици и от торова постеля.

ЗАДАЧИ

1. Създаване на сбирка от коменсални коли бактерии, изолирани от различни видове стопански птици.
2. Извършване на фенотипен анализ на резистентността към някои групи антимикробни средства при коменсални коли бактерии, изолирани от различни видове стопански птици и от торова постеля:
 - 2.1 Фенотипен анализ на резистентността към някои бета-лактамни антимикробни средства.
 - 2.2 Фенотипен анализ на резистентността към гентамицин.
 - 2.3 Фенотипен анализ на резистентността към тетрациклин.

- 2.4 Фенотипен анализ на резистентността към ципрофлоксацин.
3. Да се направи генотипен анализ на резистентността към някои групи антимикробни средства при коменсални коли бактерии, изолирани от различни видове стопански птици и от торова постеля.
- 3.2 Проучване върху разпространението на ген *bla* CTX-M-1, определящ продукцията на бета-лактамази с разширен спектър на действие (ESBL), при резистентните към бета-лактамните антимикробни средства коли бактерии.
- 3.3 Проучване върху разпространението на гените *tetA* и *tetB*, детерминиращи ефлуксни помпи, при резистентните към тетрациклин коли бактерии.
- 3.4 Проучване върху разпространението на плазмидно-детерминираните гени *qnrS*, *qnrA* и *qnrB-1* при резистентните към ципрофлоксацин коли бактерии.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Изолиране и идентифициране на коли бактериите

Фенотипните и генотипните проучвания върху резистентността към някои антимикробни средства при коменсалните коли бактерии, изолирани от кокошеви и водоплаващи птици обхващаха двугодишен период, от януари 2020 година до декември 2021 година. Изолирането, култивирането, фенотипния и генотипния анализ на пробите бяха извършени в микробиологичната лаборатория в катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“, секция “Ветеринарна микробиология” към Ветеринарномедицинския факултет при Тракийски университет,

гр. Стара Загора.

Стопанства

За провеждане на изследванията бяха получени клоакални тампонни проби от различни видове стопански птици: бройлери, кокошки-носачки, родители за бройлери, пуйки и стопански патици. Птиците бяха отглеждани в следните птицевъдни стопанства, разположени в Южна и Североизточна България:

- Птицекомбинат “Градус”, гр. Стара Загора;
- Птицекомбинат “Пилко”, гр. Разград;
- Птицекомбинат “Камчия”, гр. Шумен;
- Стопанство за отглеждане на кокошки-носачки ЕТ "Ангелов" с. Цалапица, област Пловдив;
- Пуйкоферма, с. Малко Кадиево, област Стара Загора;
- Стопанство за отглеждане на стопански патици, с. Могила, област Стара Загора;
- Стопанство за отглеждане на стопански патици, с. Памукчии, област Стара Загора;
- Стопанство за отглеждане на стопански патици, с. Крепост, област Хасково

Практиката по отношение на приложението на антибиотици в птицекомбинатите “Градус” и “Пилко” и в стопанството за отглеждане на кокошки е рестриктивна и не се употребяват цефалоспорини. В стопанството за кокошки-носачки се използва основно колистин с терапевтична цел. По отношение на приложението на антимикробни средства в пуйкофермата в с. Малко Кадиево, при новоизлюпените пуйчета до пет-дневна

възраст се използват флуорирани хинолони (енрофлоксацин) с цел метафилактика. В стопанствата за отглеждане на патици се използват амоксицилин и ципрофлоксацин с терапевтична цел.

1.1 Проби и бактериални изолати

За периода на нашите изследвания бяха получени общо 619 броя клоакални тампонни проби от здрави птици и 12 проби от торова постеля. Броят на пробите от съответните видове стопански птици беше както следва от:

- Бройлери (15-26 дневна възраст) – 184 проби;
- Кокошки-носачки – 100 проби;
- Родители за бройлери- 123 проби;
- Пуйчета на 9-дневна възраст – 50 проби;
- Пуйки на възраст над една година – 50 проби;
- Стопански патици (45-60 дневна възраст) – 100 проби;
- Торова постеля - 12 проби

Клоакалните тампонни проби транспортирахме в транспортна среда на Stuart (FL Medical, Италия).

За получаване на пробите от торова постеля използвахме обувни тампонни/марлени чорапчета, поставени върху обувките. След вземането на пробите, чорапчетата бяха поставяни в найлонов плик и транспортирани в хладилна чанта. Общо получените проби от торовата постеля бяха 12, като шест от тях бяха получени от пуйкоферма с. Малко Кадиево и шест от птицекомбинат “Градус”, гр. Стара Загора.

Броят на изолираните коменсални коли щамове от съответните

категории птици и стопанства беше:

- Бройлери, птицекомбинат „Градус“, гр. Стара Загора - 99 бр.;
 - Бройлери, птицекомбинат “Пилко”, гр. Разград - 46 бр.;
 - Родители за бройлери, птицекомбинат “Камчия” гр. Шумен – 101 бр.;
 - Кокошки-носачки, с. Цаланица - 76 бр.;
 - Стопански патици, с. Могила, с. Крепост, с. Памуклии – 93 бр.;
 - Пуйки, пуйкоферма с. Малко Кадиево - 78 бр.;
 - Торова постеля - 12 бр.;
- Общ брой коли щамове - 505 бр.**

1.2 Изолиране и идентифициране на коменсалните коли бактерии

За култивиране на тампонните проби и изолиране и идентифициране на чистите бактериални култури използвахме следните хранителни среди:

- Селенитов бульон (Himedia BioSinces, Индия);
- MacConkey агар (Himedia BioSinces, Индия);
- Тризахарножелезен агар (Himedia BioSinces, Индия);
- Политропна среда на Клиглер (Himedia BioSinces, Индия);
- Симонс цитрат агар (Himedia BioSinces, Индия);
- Среда за индол и подвижност (Himedia BioSinces, Индия);
- Симонс цитрат агар (Himedia BioSinces, Индия);
- Среда на Кларк

Първоначалната изолация на коли бактериите осъществявахме като култивирахме тампонните проби в селенитов бульон и в MacConkey агар, след което инкубирахме хранителните среди при 37°C в продължение на 18 - 24 часа. На 24-ия час от течната

хранителна среда субкултивирахме в MacConkey агар и инкубирахме културите при същия температурен режим - 37°C за 24 часа.

За култивиране на всеки две двойки тампонни чорапчета използвахме 225 ml буферирана пептонна вода и инкубирахме пробите при 37°C в продължение на 18 - 24 часа. След това от буферираната пептонна среда субкултивирахме по-аналогичен начин в агара на MacConkey и инкубирахме културите при 37°C в продължение на 18 - 24 часа. Върху агара на MacConkey коли бактериите образуват лактоза-негативни колонии, оцветени в тъмнорозов цвят, с гладка периферия.

Растеж на коли бактерии върху MacConkey агар



За предварителната биохимична идентификация на колониите върху MacConkey агар използвахме политропната среда на Клиглер или тризахарно-железния агар (TSI), средата за индол и подвижност и Симонс цитрат агар. Също така използвахме тест с метилрот и теста на Фогес-Проскауер по отношение утилизирането на глюкозата.

При растежа си в средата на Клиглер или в тризахарно-железния агар коли бактериите утилизират глюкозата и образуват газ, усвояват лактозата и не отделят сероводород.

Тест за определяне продукцията на индол

Тестът за продукция на индол извършвахме в средата за индол и подвижност. Коли бактериите разграждат аминокиселината триптофан и образуват индол-пирогроздена киселина. При позитивният тест за наличие на индол в средата наблюдавахме формирането на червен пръстен, разположен на повърхността на средата, след накапване на реактива на Kovacs.

Тест за утилизиране на цитрата в Симонс цитрат агар

Коли бактериите не могат да използват цитрата като единствен източник на въглерод, паради което не променят рН на средата, респективно цвета на индикатора.

