



РЕЦЕНЗИЯ

Върху дисертационен труд за получаване на научната степен „Доктор на науките”

АВТОР НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД: Доц.д-р Валентина Стаматова Урумова, доктор, при катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести” към Ветеринарномедицински факултет, 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 Р. България”

РЕЦЕНЗЕНТ: Професор д-р Николай Михайлов Масалски, двмн.

Известна е нарастващата загриженост в световен мащаб, че след първоначалния ентузиазъм в очакването за ликвидиране на редица заразни заболявания, в резултат на използване на антибиотиците в борбата с тях се установи, че независимо от успехите постигнати при употребата им се яви феномена на придобита резистентност от страна на представители на микробния свят. И това доказа, че някои взаимоотношения с този свят са много по-сложни отколкото се предполагаше. Видя се, че при използването дори на такива ефикасни средства ние не можем да променим напълно динамичното равновесие в него, в който като важен компонент са не само патогенните микроорганизми. Това се дължи на факта, че всяко живо същество в природата, включително и микроорганизмите се бори според своите възможности да осигури съществуването си под слънцето. В потвърждение на това обстоятелство сочи намирането, че чрез опита ни да ликвидираме болесттворните микроорганизми в действителност понякога тяхното количество се увеличава. Нещо повече. Чрез възможностите им за предаване на генетична информация се установява, че тази резистентност се разпространява особено бързо и сред съпътстващите, дори непатогенни бактерии и то точно тогава когато атакуваме чрез масово прилагане на медикаменти. Способността на микроорганизмите да изработват собствени защитни средства се оказа сериозно препятствие за терапевтичната практика в световен мащаб. Това предизвика създаването на мощна фармакологична индустрия, която съобразявайки се с новоизградените защитни механизми на бактериите да създава нови форми на антибиотици на базата на съществуващите, чието разнообразие непрекъснато нараства. Така се осъществява постоянна борба между биологичните възможности на микроорганизма да изработка средства за осигуряване на своето съществуване от една страна и от друга на технологичните възможности на човешкото общество за тяхното преодоляване, която се води с променлив успех.

Познанията в това отношение се увеличават чрез научни изследвания в целия свят. Доказа се, че промените в устойчивостта на бактериите се гарантират чрез генетични промени както в хромозомите, така и чрез наличието на извънхромозомен генетичен материал представен в плазмиди, генни касети и интегрони осигуряващи дори множествената резистентност. Получиха се и данни за настъпващи промени в ендоекологията на чревния, дихателния и урогениталния апарат на животните и хората по отношение на патогенните и резидентни микроорганизми. Това състояние придоби много по-съществено значение, когато се разглеждат възможностите относно придобитата резистентност сред попадналите във външната среда микроорганизми, както и опасностите, свързани с предаването им по веригата животни - хранителни продукти от тях – човек. Изясняването на всичко това ангажира непрекъснато вниманието на изследователите в световен мащаб. У нас има отделни научни изследвания отнасящи се предимно за установяване фенотипната резистентност срещу различни антибиотици, но е необходимо да се вникне по-дълбоко в изясняване на многопластовата и разнообразна същност на придобитата резистентност, особено сред микрофлората на животните от промишлените комплекси, в които технологията на тяхното отглеждане е неразрывно свързана с употребата на различни антибиотици и химиотерапевтици за терапия и метафилаксия.

Такава цел преследва автора на представения ми за рецензиране дисертационен труд, с претенция за получаване на научната степен „Доктор на науките”, което намирам за правилно и одобрявам.

Представеният за рецензиране труд е в обем от 309 машинописни страници и е структуриран съобразно с изискванията за оформяне на дисертационни трудове за получаване на научни степени, като включва разделите „Съдържание“ - 3 стр., „Въведение“ - 4 стр., „Литературен обзор“ - 97 стр., „Обобщение“ - 1 стр., „Цел и задачи“ - 3 стр., „Материал и методи“ - 30 стр., „Резултати“ - 66 стр., „Обсъждане“ - 40 стр., „Изводи приноси и препоръки“ - 7 стр., „Публикации свързани с дисертационния труд“ - 2 стр., „Литературен указател от 690 заглавия“ - 55 стр.

