ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
Стара Загора
Ветеринарномедицинска
факултет
№ 503 16 01 2017

До Председателя на Научно жури
определено със заповед
№ 2882/16.11.2016 г.
на Ректора на Тракийски Университет
Стара Загора

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за получаване на научната степен
„Доктор на науките"

Автор на дисертационния труд: доц. д-р Валентина Стаматова Урумова от катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести" при Ветеринарномедицински факултет към Тракийски университет – Стара Загора

Тема на дисертационния труд: „Фенотипни и генотипни характеристики на резистентността към антимикробни средства при резидентни *Escherichia coli* и *Enterococcus spp.*, изолирани от интензивно отглеждани свине в България"
Изготвил: чл.кор. Христо Миладинов Найденски, двмн от Института по микробиология „Стефан Ангелов" при БАН

Декларирам, че не съществуват условия за конфликт на интереси между мен и авторът на дисертационния труд по смисъла на ал.1, т.3 и 5 от ДР на ЗРАСРБ

Антимикробната резистентност е непрекъснато нарастващ проблем за общественото здраве и СЗО алармира за достигнали кризисни размери в различни общности и болнични заведения по света. Тя е една от най-големите заплахи за човешкото здраве днес и може да засегне хора от всяка възраст и навсякъде по света, и е потенциална опасност за всеки отделен човек. Инфекциите с резистентни бактерии водят до нарастване на заболеваемостта и смъртността при хората като 700 000 души стават жертва на антибиотична резистентност всяка година в световен мащаб. За съжаление прогнозата до 2050 г. е още по-мрачна - броят на жертвите вследствие на инфекции с резистентни микроби ще достигне 10 милиона годишно – повече, отколкото са жертвите на

рака всяка година сега. Като една от основните причини за този феномен се сочи масираната употреба на антибиотици и синтетични химиотерапевтици в съвременното интензивно животновъдство, което води до повишен риск от контаминация на основни хранителните продукти с резистентни и мултирезистентни бактерии (в т.ч. и патогенни) и техния трансфер към човека. Концепцията за прекомерната употреба на антибиотици обаче звучи доста опростено, а и наложените ограничителни мерки не дават желания резултат – резистентността при редица патогени остава стабилна, а при други дори нараства. Критично следва да се разглежда и въпросът за клиничната употреба на антибиотиците във фермите за интензивно отглеждане на животни, където третирането на отделни животни е неефективно и нецелесъобразно. В този ред на мисли, изследванията в настоящия дисертационен труд се насочват към един много по-значим аспект, а именно приложението на антибиотици във водата и фуражите, а оттам и в храносмилателния тракт на животните и в торовите лагуни. Ето защо изследванията върху фенотипните и генотипни прояви на резистентността при най-разпространените представители на резидентната микрофлора - колибактерии и ентерококи, свързани с интензивното отглеждане на свине у нас са особено актуални и придобиват висока значимост не само за медицината и обществото като цяло, но и в логично обособената концепция за „Едно здраве".

Дисертационният труд е структуриран по стандартно възприетия начин и включва разделите: Въведение (4 стр.), Литературен обзор (96 стр.), Цел и задачи (3 стр.), Материали и методи (27 стр.), Резултати (66 стр.), Обсъждане (38 стр.), Обобщение (2 стр.), Изводи (4 стр.), Приноси (2 стр.), Препоръки за практиката (1 стр.), Публикации свързани с дисертационния труд (2 стр.) и Литература (55 стр.). Цялостният обем е 309 стр. и включва 690 литературни източника, 4 от които на кирилица. Резултатите са онагледени в 27 фигури (от които 7 снимки на електрофоретични профили) и 23 таблици, от общо 31.

В литературния обзор са представени основните класове антибиотици, особеностите в тяхната структура, механизмите на рзистентност и приложението им във ветеринарната медицина, а именно бета-лактамни антибиотици,