Тест с метилрот

За тестовете с метилрот и този на Фогес-Проскауер използвахме 4-дневни култури на коли бактериите в глюкозофосфатния бульон на Кларк. Коли бактериите ферментират глюкозата в глюкозофосфатния бульон на Кларк и при промяна в рН на средата след накапването на 0.2% алкохолен разтвор на метилрот се наблюдава оцветяване в червено.

Тест на Фогес Проскауер

Коли бактериите не могат да използват 2,3-бутандиолната ферментация на глюкозата, при което се отделя ацетон и се подкиселява рН на средата. При накапване на 1 mL КОН и 3 mL на α -нафтол в 95% етанол, не наблюдавахме промяна в цвета на средата.

Идентифициране на коли щамове чрез полуавтоматичната система CRYSTAL (Becton Dickenson, USA)

При идентификационните системи (автоматични и полуавтоматични) се използват ферментационни тестове, като обикновено се включват хромогенни или флуорогенни субстрати за установяване активността на специфични ензими. Като субстрати с хромогени често се използват естери на о-нитрофенола (ONP) или р- нитрофенола (PNP), формиращи при ензимна хидролиза жълт цвят от освободения нитрофенол. При интерпретация на резултатите се използват идентификационни матрици на вероятностите.

За идентифициране на коли бактериите използвахме китове за идентификация на ентеробактерии и неферментативни бактерии от системата на CRYSTAL. Интерпретативните критерии при контролния щам *Escherichia coli* ATTC 25922 при използването на кит за определяне на ентеробактерии и неферментативни бактерии са представени в следващата таблица:

Таблица 1. Интерпретативни критерии при контролен щам *Escherichia coli* АТТС 25922 при използването на кит за определяне на ентеробактерии и неферментативни бактерии

Субстрати в панела	<i>E. coli</i> АТТС 25922	<i>E. coli</i> АТТС 25922	Субстрати в панела
Арабиноза	V	–	p-n-p-ксилозид
Маноза	+	-	p-n-p- α -арабинозид
Захароза	–	–	p-n-p-осфорилхолин
Мелибиоза	+	+	p-n-p- β -глюкоронид
Рамноза	+	–	p-n-p-N-ацетилглюкозаминид
Сорбитол	+	+	γ -L-глутамил p-нитроанилид
Манитол	+	–	Ескулин
Адонитол	–	–	p-нитроDL-фенилаланин
Галактоза	+	–	Урея
Инозитол	–	–	Глицин
p-n-p-фосфат	V	–	Цитрат
p-n-p- α - β -люкозид	-	–	Малонова киселина
p-n-p- β -глюкозид	+	(+)	Трифенил тетразолиум хлорид
Пролин нитроанилид	–	V	Аргинин
p-n-p-bis-фосфат	V	+	Лизин

Легенда: (+) повечето от изолатите са положителни;

+ положителен тест; - отрицателен тест; V варибилен тест

1.3 Методи за определяне на резистентност към проучваните антимикробни средства сред изолираните коменсални коли бактерии

За анализиране на резистентността към някои антимикробни средства при коменсалните коли бактерии, изолирани от различни видове стопански птици, бяха използвани фенотипни и генетични методи. От фенотипните методи използвахме диск- дифузионния метод и метода за определяне на МИС, а от генетичните методи технологията на TaqMan хидролитичните сонди за определяне на някои генетични фактори, детерминиращи резистентност към цефалоспорините от трета генерация, тетрациклините и флуорираните хинолони.

1.3.1 Фенотипни методи за определяне на резистентност към антимикробните средства

Бяха използвани два основни фенотипни метода за изпитване чувствителността на бактериите към антимикробните средства - диск-дифузионен метод и определяне на минималните инхибиторни концентрации (МИС) чрез техниките на микро/макро- разреждания в бульон и Е-тест. За фенотипния анализ на резистентността към антимикробните средства при коменсалните коли бактерии приложихме диск- дифузионен метод и определяне на минималните инхибиторни концентрации (МИС) чрез Е-тест. Коли бактериите бяха изследвани по отношение на тяхната чувствителност към седем антибактериални средства, принадлежащи към четири различни класа, както следва:

- Бета-лактамни антимикробни средства: ампицилин,

амоксицилин/клавуланова киселина, цефотаксим, цефтазидим, цефотаксим/клавуланова киселина, цефтазидим/клавуланова киселина;

- Аминогликозид-аминоциклитоли – гентамицин;
- Тетрациклини – тетрациклин;
- Флуорирани хинолони – ципрофлоксацин

Определяне на чувствителността към проучваните антимикробни средства при коменсалните коли бактерии чрез диск-дифузионен метод

За диск дифузионният тест използвахме следните антибиотични дискове: ампицилин (10 µg), амоксицилин/клавуланова киселина (20/10 µg), цефотаксим (5 µg), цефтазидим (10 µg), гентамицин (10 µg), тетрациклин (30 µg) и ципрофлоксацин (5 µg), произведени от Himedia BioSinces, Индия.

За провеждане на диск-дифузионният метод приготвихме стандартизирани бактериални суспензии от 18-24-часови култури в месопептонен агар с оптична плътност 0.5 по стандарта на McFarland. След щрихиране на бактериалните култури с напоен с бактериалната култура тампон върху агара на Мюлер Хинтон (Himedia BioSinces, Индия) поставяхме антибиотичните дискове, след което инкубирахме културите за 18 ± 2 часа при температура 37°C. Интерпретацията на резултатите, съответно зоните на задържане на растежа и чувствителността на коли бактериите към проучваните антимикробни средства, интерпретирахме съгласно граничните стойности определени от EUCAST за сензитивност и резистентност (Matuschek *et al.*, 2014).

Определяне на чувствителността към проучваните антимикробни средства при коменсалните коли бактерии чрез метода на минималните инхибиторни концентрации на антимикриобните средства (MIC)

Определяне на MIC чрез E-test

За определяне на MIC чрез E-test използвахме следните градуирани ленти:

- Ампицилин Ezy MIC™ Strips (0.016-256 µg/mL, Himedia BioSinces, Индия)
- Ампицилин/клавуланова к-на Ezy MIC™ Strips (0.016-256 µg/mL, Himedia BioSinces, Индия)
- Цефотаксим MIC strips (0.016-256 µg/mL, Liofilchem, Италия)
- Цефтазидим Ezy MIC™ Strips (0.016-256 µg/mL, Himedia BioSinces, Индия)
- Гентамицин MIC strips (0.016-256 µg/mL, Liofilchem, Италия)
- Тетрациклин (0.016-256 µg/mL, Liofilchem, Италия)
- Ципрофлоксацин Ezy MIC™ Strips (0.002-32µg/mL, Himedia BioSinces, Индия)

За определяне на продуцентите на бета-лактамази с разширен спектър на действие също така използвахме потвърдителен тест по препоръка на EUCAST, със следните градуирани ленти:

- Цефотаксим/клавуланова киселина (цефотаксим - 0.25-16 µg/mL и цефотаксим/клавуланова киселина - 0.016-1 µg/mL Liofilchem, Италия)
- Цефтазидим/клавуланова к-на (цефтазидим - 0.5-32 µg/mL и цефтазидим/клавуланова киселина – 0.064-4 µg/mL, Liofilchem, Италия)

За определянето на МИС на проучваните антимикуробни средства чрез Е-тест, първоначално приготвихме бактериална суспензия от 18-часови бактериални култури, стандартизирани до 0.5 по McFarland ($1-2 \times 10^8$ CFU/mL). След това неколкократно щрихирахме с напоен с бактериалната култура тампон в различни посоки по цялата повърхност на Мюлер Хинтон агара. Градуираните ленти поставяхме върху подсушената агарова повърхност така че цялата дължина на антибиотичния градиент да е в пълен контакт с повърхността на агара. След това инкубирахме културите в продължение на 16-20 часа при температура $35 \pm 2^\circ\text{C}$. При отчитане на резултатите установявахме наличието на елипсовидна зона на задържане на растежа по протежение на градуираната лента. Минималните инхибиторни концентрации отчитахме директно по скалата в точката, в която ръбът на инхибиторната зона пресича градуираната лента. И двата фенотипни метода контролирахме с контролен щам *Escherichia coli* ATCC 25922.

