



ДО  
ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА  
НАУЧНОТО ЖУРИ  
ДО  
НАУЧНИЯ СЕКРЕТАР НА  
ТУ-ВМФ,  
СТАРА ЗАГОРА

## СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Грозданка Томова Лазарова, специалист по Микробиология , Ръководител катедра Микробиология и паразитология при Медицински факултет, Тракийски Университет – Стара Загора, определена със Заповед № 2882 от 16.11. 2016 г. на Ректора на Тракийски Университет за член на научно жури за оценяване дисертационен труд на тема „ Фенотипни и генотипни характеристики на резистентността към антимикробни средства при резидентни *Escherichia coli* *Enterococcus spp.* , изолирани от интензивно отглеждани свине в Р.България“ разработен от доц. д-р Валентина Стаматова Урумова , Ветеринарномедицински факултет на ТУ-Стара Загора .

Предложението ми за оценяване дисертационен 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“** е написан на 309 стандартни машинописни страници и е структуриран съгласно общоприетите изисквания за оформяне на дисертационни трудове за получаване на научни степени. Той включва разделите Съдържание, Въведение - 4 стр., Литературен обзор - 95 стр., Цел и задачи -3 стр., Материал и методи , Резултати - 68 стр., Обсъждане - 40 стр, Изводи и приноси , Публикации свързани с дисертационния труд и Литература – 55 стр. Последният включва списък от 660 заглавия на статии от водещи автори по проблема, по-голямата част от които – от последните 10 години.

Възникването и разпространението на механизми на резистентност към антимикробни средства , както при патогенни щамове , така и сред представителите на резидентните микроорганизми , най-вече сред щамове *Escherichia coli* и *Enterococcus spp.* представлява сериозен риск за общественото здраве. Това важи особено при възможност за трансфер на механизми на резистентност по хода на хранителната верига от селскостопанските животни, предназначени за продукция. Най-често това селектиране на резистентни щамове се реализира в условията на интензивно отглеждане птици и свине.

Част от превантивните мерки, които могат да ограничат този биологичен феномен са националните и международни мониторингови програми за надзор над този процес. Чрез тях държавните институции биха могли , въз основа на обективен анализ на циркулиращите резистентни щамове в отделните региони и консумацията на антибиотици , да получат актуални данни за мащабите на явлението, а също така те да бъдат използвани като база за коректен анализ и въвеждането на адекватни мерки. В редица от страните, членки на Европейския съюз, такива данни се представят както за зоонозните бактерии, като *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, така и за представители на резидентната микрофлора.

В Р България няма изградена система, която да събира и анализира данни , свързани с разпространението на резистентни към антибиотиците и химиотерапевтици щамове, представители на сем. *Enterobacteriaceae*, изолирани от стопански животни или от домашни любимици, които крият риск от предаване , поради търде интимния контакт с человека в нормалното му битуване.

В този смисъл дисертационния труд, представен от доц. В. Урумова, свързан с фенотипни и генотипни проучвания на антимикробната резистентност при резидентни колибактерии и ентерококки, изолирани от свине е безспорно изключително актуален.

В литературния обзор са включени общите характеристики и приложението на отделните групи антимикробни средства във ветеринарната медицина, проучвани в последните десетилетия от

голям брой изследователи. Представени са значителен брой съвременни данни, отнасящи се най-вече до генетичните детерминанти, определящи резистентността към антимикробните средства. Специално място е отделено на определени генетичните платформи, детерминиращи множествената резистентност към антибиотици и химиотерапевтици, и в частност са представени структурните особености и механизмите на разпространение на интегроните от клас 1 при щамове *E.coli*.

Целта на дисертационния труд на Д-р В.Урумова е формулирана правилно . За нейното осъществяване са поставени общо 6 основни задачи с 13 подзадачи, които определят обема на извършените изследвания. Всички тези задачи са ясно и точно дефинирани.

Разделът “Материал и методи” представя един твърде многообразен аспект от специфични изследвания, свързани с идентифицирането на колибактериите и ентерококите, както и изпитване отнасянията им към няколко класа антимикробни средства, широко прилагани в интензивното свиневъдство. Акцентът обаче е поставен върху проучването на генотипния профил на резистентността с откриването на неговите детерминанти и медиатори.

Анализирани са общо 574 щама *E.coli* , от които 470 - анални тампонни преби и 104 - преби от торовите лагуни в изследваните 7 интензивни свиневъдни стопанства в различни региони на страната. Броят на изолатите, включени в микробната сбирка е 540 щама *E.coli* , от които 449 са изолирани от свине и 91 щама от торови лагуни. За изолиране на ентерококите са изследвани 280 анални тампонни преби от свине и 60 преби от лагуни в изследваните 4 от същите стопанства. Броят на spp. изолати е : 234 щама от свине и 37- от пробите от лагуните. Броят на изследваните щамове от двата микробни вида е значителен , което предопределя една неоспорима представителност на данните и достоверност на изводите.