аминогликозид-аминоциклитоли, тетрациклини, макролидни антибиотици и линкозамиди, и сулфонамиди. В логическа последователност с темата на дисертационния труд са представени най-новите данни за механизмите на резистентност, стандартните и лабораторно възприети фенотипни и генотипни методи за нейното определяне с акцент върху *E. coli*, продуциращи бета-лактамази с разширен профил. Компетентно и аналитично е представена и ролята на редица други модифициращи ензими, въздействащи върху антибиотичната структура, тяхното разпространение и значение за общественото здраве и ветеринарната медицина. Интересни данни са изложени и за биосинтетичните и полусинтетични аминогликозид-аминоциклитоли, намиращи широко приложение не само за терапия на септични състояния, чревни респираторни и уроинфекции, но и като орални форми прилагани във фуражите и водата за пиене. Макар и измествани от цефалоспорините, карбапенемите и флуорираните хинолони, тяхното ензимно инактивиране и най-често срещани механизми на резистентност в клиничната практика, допълват съвременните познания за епидемиологичния профил на този тип резистентност. В дълбочина и много детайлно са представени и другите класове антибиотици и сулфонамиди, като изключителното многообразие на литературни данни е умело съчетано в структурата на този раздел, а самите те са компетентно интерпретирани. В направеното заключение се алармира за нарастващата резистентност на различни видове бактерии към антибиотици и синтетични химиотерапевтици, усъвършенстващите се механизми на биохимично и генетично ниво, и за обективната потребност от изследвания върху различни генетични детерминанти, вкл. и мобилни елементи считани за основни медиатори на резистентността, каквито са транспозоните, интегроните и мобилните касети.

Поставените цел и задачи са мащабни по своите измерения и включват проучвания, анализ и оценка на редица фенотипни и генотипни характеристики на резидентни щамове *E. coli* и представители на рода *Enterococcus*. Задачите са групирани в 6 точки и 13 подточки. Ясно поставената цел на работата и логичната последователност и прецизност на задачите са показателни за

зрелостта и богатия изследователски опит на доц. Урумова. Пробонабирането е от 7 големи свиневъдни стопанства, като са изследвани общо 914 проби, от които 750 фекални тампонни и 164 от торови лагуни. От изследваните проби са получени 540 бактериални изолата, определени като резидентни щамове *E. coli*, 168 като *Enterococcus faecalis* и 103 като *E. faecium*.

Използвани са класически микробиологични и биохимични методи, вкл.и такива за полуавтоматична идентификация. Фенотипният анализ на резистентността е проведен с диск-дифузионния метод, а минималната инхибираща концентрация (МИК) по метода на микроразрежданията в течна хранителна среда и Е-теста. Генотипният анализ е проведен с конвенционален и qPCR. Този методичен инструментариум позволява да се получат надеждни резултати, анализът на които определя ясно фенотипния профил на резистентността към някои химиотерапевтици при резидентни щамове *E. coli* изолирани от свине от различни възрастови категории и от торови лагуни на отделни стопанства. Наблюдаваната висока резистентност (изразяваща се във висок процент на устойчиви щамове) при патогенни колищамове, изолирани от свине в периода 2010-2015 г. е много тревожен факт. Съотнесена към предходен период (2000-2004 г.), резистентността към терациклинови антибиотици, стрептомицин, спектиномицин, ампицилин и сулфонамиди е увеличена двукратно. Рязко е увеличен и процента на щамовете, които показват устойчивост към ципрофлоксацина – десеткратно в сравнение със същия период. Широко разпространение на устойчивите към антимикробни средства колищамове се доказва и при изолатите представители на резидентната чревна микрофлора на здрави свине. Като цяло процентните стойности на резистентност към отделните изследвани антибиотици са статистически достоверно по-ниски от тези, определени за патогенните вариетети, както и при щамовете изолирани от новородени и бозаещи прасета, в сравнение с тези изолирани от по-възрастни животни.

Проведените фенотипни изследвания дават сериозно основание и обуславят обективната потребност от извършване на по-задълбочени молекулярно биологични изследвания върху генетичните детерминанти,

отговорни за резистентността. Резултатите от проучваните резистентни колищамове, представители на нормалната чревна микрофлора и тези от торовите лагуни показват най-широко разпространение на гените *aaaA1* - детерминиращ резистентността към стрептомицин/спектиномицин, *tet(A)* - детерминиращ резистентността към тетрациклини и *strA/strB* - детерминиращи резистентността към стрептомицин. По-рядко се доказва наличието на гените *sul1* и *sul2*, bla_{TEM} и *tet(B)*, детерминиращи резистентността към сулфаметоксазол, аминопеницилините и цефалоспорините от първа генерация, и тетрациклини респективно, както и на гена *intI* отговорен за синтеза на интегразния ензим в интегроните от клас 1. Най-слабо е разпространението на гена *aacC2*, определящ резистентността към гентамицин, канамицин, тобрамицин и нетилмицин. Във връзка с получената информация от представените изследвания за разпространението на полирезистентните щамове и на базата на фенотипните анализи са доказани 13 картини на резистентност, 9 от които включват ампицилин. По отношение на генотипните профили, при тези щамове най-често се установява гена bla_{TEM}, който не рядко се открива заедно с гените *aadA1, strA/strB, tet(A)*, *sul1* и *sul2*. Тези факти са в подкрепа на хипотезата, че хоризонталния трнсфер на гените на резистентността при полирезистентните коменсални чревни бактерии е един от важните рискови фактори за трансфер на гени, основно чрез хранителните продукти от животни на хора.