При потвърдителният тест за определяне на МИС на комбинациите цефотаксим/клавуланова киселина и цефтазидим/клавуланова киселина при коли щамовете, показали резистентност към бета-лактамите при диск дифузионния метод, резултатите отчитахме като вземахме под внимание факта, че положителния резултат се отнасяше до 8-пъти редуциране на МИС при цефалоспорините от трета генерация при комбинацията с клавуланова киселина, в сравнение с МИС стойностите, измерени за всеки един от тях поотделно. В този случай тестът контролирахме с контролен щам *Escherichia coli* ATCC 35218.

В следващата таблица са посочени критичните стойности при

интерпретирането на резултатите при диск-дифузионния метод и при метода за определяне на минималните инхибиращи концентрации за коли бактериите, съгласно EUCAST, както и ECOFF стойностите.

Таблица 2. Интерпретативни критерии съгласно EUCAST, критични стойности при диск-дифузионния метод и MIC за *E. coli* (<https://www.eucast.org/>, 01.01.2021/22)

Антимикробни средства/ к-я на дисковете (µg)	Диаметри на зоните на задръжане на растежа (mm)	Критични стойности на MIC (mg/L)	ECOFF стойности
Ампицилин (10 µg)	S≥14; R <14 mm	S≤8; R >8 mg/L	>8 mg/L
Амоксицилин/клавуланова к-на (20/10 µg)	S≥19; R<19 mm	S≤8; R>8 mg/L	-
Цефтазидим (10 µg)	S≥22; R<19 mm	S≤1; R>4 mg/L	>0.5 mg/L
Цефотаксим (5 µg)	S≥20; R<17 mm	S≤1; R>2 mg/L	>0.25 mg/L
Гентамицин (10 µg)	S≥17; R<17 mm	S≤2; R>2 mg/L	>2 mg/L
Тетрациклин (30 µg)	S≥19 mm; R≤14 mm	S ≤8; R >8 mg/L	>8 mg/L
Ципрофлоксацин (5 µg)	S≥25; R<22 mm	S≤0.25; R>0.5 mg/L	>0.064 mg/L

Легенда: S (susceptible) – чувствителни; R (resistant) – устойчиви; MIC – минимални инхибиторни концентрации

Чрез ECOFF стойностите (епидемиологични cut-off values) могат да бъдат отдиференцирани щамовете, които притежават вродена резистентност, от тези, които експресират придобита резистентност към антимикробните средства, в резултат на различни генетични

механизми като придобиване на плазмидни генетични детерминанти, продуциране на ензими и др. За определяне на ECOFF стойностите при резистентните щамове се изисква използването на по-голям брой, който да бъде гарант за статистическата достоверност на конфиденциалните лимити при интерпретиране на процентите на сензитивност/резистентност при така наречените “диви типове”, тоест тези, които притежават вродена резистентност към изпитваните антимикробни средства. Поради това при интерпретиране на резултатите ние използвахме критичните стойности на MIC, препоръчани от EUCAST (2021/2022г) за определяне на чувствителността и резистентността към проучваните антимикробни средства при коменсалните коли бактерии. Тези от коли щамовете, които експресираха резистентност към три и повече от изследваните антимикробни средства определяхме като мултирезистентни.

1.3.2 Генетични методи за определяне на резистентността към проучваните антимикробни средства при коменсалните коли бактерии

Екстрахиране на ДНК от коли бактериите

Генетичният анализ на резистентните коли щамове се отнасяше до определяне на някои генетични платформи, детерминиращи резистентност към Цефотаксим и цефтазидим, като ген *bla* CTX-M-1, също така на плазмидно-детерминираните гени, определящи резистентност към флуорираните хинолони, *qnrS*, *qnrA* и *qnrB* и на гените, които определят резистентност към тетрациклиновите антибиотици, *tet A* и *tet B*.

За екстрахиране на ДНК от резистентните коли щамове използвахме spin-column технологията. Тя се отнася до екстракция в твърда фаза за бързо пречистване на нуклеиновите киселини. Спин-колониите съдържат мембрана от силициев диоксид, чиято роля е да свърже нуклеиновите киселини по време на екстракцията. Методът на екстрахиране на ДНК се състоеше от следните етапи: лизиране, свързване, измиване и елюиране. Първоначалната стъпка включваше лизис на таргетните клетки, след това селективно свързване на нуклеиновата киселина с мембраната от силициев диоксид, отмиване на наличните примеси и елюиране на нуклеиновата киселина, като елюиращият буфер отстраняваше нуклеиновата киселина от мембраната и тя изтичаше в епендорф епруветка.

За екстрахиране на ДНК от резистентните коли бактерии използвахме DNeasy Blood Tissue kit (Qiagen, Германия), следвайки описания протокол, предложен от производителя:

- Първоначално приготвихме суспензия от 18-24-часова бактериална култура в микроцентрифужна епруветка, след което центрофугирахме при 7500rpm за 10 минути. След това отделяхме супернатантата.
- На следващия етап депото от бактериалните клетки ресуспендирахме в 180µl ATL буфер.
- Добавяхме 20 µl протеиназа К и инкубирахме при 56°C за 30 минути.
- На следващо място вортексирахме за 15 секунди и добавяхме 200 µl AL буфер (лизиращ буфер) и 200 µl етанол (96-100%).
- След това отпипетирахме в DNeasy Mini колонна епруветка, поставена в колекционна епруветка от 2 ml, и центрофугирахме при

8000 rpm за 1 min. След това отстранявахме колекционната епруветка.

- В следващия етап добавяхме 500 μ l AW1 буфер (миещ буфер) и центрифугирахме при 8000 rpm за 1 min. Отново отстранявахме колекционната епруветка.
- Колонната епруветка поставяхме в нова колекционна епруветка от 2 ml и добавяхме 500 μ l AW2 буфер (миещ буфер). Центрофугирахме при 14 000 rpm за 3 минути, след което отново отстранявахме колекционната епруветка.
- В следващия етап прехвърляхме колонната епруветка в микроцентруфужна епруветка и добавяхме 200 μ l AE буфер (елюиращ буфер) и центрофугирахме при 8000 rpm за 1 минута.

Протоколи за амплифициране на гени на резистентност при коли бактериите в qPCR (TaqMan сонди)

За определяне наличието на гени, детерминиращи резистентност към проучваните антимикробни средства, използвахме qPCR метод, респективно технологията на хидролитични TaqMan сонди. TaqMan анализите се използват за количествен PCR анализ на генната експресия в реално време. При qPCR протокола, базиран на хидролитичните TaqMan сонди се използва 5' \rightarrow 3' нуклеазната активност на Taq - полимеразата, за да се идентифицират и определят количествено специфичните амплификационни продукти в реакцията. TaqMan сондите са натоварени с две флуоресцентни багрила, които експресират флуоресценция при различни дължини на вълната. "Reporter" (R) багрилото е свързано с 5'-края на нуклеотидната последователност на сондата, докато "quencher" (Q) багрилото се прикрепва в 3'-края. Най-често TaqMan сондата е конюгирана с репортер флуорохром

(напр. FAM, VIC или JOE) и гасител флуорохром (например TAMRA). Докато тези два флуорохрома са в непосредствена близост, флуоресценцията, излъчвана от репортерния флуорохром, се абсорбира от флуорохрома на гасителя. След усилване на целевата последователност, TaqMan сондата се разгражда от Taq-полимераза, което води до разделяне на репортера и гасителя флуорохроми. След като молекулата на репортерното багрило се освободи от сондата и вече не е в непосредствена близост до гасителното багрило, тя може да започне да флуоресцира. В резултат на това флуоресцентният сигнал на репортерния флуорохром става откриваем и допълнително се увеличава по време на последователните PCR цикли поради прогресивното натрупване на свободни репортерни флуорохроми.

