



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



ФОНД
НАУЧНИ
ИЗСЛЕДВАНИЯ

МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА



ПРОЕКТ КП-06-Н36/7 от 13.12.2019 г.

**ТЕМА: „РАЗПРОСТРАНЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НА ХРАНИТЕЛНИ
ПАТОГЕНИ С АНТИБИОТИЧНА РЕЗИСТЕНТНОСТ, ИЗОЛИРАНИ ОТ СВИНЕ,
ЛАГУНИ, ОТПАДНИ ВОДИ И НАТОРЯВАНИ ПОЧВИ В БЪЛГАРИЯ“**

РЪКОВОДИТЕЛИ: ЧЛ.-КОР. ХРИСТО НАЙДЕНСКИ, ДВМН

(ДЕКЕМВРИ 2019 г. – АПРИЛ 2020 г.,

ОКТОМВРИ 2021 г. – ДЕКЕМВРИ 2023 г.)

ГЛ. АС. ЛЮДМИЛА ДИМИТРОВА, Д-Р

(ОТ АПРИЛ 2020 г. – ОКТОМВРИ 2021 г.)

НАЧАЛО (13.12.2019 г.) – КРАЙ (07.12.2023 г.)





ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



ФОНД
НАУЧНИ
ИЗСЛЕДВАНИЯ
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА



СПИСЪК НА УЧАСТНИЦИТЕ В ПРОЕКТА:

НАУЧНА СТЕПЕН, АКАД. ДЛЪЖНОСТ	ИМЕ	МЕСТОРАБОТА	Млад УЧЕН
ДВМН, ЧЛ.-КОР.	ХРИСТО МИЛАДИНОВ НАЙДЕНСКИ	ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“	
ДМ, ДОЦЕНТ	ВЕСЕЛИН КЪНЧЕВ КЪСОВСКИ	ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“	
ДФ, ДОЦЕНТ	МАЯ МАРГАРИТОВА ЗАХАРИЕВА	ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“	
ДБ, ГЛАВЕН АСИСТЕНТ	ЗВЕЗДИМИРА ЦВЕТАНОВА	ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“	
ДМ, ГЛАВЕН АСИСТЕНТ	ЛЮДМИЛА ЛЮДМИЛОВА ДИМИТРОВА	ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“	МУ
ДФ, АСИСТЕНТ	ЯНА ЕМИЛОВА ИЛИЕВА	ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“	МУ
ДВМ, АСИСТЕНТ	МИЛА ДОБРОМИРОВА КАЛЕВА	ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“	ПД
МАГИСТЪР ВЕТЕРИНАРЕН ЛЕКАР	МАРИЕЛА ТОШЕВА НАЙДЕНСКА	БЪЛГАРСКА АГЕНЦИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТ НА ХРАНИТЕ	
МИКРОБИОЛОГ, СПЕЦИАЛИСТ	ИВА ВАСИЛЕВА ЦВЕТКОВА	ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“	
ДОКТОРАНТ	МАЯ ЛАЗАР АНГЕЛОВСКА	ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“	ДОКТ.

СПИСЪК НА КОНСУЛТАНТИТЕ В ПРОЕКТА:

НАУЧНА СТЕПЕН, АКАД. ДЛЪЖНОСТ	ИМЕ	МЕСТОРАБОТА
PHD, PROF.	MARC HEYNDRIKX	ILVO, БЕЛГИЯ
PHD, DR.	GEERTRUI RASSCHAERT	ILVO, БЕЛГИЯ
PHD, DR.	ELS DAESELEIRE	ILVO, БЕЛГИЯ
PHD	VIVI MIRIAGOU	INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE, ГЪРЦИЯ
PHD	STATHIS KOTSAKIS	INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE, ГЪРЦИЯ



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



РЕЗЮМЕ НА ПРОЕКТА:

АНТИМИКРОБНАТА РЕЗИСТЕНТНОСТ (AMP) Е СВЕТОВЕН ЗДРАВЕН ПРОБЛЕМ, ЗАСЯГАЩ НЕ САМО ЧОВЕКА, А СЪЩО ЖИВОТНИТЕ И ОКОЛНАТА СРЕДА В РАМКИТЕ НА КОНЦЕПЦИЯТА „ЕДНО ЗДРАВЕ“. ТОЙ СЕ ОБУСЛАВЯ ОТ МАСОВАТА УПОТРЕБА НА АНТИБИОТИЦИ, КАКТО В ХУΜΑΝНАТА И ВΕΤΕΡΙΝΑΡΝΑ ΜΕΔΙCΙΝΑ, ΤΑΚΑ Ι Β ΙΒΟΤΝΟΒΔΣΤΒΟΤΟ Ι ΣΕΛΣΚΟΤΟ ΣΤΟΠΑΝΣΤΒΟ ΚΑΤΟ CΥΛΟ. ΤΑΣΙ ΖΑΠΛΑΧΑ, ΒΚΛΥCΗΤΕΛΝΟ Ι ΠΟΒΙΣΑΒΑΝΕΤΟ ΝΑ ΒΡΟΥ ΜΥΛΤΙΡΕΖΙΣΤΕΝΤΝΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΙ, ΟΣΟΒΕΝΟ ΤΕΣΙ, ΚΟΙΤΟ ΣΑ ΟΣΤΟΙΧΙΒΙ ΝΑ ΣΗΡΟΚΟΣΠΕΚΤΥΡΝΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙCΙ Ι ΧΙΜΙΟΤΕΡΑΠΕΥΤΙCΙ, ΣΑ ΠΡΙCΗΝΑ ΖΑ ΝΑΡΑΣΤΒΑCΗΤΟ ΠΡΙΤΕΣΝΕΙΝΕ ΝΕ ΣΑΜΟ Β ΒΥΛΓΑΡΙΑ, ΝΟ Ι ΠΟ ΣΕΤΑ. ΟΒΙΚΝΟΒΕΝΟ ΒΖΝΙΚΝΑΛΙΤΕ ΙΝΦΕΚΤΙΟΝ ΣΑ C ΠΟΒΙΣΗΝΑ ΧΕΣΤΟΤΑ Ι ΧΕΣΤΟ ΖΑΒΥΡΣΒΑΤ C ΝΕΟΣΠΕΧ Β ΛΕΧΕΝΙΕΤΟ, Α ΠΟΝΥΚΟΓΑ Ι C ΛΕΤΑΛΕΝ ΚΡΑΥ, ΚΑΚΤΟ Ε ΠΡΙ ΣΕΠΤΙCΕΜΙΧΝΟ ΠΡΟΤΙΧΑCΙ ΣΑΛΜΟΝΕΛΟΖΑ, ΚΟΛΙΒΑΚΤΕΡΙΟΖΑ Ι ΨΕΡΣΙΝΙΟΖΑ. Β ΒΥΛΓΑΡΙΑ ΝΥΜΑ CΖΥΔΑΔΕΝΑ ΟΦΙCΙΑΛΝΑ ΙΝΦΟΡΜΑΤΙΟΝΝΑ ΣΥΣΤΕΜΑ, ΚΟΥΤΟ ΔΑ ΠΡΕΔΟΣΤΑΒΥ ΔΑΝΝΙ ΟΤΝΟCΗΟ ΝΟΠΡΕΒΑΤΑ ΝΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙCΙ Ι ΧΙΜΙΟΤΕΡΑΠΕΥΤΙCΙ Β ΣΒΙΝΕΒΥΔΣΤΒΟΤΟ. ΟΤ ΠΡΑΚΤΙΚΑΤΑ Ε ΙΣΒΕΣΤΝΟ, ΧΕ ΠΡΙ ΤΕΣΙ ΖΙΒΟΤΝΙ ΝΑΥ-ΧΕΣΤΟ ΣΕ ΠΡΙΛΑΓΑΤ ΒΕΤΑ-ΛΑΚΤΑΜΝΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙCΙ, ΤΕΤΡΑCΙΚΛΙΝΙ, ΦΛΥΟΟΡΙΡΑΝΙ ΧΙΝΟΛΟΝΙ, ΛΙΝΚΟΖΑΜΙΔΙ, ΠΟΛΙΠΕΠΤΙΔΝΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙCΙ Ι ΣΥΛΦΟΝΑΜΙΔΙ. ΔΟ ΜΟΜΕΝΤΑ ΣΑ ΠΡΟΒΕΔΕΝΙ ΝΥΚΟΛΚΟ ΟΤΔΕΛΝΙ ΙΣΛΕΔΒΑΝΥ Β ΡΑΖΛΙΧΝΙ ΣΤΟΠΑΝΣΤΒΑ ΟΤ ΣΤΡΑΝΑΤΑ, ΚΟΙΤΟ ΝΥΜΑΤ ΝΑΤΙΟΝΑΛΝΑ ΠΡΕΔΣΑΒΙΤΕΛΝΟCΗ. ΕΤΟ ΖΑCΗΟ Ε ΝΕΟΒΧΟΔΙΜΟ ΠΟ-ΜΑCΣΑΒΝΟ ΙΣΛΕΔΒΑΝΕ ΖΑ ΟΒΕΚΤΙΒΝΟ ΟCΕΝΥΑΒΑΝΕ Ι ΑΝΑΛΥΣΙΡΑΝΕ ΝΑ ΡΙCΚΟΒΕΤΕ ΟΤ ΡΑΖΒΙΤΙΤΕΤΟ ΝΑ ΡΕΖΙΣΤΕΝΤΝΙ Ι ΜΥΛΤΙΡΕΖΙΣΤΕΝΤΝΙ ΠΑΤΟΓΕΝΝΙ ΒΑΚΤΕΡΙΟΝ ΟΤ ΣΒΙΝΕΒΥΔΝΙΤΕ ΣΤΟΠΑΝΣΤΒΑ, ΡΑΖΠΡΟCΤΡΑΝΕΙΝΕΤΟ ΝΑ ΤΕΧΝΙ ΓΕΝΕΤΙΧΝΙΤΕ ΔΕΤΕΡΜΙΝΑΝΤΙ Β ΟΚΟΛΝΑΤΑ ΣΡΕΔΑ (ΠΟΧΥΙ Β ΟΤΠΑΔΝΙ ΒΟΔΙ) Ι ΤΟΡΟΧΡΑΝΙΛΙCΤΑΤΑ (ΤΟΡΟΒΙ ΛΑΓΥΝΙ) ΟΚΟΛΟ ΣΒΙΝΕΦΕΡΜΙΤΕ, ΤΥΙ ΚΑΤΟ ΠΡΥΚΟ ΙΛΙ ΚΟCΒΕΝΟ ΤΟΒΑ ΠΡΕΔΣΤΑΒΥΛΥΑ ΖΑΠΛΑΧΑ ΖΑ ΟΒCΗΕΣΤΒΕΝΟΤΟ ΖΔΡΑΒΕ Ι ΖΙΒΟΤΝΟΒΥΔΣΤΒΟΤΟ Β ΒΥΛΓΑΡΙΑ. ΝΑCΤΟΥCΗΟΤΟ ΠΡΟΕΚΤΟ-ΠΡΕΔΛΟΓΗΝΕ ΙΜΑ ΖΑ CΕΛ ΔΑ ΟΠΡΕΔΕΛΙ Ι ΟΧΑΡΑΚΤΕΡΙΣΥΡΑ ΡΑΖΠΡΟCΤΡΑΝΕΙΝΕΤΟ ΝΑ AMP Β ΧΕΤΥΡΙ ΣΒΙΝΕΒΥΔΝΙ ΚΟΜΠΛΕΚΣΑ ΝΑ ΤΕΡΙΤΟΡΥΑΤΑ ΝΑ ΒΥΛΓΑΡΙΑ ΠΟ ΟΤΝΟCΗΕΝΕ ΝΑ ΧΡΑΝΙΤΕΛΝΙΤΕ ΠΑΤΟΓΕΝΙ ΟΤ ΡΟΔΟΒΕ SALMONELLA Ι YERSINIA, ΚΑΚΤΟ Ι ΒΙΔ ESCHERICHIA COLI ΟΤ ΣΒΙΝΣΚΙ ΦΕCΕC, ΛΑΓΥΝΙ, ΟΤΠΑΔΝΙ ΒΟΔΙ Ι ΠΟΧΥΙ, ΝΑΧΟΔΥΑCΙ ΣΕ Β ΒΛΙΣΟCΤ ΔΟ ΦΕΡΜΙΤΕ, ΚΑΚΤΟ Ι ΔΑ ΔΑΔΕ ΠΡΕΔΣΑΒΑ ΖΑ ΓΕΝΕΡΙΡΑΝΕΤΟ Ι ΤΡΑΝΣΦΕΡΑ ΝΑ ΓΕΝΕΤΙΧΝΙΤΕ ΔΕΤΕΡΜΙΝΑΝΤΙ ΖΑ AMP. ΡΕΣΥΛΤΑΤΙΤΕ CΥΕ ΒΥΔΑΤ ΟΤ ΙΝΤΕΡΕC ΖΑ ΒΥΛΓΑΡΣΚΑ ΑΓΕΝCΥΑ ΠΟ ΒΕΖΟΠΑΣΧΝΟCΗ ΝΑ ΧΡΑΝΙΤΕ (ΒΑΒΧ), CΕΝΤΥΡ ΖΑ ΟCΕΝΚΑ ΝΑ ΡΙCΚΑ ΠΟ ΧΡΑΝΙΤΕΛΝΑΤΑ ΒΕΡΙΓΑ (CΟΡΧΥΒ), EFSA, ECDC Ι ΔΡ. ΣΤΡΑΝΙ Ι ΟΡΓΑΝΙΣΑΤΙΟΝ, ΚΥΔΕΤΟ AMP ΝΑ ΤΕΣΙ ΧΡΑΝΙΤΕΛΝΙ ΠΑΤΟΓΕΝΙ ΣΕ ΜΟΝΙΤΟΡΥΡΑ ΕΥΕΓΟΔΝΟ. CΥΕ ΒΥΔΕ ΟΠΡΕΔΕΛΕΝ ΠΡΟΦΙΛΥΤ ΝΑ AMP ΣΡΕΔ ΙΣΟΛΥΡΑΝΙΤΕ ΒΑΚΤΕΡΙΟΝ, ΣΤΕΠΕΝΤΑ ΝΑ ΡΑΖΠΡΟCΤΡΑΝΕΙΝΕ ΝΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΧΝΑ ΟCΤΟΙΧΙΒΟCΗ Ι ΠΟΤΕΝCΙΑΛΝΥΑ ΓΕΝΕΝ ΤΡΑΝΣΦΕΡ ΧΡΕΖ ΜΟΛΕΚΥΛΑΡΝΟ ΕΠΙΔΕΜΙΟΛΟΓΙΧΝΙ ΙΝΣΤΡΥΜΕΝΤΙ, ΖΑ ΔΑ ΣΕ ΔΑΔΕ ΒΥΖΜΟCΗΟCΗ ΖΑ ΦΙΛΟΓΕΝΕΤΙΧΕΝ ΑΝΑΛΥCΗ ΝΑ ΓΕΝΙΤΕ ΝΑ ΡΕΖΙCΤΕΝΤΝΟCΗ Ι ΡΑΖΚΡΥΒΑΝΕ ΝΑ ΝΑΧΙΝΑ ΝΑ ΤΥΑΧΝΟΤΟ ΡΑΖΒΙΤΕΙΕ Ι ΡΑΖΠΡΟCΤΡΑΝΕΙΝΕ. ΤΟΒΑ CΥΕ ΔΟΠΡΙΝΕCΕ ΖΑ ΡΑΖΒΟΤΒΑΝΕ ΝΑ ΕΦΕΚΤΙΒΝΥΑ ΜΕΡΚΥ ΖΑ ΟΓΡΑΝΙΧΑΒΑΝΕ Ι ΚΟΝΤΡΟΛ ΒΥΡΥ ΠΡΙΛΑΓΑΝΕΤΟ ΝΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙCΙ, ΚΟΕΤΟ Ε ΟCΗΟΒΝΑ ΤΟΧΚΑ ΟΤ ΠΛΑΝΑ ΖΑ ΔΕΥΣΤΕΙΕ ΝΑ CΥΟ ΣΡΕCΗΥ AMP, ΙΜΑCΗ ΖΑ CΕΛ ΔΑ ΖΑΒΑΒΥ ΠΟΥΑΤΑ Ι ΡΑΖΠΡΟCΤΡΑΝΕΙΝΕΤΟ ΝΑ ΡΕΖΙCΤΕΝΤΝΙ ΠΑΤΟΓΕΝΙ ΜΕΥΔΥ ΖΙΒΟΤΝΙΤΕ Ι ΟΚΟΛΝΑΤΑ ΣΡΕΔΑ.