Литературният обзор обхваща разглеждането на антимикробните средства разделени по техния химически състав и механизъм на действие. При беталактамните антибиотици се съсредоточава върху въпросите по създаването на различни представители на тази група и тяхното значение за различните видове животни и хора, механизъмът на тяхното действие и промените в новосъздадените форми. Те са в съответствие с промените в механизма на резистентността изработван от бактериите, който се основава на производство на беталактамази, намаляване на импорта чрез промени в структурата на клетъчната стена и активен ефлукс. Тези подробни описания позволяват да се разбере причината за появата на резистентни щамове не само при патогенните микроорганизми, но и сред представителите на резидентната флора при животните и хората. Последователно разглежда и възможностите за пренос на резистентността чрез контролиращите я гени под формата на плазиди както и рисковете за хората като следствие от консумация на контаминирани продукти от животински продукти и контакти. Класификацията на бета лактамазните ензими, техното наименование и насочена дейност към съответните антибиотици представя в добре подредена таблица. Разглежда ензимите по класове, в които числеността им е различна и множествена и интерпретира различието в хромозомната и плазидна генна детерминираност. Отделя специално внимание на разпространението на беталактамазите от представители на Enterobacteriaceae сред различните видове животни, чийто спектър се увеличава и ареалът на разпространение се разширява в глобален мащаб. Посочва предимствата и недостатъците на методите за фенотипно определяне на беталактамазите продуцирани от устойчиви щамове към антибиотици включително и приложението на автоматизирани системи за целта. Заедно с това обръща внимание на прилагането на PCR за генотипно определяне на резистентността чрез откриване на съответни гени независимо дали са плазидно или хромозомно свързани. За целта разглежда няколко методи различаващи се по постановка и възможности.

Групата на аминогликозид-аминоциклиоли представя в пет подгрупи в зависимост от промените в химическият им състав. Тяхното действие след проникване в протоплазмата се състои в блокиране на 30S рибозоми и последваща неспособност за синтез на жизнено важни протеини. Разглежда механизмите на резистентност срещу антибиотиците основаващи се на намаляване пермабилитета на клетъчната стена, нарушения на импорта, активизиране на ефлукса и ензимно инактивиране на аминогликозидите. При разглеждане класификацията на ензимите в зависимост от техната модификация и генетични детерминанти, като отбелязва, че действието им са разпростира върху грамположителни и грамотрицателни бактерии, а генетичните им детерминанти се откриват както в хромозомите, така и в плазиди и особено в интегрони. Много подробности отделя на различните ензими относно тяхното действие срещу разни антибиотици от групата. Цитира много съобщения за причините за широкото дисеминиране на резистентността като акцентира на прекомерно интензивното използване на антибиотиците за терапия, профилактика и промишлени цели в животновъдните комплекси, с което се извършва широк селективен натиск не само върху патогенни видове но и върху резидентната микрофлора. В това отношение основно е значението на съответните гени, кодиращи производството на специфични ензими.

Третата група антибиотици, която разглежда са тези на тетрациклина. Отбелязва, че интересът към тях се състои в това, че се разглеждат като широкоспектърни терапевтици и растежни промотори. Тя се съсредоточава върху литературата, която проучва механизма на проникване през целуларната мембра на енергийно зависим и инхибиране на протеинния синтез чрез свързване с 30S бактерийни рибозоми. На внимание поставя приложението им в медицината и ветеринарномедицинската практика. Очертава предимствата им като широкоспектърни срещу грампозитивни и грамнегативни микроорганизми и лидерската позиция, която заемат сред антибиотиците употребявани във ветеринарната медицина, което става чрез включването им в метафилаксията при свине и птици. Относно механизмите на придобитата резистентност цитира активния ефлукс, протекцията на рибозомите и ензимно инактивиране, които са детерминирани от