За осъществяване на генетичните анализи използвахме готови китове, Microbial DNA qPCR assay kits, произведени от QIAGEN (Германия).

Гени на резистентност	Cat. № for Microbial DNA qPCR Assays/ Assay Kits
CTX-M-1 group	BPAR00377A/ BBAR00377A
QnrS	BPAR00441A/ BBAR00441A
QnrB-1	BPAR00434A/ BBAR00434A
tetA	BPAR00449A/ BBAR00449A
tetB	BPAR00450A BBAR00450A

Китовете съдържат следните компоненти:

- Microbial DNA qPCR Assay (двойка праймери и хидролитична TaqMan сонда)
- Positive PCR Control
- Microbial DNA Positive Control
- Microbial DNA-Free Water
- Microbial qPCR Mastermix

За генетични изследвания, използвахме TaqMan сонда за откриване на амплификационна област, детерминираща резистентност към антимикробните средства, маркирана с FAM (синьо) репортерно багрило и ROX Reference Dye (пасивно референтно багрило). Референтното багрило ROX, нормализира флуоресцентния сигнал на репортерните qPCR багрила при модифицирани сонди или при TaqMan™ сонди. ROX Reference Dye има лесно различим червен спектър на излъчване и осигурява базова линия в мултиплексните qPCR анализи.

Компоненти	n=1
PCR water	6.5 µl
Master mix	12.5 µl
qPCR assay	1 µl
Mastermix volume	20 µl
DNA template	5 µl
Общ обем	25 µl

Амплификационните реакции извършвахме в qPCR апарат на STRATAGENE Mx3000P, произведен от Agilent Technologies (САЩ). Протоколът за амплифициране на гените *bla* СТХ-М-1, *tet A*, *tet B*, *qnrS*, *qnrA* и *qnrB* беше съставен от следните компоненти:

Термопрофилът на амплификационната реакция включваше

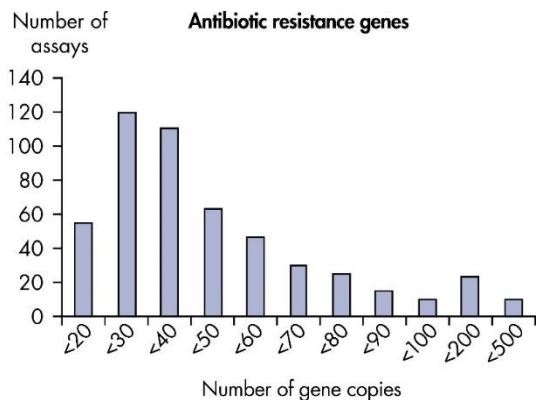
следните етапи:

- Начална стъпка на денатурация при 95°C за 10 минути
- Следващата стъпка включваше 2 етапа, повтарящи се в 40 цикъла:
- денатурация (95°C за 15 секунди);
- аниалинг/елонгаця (60°C за 2 минути)

Долната граница на количествено определяне (LLOQ) е най-ниската концентрация на матрицата, която все още попада в линейния диапазон на стандартната крива. LLOQ за всички qPCR анализи на микробна ДНК показва висока чувствителност.

Диаграмата показва разпределението на LLOQ за микробни ДНК qPCR анализи за откриване на гени за антибиотична резистентност. 95% от всички анализи на гени за антибиотична резистентност имат LLOQ <100 генни копия.

<https://www.qiagen.com>



От 23-ти цикъл положителните qPCR реакции демонстрират експоненциално нарастване на флуоресценцията, а негативната контрола показва ниски базови стойности на флуоресцентния сигнал. Положителната контрола в съответствие с протокола на DNA assay kit на Qiagen, Германия показва C_T стойности ≤ 22 -ия цикъл, докато C_T стойността на отрицателната контрола е >34 -ия цикъл.

Статистическа обработка на данните

Статистическата обработка на данните извършихме с програма GraphPad Version 3.

При анализа на резултатите бяха отчетени следните нива на статическа достоверност: $p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$.

III. РЕЗУЛТАТИ

1. Разпространение на резистентност към изследваните антимикробни средства сред коменсалните коли бактерии, изолирани от бройлери и кокошки-носачки

1. 1. Фенотипни профили на резистентност към изследваните антимикробни средства сред коменсалните коли бактерии, изолирани от бройлери и кокошки

От получените 120 клоакални проби от бройлери в птицекомплекс “Градус” (гр. Стара Загора) бяха изолирани 99 колищама. От получените 64 клоакални проби от бройлери в птицекомплекс “Пилко” (гр. Разград) бяха изолирани общо 46 колищама. Общият брой на коли щамове от двете стопанства беше 145.

От получените 100 клоакални проби от кокошки в стопанство в с. Цалапица (ЕТ “Ангелов”) бяха изолирани общо 76 коли щамове.

Най-висок процент на резистентни коли щамове, изолирани от бройлери беше установен по отношение на ципрофлоксацин (68.3%), след това и към тетрациклин (66.9%). Също така беше анализирано широко разпространение на резистентността при коли

щамове по отношение на ампицилин (53.8%) и към комбинацията амоксицилин/клавуланова киселина (44.1%). Резистентните коли щамове към цефотаксим бяха 5.5%, респективно към цефтазидим 7.6%. Сред изолираните коли щамове от бройлери от птицекомплекс “Пилко” не установихме резистентност към цефотаксим. Също така процентите на резистентните коли щамове към гентамицин, изолирани от бройлери от двата птицекомплекса, бяха с близки стойности съответно 15.1% и 17.4%. Статистически достоверни различия по отношение на показателите за относителен дял, представящи резистентните коли бактерии към проучваните антибиотици, изолирани от двете стопанства, не бяха установени.

Най-висок процент на резистентност беше анализиран спрямо ципрофлоксацин (68.3%, 75%) при коли щамове от бройлери и от кокошки, но не се наблюдаваха статистически достоверни различия при показателите за относителен дял. Не бяха установени статистически достоверни различия и по отношение на резистентността към аминопеницилините при коли щамове, изолирани от бройлери (53.8%; 44,1%) и от кокошки (50.0%; 39,5%). Освен това бяха наблюдавани статистически достоверни различия по отношение на резистентността към тетрациклин ($p \leq 0.01$), като тя беше по- висока при коли щамове, изолирани от бройлери (66.9%), в сравнение с наблюдаваната резистентност при щамове от кокошки (33%). Интерес представляваше и факта, че при коли бактериите, изолирани от кокошки, не беше определена резистентност към цефалоспорините, респективно и към гентамицин.

При коли щамове от бройлери MIC_{90} за ампицилин беше 32 $\mu\text{g/mL}$, респективно 8 $\mu\text{g/mL}$ при бактериите, изолирани от кокошки. За комбинацията амоксицилин/клавуланова киселина

MIC₉₀ беше 16 µg/mL за щамовете от бройлери и 8 µg/mL за щамовете от кокошки. По отношение на ципрофлоксацин бяха определени стойности на MIC₉₀ 0.5 µg/mL както при бактериите, изолирани от бройлери, така и при тези, изолирани от кокошки. При коли щамовете от бройлери MIC₉₀ за тетрациклин беше 16 µg/mL, респективно 8 µg/mL при щамовете от кокошки. По отношение на цефотаксим бяха анализирани следните стойности за MIC₉₀, съответно 0.25 µg/mL при коменсалните коли бактерии, изолирани от бройлери и 0.125 µg/mL при щамовете от кокошки. Еквивалентни бяха определените стойности на MIC₉₀ за цефтазидим, съответно 0.125 µg/mL при коли бактериите, изолирани от бройлери и от кокошки.