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



ФОНД
НАУЧНИ
ИЗСЛЕДВАНИЯ
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА



ХИПОТЕЗА И ЦЕЛ НА ПРОЕКТА:

AMP е следствие от широкото използване на антибиотици в хуманната и ветеринарната медицина на повече от 60 години. Съобщава се, че броят на смъртните случаи, причинени от AMP, ще нарасне от 700 000 през 2014 г. на 10 милиона през 2050 г. Различни фракции от животински отпадъци, като свински тор или отпадъчни води, се прилагат рутинно за наторяване на земеделска земя в много страни. Тези отпадъци обаче са се превърнали в резервоар на AMP, тъй като съдържат различни видове бактерии и техни гени за антибиотична резистентност (GAR), които се освобождават в земеделските почви чрез торене на дълбочина от 20-30 до 40-60 см.



Фигура 1. Общо представяне на значимостта на разработваната тема (HE ET AL., 2019)

РЕЗИСТЕНТНИТЕ БАКТЕРИИ И ТЕХНИТЕ ГЕНЕТИЧНИ ДЕТЕРМИНАНТИ МОГАТ ДА СЕ РАЗПРОСТРАНЯВАТ И ОБМЕНЯТ ПО РАЗЛИЧНИ НАЧИНИ. МОЛЕКУЛЯРНАТА БАЗА НА АНТИБИОТИЧНАТА РЕЗИСТЕНТНОСТ ВКЛЮЧВА ГЕНЕТИЧНИ ЕЛЕМЕНТИ КАТО ПЛАЗМИДИ, ТРАНСПОЗОНИ, ИНТЕГРОНИ, ГЕНЕТИЧНИ ОСТРОВИ И ДР., КОИТО СА РАЗПОЛОЖЕНИ В БАКТЕРИАЛНИЯ ГЕНОМ. АКО БАКТЕРИИ, КОИТО СА НОСИТЕЛИ НА ТАКИВА ЕЛЕМЕНТИ ВЛЯЗАТ В КОНТАКТ С ДРУГИ, ТЕ ОБМЕНЯТ ГЕНЕТИЧНИ ДЕТЕРМИНАНТИ НА РЕЗИСТЕНТНОСТ ПОМЕЖДУ СИ ЧРЕЗ Т. НАР. ХОРИЗОНТАЛЕН ГЕНЕН ТРАНСФЕР (PRESCOTT, 2014). ПЪТЯТ НА РАЗПРОСТРАНЕНИЕ ЧРЕЗ ТРАНСПОЗОНИ И ПЛАЗМИДИ МЕЖДУ ПАТОГЕННИ И НЕПАТОГЕННИ БАКТЕРИИ В ОКОЛНАТА СРЕДА, ВКЛ. GAR, Е НАЙ-ЧЕСТО СРЕЩАНИЯТ ПО ХРАНИТЕЛНАТА ВЕРИГА И НАЙ-ВАЖЕН ЗА ТРАНСМИСИЯТА НА ГЕНЕТИЧНА ВАРИАБИЛНОСТ (GARNER ET AL., 2017; YU ET AL., 2016). В БЪЛГАРИЯ НЯМА ДАННИ ЗА ПРОВЕДЕН МОНИТОРИНГ ЗА НАЛИЧИЕ НА РЕЗИСТЕНТНИ БАКТЕРИИ ПРИ СВИНЕТЕ И РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА GAR В ЛАГУНАТА. ЛИПСВА И ИНФОРМАЦИЯ ЗА СПОСОБНОСТТА НА ПАТОГЕНИТЕ, ПРЕНАСЯНИ ОТ ХРАНИТЕ, ДА ОБРАЗОВАТ БИОФИЛМИ КАТО УНИКАЛЕН МЕХАНИЗЪМ ЗА ПРЕОДОЛЯВАНЕ НА ВРЕДНИТЕ ФАКТОРИ НА ОКОЛНАТА СРЕДА И ЗАПАЗВАНЕ НА AMP.



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



РАБОТЕН ПАКЕТ 1: ЗООНОЗНИ ПАТОГЕНИ В СВИНСКИ ФЕЦЕСИ И НАЛИЧИЕ НА ГЕНИ НА РЕЗИСТЕНТНОСТ

РЪКОВОДИТЕЛ НА РАБОТНИЯ ПАКЕТ: Чл.-кор. ХРИСТО МИЛАДИНОВ НАЙДЕНСКИ, ДВМН

УЧАСТНИЦИ В ИЗПЪЛНЕНИЕТО НА ДЕЙНОСТИТЕ ПО РАБОТНИЯ ПАКЕТ:

Доц. ВЕСЕЛИН КЪСОВСКИ, ДМ

доц. МАЯ МАРГАРИТОВА ЗАХАРИЕВА, ДФ

Гл. Ас. ЛЮДМИЛА ЛЮДМИЛОВА ДИМИТРОВА, ДМ

Ас. ЯНА ЕМИЛОВА ИЛИЕВА, ДФ

ДОКТОРАНТ МАЯ ЛАЗАР АНГЕЛОВСКА

МИКРОБИОЛОГ И СПЕЦИАЛИСТ ИВА ВАСИЛЕВА ЦВЕТКОВА

ДЕЙНОСТ 1.1 ИЗОЛИРАНЕ, БИОХИМИЧНА ИДЕНТИФИКАЦИЯ И СЕРОЛОГИЯ НА *SALMONELLA* SPP., *E. COLI* И *YERSINIA* SPP. ОТ СВИНСКИ ФЕЦЕСИ

ИЗОЛАТИ ОТ ТРИТЕ БАКТЕРИАЛНИ ВИДА ЩЕ БЪДАТ ТЪРСЕНИ В СВИНСКИ ФЕЦЕСИ ОТ ЧЕТИРИ РАЗЛИЧНИ СВИНЕФЕРМИ НА ТЕРИТОРИЯТА НА БЪЛГАРИЯ. ИДЕНТИФИКАЦИЯТА ЩЕ БЪДЕ ПРОВЕДЕНА СЪГЛАСНО СЛЕДНИТЕ МЕЖДУНАРОДНИ СТАНДАРТИ: ISO-6579:2002 ЗА *SALMONELLA* SPP., ISO-16654:2001 ЗА *E. COLI* И ISO 10273:2017 ЗА *Y. ENTEROCOLITICA*. БИОХИМИЧНОТО ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ЩАМОВЕТЕ ЩЕ БЪДЕ НАПРАВЕНО С АПАРАТ BD PHOENIX M50, А ИДЕНТИФИКАЦИЯТА – С API20E. ИЗОЛАТИТЕ С БИОХИМИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, ТИПИЧНА ЗА ТЪРСЕНИТЕ ТРИ ВИДА ЩЕ БЪДАТ ИЗСЛЕДВАНИ ПО-НАТАТЪК С МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧНИ МЕТОДИ ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА 16S rRNA И СПЕЦИФИЧНИ ГЕНИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ (ВЖ. ДЕЙНОСТ 1.2). ПАРАЛЕЛНО С ТОВА ЩЕ БЪДЕ ПРОВЕДЕНО СЕРОТИПИРАНЕ НА ИЗОЛАТИТЕ С КЛАСИЧЕСКИ МЕТОДИ ЗА АГЛУТИНАЦИЯ БАЗИРАНИ НА ИЗПОЛЗВАНЕТО НА СТАНДАРТНИ СЕРУМИ.

ДЕЙНОСТ 1.2 ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА ИЗОЛАТИТЕ, СЕЛЕКТИРАНИ В ДЕЙНОСТ 1.1, С МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧНИ ДЕЙНОСТИ

ИДЕНТИФИКАЦИЯТА НА 16S rRNA ГЕНИТЕ ЩЕ СЕ ПРОВЕДЕ С КЛАСИЧЕСКА PCR РЕАКЦИЯ И СЕКВЕНИРАНЕ НА ТОЗИ ДНК УЧАСТЪК. СЛЕД ТОВА В ИЗОЛАТИТЕ, ПОЛОЖИТЕЛНИ ЗА 16S rRNA НА СЪОТВЕТНИЯ ВИД, ЩЕ СЕ ТЪРСЯТ СПЕЦИФИЧНИ ЗА ВИДА ГЕНИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ С ПРАЙМЕРИ, УТВЪРДЕНИ В МЕЖДУНАРОДНИ ЛАБОРАТОРНИ PCR ПРОТОКОЛИ. ПО ВРЕМЕ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО ЩЕ СЕ ТЕСТВАТ И НОВИ ПРАЙМЕРИ, ПУБЛИКУВАНИ НАСКОРО В НАУЧНАТА ЛИТЕРАТУРА. ВИДОВАТА ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЩЕ БЪДЕ ПОТВЪРДЕНА С LAMP МЕТОДА. LAMP ПРОТОКОЛ ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА *Y. ENTEROCOLITICA* (ПО ГЕН rPOF) ВЪВ СВИНСКИ ФЕЦЕСИ Е ВЕЧЕ УСПЕШНО ВЪВЕДЕН В ЛАБОРАТОРИЯТА ПО ЗООНОЗИ И ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ. В ХОДА НА ПРОЕКТА ЩЕ СЕ ТЕСТВАТ ПРАЙМЕРИ И ПРОТОКОЛИ ОТ НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И ISO/TS 18867:2015 ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА ДРУГИ *YERSINIA* ВИДОВЕ (НАПР. *Y. PSEUDOTUBERCULOSIS*), *E. COLI* И *SALMONELLA* SPP. С ВЪВЕЖДАНЕ НА LAMP ПРОТОКОЛИ. ПАТОГЕННИЯТ ПОТЕНЦИАЛ НА ИЗОЛАТИТЕ ОТ РОД *YERSINIA* ЩЕ БЪДЕ ОПРЕДЕЛЕН ЧРЕЗ ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА СПЕЦИФИЧНИ ГЕНИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ КАТО *AIL* И *virF*, РАЗПОЛОЖЕНИ В ХРОМОЗОМНАТА ДНК ИЛИ ПЛАЗМИДА rYV. ОТНОСНО *SALMONELLA* SPP., В ДНК ПРОБИТЕ ЩЕ БЪДАТ ТЪРСЕНИ ГЕНИ, ОТГОВОРНИ ЗА ПРОИЗВОДСТВОТО НА ЕНТЕРОТОКСИН (*STN*) И ЗА ИНВАЗИВНИЯ ПОТЕНЦИАЛ (*INVA*), А В ИЗОЛАТИ ОТ ВИДА *E. COLI* ЩЕ БЪДАТ ТЪРСЕНИ ГЕНИ, ДОКАЗВАЩИ НАЛИЧИЕТО НА ЕТЕС (*STa*, *STb*), ЕРЕС (*eae*) ИЛИ STEC/VTEC (*stx1*, *stx2*). ДНК, ИЗОЛИРАНА ОТ ФЕЦЕС, ЩЕ



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



БЪДЕ ДОСТАВЯНА НА НАЦИОНАЛНАТА РЕФЕРЕНТНА ЛАБОРАТОРИЯ ЗА КЛАСИЧЕСКА И АФРИКАНСКА ЧУМА (НДНИВМИ, София).

ДЕЙНОСТ 1.3 Изследване на изолатите, избрани в дейност 1.2 за антимикробна резистентност

Всички изолати от дейност 1.2 ще бъдат изследвани за АМР със стандартни микробиологични методи като диск-дифузионен тест и метода на микротитруването. Изолатите с доказана резистентност ще бъдат изследвани с PCR за идентифициране на гени на резистентност (изброени в раздел 3.1. Изследователска методи и техники) с праймери от международни утвърдени протоколи и научни публикации. Резистентните изолати ще бъдат тествани за тяхната способност да образуват биофилм с методите, изброени в раздел 3.1 от проектното предложение.