От проведените фенотипни и генотипни анализи е определен и профила на резистентността на *Enterococcus faecalis* и *E. faecium*, изолирани от различни категории свине и торови лагуни. Най-широко разпространена е резистентността към еритромицин, последвана от резистентността към тетрациклин и стрептомицин. Относително по-ниски стойности за резистентност на ентерококовите щамове са получени спрямо ампицилин и гентамицин. При анализ на наблюдаваните картини на резистентност при двата вида ентерококи се доказва най-висок процент на резистентни щамове едновременно към еритромицин и тетрациклин. Установената честота на разпространение на някои генетични детерминанти на резистентността при ентерококовите щамове,

произхождащи от свине и торовите лагуни има важно значение за определяне степента на риска за общественото здраве. Установените високи стойности на разпространение на гена *ermB* биха могли да характеризират торовите лагуни като критични точки за разпространението на гени на резистентността в околната среда.

Разделът Обсъждане представя съдържателен и задълбочен анализ на собствените данни относно характера и обхвата на антибиотичната резистентност при патогенни за свине *E. coli* и резидентни щамове *E. faecalis, E. faecium* и колищамове. В своята цялост, получените собствени резултати са умело съпоставени с тези на други автори и международни институции (EFSA, ECDC и др.), в резултат на което са направени важни научно-обосновани изводи и заключения. Обширният и изчерпателен анализ на голямото множество от автори работещи по различни аспекти на темата, хвърлят светлина върху комплексните фактори, обуславящи фенотипните и генотипни прояви на антибиотичната резистентност при изолати от различни възрастови и технологични групи свине, и торови лагуни. Представени са и неоспорими аргументи в полза на доминиращите генетични детерминанти на антимикробната резистентност за различните класове антимикробни средства.

Представените резултати са в основата на направените 18 извода, които приемам като напълно релевантни на проведените изследвания и получените резултати. Направеният анализ на експерименталните данни и тяхното сравняване с тези на други автори формират редица важни научни и научно-приложни приноси, общо 7 на брой, 5 от които са оригинални и 2 потвърдителни. Направени са и цени препоръки за ветеринарно-медицинската практика и свиневъдството като важни подотрасъл на животновъдството, включващи изпитване чувствителността на съответния етиологичен агент преди да се предприеме етиотропна терапия, ротация и перманентен контрол по отношение кратност и продължителност на прилагане на антибиотици и химиотерапевтици, периодичен скрининг на антибиотичната резистентност на резидентната и особено чревната микрофлора и торовите лагуни, разработване на национална система за надзор на антимикробната резистентност, в т.ч. и за

повишаване квалификацията на ветеринарните специалисти по въпросите на антибиотичната политика и резистентност.

Голяма част от значимите резултати предмет на настоящия дисертационен труд са достояние на широката научна общественост. Те са публикувани в 14 журнални статии, отпечатани в реферирани национални и международни списания, 5 от които с импакт фактор. В 11 от публикациите доц. Урумова е първи автор, което е доказателство за водещото й цялостно участие в изследванията.

В проведеното първо заседание на научното жури (30.11.2016 г.) представих писмено становище в което изложих някои забележки и препоръки за окончателното оформление на дисертационния труд. В настоящия му вид отбелязвам, че са отразени не само моите препоръки, но са взети под внимание и бележките на други колеги, присъствали на заседанието.

В **заключение**, считам, че представеният дисертационен труд е цялостна, завършена и прецизно изпълнена мащабна изследователска работа с важни оригинални и потвърдителни приноси за ветеринарномедицинската наука и практика. Темата е особено актуална, а дисертационния труд е добре структуриран, с убедително представяне на проведените собствени изследвания в една много важна за страната ни и световната медицина област. По своето съдържание, качества и приноси работата е отговаря на научните критерии на ЗРАСРБ и правилника на ВМФ при ТУ-Стара Загора за придобиване на научната степен „Доктор на науките", поради което препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да гласуват единодушно с положителен вот за присъждане на научната степен „Доктор на науките" на доцент д-р Валентина Стаматова Урумова.

15.01.2017 г.

София

чл.-кор. Христо Найденски, двмн