1.2 Генотипни профили на резистентност към изследваните антимикробни средства сред коменсалните коли бактерии, изолирани от бройлери и кокошки- носачки

От общо изследваните 221 коли щамове, при осем от резистентните щамове (5.5%) към аминопеницилините и цефалоспорините беше наблюдавано наличие на ген *bla*_{CTX-M-1}. При коли щамовете, изолирани от кокошки-носачки не беше установено наличие на резистентност към цефалоспорините, респективно наличие на ген *bla*_{CTX-M-1}. При нито един от щамовете, изолирани от бройлери и от кокошки-носачки, не бяха установени гените *qnrA* и *qnrB1*, определящи плазмидно-медираната резистентност към флуорираните хинолони. При 156 от резистентните към ципрофлоксацин коли щамове, изолирани от бройлери и от кокошки (70.6 %) беше наблюдавано наличие на ген *qnrS*. При общо 101 (45.7%) от коли щамовете, експресиращи резистентност към

тетрациклин, беше установено присъствие на ген *tetA*, респективно при 21 от щамовете (9.5%) беше наблюдавано наличие и на ген *tetB*, като при резистентните към тетрациклин коли бактерии, изолирани от кокошки-носачки не наблюдавахме разпространение на ген *tetB*.

При 37 (37.4%) от резистентните коли щамове, изолирани от бройлери, беше анализиран мултирезистентен профил, включващ аминопеницилини, тетрациклин и ципрофлоксацин, свързан с широкото разпространение на гените *qnr S* (25.5%) и *tetA* (20.7%). При 25 (33.0%) от резистентните щамове, изолирани от кокошки-носачки беше анализиран резистентен профил, включващ аминопеницилини и ципрофлоксацин, също отнасящ се до високата честота на разпространение на ген *qnr S* (33.0%).

2. Разпространение на резистентност към изследваните антимикробни средства сред коменсалните коли бактерии, изолирани от родителски стада за бройлери

От получените 123 клоакални проби от родители за бройлери в стопанство “Камчия”, гр. Шумен бяха изолирани общо 101 колищама.

2.1 Фенотипни профили на резистентност към изследваните антимикробни средства сред коменсалните коли бактерии, изолирани от родителските стада за бройлери

Най-висок процент на резистентни коли бактерии, изолирани от родители за бройлери, беше определен към тетрациклин (61.4%), а след това и към ципрофлоксацин (58.4%). Резистентните коли бактерии към ампицилин и амоксицилин/клавуланова киселина бяха съответно 52.0% и 38.6%. При коли щамовете от родители за бройлери беше наблюдавано по-слабо разпространение на

резистентността към цефалоспорините, цефотаксим и цефтазидим (1.0%, 5.9%). Също така беше установено слабо присъствие на резистентни към гентамицин коли бактерии (4.9%)

Стойностите на MIC₉₀ по отношение на аминопеницилините бяха съответно за ампицилин 16 µg/mL и за амоксицилин/клавуланова киселина 8 µg/mL. Високи стойности на MIC₉₀, 32 µg/mL бяха наблюдавани за тетрациклин. MIC₉₀ за цефотаксим и цефтазидим бяха 0.25 µg/mL и 0.5 µg/mL. Намерените стойности на MIC₉₀ за ципрофлоксацин бяха 0.25 µg/mL, а за гентамицин 1 µg/mL.

2.2. Генотипни профили на резистентност към изследваните антимикробни средства сред коменсалните коли бактерии, изолирани от родители за бройлери

От общо изследваните 101 коли щамове, при четири от резистентните щамове към аминопеницилините и цефалоспорините (3.9%) беше наблюдавано наличие на ген *bla*_{CTX-M-1}. При 55 от резистентните към ципрофлоксацин коли щамове (54.4%), изолирани от родители за бройлери беше наблюдавано разпространение на ген *qnrS*. При нито един от резистентните към ципрофлоксацин коли щамове не беше анализирано наличието на плазмидно-детерминирани гени *qnrA* и *qnrB1*. При 56 от коли щамове, резистентни към тетрациклин (55.4%) беше установено присъствие на ген *tetA*, респективно при шест щамове (5.9%) беше наблюдавано присъствие и на ген *tetB*.

При 39 от резистентните коли щамове (38.6%), изолирани от родители за бройлери, беше анализиран мултирезистентен профил,

включващ аминопеницилини, тетрациклин и ципрофлоксацин, отнасящи се до широко разпространение на гените *qnr S* (38.6%) и *tetA* (38.6%). Също така при седем от резистентните щамове (6.9 %) беше анализиран мултирезистентен профил, включващ аминопеницилини, цефалоспорини, тетрациклин и ципрофлоксацин, като при четири от тях беше наблюдавано наличие на ген *bla* _{CTX-M-1} (3.9%), респективно при седем от тях присъствие на ген *qnr S* (6.9%), при 5 от тях наличие на ген *tet A* (4.9%) и при два присъствие и на ген *tet B* (1.9%).

3. Разпространение на резистентност към изследваните антимикробни средства сред изследваните коменсални коли бактерии, изолирани от стопански патици и пуйки

3.1 Фенотипни профили на резистентност към изследваните антимикробни средства сред коменсалните коли бактерии, изолирани от стопански патици и пуйки

От получените 110 клоакални тампонни проби от стопански патици (стопанства, с. Могила, с. Памукчии, област Стара Загора и с. Крепост, област Хасково) бяха изолирани 93 коли щамове, респективно от 110-те тампонни проби от пуйки (пуйкоферма, с. Малко Кадиево, област Стара Загора) бяха изолирани 78 коли щамове, като 34 щамове бяха изолирани от 9-дневни пуйчета и 44 коли щамове от 12-месечни пуйки.

Статистически достоверни различия в разпространението на резистентността към ампицилин ($p \leq 0.05$), тетрациклин ($p \leq 0.001$) и към ципрофлоксацин ($p \leq 0.01$) бяха доказани сред коли щамове от водоплаващи птици в четвъртото стопанство. Статистически

достоверни различия по отношение на по-слабо разпространение на резистентността към ампицилин ($p \leq 0.05$), тетрациклин ($p \leq 0.001$) и към ципрофлоксацин ($p \leq 0.001$) бяха определени сред коли щамовете от водоплаващите птици в първото стопанство. Във второто и третото от изследваните стопанства установихме също присъствие на резистентност към комбинацията амоксицилин/клавуланова киселина (над 40%) без наличието на статистически достоверни различия. По-високи стойности на резистентност към гентамицин (31.6%) без наличието на статистически достоверни различия бяха наблюдавани сред коменсалните коли бактерии, изолирани от водоплаващите птици в първото стопанство. По-ниски нива на резистентност към ципрофлоксацин без наличие на статистическа достоверност бяха наблюдавани сред коменсалните коли щамове, изолирани от водоплаващите птици в третото стопанство (55%).

Най-висок процент на резистентност при коли бактериите, изолирани от водоплаващи птици беше установен към тетрациклин (81.7%), а след това и към ампицилин (75.3%). При коли щамовете от водоплаващи птици беше също така наблюдавано по-широко разпространение на резистентността към ципрофлоксацин (66.7%). При същите не беше установена резистентност към цефотаксим и цефтазидим, докато при изолатите от пуйки беше определена такава резистентност при два щамове (2.6%), които бяха изолирани от пуйчета на 9-дневна възраст. При коли бактериите, изолирани от пуйки, наблюдавахме също по-високи нива на резистентност към тетрациклин (71.8%) и ампицилин (70.5%), като по-високи стойности бяха определени при изолатите от пуйчета на 9-дневна възраст (73.5%), в сравнение с нивата на резистентност, установени

при щамовете, изолирани от 12-месечни пуйки (70.4%, 68.2%). Сред коменсалните коли бактерии, изолирани от пуйки, бяха установени по - високи стойности на резистентност към ципрофлоксацин (58.9%), като отново по-висок процент на резистентност беше установен при щамовете, изолирани от 9-дневни пуйчета (70.5%).