РАБОТЕН ПАКЕТ 2: Зоонозни патогени в лагуни на свинеферми и гени на резистентност

Ръководител на работния пакет: Доц. д-р Веселин Късовски, ДМ

Участници в изпълнението на дейностите по работния пакет:

Чл.-кор. проф. Христо Найденски, ДВМН

доц. Мая Маргаритова Захариева, ДФ

гл. ас. Людмила Людмила Димитрова, ДМ

ас. Яна Емилова Илиева, ДФ

Докторант Мая Лазар Ангеловска

Микробиолог специалист Ива Василева, Цветкова

DR. VIVI MIRIAGOU, PhD (Институт Пастър, Гърция) - консултант

DR. STATHIS KOTSAKIS, PhD (Институт Пастър, Гърция) - консултант

ДЕЙНОСТ 2.1 Изолиране на *SALMONELLA* spp., *E. COLI* и *YERSINIA* spp. от лагуни в свинеферми

Изолати от трите бактериални вида ще бъдат търсени в проби от лагуни в четири различни свинеферми на територията на България. Идентификацията и броя бактериални колонии ще бъдат направени съгласно следните международно утвърдени стандарти: ISO-6579:2002 за *SALMONELLA* spp., ISO-16654:2001 за *E. COLI* и ISO 10273:2017 за *Y. ENTEROCOLITICA*. Биохимичната характеристика на изолатите ще бъде проведена на апарат BD PHOENIX M50, а идентификацията – с API20E. Изолатите с биохимични характеристики, типични за търсените бактериални видове ще бъдат обработени по-нататък с молекулярно-биологични методи за идентификация на 16S rRNA и специфични гени на вирулентност. В допълнение, изолатите ще бъдат серотипирани с помощта на стандартни методи за аглутинация.

ДЕЙНОСТ 2.2 Идентификация на изолатите, селектирани в дейност 2.1, с молекулярно-биологични дейности

Идентификацията на 16S rRNA гените ще се проведе с класическа PCR реакция и секвениране на този ДНК участък. След това в изолатите, положителни за 16S rRNA на съответния вид, ще се търсят



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



СПЕЦИФИЧНИ ЗА ВИДА ГЕНИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ С ПРАЙМЕРИ, УТВЪРДЕНИ В МЕЖДУНАРОДНИ ЛАБОРАТОРНИ PCR ПРОТОКОЛИ. ПО ВРЕМЕ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО ЩЕ СЕ ТЕСТВАТ И НОВИ ПРАЙМЕРИ, ПУБЛИКУВАНИ НАСКОРО В НАУЧНАТА ЛИТЕРАТУРА. ВИДОВАТА ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЩЕ БЪДЕ ПОТВЪРДЕНА С LAMP МЕТОДА. LAMP ПРОТОКОЛ ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА *Y. ENTEROCOLITICA* (ПО ГЕН *ϕNP*) ВЪВ СВИНСКИ ФЕЦЕСИ Е ВЕЧЕ УСПЕШНО ВЪВЕДЕН В ЛАБОРАТОРИЯТА ПО ЗООНОЗИ И ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ. В ХОДА НА ПРОЕКТА ЩЕ СЕ ТЕСТВАТ ПРАЙМЕРИ И ПРОТОКОЛИ ОТ НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И ISO/TS 18867:2015 ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА ДРУГИ *YERSINIA* ВИДОВЕ (НАПР. *Y. PSEUDOTUBERCULOSIS*), КАКТО И ЗА *E. COLI* И *SALMONELLA SPP.* С ВЪВЕЖДАНЕ НА LAMP ПРОТКОЛИ. ПАТОГЕННИЯТ ПОТЕНЦИАЛ НА ИЗОЛАТИТЕ ОТ РОД *YERSINIA* ЩЕ БЪДЕ ОПРЕДЕЛЕН ЧРЕЗ ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА СПЕЦИФИЧНИ ГЕНИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ КАТО *ail* И *virF*, РАЗПОЛОЖЕНИ В ХРОМОЗОМНАТА ДНК ИЛИ ПЛАЗМИДА *pYV*. ОТНОСНО *SALMONELLA SPP.*, В ДНК ПРОБИТЕ ЩЕ БЪДАТ ТЪРСЕНИ ГЕНИ, ОТГОВОРНИ ЗА ПРОИЗВОДСТВОТО НА ЕНТЕРОТОКСИН (*stn*) И ЗА ИНВАЗИВНИЯ ПОТЕНЦИАЛ (*invA*), А В ИЗОЛАТИ ОТ ВИДА *E. COLI* ЩЕ БЪДАТ ТЪРСЕНИ ГЕНИ, ДОКАЗВАЩИ НАЛИЧИЕТО НА ЕТЕС (*stA*, *stB*), ЕРЕС (*eae*) ИЛИ STEC/VTEC (*stx1*, *stx2*). ДНК-ПРОБИ, ИЗОЛИРАНИ ОТ ЛАГУНИТЕ, ЩЕ БЪДЕ ДОСТАВЯНИ НА НАЦИОНАЛНАТА РЕФЕРЕНТНА ЛАБОРАТОРИЯ ЗА КЛАСИЧЕСКА И АФРИКАНСКА ЧУМА (НДНИВМИ, СОФИЯ).

ДЕЙНОСТ 2.3 ИЗСЛЕДВАНЕ НА ИЗОЛАТИТЕ, ИЗБРАНИ В ДЕЙНОСТ 2.2 ЗА АНТИМИКРОБНА РЕЗИСТЕНТНОСТ

ВСИЧКИ ИЗОЛАТИ ОТ ДЕЙНОСТ 2.2 ЩЕ БЪДАТ ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА AMP СЪС СТАНДАРТНИ МИКРОБИОЛОГИЧНИ МЕТОДИ КАТО ДИСК-ДИФУЗИОНЕН ТЕСТ И МЕТОДА НА МИКРОТИТРУВАНЕТО. ИЗОЛАТИТЕ С ДОКАЗАНА РЕЗИСТЕНТНОСТ ЩЕ БЪДАТ ИЗСЛЕДВАНЕ С PCR ЗА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ГЕНИ НА РЕЗИСТЕНТНОСТ (ИЗБРОЕНИ В РАЗДЕЛ 3.1. ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКА МЕТОДИ И ТЕХНИКИ) С ПРАЙМЕРИ ОТ МЕЖДУНАРОДНИ УТВЪРДЕНИ ПРОТОКОЛИ И НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ.

РАБОТЕН ПАКЕТ 3: ЗООНОЗНИ ПАТОГЕНИ В ПОЧВИ ОКОЛО СВИНЕФЕРМИ, ГЕНИ НА РЕЗИСТЕНТНОСТ И АНТИБИОТИЧНИ ОСТАТЪЦИ

РЪКОВОДИТЕЛ НА РАБОТНИЯ ПАКЕТ: гл. ас. д-р Людмила Людмилова Димитрова, дм

УЧАСТНИЦИ В ИЗПЪЛНЕНИЕТО НА ДЕЙНОСТИТЕ ПО РАБОТНИЯ ПАКЕТ:

Чл.-кор. проф. Христо Найденски, двмн

Доц. Веселин Късовски, дм

доц. Мая Маргаритова Захариева, дф

ас. Яна Емилова Илиева, дф

ДОКТОРАНТ Мая Лазар Ангеловска

МИКРОБИОЛОГ СПЕЦИАЛИСТ ИВА ВАСИЛЕВА ЦВЕТКОВА

Проф. д-р Marc Heyndrickx, PhD (ILVO, Белгия) - консултант

д-р Geertrui Rasschaert, PhD (ILVO, Белгия) - консултант

д-р Els Daeseleire, PhD (ILVO, Белгия) - консултант

д-р Vivi Miriagou, PhD (Институт Пастьор, Гърция) - консултант

д-р Stathis Kotsakis, PhD (Институт Пастьор, Гърция) - консултант



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



ФОНД
НАУЧНИ
ИЗСЛЕДВАНИЯ
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА



Дейност 3.1 Изоліране на *SALMONELLA* spp., *E. COLI* и *YERSINIA* spp. от почви

Изолати от трите бактериални вида ще бъдат търсени в проби от почви около четири различни свинеферми на територията на България. Идентификацията и броя бактериални колонии ще бъдат направени съгласно следните международно утвърдени стандарти: ISO-6579:2002 за *SALMONELLA* spp., ISO-16654:2001 за *E. COLI* и ISO 10273:2017 за *Y. ENTEROCOLITICA*. Биохимичната характеристика на изолатите ще бъде проведена на апарат BD Phoenix M50, а идентификацията – с API20E. Изолатите с биохимични характеристики, типични за търсените бактериални видове ще бъдат обработени по-нататък с молекулярно-биологични методи за идентификация на 16S rRNA и специфични гени на вирулентност. В допълнение, изолатите ще бъдат серотипирани с помощта на стандартни методи за аглутинация.

Дейност 3.2 Идентификация на изолатите, селектирани в дейност 3.1, с молекулярно-биологични дейности

Идентификацията на 16S rRNA гените ще се проведе с класическа PCR реакция и секвениране на този ДНК участък. След това в изолатите, положителни за 16S rRNA на съответния вид, ще се търсят специфични за вида гени на вирулентност с праймери, утвърдени в международни лабораторни PCR протоколи. По време на изследването ще се тестват и нови праймери, публикувани наскоро в научната литература. Видовата идентификация ще бъде потвърдена с LAMP метода. LAMP протокол за идентификация на *Y. ENTEROCOLITICA* (по ген rNOR) във свински фецеси е вече успешно въведен в Лабораторията по зоонози и фактори на вирулентност. В хода на проекта ще се тестват праймери и протоколи от научни публикации за идентификация на други *YERSINIA* видове (напр. *Y. PSEUDOTUBERCULOSIS*), както и за *E. COLI* и *SALMONELLA* spp. с въвеждане на LAMP протоколи. Патогенният потенциал на изолатите от род *YERSINIA* ще бъде определен чрез идентификация на специфични гени на вирулентност като *AIL* и *virF*, разположени в хромозомната ДНК или плазмиди rYV. Относно *SALMONELLA* spp., в ДНК пробите ще бъдат търсени гени, отговорни за производството на ентеротоксин (*STN*) и за инвазивния потенциал (*invA*), а в изолати от вида *E. COLI* ще бъдат търсени гени, доказващи наличието на ETEC (*STa*, *STb*), EPEC (*eae*) или STEC/VTEC (*stx1*, *stx2*). ДНК, изолирана от фецес, ще бъде доставяна на Националната референтна лаборатория за класическа и африканска чума (НДНВМИ, София).

Дейност 3.3 Изследване на изолатите, избрани в дейност 2.2 за антимикробна резистентност

Всички изолати от дейност 3.2 ще бъдат изследвани за АМР със стандартни микробиологични методи като диск-дифузионен тест и метода на микротитруването. Изолатите с доказана резистентност ще бъдат изследвани с PCR за идентифициране на гени на резистентност (изброени в раздел 3.1. Изследователски методи и техники) с праймери от международни утвърдени протоколи и научни публикации.

Дейност 3.4 Изследване за наличие на антибиотични остатъци в почви, в близост до свинеферми

За тази цел ще бъдат използвани аналитични методи, като напр. LC-MS/MS. Тази дейност ще бъде извършена в тясна колаборация с института ILVO в Меле, Белгия: обработените проби ще бъдат изпращани там за анализ в тяхната техническа база.



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



РАБОТЕН ПАКЕТ 4: ЗООНОЗНИ ПАТОГЕНИ В ОТПАДНИ ВОДИ В БЛИЗОСТ ДО СВИНЕФЕРМИ И ТЕХНИТЕ ГЕНИ ЗА РЕЗИСТЕНТНОСТ

РЪКОВОДИТЕЛ НА РАБОТНИЯ ПАКЕТ: Гл. ас. Звездимира Георгиева Цветанова, дб

УЧАСТНИЦИ В ИЗПЪЛНЕНИЕТО НА ДЕЙНОСТИТЕ ПО РАБОТНИЯ ПАКЕТ:

Чл.-кор. проф. Христо Найденски, двмн

Доц. Веселин Късовски, дм

доц. Мая Маргаритова Захариева, дф

гл. ас. Людмила Людмилова Димитрова, дм

ас. Яна Емилова Илиева, дф

Докторант Мая Лазар Ангеловска

Микробиолог специалист Ива Василева, Цветкова

д-р VIVI MIRIAGOY, PhD (Институт Пастьор, Гърция) - консултант

д-р STATHIS KOTSAKIS, PhD (Институт Пастьор, Гърция) - консултант

Дейност 4.1 Изолитране на *SALMONELLA* spp., *E. COLI* и *YERSINIA* spp. от отпадни води от свинеферми

Изолати от трите бактериални вида ще бъдат търсени в проби от отпадни води в близост до четири различни свинеферми на територията на България. Идентификацията и броя бактериални колонии ще бъдат направени съгласно следните международно утвърдени стандарти: ISO-6579:2002 за *SALMONELLA* spp., ISO-16654:2001 за *E. COLI* и ISO 10273:2017 за *Y. ENTEROCOLITICA*. Биохимичната характеристика на изолатите ще бъде проведена на апарат BD PHOENIX M50, а идентификацията – с API20E. Изолатите с биохимични характеристики, типични за търсените бактериални видове ще бъдат обработени по-нататък с молекулярно-биологични методи за идентификация на 16S rRNA и специфични гени на вирулентност. В допълнение, изолатите ще бъдат серотипирани с помощта на стандартни методи за аглутинация.

Дейност 4.2 Идентификация на изолатите, селектирани в дейност 4.1, с молекулярно-биологични дейности

Идентификацията на 16S rRNA гените ще се проведе с класическа PCR реакция и секвениране на този ДНК участък. След това в изолатите, положителни за 16S rRNA на съответния вид, ще се търсят специфични за вида гени на вирулентност с праймери, утвърдени в международни лабораторни PCR протоколи. По време на изследването ще се тестват и нови праймери, публикувани наскоро в научната литература. Видовата идентификация ще бъде потвърдена с LAMP метода. LAMP протокол за идентификация на *Y. ENTEROCOLITICA* (по ген rNOR) във свински фецеси е вече успешно въведен в лабораторията по зоонози и фактори на вирулентност. В хода на проекта ще се тестват праймери и протоколи от научни публикации за идентификация на други *YERSINIA* видове (напр. *Y. PSEUDOTUBERCULOSIS*), както и за *E. COLI* и *SALMONELLA* spp. с въвеждане на LAMP протоколи. Патогенният потенциал на изолатите от род *YERSINIA* ще бъде определен чрез идентификация на специфични гени на вирулентност като *ail* и *virF*, разположени в хромозомната ДНК или плазмиди rYV. Относно



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



ФОНД НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА



SALMONELLA spp., в ДНК пробите ще бъдат търсени гени, отговорни за производството на ентеротоксин (*STN*) и за инвазивния потенциал (*INV*A), а в изолати от вида *E. coli* ще бъдат търсени гени, доказващи наличието на ЕТЕС (*ST*A, *ST*B), ЕРЕС (*EA*E) или STEC/VTEC (*ST*X1, *ST*X2). ДНК, изолирана от фецес, ще бъде доставяна на Националната Референтна Лаборатория за Класическа и Африканска Чума (НДНВМИ, София).