гени широко разпространени сред бактерийте, разположени в хромозоми и плазмиди. Проследява механизма на резистентност при всяка една от тези дейности с много подробности. Отбелязва, че широко разпространение на гените на резистентност срещу тетрациклините е класически модел за възникването и след въздействие на селективната преса от употреба на антибиотици. От тук обръща внимание и на извода, че нараства ролята на резидентната микрофлора като резервоар и източник на разпространение на генетични детерминанти не само към тетрациклините.

За групата на макролиди и линкозамиди се спира на публикации третиращи въпроси, както в досега разгледаните. Тук механизма на действие на антибиотика се определя от свързването с 23Sr RNA и 50S рибозома и последващ резултат инхибиране на протеинов синтез и последващо бактериостатично и бактерицидно действие. Подобно срещу други антибиотици и срещу представителите на тази група микроорганизмите развиват резистентност, и което е изключително важно е резистентността на чревната флора от резидентни ентерококи придобита чрез редуциране на възможността на макролидите да се свързват с рибозомната мишена. Хоризонталния пренос на гени кодиращи резистентността се извършва при тази група чрез транспозони и плазмиди. Цитира автори според които в свиневъдството се селектира резистентност не само при ентерококите като коменсали, но и при патогенните микроорганизми. Посочва също, че рисковете за общественото здраве са на лице.

Групата на химиотерапевтиците представя в лицето на сулфонамидите, като посочва, че тяхната употреба предшества тази на антибиотиците. Отново отдава внимание на химическата характеристика на строежа им. Действието им определя като спъване на протеиновия синтез чрез инхибиране на ензимите участващи в синтеза на фолиевата киселина. Те имат бактериостатичен ефект срещу грампозитивни и грамотрицателни бактерии. Синтетични са и няма природни ензими, които да ги разрушават. Промените, които настъпват в микроорганизмите са в резултат на мутации, настъпващи след употребата им в практиката:

Специално внимание отделя на множествената резистентност определяна от интегроните като носители на генни касети и на способността им за бързо транспортиране между бактериите. Обяснението е в това че, наборът от гени в тях определя полирезистентността срещу антибиотици и химиотерапевтици от различен клас. Заедно с това посочва и обстоятелството, че те могат да се съдържат в представители на непатогенната резидентна флора, от които могат да се предават на патогенни микроорганизми. Литературният обзор завършва с обобщение, в което акцентира на моментите провокиращи целта на предвидените изследвания. За отбелязване е фактът, че в него цитира правителствени и междудържавни документи, третиращи въпросите на резистентността на бактерийте, препоръки за ограничаване на използването на антибиотиците и успехите на някои страни в това отношение.

Както вече отбелязах целта на изследванията е правилно поставена и за нейното решаване си поставя за решаване 6 задачи и 13 подзадачи формулирането, на които очертават обема на предвидените изследвания.

Разделът „Материал и методи“ обхваща разнообразен набор при различните изследвания чието използване е извършвано със солидни познания и вещина. Проучван е фенотипния и генотипния профил на резистентността на *E. coli* изолирани от свине и лагуни показващи резистентност срещу използваните антибиотици и химиотерапевтици от 7 различни свиневъдни стопанства в страната и от 4 лагуни към някои от тях. От 574 преби /470 фекални и 104 от лагуни/ изолира 540 резидентни *E. coli* съответно 449 от свине и 91 от лагуни. За изолиране на ентерококи изследва 280 фекални преби 60 от лагуни, от които изолира 234 щама от свине и 37 от пробите от лагуни. Изолирането и иденфицирането на *E. coli* извършва по стандартни процедури чрез полуавтоматичния метод при използването на системата CRISTAL (Becton- Dickinson). По стандартни методи прилагани при изолирането на ентерококи изолира и идентифицира *E. faecium* и *E. fecalis*. За всички видове изолати спазва изискванията на определени критерии представени в таблици, което гарантира точността на изследванията. Съобразно с най-новите изисквания извършва фенотипните изследвания за резистентност на щамовете чрез дискидифузионния метод на определянето на MIC прави чрез серийни разреждания в бульон и агар като условията които спазва също коректно представени в табличен вид. Продукцията на беталактамази с разширен спектър при *E.coli* определя чрез двоен дисков синергичен тест а за определянето на MIC използва E-тест Liofilchem от Индия.