По-широко беше разпространението на резистентност към комбинацията амоксицилин/клавуланова киселина сред коли щамовете, изолирани от пуйки (41.0%), в сравнение с това, което наблюдавахме при щамовете, изолирани от водоплаващи патици (18.3%), като беше установена статистически достоверна разлика ($p \leq 0.001$ ***) по отношение на показателите. В сравнителен аспект на база показателите за относителен дял не беше установена статистически достоверна разлика, отнасяща се до останалите от изследваните антибиотици при коли щамовете, изолирани от стопански патици и от пуйки.

При щамовете от стопански патици MIC₉₀ за ампицилин беше 8 µg/mL, респективно по-високи стойности 16 µg/mL бяха определени при щамовете от пуйки. При коли бактериите от двете групи по отношение на комбинацията амоксицилин/клавуланова киселина бяха установени стойности на MIC₉₀ от 4 µg/mL. Наблюдаваните стойности на MIC₉₀ за цефотаксим и цефтазидим при щамовете, изолирани от пуйки бяха съответно 0.125 µg/mL и 0.25 µg/mL. При двете групи коли бактерии бяха определени еквивалентни нива на MIC₉₀ за ципрофлоксацин съответно 0.5 µg/mL, и за гентамицин 2 µg/mL. По-високи стойности на MIC₉₀, 16 µg/mL за тетрациклин бяха определени при щамовете, изолирани от пуйки в сравнение с MIC₉₀ за тетрациклина при коли щамовете от

стопански патици (8 µg/mL).

3.2 Генотипни профили на резистентност към изследваните антимикробни средства сред коменсалните коли бактерии, изолирани от стопански патици и пуйки

При 61.3% от изследваните коли щамове от водоплаващи птици, респективно при 29.5% от щамовете от пуйки беше установен полирезистентен профил, включващ ампицилин, тетрациклин и ципрофлоксацин. При 16.1% от коли щамовете от водоплаващи птици наблюдавахме резистентен профил, включващ тетрациклин и ципрофлоксацин. При 17.9% от щамовете, изолирани от пуйки, установихме полирезистентен профил, включващ ампицилин, амоксицилин/клавуланова киселина, тетрациклин и ципрофлоксацин. При 2.6% от проучваните коли бактерии, изолирани от пуйки, бяха установени полирезистентни профили, включващи ампицилин, амоксицилин/клавуланова киселина, цефотаксим, цефтазидим, тетрациклин и ципрофлоксацин.

Най-широко разпространение при проучваните коли щамове, изолирани от водоплаващи птици и пуйки беше наблюдавано по отношение на гените *tetA* и *qnrS*. При 81.7% от щамовете, изолирани от водоплаващи птици определихме присъствие на ген *tetA*, а при 48.4% и на ген *tetB*.

Ген *tetA*, беше установен при 71.8% от изследваните щамове, изолирани от пуйки, докато по-слабо разпространение беше наблюдавано по отношение разпространението на ген *tetB* (17.9%). При нито един от резистентните коли щамове не беше определено присъствие на ген *qnrA*. Разпространението на ген *qnrS* беше наблюдавано при 26.9% от щамовете, изолирани от водоплаващи

птици, респективно при 26.0% от щамовете, изолирани от пуйки. Също така беше установено по-широко присъствие на ген *qnrB1* при 12.8% от щамовете, изолирани от пуйки, докато ген *qnrB1* беше определен само при три щама (3.2%), изолирани от водоплаващи птици. Присъствието на ген *bla_{CTX-M-1}* беше определено при 2.6% от коли бактериите, изолирани от пуйки.

4 Разпространение на резистентност към изследваните антимикробни средства сред коменсалните коли бактерии, изолирани от торова постеля в стопанства за отглеждане на бройлери и пуйки

а. Фенотипни профили на резистентност към изследваните антибиотици сред коменсалните коли бактерии, изолирани от торова постеля на бройлери и пуйки в две стопанства.

От получените 12 проби от торовата постеля, шест от които бяха от торовата постеля в стопанство за отглеждане на бройлери и шест от торовата постеля в стопанство за отглеждане на пуйки, бяха изолирани 12 коли щама.

Таблица 3 представя резултатите, отнасящи се до разпространението на резистентността към проучваните антимикробни средства сред коменсалните коли бактерии, изолирани от торова постеля. Най-висока превалентност на резистентни коменсални коли бактерии (100%) към аминокпеницилини, тетрациклин и ципрофлоксацин бяха намерени при щамовете от торовата постеля в стопанството за отглеждане на бройлери. При коли щамовете, изолирани от торовата постеля в стопанството за отглеждане на пуйки беше наблюдавано широко разпространение на резистентността към тетрациклин (71.8%), след това към ампицилин (70.5%) и към ципрофлоксацин (58.9%).

Таблица 3. Разпространение на резистентността към изследваните антимикробни средства сред коменсалните коли бактерии, изолирани от торова постеля в две стопанства за отглеждане на бройлери и пуйки

Антимикробни средства	Резистентни <i>E.coli</i> , изолирани от торова постеля в стопанство за отглеждане на бройлери (n=6)	Резистентни <i>E.coli</i> , изолирани от торова постеля в стопанство за отглеждане на пуйки (n=6)	Общо изолирани резистентни <i>E.coli</i> от торова постеля (n=12)	CL/95%
Ампицилин	6 (100%)	3 (50.0%)	9 (75.0%)	47.8÷94.3
Амоксицилин/ клавуланова к-на	6 (100%)	3 (50.0%)	9 (75.0%)	47.8÷94.3
Цефотаксим	4 (66.6%)	-	4 (33.3%)	10.6÷61.2
Цефтазидим	3 (50.0%)	-	3 (25%)	4.7÷52.1
Гентамицин	5 (83.3 %)	-	5 (41.7%)	16.5÷69.4
Тетрациклин	6 (100%)	5 (83.3%)	11 (91.7%)	71.3÷100
Ципрофлоксацин	6 (100%)	3 (50.0%)	9 (75.0%)	47.8÷94.3

Легенда: p≤0.05*; p≤0.01**; p≤0.001***

При коменсалните коли бактерии от торова постеля стойностите на MIC₉₀ за тетрациклин бяха най-високи 128 µg/mL.

4.2 Генотипни профили на резистентност към изследваните антимикробни средства сред коменсалните коли бактерии, изолирани от торова постеля

От общо изследваните 12 коли щамове при пет от резистентните

щамове към аминопеницилините и цефалоспорините (41.6%) беше наблюдавано наличие на ген *bla* CTX-M-1. При 8 от резистентните към ципрофлоксацин коли щамове (66.7%) беше наблюдавано разпространение на ген *qnrS*. При един от коли щамове, резистентни към ципрофлоксацин, беше установено и наличие на ген *qnrB1*. При 9 от коли щамове, експресиращи резистентност към тетрациклин (75.0%), беше установен ген *tetA*, при два щамове (16.7%) беше наблюдавано присъствие и на ген *tetB*.

При един от резистентните коли щамове (8.3%) беше анализиран мултирезистентен профил, включващ аминопеницилини, тетрациклин и ципрофлоксацин, респективно той беше свързан с наличието на гените *qnrS* и *tetA*. Също така при три от резистентните щамове (25.0%), изолирани от торова постеля беше анализиран мултирезистентен профил, включващ аминопеницилини, цефалоспорини, тетрациклин и ципрофлоксацин, отнасящ се до наличието на гените *bla* CTX-M-1, *qnrS* и *tetA*. При един от мултирезистентните коли щамове, чийто профил включваше аминопеницилини, гентамицин, тетрациклин и ципрофлоксацин, беше установено наличие на ген *qnrB1*.