Дейност 4.3 Изследване на изолатите, избрани в дейност 4.2 за антимикробна резистентност

Всички изолати от дейност 4.2 ще бъдат изследвани за АМР със стандартни микробиологични методи като диск-дифузионен тест и метода на микротитруването. Изолатите с доказана резистентност ще бъдат изследвани с PCR за идентифициране на гени на резистентност (изброени в раздел 3.1. Изследователска методи и техники) с праймери от международни утвърдени протоколи и научни публикации. Резистентните изолати ще бъдат тествани за тяхната способност да образуват биофилм с методите, изброени в раздел 3.1 от проектното предложение.

ПОДХОДИ ЗА ПОСТИГАНЕ НА ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИТЕ ЦЕЛИ:



ФИГУРА 2. Илюстративно изображение на приложените подходи за постигане на крайните цели в проекта



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



ОЧАКВАНИ РЕЗУЛТАТИ ПРЕЗ ЕТАП 1

В РЕЗУЛТАТ ОТ ИЗПЪЛНЕНИЕТО НА ПРОЕКТА СЕ ОЧАКВА ДА БЪДАТ ИЗОЛИРАНИ ЩАМОВЕ ОТ *SALMONELLA SP.*, *E. COLI* И *Y. ENTEROCOLITICA*. Те ще бъдат търсени в свински фецеси и лагуни, от четири различни свинеферми на територията на България. Идентификацията ще бъде проведена съгласно утвърдени международни ISO стандарти. Биохимичното охарактеризиране на щамовете ще бъде направено с конвенционални биохимични тестове, а тяхната идентификация и видово потвърждаване ще бъде с използването на API20E тест и автоматизираната система BD PHOENIX M50. Изолатите с биохимична характеристика, типична за търсените три вида ще бъдат изследвани и с молекулярно-биологични методи за идентификация на 16S rRNA гена чрез класическа PCR реакция. Допълнително ще се търсят и специфични за вида гени на вирулентност антибиотична резистентност с ПРАЙМЕРИ и протоколи, утвърдени във водещи международни лаборатории. За надеждна, бърза и икономически ефективна видова идентификация ще бъде разработен и LAMP (LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION) метода. В съмнителни случаи за видова принадлежност ще бъде провеждано и секвениране, като този анализ може да се приложи и за изследване наличието на гени на резистентност. Патогенният потенциал на изолатите от род *YERSINIA* ще бъде определен чрез идентификация на специфични гени на вирулентност като *ail* и *virF*, разположени в хромозомната ДНК или плазмидата на вирулентността (pYV). От изолираните щамове от род *SALMONELLA* ще бъде изолирана хромозомна ДНК, а впоследствие в пробите ще бъдат търсени гени, отговорни за синтеза на ентеротоксин (STN) и на белтъци отговорни за инвазивния потенциал (INVA) на бактериите. В изолатите от вида *E. COLI* ще бъдат търсени гени, доказващи наличието на ETEC (STa, STb), EPEC (EAE) или STEC/VTEC (stx1, stx2). Паралелно с това ще бъде проведено серотипиране на изолатите с класически методи за аглутинация базирани на използването на специфични стандартни серуми.

ОЧАКВА СЕ ДА СЕ ПОЛУЧАТ АКТУАЛНИ ДАННИ ЗА СТЕПЕНТА НА РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА АНТИМИКРОБНАТА РЕЗИСТЕНТНОСТ СРЕД ИЗСЛЕДВАНИТЕ ЩАМОВЕ И ГЕОТРАФСКИ РАЙОНИ, В КОИТО СА РАЗПОЛОЖЕНИ СЪОТВЕТНИТЕ СВИНЕФЕРМИ. Използвани ще бъдат, както конвенционални стандартизирани методи (диск-дифузионен тест и метод на микротитруването), така и автоматизираната система BD PHOENIX™ M50. В допълнение към информацията за наличие на антимикробна резистентност и гени, детерминиращи тази резистентност в посочените по-горе хранителни патогени, изолирани от свински фецеси и лагуни, ще бъде определен и потенциала на резистентните бактерии да образуват биофилми.



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



ПОСТИГНАТИ РЕЗУЛТАТИ ПРЕЗ ЕТАП 1

ПРЕЗ ОТЧЕТНИЯ ЕТАП БЯХА СЪБРАНИ ПРОБИ ОТ ФЕЦЕСИ, ЛАГУНИ, ПОЧВИ И ОТПАДНИ ВОДИ ОТ ДВЕ СВИНЕФЕРМИ В ТРИ ЕКСПЕДИЦИИ (ДВЕ ОТ ГР. КОСТИНБРОД ПРЕЗ 2020 Г. И 2021 Г. И ЕДНА ОТ ГР. ВЕЛИКО ТЪРНОВО ПРЕЗ 2021 Г.). С ИЗПОЛЗВАНЕТО НА МЕЖДУНАРОДНО УТВЪРДЕНИ СТАНДАРТНИ ПРОЦЕДУРИ СА ПОЛУЧЕНИ ИЗОЛАТИ, СУСПЕКТНИ ЗА РОДОВЕТЕ *SALMONELLA* И *YERSINIA*, КАКТО И ВИДА *ESCHERICHIA COLI*. СУСПЕКТНИТЕ ЗА ТРИТЕ ВИДА КОЛОНИИ БЯХА ПОДЛОЖЕНИ НА РАЗЛИЧНИ БИОХИМИЧНИ И ИМУНОЛОГИЧНИ ТЕСТОВЕ. ИЗОЛАТИТЕ ОТ РОД *SALMONELLA* НЕ ПОКАЗАХА ПОЗИТИВЕН РЕЗУЛТАТ ОТ ПРОВЕДЕНАТА РЕАКЦИЯ АГЛУТИНАЦИЯ ЗА VI-АНТИГЕН И ПРИНАДЛЕЖНОСТ КЪМ НЯКОЯ ОТ СЕРОГРУПИТЕ А-Е. СЕДЕМ ОТ ИЗОЛАТИТЕ СУСПЕКТНИ ЗА *Y. ENTEROCOLITICA* ПОКАЗАХА ХАРАКТЕРНИ БИОХИМИЧНИ ОТНАСЯНИЯ – УРЕАЗА (+), КАТАЛАЗА (+), ОКСИДАЗА И ФЕНИЛАЛАНИН ДЕАМИНАЗА – ОТРИЦАТЕЛНИ, А ДРУГИ ТРИ - ЗА РОД *YERSINIA*. ПРОВЕДЕНАТА ИДЕНТИФИКАЦИЯ С MALDI-TOF MS ПОТВЪРДИ ПРИНАДЛЕЖНОСТТА НА ЧЕТИРИ ЩАМА КЪМ ВИДА *Y. ENTEROCOLITICA* И НА ТРИ ЩАМА *Y. FREDERIKSENII*. ДИРЕКТНАТА ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА ПАТОГЕННИ ЙЕРСИНИИ В ПРОБИ ОТ ФЕЦЕСИ БЕ ИЗВЪРШЕНА ЧРЕЗ ДИГИТАЛЕН КАПКОВ PCR (ddPCR). ЕДНА ОТ ПРОБИТЕ БЕ ПОЛОЖИТЕЛНА ЗА *Y. ENTEROCOLITICA* И *Y. PSEUDOTUBERCULOSIS*, КАТО КОЛИЧЕСТВЕНОТО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА БРОЯ НА ГЕНОМНИТЕ КОПИЯ ДОКАЗА 9×10^4 /G, РЕСПЕКТИВНО 4×10^4 /G ФЕЦЕС. ПОЛОЖИТЕЛНИТЕ ЗА ИНДОЛ ИЗОЛАТИ НА *E. COLI* БЯХА БИОХИМИЧНО ОХАРАКТЕРИЗИРАНИ И ПОСЛЕДВАЩО ИДЕНТИФИЦИРАНИ С АВТОМАТИЧНАТА СИСТЕМА BD PHOENIX™ M50, А ЧАСТ ОТ ТЯХ СА ИДЕНТИФИЦИРАНИ С MALDI-TOF MS. ОТ ВСИЧКИТЕ 65 ИЗОЛАТА СУСПЕКТНИ ЗА *E. COLI* ОТ ФЕЦЕСИ, ЛАГУНИ, ПОЧВИ И ОТПАДНИ ВОДИ, 48 СА ИДЕНТИФИЦИРАНИ С MALDI-TOF MS, А 17 С BD PHOENIX™ M50. ЕДИН ОТ ЩАМОВЕТЕ ИЗОЛИРАН ОТ ЛАГУНА Е ПРОДУЦИРАЩ КАРБАПЕНЕМАЗА, КОЕТО ПОТВЪРЖДАВА ХИПОТЕЗАТА ЗА ПРИЛАГАНЕТО НА АНТИБИОТИЦИ В СВИНЕВЪДСТВОТО И РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА АНТИМИКРОБНАТА РЕЗИСТЕНТНОСТ В ОКОЛНАТА СРЕДА.

РЕЗУЛТАТИТЕ, ПОЛУЧЕНИ ОТ ИЗСЛЕДВАНЕТО НА ФЕЦЕСИ С BD PHOENIX M50 ДОКАЗВАТ НАЛИЧИЕТО НА ПЕТ ЩАМА *E. COLI*, КОИТО СА РЕЗИСТЕНТНИ КЪМ АМПИЦИЛИН, ЧЕТИРИ КЪМ ТРИМЕТОПРИМ И ДВА КЪМ КОМБИНАЦИЯТА МЕЖДУ ТРИМЕТОПРИМ/СУЛФАМЕТОКСАЗОЛ. ДИСК-ДИФУЗИОННИЯТ ТЕСТ ДОКАЗА РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ АМОКСИЦИЛИН, ТЕТРАЦИКЛИН, ХЛОРАМФЕНИКОЛ, ТРИМЕТОПРИМ/СУЛФАМЕТОКСАЗОЛ И ДОКСИЦИКЛИН ХИДРОХЛОРИД И НАЛИДИКСОВА КИСЕЛИНА. ПРИ ИЗОЛАТИТЕ ОТ ЛАГУНИ, СЕ ДОКАЗВАТ ШЕСТ ЩАМА РЕЗИСТЕНТНИ КЪМ АМПИЦИЛИН, КАТО ЕДИН ОТ ТЯХ СЕ ХАРАКТЕРИЗИРА С МНОЖЕСТВЕНА РЕЗИСТЕНТНОСТ (УСТОЙЧИВ НА ГЕНТАМИЦИН, АМОКСИЦИЛИН/КЛАВУЛАНОВА КИСЕЛИНА, ЦИПРОФЛОКСАЦИН, КОЛИСТИН, ТРИМЕТОПРИМ И ТРИМЕТОПРИМ / СУЛФАМЕТОКСАЗОЛ) (BD PHOENIX™ M50). ПРОУЧВАНИЯТА ВЪРХУ ГЕНИТЕ ЗА АНТИБИОТИЧНА РЕЗИСТЕНТНОСТ ПРИ ЩАМОВЕ *E. COLI* ИЗОЛИРАНИ ОТ ФЕЦЕСИ КЪМ В-ЛАКТАМНИ АНТИБИОТИЦИ (*vlATEM* И *vlASHV*) И *ampC* ГЕН ЗА В-ЛАКТАМАЗА, ДОКАЗВАТ НАЛИЧИЕТО НА ГЕНА *ampC*, ОТГОВАРЕН ЗА СИНТЕЗА НА В-ЛАКТАМАЗА ПРИ ТРИ ИЗОЛАТА ОТ ПРАСЕТА ЗА УГОЯВАНЕ. ПРИ ЩАМОВЕ *E. COLI* ИЗОЛИРАНИ ОТ ЛАГУНИ Е ДОКАЗАНО НАЛИЧИЕТО НА ГЕНИТЕ *vlATEM* И *vlASHV* В ЕДИН ИЗОЛАТ, КОЙТО ОСВЕН С МНОЖЕСТВЕНА РЕЗИСТЕНТНОСТ СЕ ХАРЕКТЕРИЗИРА И С ОБРАЗУВАНЕТО НА СИЛЕН БИОФИЛМ. НАЛИЧИЕТО НА *ampC* ГЕНА ЗА В-ЛАКТАМАЗА Е УСТАНОВЕНО В ЧЕТИРИ ИЗОЛАТА.

СПОСОБНОСТ НА ИЗОЛИРАНИ ЕДИНИЧНИ КОЛОНИИ ОТ ФЕЦЕСИ ДА ФОРМИРАТ БИОФИЛМ СЕ ДОКАЗВА ПРИ ВСИЧКИ ИЗСЛЕДВАНИ ЩАМОВЕ *E. COLI*, ИЗОЛИРАНИ ОТ ФЕЦЕСИ. СИЛНА БИОФИЛМ ОБРАЗУВАЩА АКТИВНОСТ Е УСТАНОВЕНА ПРИ ДВА ЩАМА, УМЕРЕНА АКТИВНОСТ СЪЩО ПРИ ДВА ЩАМА И СЛАБА ПРИ ЧЕТИРИ ЩАМА. ПРИ ОСЕМ ЩАМА *E. COLI* ИЗОЛИРАНИ ОТ ЛАГУНИ, СИЛЕН БИОФИЛМ СЕ НАБЛЮДАВА ПРИ ТРИ ЩАМА, УМЕРЕН БИОФИЛМ ПРИ ЧЕТИРИ И ЕДИН ЩАМ НЕ ОБРАЗУВА БИОФИЛМ.



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



ОЧАКВАНИ РЕЗУЛТАТИ ПРЕЗ ЕТАП II

В РЕЗУЛТАТ ОТ ИЗПЪЛНЕНИЕТО НА ПРОЕКТА СЕ ОЧАКВА ДА БЪДАТ ИЗОЛИРАНИ ЩАМОВЕ ОТ *SALMONELLA SP.*, *E. COLI* И *Y. ENTEROCOLITICA*. Те ще бъдат търсени в свински фецеси и лагуни, от четири различни свинеферми на територията на България. Идентификацията ще бъде проведена съгласно утвърдени международни ISO стандарти. Биохимичното охарактеризиране на щамовете ще бъде направено с конвенционални биохимични тестове, а тяхната идентификация и видово потвърждаване ще бъде с използването на API20E тест и автоматизираната система BD PHOENIX M50. Изолатите с биохимична характеристика, типична за търсените три вида ще бъдат изследвани и с молекулярно-биологични методи за идентификация на 16S rRNA гена чрез класическа PCR реакция. Допълнително ще се търсят и специфични за вида гени на вирулентност антибиотична резистентност с ПРАЙМЕРИ и протоколи, утвърдени във водещи международни лаборатории. За надеждна, бърза и икономически ефективна видова идентификация ще бъде разработен и LAMP (LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION) МЕТОДА.