При генотипните изследвания за определяне на резистентността извършва екстракирането на ДНК при следване на процедурите лизиране, въздействие с миещи

буфери и елюиране при спазване изискванията на производителя на компонентите. За амплифициране използва 7 различни гени, определящи резистентност към тетрациклин, стрептомицин, спектомицин, гентамицин, продукция на бета-лактамази всички при *E.coli* и определящи резистентност срещу еритромицин при *Enterococcus spp.* Тези действия извършва съгласно протокол, включващ съответен апарат и готови китове. Всички изследвания за амплифициране на различните гени са подчинени на необходимата последователност на процедурите ясно описани в раздела. Позитивните контроли са предоставени отrenomирани лаборатории в Полша. Общото впечатление, което добивам от представеното в този раздел е високата ерудираност на дисертантката, умението й да използва модерни методи на изследване и стриктното спазване на изискванията при изпълнението на всички процедури. Това естествено гарантира истинността на получените резултати.

Раздел „Резултати“. При определяне на фенотипния профил на резистентност на *E.coli* към антибиотици доказва постоянна тенденция за повишаването ѝ към всички антибиотици включени в изследването. Това се отнася за щамовете изолирани от всички групи свине от различните стопанства както и за щамовете изолирани от съответните лагуни. Изключение от високият процент резистентност срещу тях правят новите генерации антибиотици. Правилно намира, че устойчивостта в различните ферми нараства към системно употребяваните в тях антибиотици, но заедно с това установява множествена устойчивост към два до шест антибиотика и сулфонамиди, която се движи от 0.4% до 27.8% в изследваните 540 щама *E. coli* изолирани от свине и лагуни. Резултатите са представени в синтезиран вид в таблици и фигури с висока достоверност.

При генетичните изследвания намира почти пълно покритие с резултатите от фенотипните изследвания за резистентност към беталактамните антибиотици – 186 щама при фенотипни към 164 щама при генотипните. Резултатите към тях се кодират от гена bla TEM но не и от ген bla OXA -1. Не е така при резултатите получени при търсенето на гените aacC1 и aacC 2 детерминиращи резистентността към гентамицин. Изненадващо е, че съвпаденията с фенотипните намирания е с десетократна разлика или в абсолютен брой 64/7 и то само при ген aacC2 и въобще не намира наличие на aacC1.

При определяне генотипния профил на резистентността към тетрациклина установява различно разпространение на гените tetA и tetB. Така, докато при фенотипното определяне на 540 щама *E. coli* резистентните са 396 или 73.3% то при генотипното определяне те са 336, съответно открива ген tetA при 293 и при tetB 41 и два щама са носители на двета гена. Установява количествена разлика на резистентни щамове между различните групи свине (възрастови и технологични) и при изолираните от лагуни но с ясна тенденция при всички за увеличаване на резистентността.

Проследява разпространението на ген sul1 и на ген sul 2 кодиращи резистентност срещу сулфонамидите. Има данни и за ген int I определящ интегралния ензим в интегрони от клас 1. Двата гена намира като почти еднакво разпределени, но комбинация между двета открива само в 10.3 от изолираните щамове. И тук представя разпределението им в различните групи свине и торови лагуни. Интересни са данните от таблица 26 сочещи във всички случаи по-ниска резистентност кодирана от гени sul 1 в сравнение с тази кодирана от ген aad A1 и още по-ниска при наличие на комбинация на гените aadA1 и sul 1. Намира висока резистентност при носители на ген int I, макар че се намира сравнително рядко в изолираните щамове (14.3%), при което това са най-високите стойности при щамове изолирани от прасета за угояване.