5 Обобщение на резултатите

На таблица 4 са представени обобщените данни за фенотипа на резистентността към изследваните антимикуробни средства при коменсалните коли бактерии, изолирани от различни видове стопански птици. Най-висок процент на резистентност, съответно 81.7% и 75.3% беше анализиран към тетрациклин и към ампицилин при щамове от патици. Широко разпространение на резистентността към ципрофлоксацин (75.0%) беше наблюдавано при щамове от кокошки-носачки. Резистентните към

тетрациклин коли щамове, изолирани от пуйки, бяха 71.8%, към ампицилин респективно 70.5%. След това резистентността към ципрофлоксацин при коли щамовете, изолирани от бройлери беше 70.7%. По отношение на цефалоспорините от трета генерация, висока превалентност на резистентни щамове - 8.1% и 7.1%, беше определена при коменсалните коли бактерии, изолирани от бройлери, в сравнение с установената при щамовете от родители за бройлери (5.9%, 4.9%) и при щамовете от пуйки (2.6%, 2.6%)

Таблица 4. Обобщени данни за фенотипа на резистентността към проучваните антимикробни средства при коменсални коли бактерии, изолирани от различни видове стопански птици

Антимикробни средства	Резистентни <i>E.coli</i> от бройлери (n=145)	Резистентни <i>E.coli</i> от кокошки (n=76)	Резистентни <i>E.coli</i> от родители за бройлери (n=101)	Резистентни <i>E.coli</i> от стопански птици (n=93)	Резистентни <i>E.coli</i> от пуйки (n=78)
Ампицилин	54 (54.5%) ^{***}	38 (50.0%)	52 (52.0%)	70 (75.3%) ^{***}	55 (70.5%) ^{***}
Амоксиклав	45 (45.4%) ^{***}	30 (39.5%)	39 (38.6%)	17(18.3%) ^{***}	32 (41.0%)
Цефотаксим	8 (8.1%) [*]	-	1 (1.0%) [*]	-	2 (2.6%)
Цефтазидим	7 (7.1%)	-	6 (5.9%)	-	2 (2.6%)
Гентамицин	15 (15.1%) [*]	-	5 (4.9%) ^{**}	16 (17.2%)	14 (17.9%)
Тетрациклин	65 (65.6%) ^{***}	25 (33.0%) ^{***}	62 (61.4%)	76 (81.7%) ^{***}	56 (71.8%)
Ципрофлоксацин	70 (70.7%) [*]	57 (75.0%) [*]	59 (58.4%) [*]	62 (66.7%)	46 (58.9%) [*]

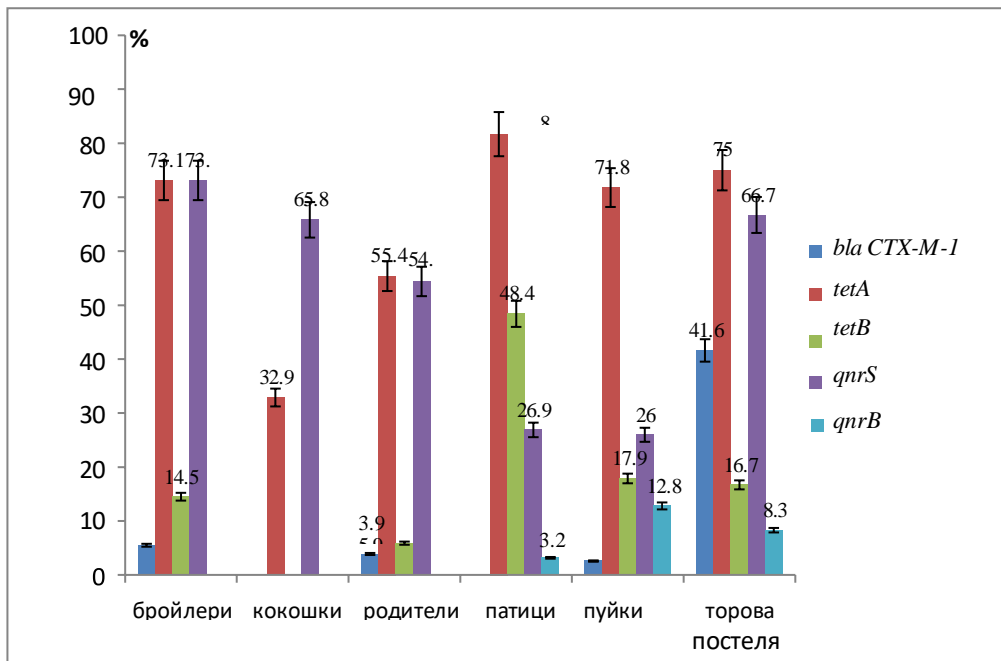
Легенда: p≤0.05^{*}; p≤0.01^{**}; p≤0.001^{***}

На фигура 1 са представени данните относно разпространението на изследваните гени сред коменсалните коли бактерии, изолирани от различни видове стопански птици и от торова постеля. Най-широко разпространение на ген *bla*_{CTX-M-1} наблюдавахме сред коли щамовете от торовата постеля (41.6%) и сред щамовете, изолирани

от бройлери (5.5%). При коли щамовете от родители за бройлери и от пуйки беше установено присъствие на ген *bla*_{CTX-M-1}, съответно 3.9% и 2.6%. По отношение на разпространението на гените, определящи резистентност към тетрациклин, доминиращо беше присъствието на ген *tetA* (81.7%) и респективно на *tetB* (48.4%) беше установен при коли бактериите, изолирани от стопански патици. Също така висок процент на разпространение на ген *tetA* беше анализирано при коменсалните коли бактерии от бройлери (73.1%), от пуйки (71.8%) и от торова постеля (75%). По-широко разпространение на ген *qnrS* беше наблюдавано при коли щамовете, изолирани от бройлери (73.1%), след това при тези от кокошки-носачки (65.8%), от торова постеля (66.7%) и от родители за бройлери (54.4%).

По-широко разпространение на ген *qnrB-1* беше установено при щамовете, изолирани от пуйки (12.8%), а след това и при щамовете от торовата постеля (8.3%).

Фигура 1. Разпространение на гените на резистентност сред коменсалните коли бактерии, изолирани от различни видове стопански птици и от торова постеля



IV. ИЗВОДИ

1. Доказан е най-висок процент на резистентност към аминопеницилините и ципрофлоксацин с доминиращо присъствие на ген *qnrS* при полирезистентните резидентни коли щамове, изолирани от бройлери, родители за бройлери и кокошки-носачки.
2. По отношение на резистентността към тетрациклин, се наблюдава по-слабо разпространение на резистентни резидентни коли бактерии, изолирани от кокошки носачки, както и отсъвие на резистентност към цефалоспорините от трета генерация и към гентамицин, в сравнение с фенотипните профили, които са установени при щамовете от бройлери.
3. При коменсалните коли бактерии, изолирани от бройлери и родители за бройлери, по-високи нива на резистентност се установяват спрямо тетрациклин, а след това към ципрофлоксацин, ампицилин и амоксицилин/клавуланова киселина, с доминиращо присъствие на гените *qnrS* и *tetA*.
4. Генетичния анализ на резистентността към цефалоспорините при коли бактериите от бройлери показва слабо присъствие на ген *bla* CTX-M-1, който определя продукцията на бета-лактамази с разширен спектър на действие, като разпространението му при коли щамовете от родители за бройлери е установено при над 3%.