В СЪМНИТЕЛНИ СЛУЧАИ ЗА ВИДОВА ПРИНАДЛЕЖНОСТ ЩЕ БЪДЕ ПРОВЕЖДАНО И СЕКВЕНИРАНЕ, КАТО ТОЗИ АНАЛИЗ МОЖЕ ДА СЕ ПРИЛОЖИ И ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НАЛИЧИЕТО НА ГЕНИ НА РЕЗИСТЕНТНОСТ. ПАТОГЕННИЯТ ПОТЕНЦИАЛ НА ИЗОЛАТИТЕ ОТ РОД *YERSINIA* ЩЕ БЪДЕ ОПРЕДЕЛЕН ЧРЕЗ ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА СПЕЦИФИЧНИ ГЕНИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ КАТО *ail* И *virF*, РАЗПОЛОЖЕНИ В ХРОМОЗОМНАТА ДНК ИЛИ ПЛАЗМИДА НА ВИРУЛЕНТНОСТТА (*ryv*). ОТ ИЗОЛИРАНИТЕ ЩАМОВЕ ОТ РОД *SALMONELLA* ЩЕ БЪДЕ ИЗОЛИРАНА ХРОМОЗОМНА ДНК, А ВПОСЛЕДСТВИЕ В ПРОБИТЕ ЩЕ БЪДАТ ТЪРСЕНИ ГЕНИ, ОТГОВОРНИ ЗА СИНТЕЗА НА ЕНТЕРОТОКСИН (*STN*) И НА БЕЛТЪЦИ ОТГОВОРНИ ЗА ИНВАЗИВНИЯ ПОТЕНЦИАЛ (*invA*) НА БАКТЕРИИТЕ. В ИЗОЛАТИТЕ ОТ ВИДА *E. COLI* ЩЕ БЪДАТ ТЪРСЕНИ ГЕНИ, ДОКАЗВАЩИ НАЛИЧИЕТО НА ЕТЕС (*STa*, *STb*), ЕРЕС (*eae*) ИЛИ *STEC/VTEC* (*stx1*, *stx2*).

ПАРАЛЕЛНО С ТОВА ЩЕ БЪДЕ ПРОВЕДЕНО СЕРОТИПИРАНЕ НА ИЗОЛАТИТЕ С КЛАСИЧЕСКИ МЕТОДИ ЗА АГЛУТИНАЦИЯ БАЗИРАНИ НА ИЗПОЛЗВАНЕТО НА СПЕЦИФИЧНИ СТАНДАРТНИ СЕРУМИ.

ОЧАКВА СЕ ДА СЕ ПОЛУЧАТ АКТУАЛНИ ДАННИ ЗА СТЕПЕНТА НА РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА АНТИМИКРОБНА РЕЗИСТЕНТНОСТ СРЕД ИЗСЛЕДВАНИТЕ ЩАМОВЕ И ГЕОТРАФСКИ РАЙОНИ, В КОИТО СА РАЗПОЛОЖЕНИ СЪОТВЕТНИТЕ СВИНЕФЕРМИ. ИЗПОЛЗВАНИ ЩЕ БЪДАТ, КАКТО КОНВЕНЦИОНАЛНИ СТАНДАРТИЗИРАНИ МЕТОДИ (ДИСК-ДИФУЗИОНЕН ТЕСТ И МЕТОД НА МИКРОТИТРУВАНЕТО), ТАКА И АВТОМАТИЗИРАНАТА СИСТЕМА BD PHOENIX™ M50. В ДОПЪЛНЕНИЕ КЪМ ИНФОРМАЦИЯТА ЗА НАЛИЧИЕ НА АНТИМИКРОБНА РЕЗИСТЕНТНОСТ И ГЕНИ, ДЕТЕРМИНИРАЩИ ТАЗИ РЕЗИСТЕНТНОСТ В ПОСОЧЕНИТЕ ПО-ГОРЕ ХРАНИТЕЛНИ ПАТОГЕНИ, ИЗОЛИРАНИ ОТ СВИНСКИ ФЕЦЕСИ И ЛАГУНИ, ЩЕ БЪДЕ ОПРЕДЕЛЕН И ПОТЕНЦИАЛА НА РЕЗИСТЕНТНИТЕ БАКТЕРИИ ДА ОБРАЗУВАТ БИОФИЛМИ.



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE

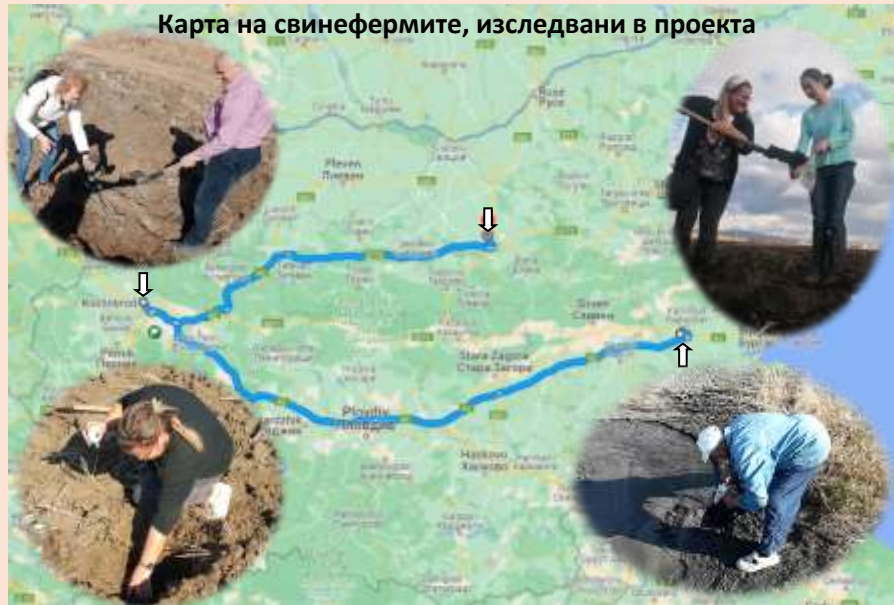


ФОНД
НАУЧНИ
ИЗСЛЕДВАНИЯ
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА



ПОСТИГНАТИ РЕЗУЛТАТИ ПРЕЗ ЕТАП II

ПРЕЗ ОТЧЕТНИЯ ЕТАП БЯХА СЪБРАНИ ПРОБИ ОТ ФЕЦЕСИ, ЛАГУНИ, ПОЧВИ И ОТПАДНИ ВОДИ ОТ СВИНЕФЕРМА КРАЙ ГР. КАРНОБАТ И ПОЧВИ ОТ СВИНЕФЕРМА КРАЙ ГР. КОСТИНБРОД (ТРЕТА ЕКСПЕДИЦИЯ). ПРОДЪЛЖИ РАБОТАТА С ПОЛУЧЕНИТЕ ИЗОЛАТИ ОТ ЕТАП 1 ОТ ГР. ВЕЛИКО ТЪРНОВО И ГР. КОСТИНБРОД (ВТОРА ЕКСПЕДИЦИЯ). С ИЗПОЛЗВАНЕТО НА МЕЖДУНАРОДНО УТВЪРДЕНИ СТАНДАРТНИ ПРОЦЕДУРИ СА ПОЛУЧЕНИ ИЗОЛАТИ, СУСПЕКТНИ ЗА РОДОВЕТЕ *SALMONELLA* И *YERSINIA*, КАКТО И ВИДА *ESCHERICHIA COLI*. СУСПЕКТНИТЕ ЗА ТРИТЕ ВИДА КОЛОНИИ БЯХА ПОДЛОЖЕНИ НА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНО ОПРЕДЕЛЯНЕ С MALDI-TOF MS. УСТАНОВИХА СЕ 3 КОЛОНИИ, ПОДОЗРИТЕЛНИ ЗА *SALMONELLA* SP. (ОТ МНОГО СУХА ПРОБА ОТ ТРАКТОР, С КОЙТО СЕ ПРЕНАСЯ МАТЕРИАЛЪТ ОТ СЕПАРАТОРА ДО ОКОЛНОТО ПОЛЕ КРАЙ СВИНЕФЕРМАТА В ГР. КАРНОБАТ) И ОБЩО 34 КОЛОНИИ, СУСПЕКТНИ ЗА *ESCHERICHIA COLI* (9 БР. – ВЪВ ФЕЦЕСИ, ГР. ВЕЛИКО ТЪРНОВО И 9 БР. – ВЪВ ФЕЦЕСИ, 4 БР. – В ЛАГУНИ, 3 БР. – В ПОЧВИ И 9 БР. – В ОТПАДНИ ВОДИ ОТ СВИНЕФЕРМА В ГР. КАРНОБАТ). БЕШЕ НАПРАВЕНА ПВР, ВКЛЮЧИТЕЛНО И НА ПРОБИ ОТ ЕТАП 1, БИОХИМИЧНО ОПРЕДЕЛЕНИ КАТО ПРИНАДЛЕЖАЩИ КЪМ ВИДОВЕ *Y. ENTEROCOLITICA* (*AIL* ГЕН) И *E. COLI* (*UIDA* И *YCST* ГЕНИ). ДОКАЗА СЕ ВИДОВАТА ПРИНАДЛЕЖНОСТ НА 6 ИЗОЛАТА ЗА *Y. ENTEROCOLITICA* (3 БР. – В ЛАГУНИ И 3 БР. – В ОТПАДНИ ВОДИ) И 3 ИЗОЛАТА ЗА *SALMONELLA* SP. (*ESR3* ГЕН И ОПЕРОН ЗА ТРАНСПОРТИРАНЕ НА ХИСТИДИН) В ОТПАДНИ ВОДИ ОТ СВИНЕФЕРМА В ГР. КОСТИНБРОД. БЕШЕ ИЗСЛЕДВАНА АДХЕРЕНТНАТА СПОСОБНОСТ НА ВСИЧКИ ДОКАЗАНИ *E. COLI*, КАКТО И ТЯХНАТА АНТИБИОТИЧНА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ И НАЛИЧИЕ НА ГЕНИ НА АНТИБИОТИЧНА РЕЗИСТЕНТНОСТ (ГАР). УСТАНОВИХА СЕ 2 КОЛОНИИ ОТ ФЕЦЕСИ ОТ СВИНЕФЕРМА В ГР. КАРНОБАТ, КОИТО ОБРАЗУВАХА ЗДРАВ БИОФИЛМ И ПОКАЗАХА МУЛТИРЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ ТЕТРАЦИКЛИНИ, ПЕНИЦИЛИНИ, МАКРОЛИДИ (ЕРИТРОМИЦИН) И ХЛОРАМФЕНИКОЛ. ТЕ БЯХА ПОЛОЖИТЕЛНИ ЗА НОСИТЕЛСТВО НА ГАР (*VLATEM* И НА *AMPС* КЪМ *B*-ЛАКТАМНИ АНТИБИОТИЦИ). БЕШЕ РАЗРАБОТЕН LAMP ПРОТОКОЛ ЗА ОПТИМИЗИРАНЕ ЧУВСТВИТЕЛНОСТТА НА РЕАКЦИЯТА ПРИ ТЪРСЕНЕ НА *Y. ENTEROCOLITICA* ВЪВ ФЕЦЕС. ОТ ЛАГУНИТЕ ОТ ГР. КАРНОБАТ БЯХА ИЗОЛИРАНИ 3 ЩАМА *E. COLI*, ОБРАЗУВАЩИ ЗДРАВ БИОФИЛМ, РЕЗИСТЕНТНИ КЪМ СТРЕПТОМИЦИН, ХЛОРАМФЕНИКОЛ И ЕДИН ОТ ТЯХ – КЪМ ИЗСЛЕДВАНИТЕ ТЕТРАЦИКЛИНИ. ОТ ПОЧВИТЕ В СВИНЕФЕРМА В ГР. ВЕЛИКО ТЪРНОВО БЯХА ИЗОЛИРАНИ 2 ЩАМА, КОИТО ОБРАЗУВАХА ЗДРАВ БИОФИЛМ И СЕ ОКАЗАХА ЧУВСТВИТЕЛНИ КЪМ ВСИЧКИ ПРИЛАГАНИ АНТИБИОТИЦИ. ДОКАЗАНО БЕШЕ, ЧЕ ПОЧВЕНИТЕ ПРОБИ ОТ СЪЩАТА СВИНЕФЕРМА СЪДЪРЖАТ НАЙ-ВИСОКИ КОЛИЧЕСТВА ОСТАТЪЦИ ОТ 8 БР. АНТИБИОТИЦИ (ЦИПРОФЛОКСАЦИН, ЕНРОФЛОКСАЦИН, ФЛУМЕКВИН, СУЛФАМЕТАЗИН, ОКСИТЕТРАЦИКЛИН, ЛИНКОМИЦИН, ТИАМУЛИН И ТИЛОЗИН), СЛЕДВАНИ ОТ ГР. КОСТИНБРОД (НИСКИ КОНЦЕНТРАЦИИ НА ОКСИТЕТРАЦИКЛИН И ФЛУМЕКВИН) И ГР. КАРНОБАТ (НЕ СА ОТКРИТИ АНТИБИОТИЧНИ ОСТАТЪЦИ). ОТ ОТПАДНИТЕ ВОДИ ОТ СВИНЕФЕРМА В ГР. КОСТИНБРОД БЯХА ДОКАЗАНИ 4 ЩАМА, КОИТО ПОКАЗАХА СИЛНА АДХЕРИРАЩА СПОСОБНОСТ И МУЛТИРЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ ТЕТРАЦИКЛИНИ, ФЛУОРОХИНОЛОНИ, ПЕНИЦИЛИНИ, АМИНОГЛИКОЗИДИ (СТРЕПТОМИЦИН) И ТРИМЕТОПРИМ/СУЛФАМЕТОКСАЗОЛ, КАКТО И НАЛИЧИЕ НА ГАР (*VLATEM* И *AMPС*). ОТ СВЕЖАТА ТЪРДА ФРАКЦИЯ ОТ СЕПАРАТОРА В СВИНЕФЕРМАТА В ГР. КАРНОБАТ, 3 ИЗОЛАТА ОБРАЗУВАХА ЗДРАВ БИОФИЛМ И СЕ ОПРЕДЕЛИХА КАТО РЕЗИСТЕНТНИ КЪМ ТЕТРАЦИКЛИНИ, ПЕНИЦИЛИНИ И ХЛОРАМФЕНИКОЛ. ТЕ БЯХА ПОЛОЖИТЕЛНИ ЗА ТЪРСЕНИЯ *AMPС* ГЕН И ОТРИЦАТЕЛНИ ЗА *VLATEM* ГЕН. ДОПЪЛНИТЕЛНО, БЕШЕ ИЗВЪРШЕНА ОПТИМИЗАЦИЯ НА ПРОТОКОЛА ЗА ddPCR С ДНК, ИЗОЛИРАНА ОТ ИЗКУСТВЕНО КОНТАМИНИРАНИ ПРОБИ С *Y. ENTEROCOLITICA* С ЦЕЛ КОЛИЧЕСТВЕНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА БРОЯ БАКТЕРИАЛНИ ГЕНОМНИ КОПИЯ В ОТПАДНИ ВОДИ.