Интересни са намиранията при изследването на резистентността на ентерокковите щамове принадлежащи към вид *E. faecalis* и вид *E. faecium*. Фенотипните изследвания на резистентността към включените в проучването антибиотици са представени в добре подредени таблици и графики. Правят впечатление намиранията, че има постоянно увеличение на количеството на резистентните щамове при изолатите от по-възрастните групи свине, което е в съответствие с проблемните заболявания при тях и включените за метафилаксията им антибиотици. Намира съответствия и в изолатите от торовите лагуни, което е очаквано тъй като замърсяването им идва предимно от свинете, включени в по-възрастовите групи.

Генотипен профил установява единствено за резистентност спрямо еритромицин. Открива ген ermB в най-висок % при групата свине за угояване и в торовите лагуни докато този процент е най-нисък при щамовете изолирани от бозаещите прасета. Има също висок, но не пълен % на съответствие между фенотипното доказване на резистентността и генотипа в полза на фенотипното откриване /Фиг. 27/.

В раздел „Обсъждане“ получените като резултат на обширните изследвания данни, дават възможност за задълбочени интерпретации. Те са направени като се съпоставят намиранията на други автори и изразяване на собствени становища и са в съответствие с общото становище, че резистентността на резидентните микроорганизми спрямо антибиотици и сульфонамиди показва непрекъсната тенденция към нарастване. Правилна е и констатацията, че първите заселници на чревния тракт на новородените са представители на резидентната микрофлора и сред тях има такива, които показват резистентност към антибактерийните средства. От сравнително малък процент в началния период от живота на новородените, с преминаване в следващите възрастови и технологични групи, в зависимост от използването на средствата за третирания тези проценти нарастват, което съвпада с намиранията и на редица други автори. Не пропуска да отбележи и постиженията в някои страни, в които тези средства са изключени от технологична употреба при отглеждане на животните, количеството на резистентните щамове от резидентната микрофлора намалява. Като имам предвид компетентността на доцент Урумова мисля, че тук тя би могла да изкаже становището си дали нарастването на количеството на устойчивите микроорганизми се увеличава чрез намаляване количеството на чувствителните в резултат от прилаганите третирания и съответно намножаване на резистентните или се появяват нови резистентни щамове. Този въпрос е важен, тъй като е необходимо да се осветли определението „селекционен натиск“ и доколко той влияе в двете посоки. Самата тя сочи, че в природата не съществува естествена резистентност срещу сульфонамидите, поради техното технологично създаване. Тогава резистентността, която намира в наши условия ли се създава или има внос на резистентни щамове от чужбина заедно с импорта на разплоден материал. Може би за това тя правилно посочва, че се налага да се създаде стройна система за концепция на антибиотичната ни политика в животновъдството с цел осигуряване възможност за реалистичен анализ и обективно оценяване на рисковете за общественото здраве. Важно е становището на дисертантката по отношение ролята на интегроните за преноса на генетичен материал при осъществяването на множествената резистентност. Тя е първа в нашите среди, която обръща внимание на проблемите в тази област и е редно да продължи тези си изследвания началото, на които вече е поставила. Необходим е коментар по факта, че не открива някои от търсените кодиращи резистентността гени срещу включените в изследванията антибиотици. Въпросът е дали причината е в използваните в реакцията праймери или има други, неизвестни гени кодиращи тази резистентност. Интересен би бил коментарът на доцент Урумова по отношение по-високата чувствителност на методите за фенотипен анализ на резистентността в сравнение с метода за генотипния анализ. Този коментар е необходим, тъй като съвсем естествено е да се очаква, че в резултат на представените ни данни от тези проведени на високо ниво изследвания, да последват предложения за промени в лабораторнодиагностичната дейност. Съществен момент в обсъждането на значението на хоризонталния трансфер на гените на полирезистентността на коменсалните чревни бактерии чрез хранителни продукти от животни на хора, в което дисертантката правилно заключава, че този процес е многопластов и се нуждае от по-нататъшни детайлни анализи, особено когато се касае за зоонозни микроорганизми. Въпреки, че намира различия в резистентността срещу някои използвани в момента нови форми на представители на отделните групи антибиотици и химиотерапевтици тя правилно предупреждава, че с оглед общата тенденция към повишаване обема и обхватата на резистентността сред бактериите е необходимо наблюденията към този процес да са постоянни, за да се оценяват правилно рисковете за общественото здраве и съответно да се осъществява ефективен контрол.