5. При коменсалните коли щамове от водоплаващи патици и от пуйки фенотипно най-високи проценти на резистентност се установяват по отношение на тетрациклин, ампицилин и ципрофлоксацин. При тестираните щамове от пуйчета на 9 дневна възраст фенотипно се открива по-широко разпространение на резистентност към посочените антимикробни средства. Като статистически достоверно, по-висока превалентност по отношение на резистентността към амоксицилин/ клавуланова киселина е определена при щамовете, изолирани от пуйки.
6. При коменсалните коли бактерии, изолирани от водоплаващи патици не се открива резистентност към цефалоспорините от трета генерация. При полирезистентните коли щамове от водоплаващи патици и от пуйки най-често се установяват фенотипни профили, които включват ампицилин, тетрациклин и ципрофлоксацин с преобладаващо присъствие на гените *tetA* и *qnrS*. При щамовете, изолирани от водоплаващи патици, резистентността към тетрациклин също така е детерминирана при над 40% от щамовете с наличието и на ген *tetB*. Плазмидно детерминирата резистентност към ципрофлоксацин при коли щамовете от пуйки освен с наличието на ген *qnrS* е свързана и с присъствието на ген *qnrB1*, който е определен при 12.8% от щамовете.
7. Значим и разнообразен резервоар на генетични фактори, определящи резистентност към бета-

лактамите, тетрациклина и ципрофлоксацина, са коли щамове, изолирани от торвата постеля в стопанствата за бройлери и в стопанството за отглеждане на пуйки. Фенотипните профили при полирезистентните щамове от торвата постеля включват най-често аминопеницилини, тетрациклин и ципрофлоксацин, с преобладаващо присъствие на гените *tetA* и *qnrS*. Също така, превалентността на резистентните щамове към тетрациклин е по-висока при щамове от торвата постеля в стопанството за пуйки, а разпространението на резистентни към ампицилин щамове е по-широко представено при щамове от торвата постеля в стопанствата за бройлери. За разлика от коли щамове, изолирани от различни видове стопански птици, при резидентните коли бактерии, изолирани от торвата постеля от стопанството за отглеждане на бройлери, показаха широко разпространение на резистентност спрямо гентамицин, цефотаксим и цефтазидим. Това се потвърждава и от присъствието на ген *bla*_{CTX-M-1} (41.6%)

V. ПРИНОСИ

В торвата постеля в различни птицевъдни стопанства са установени полирезистентни коли щамове, които притежават разнообразни генитични фактори, определящи антиминобната резистентност, като особено значение за общественото здраве имат

тези, които продуцират бета-лактамази с разширен спектър на действие

Потвърдителен принос

Установено е доминиращото разпространение на някои генетични фактори, детерминиращи резистентността към определени класове антимикробни средства, при коли щамове, изолирани от стопанските птици и торвата постеля.

Потвърдителен принос

За първи път в Република България е направен цялостен фенотипен анализ на резистентността към някои основни групи антимикробни средства на коменсални коли щамове изолирани от различни видове стопански птици, както и на щамове от торвата постеля в различни стопанства.

Оригинален принос

За първи път в Република България е направен комплексен генотипен анализ на резистентността към няколко класа антимикробни средства на коменсални коли щамове, изолирани от различни видове стопански птици, а така също и на щамове от торвата постеля в различни стопанства.

Оригинален принос

VI. ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА

1. За да се понижи селективния натиск на терапевтично ниво, включването на антибиотици в птицевъдството да се базира на аргументирани предписания на препаратите, както и да се осъществява целесъобразен контрол от страна на ветеринарните лекари по отношение на начина и продължителността на тяхното приложение.

2. Торвата постеля да бъде включена в мониторинга на антимикробната резистентност в бройлерното птицевъдство във връзка с разпространението на резистентността сред коменсалните коли бактерии и ентерококи, с оглед обективното определяне на доминиращите фенотипни и генотипни профили при полирезистентните щамове на територията на нашата страна.

3. Да се създадат условия от страна на Българската агенция по безопасност на храните за непрекъснато повишаване квалификацията на ветеринарните лекари по въпросите, свързани с провеждането на антибиотична политика в сектора, както и по отношение на превантивните практики, целящи ограничаване на антимикробната резистентност.

4. Да се създадат условия от страна на Българската агенция по безопасност на храните за осъществяване на обективен годишен мониторинг по отношение на задължителната програма, въведена от Европейската комисия, засягаща разпространението на

резистентността при коменсалните коли бактерии. Също така, да се осъществява мониторинг на национално ниво по отношение на коменсалната чревна микрофлора при различните видове стопански птици, предвид неговото значение за редуциране на рисковете за разпространение на проблеми за общественото здраве, какъвто е този с превалентността на продуцентите на бета-лактамази с разширен спектър на действие, както сред резидентните коли бактерии, така и сред салмонелите.

Списък на публикациите във връзка с дисертационния труд:

- **R.D. Stefanova.** 2021. Prevalence of poultry *Escherichia coli* isoaltes producing extended-spectrum beta-lactamases and their public health importance. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. doi: 10.15547/bjvm.2400. ISSN: 1311-1477. Q3, SJR- 0.185
- Urumova V., **R. Stefanova**, M. Lyutskanov. 2021. Investigations on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolates from waterfowlv (Ducks) and turkeys. *Veterinarija ir zootechnika*, 79 (2):50-56. ISSN: 13922130. Q4, SJR- 0.128
- Urumova V., **R. Stefanova**, M. Lyutskanov. 2022. Studies on the prevalence of certain genetic factors determining antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from broilers and laying hens (short communication). *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 27(1):143-152. ISSN: 1311-1477. Q3, SJR- 0.185.

Участие в научни конференции

- **Stefanova R.**, Urumova V., Lyutskanov M. Distribution of *Escherichia coli* producing Extended-spectrum beta-lactamases isolated from birds- A review. International Scientific Conference “Tradition and Modernity in Veterinary Medicine”, 24-26. 04. 2020, Sofia, Bulgaria.
- **Stefanova R.**, Urumova V., Lyutskanov M. Studies on the prevalence of certain genetic factors determining antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from broilers and laying hens. International Scientific Conference “Tradition and Modernity in Veterinary Medicine”, 16-18. 04. 2021, Sofia, Bulgaria.
- Urumova V., **Stefanova R.**, Dobрева D. Investigation on antimicrobial resistance rates in commensal *Escherichia coli* isolates from broiler chickens (2020-2024). XXVII Symposium of Epizootiologist and Epidemiologists, Kladovo, Сърбия, 10-12 април, 2025. pp.184-185. ISBN-978-86-83115-55-6.

SUMMARY

This study investigates antimicrobial resistance (AMR) in commensal *Escherichia coli* strains isolated from various poultry species and environmental samples in poultry farms across Bulgaria. The research covers a two-year period (2020–2021) and employs both phenotypic and genotypic methods to analyze resistance patterns. It emphasizes the extensive use of antimicrobial agents in poultry production, which contributes to the emergence and spread of resistant bacteria, posing a significant risk to public health.

The study focuses on the distribution of resistance genes such as *bla*_{CTX-M-1}, *tetA*, *tetB*, *qnrS*, and *qnrB* among isolates obtained from broilers, laying hens, parent stock, ducks, and manure bedding samples. Various microbiological, biochemical, and molecular techniques were applied, including disk diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC) determination, PCR.

The results reveal high resistance rates to antibiotics such as tetracycline, ampicillin, and ciprofloxacin, with significant variations in resistance frequency depending on poultry species and farm type. The findings highlight the need for systematic monitoring of antimicrobial use and resistance gene distribution to develop effective control strategies, reducing the risk of resistant bacteria entering the food chain and the environment.

This research represents the first comprehensive study of its kind in Bulgaria, providing detailed phenotypic and genotypic data on antimicrobial resistance in commensal bacteria isolated from poultry and bedding material. It offers valuable insights for the development of public health and food safety policies, emphasizing the importance of prudent antibiotic use in veterinary medicine.