ФИГУРА 3. МЕСТОПОЛОЖЕНИЕ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ФЕРМИ ПО ПРОЕКТА

СЪБИРАНЕ НА ПРОБИ

1) гр. Костинброд

- 2020 г. - F1 и F2 от свински фецес на свине за уговяване и F3 от фецес на свине майки и подрастващи; проби L1 – L3 от лагуни бяха взети от персонала на свинефермата, тъй като бяха въведени протиепидемични ограничителни мерки заради COVID-19
- 2021 г. - F1 от фецес на подрастващи, F2 от фецес на свине майки, F3 от фецес на свине за уговяване, L1 на 10 см дълбочина от лагуна, L2 на 50 см дълбочина от лагуна и L3 на 70 см дълбочина от лагуна; S2 – почва на около 1 м до лагуната и около 20 см дълбочина, S3 – почва на около 4 м до лагуната и около 25 см дълбочина, S4 – почва от повърхностния слой на наторена нива и S5 почва от около 15 см дълбочина на наторена нива; W1 – отпадни води от свине за уговяване на 5 см дълбочина, W2 – отпадни води от свине за уговяване на 25 см дълбочина, W3 – отпадни води от свине за уговяване на 40 см дълбочина; L1 на 10 см дълбочина от лагуна, L2 на 50 см дълбочина от лагуна и L3 на 70 см дълбочина от лагуна
- 2022 г. - S1 – на 10 см от повърхността на почва на нива 1, S2 – на 30 см от повърхността на почва на нива 1 и S3 – на 50 см от повърхността на почва на нива 1, S4 – на 10 см от повърхността на почва на нива 2, S5 – на 30 см от повърхността на почва на нива 2, S6 – на 50 см от повърхността на почва на нива 2, S7 – на 10 см от повърхността на почва на нива 3, S8 – на 30 см от повърхността на почва на нива 3, S9 – на 50 см от повърхността на почва на нива 3.
- гр. Велико Търново 2021 г. – F1 от фецес на бременни свине, F2 от фецес на свине майки, F3 от фецес на свине за уговяване и F4 от подрастващи прасета; L1 на 1 м дълбочина от лагуна; S1 – S3 – три участъка на 25 см дълбочина от почвата на торена нива с домати; W1 – отпадни води от свине за уговяване, W2 – отпадни води от подрастващи прасета, W3 – отпадни води от свине майки и W4 – отпадни води от бременни свине; L1 – на 1 м



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



ΜΙΝΙΣΤΕΡΣΤΒΟ ΝΑ ΟΒΡΑΖΟΒΑΝΙΕΤΟ Ι ΝΑΥΚΑΤΑ

ΦΟΝΔ
ΝΑΥΧΝΙ
ΙΖΣΛΕΔΒΑΝΙΥ



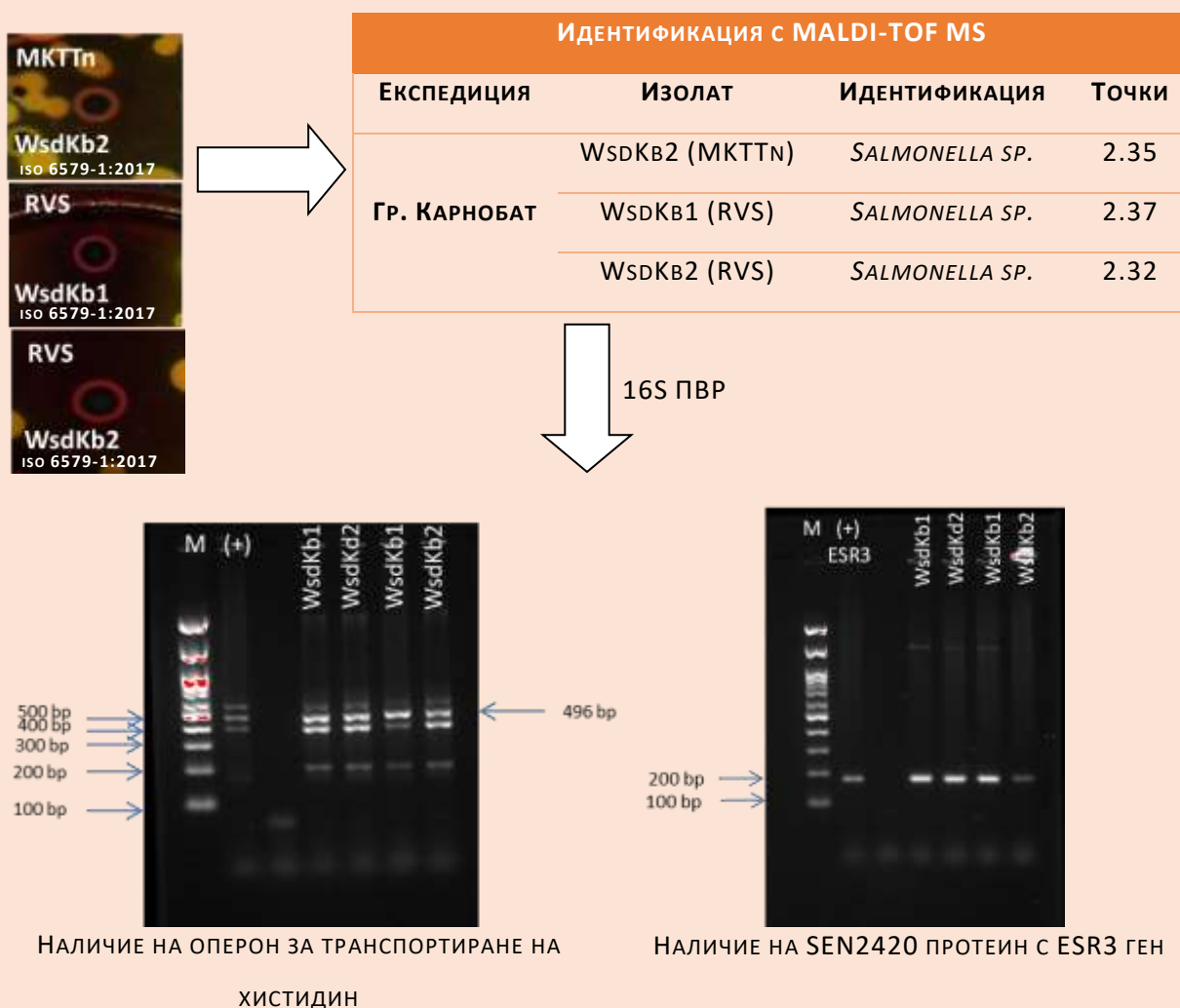
дълбочина на лагуната; S1 – S3 – почва на 25 см дълбочина от селскостопански ниви (с домати) в границите (околността) на фермата

- 2) с. Крумово градище, обл. Бургас 2022 г. - F1 и F2 - от свине майки в процес на лактация, F3 и F4 - от бозаещи прасенца, F5 и F6 – от млади подрастващи прасета; L1 – от повърхностния слой на 5 см дълбочина на лагуната, L2 – на 25 см дълбочина на лагуната; S1 – почва на 10 см от повърхността на поле 1, S2 - почва на 10 см от повърхността на поле 2, S3 - почва на 30 см от повърхността на поле 2, S4 - почва на 50 см от повърхността на поле 2, S5 - почва на 10 см от повърхността на поле 3, S6 - почва на 30 см от повърхността на поле 3 и S7 - почва на 50 см от повърхността на поле 3.

ЗНАЧИМИ РЕЗУЛТАТИ ПО ПРОЕКТА

ИЗОЛИРАНЕ НА *SALMONELLA* SP.

УСПЕШНО БЯХА ИЗОЛИРАНИ И ДОКАЗАНИ ЧЕТИРИ КОЛОНИИ ОТ ОТПАДНИ ВОДИ НА СВИНЕФЕРМА КРАЙ ГР. КАРНОБАТ, ПРИНАДЛЕЖАЩИ КЪМ *SALMONELLA* SP.



ФИГУРА 4. СХЕМА НА ИЗОЛИРАНЕ И ДОКАЗВАНЕ НА *SALMONELLA* SP.

ПРАЙМЕР	ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТ	ЛИТЕРАТУРА	ПРАЙМЕР	ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТ	ЛИТЕРАТУРА
ОПЕРОН ЗА ХИСТИДИН F	5'-ACTGGCGTTATCC CTTTCTC TGGTG-3'	(COHEN ET AL., 1993)	ESR3 F	5'-CAAAAGCGACA AATAATCTG-3'	(LUZÓN AND CRISTABEL, 2021)
ОПЕРОН ЗА ХИСТИДИН R	5'-ATGTTGTCSTGCCSS TGGTAAGAGA-3'		ESR3 R	5'-TTTCTCCGCCTG TTTTCGTT-3'	

ТАБЛИЦА 1. ИЗПОЛЗВАНИ ПРАЙМЕРИ И ТЕХНИТЕ СЕКВЕНЦИИ



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



ФОНД НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА

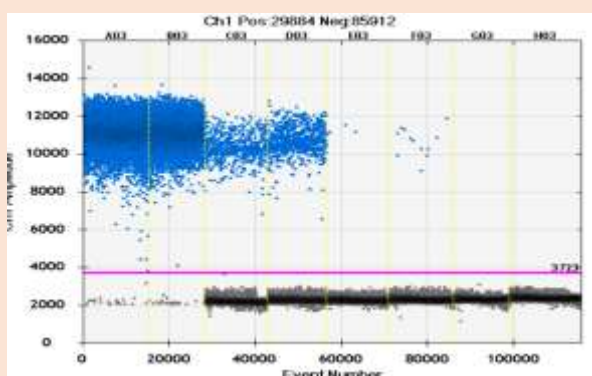


ИЗОЛИРАНЕ НА *YERSINIA ENTEROCOLITICA* SP. И *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

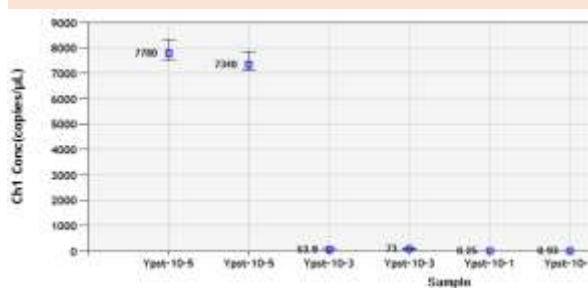
ДИГИТАЛНА КАПКОВА ПВР (ddPCR)

ТОЗИ ПОДХОД БЕ ИЗПОЛЗВАН ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА *Y. ENTEROCOLITICA* И *Y. PSEUDOTUBERCULOSIS* В ДНК, ДИРЕКТНО ИЗОЛИРАНА ОТ ФЕЦЕСИ ПО ПРОТОКОЛ, РАЗРАБОТЕН В ЛАБОРАТОРИЯ ПО ЦИТОТОКСИЧНОСТ И СИГНАЛНА ТРАНСДУКЦИЯ.

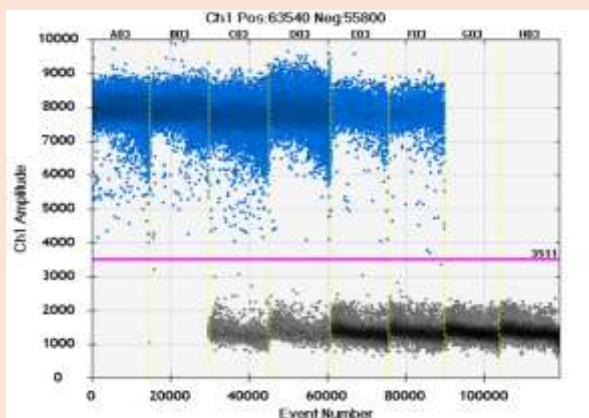
***Y. PSEUDOTUBERCULOSIS* (Co+)**



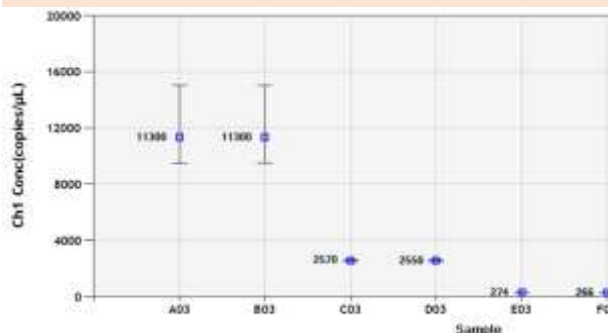
ΚΟΝΤΡΑΚΤΑΡΙΑ ΝΑ ΔΝΚ: 1) 1.5×10^5 ; 2) 1.2×10^3 ; 3) 1.2×10^1



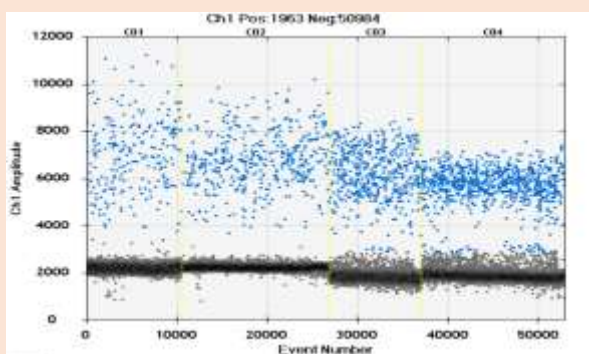
***Y. ENTEROCOLITICA* (Co+)**



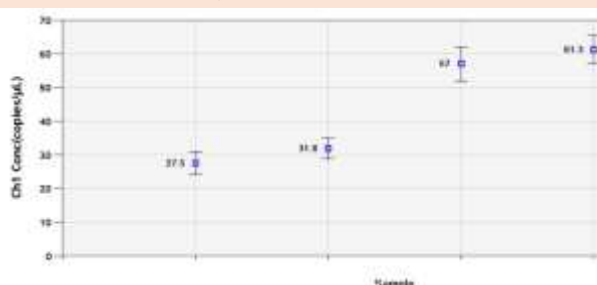
ΚΟΝΤΡΑΚΤΑΡΙΑ ΝΑ ΔΝΚ ΚΟΝΤΡΟΛΙΤΕ Β ΡΕΑΚΤΑΡΙΑ: 1) 2×10^5 ; 2) 5×10^4 ; 3) 5×10^3