Ценни са намиранията на почти еднакво разпространение на резистентни микроорганизми в торовите лагуни в сравнение с тези изолирани от живи животни. С това Урумова насочва вниманието, че те са не по-малко важен фактор за разпространението им. Интересно би било тя да представи свои виждания за намаляване на този риск, в по-нататъшните си проучвания.

В резултат на многопосочните и обемни изследвания и получените резултати прави 18 изводи. Те отговарят напълно на постиженията й във всички показатели по различните раздели. От тях личи, че поставените за решаване задачи са завършили със съответен успех, с което съм напълно съгласен. Претенциите за приносите на брой 7 са в съответствие с изводите. Те са наистина оригинални, защото проучвания в из branите насоки се извършват за първи път в нашите среди и заслужават тези приоритети. Препоръките за практиката, които прави доцент Урумова са ценни, но до известна степен стандартни. Тяхното изпълнение може да стане само при технически и организационни

възможности в съответни лаборатории, служби и вземане на административни мерки. Мисля, че точно в такива авторитетни научни трудове тези необходимости трябва да бъдат релефно очертани и изпълнението им императивно наложено. От своя личен опит и широки връзки с практиката вярвам, че дисертантката е добила реална представа за състоянието на нещата в страната ни и за действителното изпълнение на препоръките, условието без което това не може да стане, са решителни мерки по създаване на възможности за реализирането им. Вижданията за тези необходимости можеха да намерят място поне в още една-две препоръки.

Публикациите, свързани с дисертационния труд са 14, от които 10 колективни и в 7 от тях е на първо място и в 3 на второ. Четири са самостоятелни. Категоричият извод е, че разработвания проблем е лично дело на дисертантката. Всички са на латиница с изключение на една, която е на български език. В чуждестранни списания и в материали от общи прояви са 9 с общ импакт фактор 1.147. От цитираните в литературния указател авторски заглавия 294 /43%/ са от последните 10 години и това сочи, че Урумова е в унисон със съвременото състояние на проблемите за резистентността на микроорганизмите към използваните за борба с тях медикаменти. Гореизброените показатели отговарят на изискванията за положително окачествяване на дисертационния труд за получаване на научната степен „доктор на науките“. Изискваните документи по защита на дисертационния труд са правилно представени със съответно подреждане.

В заключение намирам, че дисертационният труд на тема „Фенотипни и генотипни характеристики на резистентността към антимикробни средства при резидентни *Escherichia coli* и *Enterococcus spp*, изолирани от интензивно отглеждани свине в Р. България“ с автор доцент д-р Валентина Стаматова Урумова, доктор, е лично нейно дело, напълно завършен е, има съответни приноси изисквани за присъждане на научната степен „Доктор на науките“, съгласно Закона за усъвършенстване на академичния състав в Република България, поради което препоръчвам на членовете на уважаемото Научно жури да гласуват положително за присъждане на научното звание „Доктор на науките“ на доцент д-р Валентина Стаматова Урумова от катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“ към Ветеринарномедицински факултет, Тракийски университет, Стара Загора.

08.01.2017 г.
София

Рецензент:

/ Проф. д-р Николай Масалски, двМН /