ΠΡΟΒΑ ΝΑ ΦΕΚΣ (F3), ΙΖΟΛΙΡΑΝ ΟΤ ΣΒΙΝΕΦΕΡΜΑ Β ΓΡ. ΚΟΣΤΙΝΒΡΟΔ



ΚΟΝΤΡΑΚΤΑΡΙΑ ΝΑ ΔΝΚ: 1) *Y. PSEUDOTUBERCULOSIS* – 5.9×10^2 ; 2) *Y. ENTEROCOLITICA* – 1.2×10^3

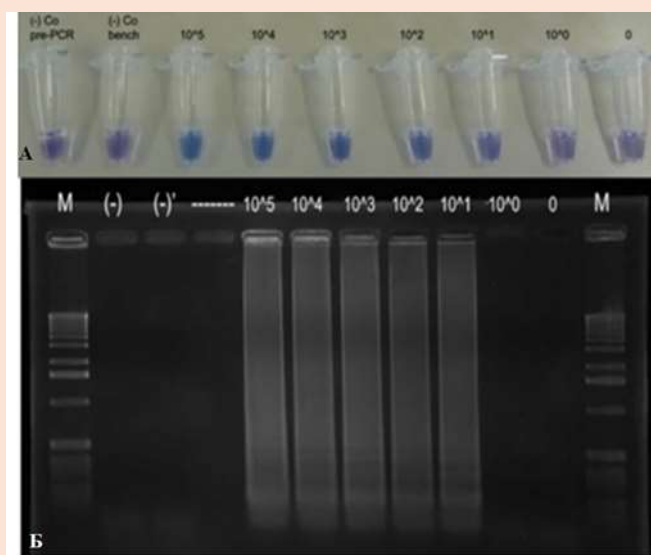


ПРИМКОВО-МЕДИРАНА ИЗОТЕРМАЛНА АМПЛИФИКАЦИЯ (LAMP) – РАЗРАБОТВАНЕ НА ПРОТОКОЛ

ПРАЙМЕР	ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТ	ЛИТЕРАТУРА
FIP	5'-CGCAACSTTATCTTGCCAA TCATCAGACAAACSTGCCA-3'	(LI ET AL., 2010)
BIP	5'-CACCAAACSTTTTCATCTTA TGCGAGGCCGATATTGC-3'	
F3	5'-TTTACCGGGCGAGGATGG C-3'	
B3	5'-TGCGAGAGAGATCAATTTGA AAT-3'	
LF	5'-TCGCAGTGAGCACCCAG-3'	
LB	5'-AGCGCGAATTCAGGCATT-3'	

ИЗПОЛЗВАН Е КИТ BLUE-LAMP (EURX, ПОЛША). ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЧУВСТВИТЕЛНОСТТА НА LAMP РЕАКЦИЯТА БЕШЕ ИЗПОЛЗВАНА ДНК, ИЗОЛИРАНА ОТ ЩАМ *Y. ENTEROCOLITICA* БИО/СЕРОТИП 4/О:3 (IP8944) И ПРИГОТВЕНИТЕ СЕРИЙНИ РАЗРЕЖДЕНИЯ. РЕЗУЛТАТИТЕ БЯХА ОТЧИТАНИ ЧРЕЗ ЕЛЕКТРОФОРЕЗА В АГАРОЗЕН ГЕЛ И ВИЗУАЛНО ЧРЕЗ БАГРИЛОТО ХИДРОКСИНАФТОЛОВО СИНЬО (ФИГУРА 5 А И Б). И ДВАТА МЕТОДА ЗА ОТЧИТАНЕ НА LAMP ПРОДУКТИТЕ БЯХА С ЕДНАКВА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ ЗА ДОКАЗВАНЕ НА РНОР ГЕНА НА ПАТОГЕННА *Y. ENTEROCOLITICA*.

Таблица 2. ИЗПОЛЗВАНИ ПРАЙМЕРИ И ТЕХНИТЕ СЕКВЕНЦИИ



Легенда: А - Визуализация на продуктите посредством багрило HNB; Б - Визуализация на продуктите от реакцията чрез агазорна гел електрофореза. М = ДНК маркер 100 ВД; (-) = отрицателна контрола без ДНК; (-)' = втора отрицателна контрола с вода добавена на плота след накапване на ДНК; *Y. ENTEROCOLITICA* IP864 в различни концентрации (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 и 100 копия) на ДНК.

Фигура 5. Чувствителност на LAMP реакцията.

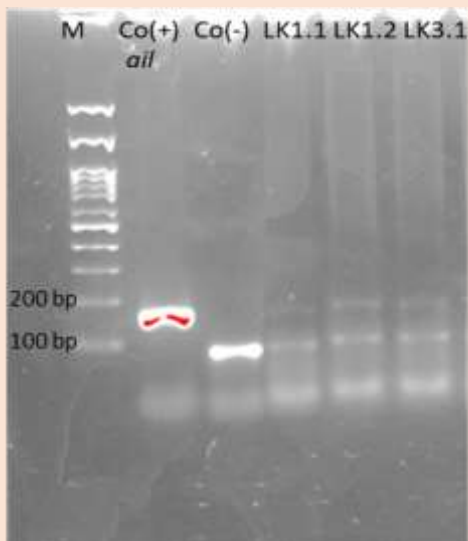


ИЗОЛИРАНЕ НА *YERSINIA ENTEROCOLITICA*



ИДЕНТИФИКАЦИЯ С MALDI-TOF MS			
Експедиция	Изолат	Идентификация	Точки
Костинброд 2021	YLK1.1	<i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	2.45
	YLK1.2	<i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	2.35
	YLK3.1	<i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	2.38

16S ПВР



ФИГУРА 6. СХЕМА НА ИЗОЛИРАНЕ И ДОКАЗВАНЕ НА *Y. ENTEROCOLITICA*

ПРАЙМЕР	ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТ	ЛИТЕРАТУРА
<i>AiLF</i> -REAL 10A	5'-ATGATAACTGGGG AGTAATAGGTTTCG-3'	(LAMBERTZ ET AL., 2008)
<i>AiLR</i> -REAL 9A	5'-CCCAGTAATCCAT AAAGGCTAACATAT-3'	

ТАБЛИЦА 3. ИЗПОЛЗВАНИ ПРАЙМЕРИ И ТЕХНИТЕ СЕКВЕНЦИИ

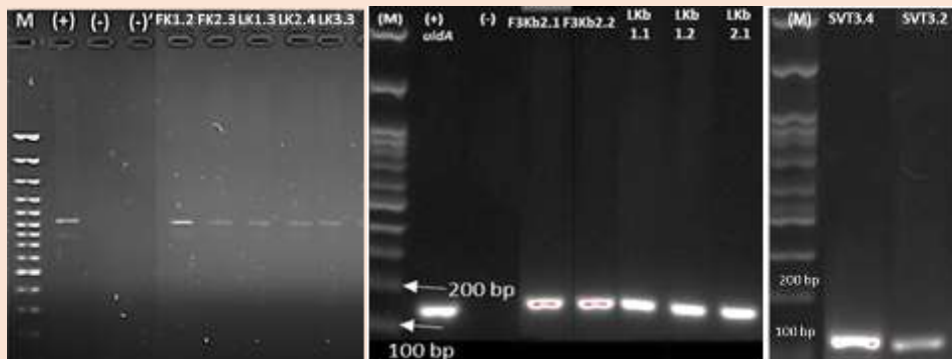


ИЗОЛИРАНЕ НА *E. COLI*

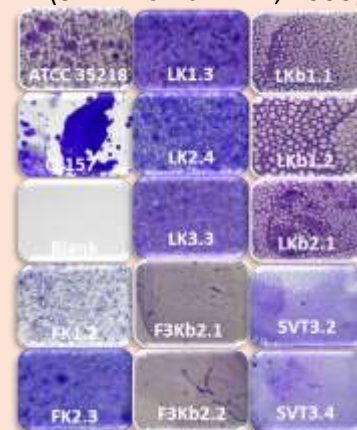
ИЗОЛИРАНИ И ДОКАЗАНИ ЗА ПРИНАДЛЕЖАЩИ КЪМ ВИД *E. COLI* СА ОБЩО 33 КОЛОНИИ ОТ ФЕЦЕСИ (ГР. КОСТИНБРОД – 9 БР., ГР. ВЕЛИКО ТЪРНОВО – 15 БР. И ГР. КАРНОБАТ – 9 БР.), 24 КОЛОНИИ ОТ ЛАГУНИ (ГР. КОСТИНБРОД – 14 БР., ГР. ВЕЛИКО ТЪРНОВО – 6 БР. И ГР. КАРНОБАТ – 4 БР.), 9 КОЛОНИИ ОТ ПОЧВИ (ГР. КОСТИНБРОД – 1 БР., ГР. ВЕЛИКО ТЪРНОВО – 4 БР. И ГР. КАРНОБАТ – 4 БР.) И 30 КОЛОНИИ ОТ ОТПАДНИ ВОДИ (ГР. КОСТИНБРОД – 5 БР., ГР. ВЕЛИКО ТЪРНОВО – 16 БР. И ГР. КАРНОБАТ – 9 БР.). ЗА ЦЕЛТА СА ИЗПОЛЗВАНИ МИКРОБИОЛОГИЧНИ ПОДХОДИ (ISO 16654:2001/AMD 1:2017 И ISO 9308-1). НЯКОИ ОТ ИЗОЛАТИТЕ БЯХА БИОХИМИЧНО ОХАРАКТЕРИЗИРАНИ С АВТОМАТИЗИРАНАТА СИСТЕМА BD PHOENIX M50, ДОКАТО ДРУГИ БЯХА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНО ОПРЕДЕЛЕНИ С MALDI-TOF MS, КАТО НАКРАЯ ВСИЧКИ КОЛОНИИ БЯХА ДОКАЗАНИ ЗА ВИД *E. COLI* С 16S ПВР (DIMITROVA ET AL., 2021; KALEVA ET AL., 2023).

НА СХЕМАТА СА ПРЕДСТАВЕНИ САМО *E. COLI* ИЗОЛАТИТЕ, ОБРАЗУВАЩИ ЗДРАВ БИОФИЛМ, ДОКАЗАТЕЛСТВО ЗА ТЯХНАТА ВИДОВА ПРИНАДЛЕЖНОСТ, АНТИБИОТИЧНА РЕЗИСТЕНТНОСТ И ГЕННА ЕКСПРЕСИЯ. ОСТАНАЛИТЕ РЕЗУЛТАТИ СА ПРЕДСТАВЕНИ В 2 ПУБЛИКАЦИИ ПО ПРОЕКТА (DIMITROVA ET AL., 2021; KALEVA ET AL., 2023).

16S ПВР



ТЕСТ ЗА БИОФИЛМ ОБРАЗУВАНЕ (СТЕРАНОВИЌ ЕТ АЛ., 2000)



ПРАЙМЕР	ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТ	ЛИТЕРАТУРА
16S rRNA F	5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3'	{MAGRAY, 2011 #1}
16SrRNA R	5'-CTTGTGCGGGCC CCCGTCAATTC-3'	
<i>uidA</i> F	5'-AAAACGGCAAGA AAAAGCAG-3'	{BEJ, 1991 #32}
<i>uidA</i> R	5'-ACGCGTGGTTAC AGTCTTGCG-3'	
<i>yccT</i> F	5'-GCATCGTGACCACSTTGA-3'	{CLIFFORD, 2012 #31}
<i>yccT</i> R	5'-CAGCGTGGTGGCAAAA-3'	

Таблица 4. ИЗПОЛЗВАНИ ПРАЙМЕРИ И ТЕХНИТЕ СЕКВЕНЦИИ

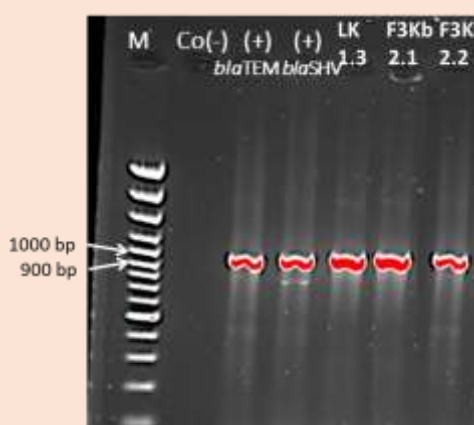
ТЕСТ ЗА АНТИБИОТИЧНА РЕЗИСТЕНТНОСТ

Клас	Антибиотик / изолат	FK 1.2	FK 2.3	LK 1.3	LK 2.4	LK 3.3	F3Kb 2.1	F3Kb 2.2	LKb 1.1	LKb 1.2	LKb 2.1	SVT 3.2	SVT 3.4	E. coli O:157	E. coli ATCC 35218
Тетрациклини	Тетрациклин	R	I	R	R	R	R	R	S*	S	R	S	I	R	S
	Доксициклин хидрохлорид	R	R	R	R	S	R	R	S	I	R	S	S	S	S
Макролиди	Еритромицин	S	S	I	S	S	R	R	I	S	I	I	I	S	S
Флуорохинолони	Налидиксова киселина	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
	Пефлоксацин	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Пеницилини	Ампицилин	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
	Амоксицилин	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	N.M.	R
	Амоксицилин/клавула-нова киселина	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
Аминогликозиди	Стрептомицин	S	S	I	S	S	S	I	I	R	R	S	S	S	R
Други агенти	Хлорамфеникол	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
	Триметоприм / сулфаметоксазол	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Таблица 5. Антибиотикограма на *E. coli* изолати



ЕКСПРЕСИЯ НА ГЕНИ НА РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ АНТИБИОТИЦИ ОТ ГРУПАТА НА ПЕНИЦИЛИНИТЕ



Фигура 7. Подход на доказване и установяване биофилм-образуващия потенциал, антибиотична резистентност и експресия на гени на антибиотична резистентност на *E. coli* изолати



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



НАЛИЧИЕ НА АНΤΙΒΙΟΤΙΧΝΙ ΟΣΤΑΤΉΤΣΙ Β ΠΟΧΒΙ

№	ΠΡΟΒΑ	ΔΑΤΑ	ΓΡΑΔ	ΔΉΛΒΟΧΙΝΑ ΝΑ ΒΖΙΜΑΝΕ ΝΑ ΠΡΟΒΑΤΑ	ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΧ/ΧΙΜΙΟΤΕΡΑΠΕΥΤΙΚ
1	S1VT	09.08.2021	ΒΕΛΙΚΟ ΤΉΡΝΟΒΟ	25 CM	CIPROFLOXACIN – 46 μG/KG ENROFLOXACIN – 147 μG/KG FLUMEQUINE – 2.9 μG/KG SULFAMETHAZINE – 0.15 μG/KG ΟΧΥΤΕΤΡΑΧΥΛΙΝΕ – 3 μG/KG LINCΟΜΥCΙΝ – 0.25 μG/KG ΤΙΑΜΥΛΙΝ – 0.47 μG/KG ΤΥΛΟCΙΝ – 36.9 μG/KG
2	S2VT	09.08.2021	ΒΕΛΙΚΟ ΤΉΡΝΟΒΟ	25 CM	CIPROFLOXACIN – 11.8 μG/KG ENROFLOXACIN – 53.1 μG/KG FLUMEQUINE – 2.5 μG/KG SULFADOXINE – 0.19 μG/KG ΟΧΥΤΕΤΡΑΧΥΛΙΝΕ – 3.4 μG/KG ΤΥΛΟCΙΝ – 17.1 μG/KG
3	S3VT	09.08.2021	ΒΕΛΙΚΟ ΤΉΡΝΟΒΟ	25 CM	CIPROFLOXACIN – 13.9 μG/KG ENROFLOXACIN – 89.8 μG/KG FLUMEQUINE – 2.2 μG/KG SULFADOXINE – 0.12 μG/KG ΟΧΥΤΕΤΡΑΧΥΛΙΝΕ – 3.4 μG/KG ΤΙΑΜΥΛΙΝ – 0.21 μG/KG ΤΥΛΟCΙΝ – 29.7 μG/KG
4	S1Kv1	27.10.2022	ΚΑΡΝΟΒΑΤ	10 CM, ΠΟΛΕ 1	ΝΕ CΕ ΟΤΚΡΙΒΑΤ



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



ΦΟΝΔ
ΝΑΥΧΝΗ
ΙΖΣΛΕΔΒΑΝΗΑ
ΜΗΝΗΣΤΕΡΣΤΒΟ ΝΑ ΟΒΡΑΖΟΒΑΝΗΕΤΟ Ι Η ΝΑΥΚΑΤΑ



5	S1Kv1'	27.10.2022	ΚΑΡΝΟΒΑΤ	10 CM, ΠΟΛΕ 1	ΝΕ ΣΕ ΟΤΚΡΗΒΑΤ
6	S1Kv2	27.10.2022	ΚΑΡΝΟΒΑΤ	30 CM, ΠΟΛΕ 1	ΝΕ ΣΕ ΟΤΚΡΗΒΑΤ
7	S1Kv3	27.10.2022	ΚΑΡΝΟΒΑΤ	50 CM, ΠΟΛΕ 1	SULFAPYRIDINE – 0.37 µG/KG
8	S2Kv1	27.10.2022	ΚΑΡΝΟΒΑΤ	10 CM, ΠΟΛΕ 2	SULFAMETHAZINE – 0.14 µG/KG
9	S2Kv2	27.10.2022	ΚΑΡΝΟΒΑΤ	30 CM, ΠΟΛΕ 2	SULFAMETHAZINE – 0.16 µG/KG
10	S2Kv2	27.10.2022	ΚΑΡΝΟΒΑΤ	50 CM, ΠΟΛΕ 2	ΝΕ ΣΕ ΟΤΚΡΗΒΑΤ
11	S1K10	23.11.2022	ΚΟΣΤΗΝΒΡΟΔ	10 CM, ΚΒΑΔΡΑΝΤ 1	ΟΧΥΤΕΤΡΑΚΥΚΛΗΝΕ – 1.3 µG/KG
12	S1K30	23.11.2022	ΚΟΣΤΗΝΒΡΟΔ	30 CM, ΚΒΑΔΡΑΝΤ 1	ΟΧΥΤΕΤΡΑΚΥΚΛΗΝΕ – 0.68 µG/KG
13	S1K50	23.11.2022	ΚΟΣΤΗΝΒΡΟΔ	50 CM, ΚΒΑΔΡΑΝΤ 1	ΝΕ ΣΕ ΟΤΚΡΗΒΑΤ
14	S2K10	23.11.2022	ΚΟΣΤΗΝΒΡΟΔ	10 CM, ΚΒΑΔΡΑΝΤ 2	ΟΧΥΤΕΤΡΑΚΥΚΛΗΝΕ – 1.9 µG/KG FLUMEQUINE – 2.8 µG/KG
15	S2K30	23.11.2022	ΚΟΣΤΗΝΒΡΟΔ	30 CM, ΚΒΑΔΡΑΝΤ 2	ΟΧΥΤΕΤΡΑΚΥΚΛΗΝΕ – 1.2 µG/KG FLUMEQUINE – 1.6 µG/KG
16	S2K50	23.11.2022	ΚΟΣΤΗΝΒΡΟΔ	50 CM, ΚΒΑΔΡΑΝΤ 2	ΟΧΥΤΕΤΡΑΚΥΚΛΗΝΕ – 0.88 µG/KG FLUMEQUINE – 0.97 µG/KG
17	S3K10	23.11.2022	ΚΟΣΤΗΝΒΡΟΔ	10 CM, ΚΒΑΔΡΑΝΤ 3	ΟΧΥΤΕΤΡΑΚΥΚΛΗΝΕ – 6.4 µG/KG FLUMEQUINE – 3.4 µG/KG
18	S3K30	23.11.2022	ΚΟΣΤΗΝΒΡΟΔ	30 CM, ΚΒΑΔΡΑΝΤ 3	ΟΧΥΤΕΤΡΑΚΥΚΛΗΝΕ – 8.9 µG/KG FLUMEQUINE – 5.6 µG/KG
19	S3K50	23.11.2022	ΚΟΣΤΗΝΒΡΟΔ	50 CM, ΚΒΑΔΡΑΝΤ 3	ΟΧΥΤΕΤΡΑΚΥΚΛΗΝΕ – 2.4 µG/KG FLUMEQUINE – 1.3 µG/KG

Ταβλнца 5. ΚΟΝΣΕΝΤΡΑΤΗΑ ΝΑ ΑΝΤΗΒΗΟΤΗΤΗΕ ΚΑΙ ΧΗΜΗΟΤΕΡΑΠΕΥΤΗΤΗΕ, ΟΤΚΡΗΤΗ Β ΠΟΧΒΗ ΟΤ ΤΡΗ ΣΒΗΝΕΦΕΡΜΗ ΝΑ ΤΕΡΗΤΟΡΗΑΤΑ ΝΑ Ρ ΒΥΛΓΑΡΗΑ.



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



ПУБЛИКАЦИИ ПО ПРОЕКТА:

1. DIMITROVA, L., KALEVA, M., ZAHARIEVA, M.M., STOYKOVA, C., TSVETKOVA, I., ANGELOVSKA, M., ILIEVA, Y., KUSSOVSKI, V., NAYDENSKA, S. AND NAJDENSKI, H., 2021. PREVALENCE OF ANTIBIOTIC-RESISTANT *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM SWINE FAECES AND LAGOONS IN BULGARIA. *ANTIBIOTICS*, 10(8), p.940. **IF: 4,8. Q2.**
2. KALEVA, M.D., ILIEVA, Y., ZAHARIEVA, M.M., DIMITROVA, L., KIM, T.C., TSVETKOVA, I., GEORGIEV, Y., OROZOVA, P., NEDEV, K. AND NAJDENSKI, H., 2023. ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND BIOFILM FORMATION OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM PIG FARMS AND SURROUNDINGS IN BULGARIA. *MICROORGANISMS*, 11(8), p.1909. **IF: 4,5. Q2.**
3. DIMITROVA, L., ZAHARIEVA, M. AND NAJDENSKI, H., 2022. PIG FARMS AND THEIR SURROUNDINGS AS A FACTOR IN THE SPREAD OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE. *ECOLOGICAL ENGINEERING AND ENVIRONMENT PROTECTION*, 1, p. 14-21.
4. ANGELOVSKA, M., ZAHARIEVA, M.M., NAJDENSKI, H., 2023. *YERSINIA ENTEROCOLITICA* - ISOLATION, PATHOGENICITY, AND PREVALENCE IN FARMS FOR SLAUGHTERED PIGS. *ACTA MICROBIOLOGICA BULGARICA*, 39(2), p. 118-129. **IF: 0,39. Q4.**

ПОПУЛЯРИЗИРАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ:

1. МЕЖДУНАРОДНА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ "ТРАДИЦИЯ И МОДЕРНОСТ ВЪВ ВЕТЕРИНАРНАТА МЕДИЦИНА", 16-18.04.2021 г., гр. София, България.
2. СЕДМА МЕЖДУНАРОДНА КОНФЕРЕНЦИЯ "ЕКОЛОГИЧНО ИНЖИНИЕРСТВО И ОПАЗВАНЕ НА ОКОЛНАТА СРЕДА" (ЕИООС'2021) С МЛАДЕЖКА НАУЧНА СЕСИЯ И ЛЕТЕН УНИВЕРСИТЕТ MELISSA, 30.09 – 03.10.2021 г., гр. Варна, България.
3. "НАУКИ В ДИАЛОГА И МОНОЛОГА", ХУМБОЛТОВ СЪЮЗ В БЪЛГАРИЯ, 30.06 – 03.07.2022 г., с. Арбанаси, България.
4. ПЕТНАДЕСЕТИ КОНГРЕС НА МИКРОБИОЛОЗИТЕ В БЪЛГАРИЯ С МЕЖДУНАРОДНО УЧАСТИЕ, 05 – 08.10.2022 г., гр. Копривщица, България.
5. МЕЖДУНАРОДНА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ "ТРАДИЦИЯ И СЪВРЕМЕННОСТ ВЪВ ВЕТЕРИНАРНАТА МЕДИЦИНА", 28 – 30.04.2022 г., гр. София, България.
6. НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ "120 ГОДИНИ НАЦИОНАЛЕН ДИАГНОСТИЧЕН НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКИ ИНСТИТУТ И 140 ГОДИНИ ОТ РОЖДЕНИЕТО НА НЕГОВИЯ ПАТРОН ПРОФ. Д-Р ГЕОРГИ ПАВЛОВ", 21.10.2022 г., гр. София, България.





ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



7. МЕЖДУНАРОДЕН КОНГРЕС “55 Дни Превантивна Медицина”, 26 – 29.09.2023 г., гр. Ниш, Сърбия.
8. ПО ПРОЕКТА БЕШЕ ЗАЩИТЕН ЕДИН ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД НА МАЯ АНГЕЛОВСКА С НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ ЧЛ.-КОР. ХРИСТО НАЙДЕНСКИ НА ТЕМА: “РАЗПРОСТРАНЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НА ЕНТЕРОПАТОГЕННИ ЩАМОВЕ *Y. ENTEROCOLITICA*, ИЗОЛИРАНИ ОТ СВИНЕ”, ГР. СОФИЯ, 2023 Г.

ДРУГИ ДЕЙНОСТИ, СВЪРЗАНИ С ПРОЕКТА:

1. ОРГАНИЗИРАНИ И ОСЪЩЕСТВЕНИ РАБОТНИ СРЕЩИ В INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE, АТИНА, ГЪРЦИЯ.
2. ОРГАНИЗИРАНИ И ОСЪЩЕСТВЕНИ РАБОТНИ СРЕЩИ В ИНСТИТУТА ILVO, МЕЛЕ, БЕЛГИЯ.
3. УТВЪРЖДАВАНЕ НА СЪЩЕСТВУЩОТО ПАРТНЪОРСТВО И ОБСЪЖДАНЕ ВЪЗМОЖНОСТИТЕ ЗА БЪДЕЩИ ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ С ПОСОЧЕНИТЕ ДВА ИНСТИТУТА.



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE



ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА:

- Cohen, N.D., Neiberghs, H.L., McGruder, E.D., Whitford, H.W., Behle, R.W., Ray, P.M., Hargis, B., 1993. Genus-specific detection of salmonellae using the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5, 368-371.
- Dimitrova, L., Kaleva, M., Zaharieva, M.M., Stoykova, C., Tsvetkova, I., Angelovska, M., Ilieva, Y., Kussovski, V., Naydenska, S., Najdenski, H., 2021. Prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from swine faeces and Lagoons in Bulgaria. *Antibiotics* 10, 940.
- Garner, E., Benitez, R., von Wagoner, E., Sawyer, R., Schaberg, E., Hession, W.C., Krometis, L.-A.H., Badgley, B.D., Pruden, A., 2017. Stormwater loadings of antibiotic resistance genes in an urban stream. *Water research* 123, 144-152.
- He, L.-Y., He, L.-K., Liu, Y.-S., Zhang, M., Zhao, J.-L., Zhang, Q.-Q., Ying, G.-G., 2019. Microbial diversity and antibiotic resistome in swine farm environments. *Science of The Total Environment*.
- Kaleva, M.D., Ilieva, Y., Zaharieva, M.M., Dimitrova, L., Kim, T.C., Tsvetkova, I., Georgiev, Y., Orozova, P., Nedev, K., Najdenski, H., 2023. Antimicrobial Resistance and Biofilm Formation of *Escherichia coli* Isolated from Pig Farms and Surroundings in Bulgaria. *Microorganisms* 11, 1909.
- Lambertz, S.T., Nilsson, C., Hallanvuo, S., Lindblad, M., 2008. Real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 6060-6067.
- Li, Y., Jiang, M., Liu, W., Zhang, L., Zhang, S., Zhao, X., Xiang, R., Liu, Y., 2010. Loop-mediated isothermal amplification method targets to the *phoP* gene for detection of *Yersinia enterocolitica*. *Molecular and cellular probes* 24, 68-71.
- Luzón, V., Cristabel, D., 2021. Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación previo a la obtención del Grado de Licenciada en Atención Prehospitalaria y en Emergencias. Quito: UCE,
- Prescott, J.F., 2014. The resistance tsunami, antimicrobial stewardship, and the golden age of microbiology. *Veterinary microbiology* 171, 273-278.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M., 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods* 40, 175-179.
- Yu, Z., He, P., Shao, L., Zhang, H., Lü, F., 2016. Co-occurrence of mobile genetic elements and antibiotic resistance genes in municipal solid waste landfill leachates: a preliminary insight into the role of landfill age. *Water research* 106, 583-592.