Изолирането и идентифицирането на щамовете е извършено с конвенционалните микробиологични методи , включващи и използването на полуавтоматичната система за идентификация CRYSTAL/BD, USA. За анализ на фенотипните методи на резистентност към антибиотици и химиотерапевтици при *E.coli* и

*Enterococcus spp.* щамовете са извършвани конвенционални фенотипни схеми , като двоен дисков метод за синергизъм, както и определянето на MIC на антимикробните средства: Ceftazidime и Cefotaxime , самостоятелно , и в комбинация с бета-лактамазен инхибитор ( клавуланова киселина) , Broth microdilution test , Agar dilution test , E-test . В проучванията на резистентни изолати , за контрол на методите са използвани еталонни контролни щамове : *E.coli* ATCC 25922 и *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

При генотипните изследвания са използвани два принципа: конвенционален PCR и qPCR. Представените протоколи за qPCR се отнасят до амплифицирането на 7 от изследваните генетични маркери и са свързани с оценка на резистентността към цефалоспорините от трета генерация, а също гентамицин, стрептомицин, спектиномицин, тетрациклин и еритромицин. По аналогичен начин са представени протоколите чрез конвенционален PCR за амплификация на още 7 от изследваните гени, отнасящи се до резистентността към аминопеницилини, цефалоспорините от първа генерация, както и стрептомицин, сулфонамиди, а също така и до структурите на интегроните от клас 1.

Като резултат от проведените сравнителни проучвания при **патогенни щамове *E.coli*** за два различни периода е установена ясно изразена тенденция на нарастване относителния дял на резистентни към ампицилин, гентамицин, стрептомицин, спектиномицин и тетрациклин щамове. Най-силно е нараствал процентът на щамовете, показващи устойчивост към енрофлоксацин/ципрофлоксацин.

При щамовете *E.coli*, представители на резидентната чревна микрофлора, най-високи нива на резистентност се установяват спрямо тетрациклиновите антибиотици, стрептомицина, спектиномицина, относително по-ниски са процентите на устойчивост към ампицилин, амиксицилин/клавуланова киселина, гентамицин, и цефалотин , а най-ниски - към цефалоспорините от трета генерация. Нивата на регистрираната антимикробна резистентност са различни за различните свиневъдни стопанства и са в корелативна зависимост

от величината на селективния натиск, свързан с тяхната употреба.

Най-високи средни проценти на резистентност при всичките обследвани свиневъдни стопанства се установяват за щамовете, изолирани от подрастващите прасета и прасетата за угояване. Доказано е още, че торовите лагуни около свиневъдните стопанства са важна екологична ниша, в която се съхраняват *E.coli* щамове, показващи сходни нива и почти идентично разпределение на резистентността с щамове, изолирани от прасетата за угояване. Тези нива корелират със средните, установени в съответното стопанство за различните антимикробни средства.

Важен резултат в дисертационния труд, според мен, е изводът, че въпреки нарастващата употреба на цефалоспорините от трета и четвърта генерация, фенотипния анализ на *E.coli* щамовете, произхождащи от проучваните седем свиневъдни стопанства, извършен чрез няколко алтернативни теста, показва наличие само на единични изолати с характеристиките на пордусенти на бета-лактамази с разширен спектър на действие (ESBL).

Специално внимание заслужава и установеният при проучването факт, че при близо една трета от резидентните *E.coli*-щамове, изолирани от свине, се доказва наличие на ген *bla* тем, докато при нито един щам *E.coli*, резистентен към ампицилин, цефалотин и амоксицилин / клавуланова киселина не се установява наличие на ген *bla oxa-1*. Най-широко разпространение на *bla* тем-гени има сред *E.coli*, щамовете, изолирани от подрастващи прасета и то при тези които фенотипно проявяват устойчивост само към ампицилин. Повече от половината от анализираните *E.coli*-щамове, показващи резистентност към стрептомицин и спектиномицин носят ген *aadA1*, а при повече от една трета от тях се открива ген *strA/strB*, отговорен само за резистентността към стрептомицин. При нито един от резистентните към гентамицин колищамове не се доказва наличието на ген *aacC1*, а само при 1.3 % от тях се установява наличието на ген *aacC2*, който освен към гентамицин определя и резистентност, към канамицин, тобрамицин и нетилмицин.

Сред щамове, резистентни към тетрациклин, е доказано най-често наличие на ген *tet(A)*, който доминиращо присъства при изолатите от прасетата за угояване. Наличие на другия генетичен детерминант, отговорен за резистентност към тетрациклини - *tet(B)*, се потвърждава много по-рядко. Комбинацията от двата ефлуксни гена е установена в единични щамове, изолирани само от прасетата за угояване.

Гените *sul1* и *sul2* детерминиращи резистентност към сулфаметоксазол имат почти едно и също разпространение сред резидентните колибактерии, изолирани от свине, а комбинацията от двата гена се открива почти два пъти по-рядко. Най-голям резервоар на гени на резистентност и с най-голямо генетично разнообразие са резидентните колибактерии при подрастващите прасета и прасетата за угояване. Такава роля имат и торовите лагуни.

При ентерококите от видовете *E. faecalis* и *E. faecium* от чревния тракт на здравите свине фенотипно най-високи проценти на резистентност се установяват спрямо тетрациклина и еритромицина, а най-ниски - спрямо ампицилина. Не се откриват такива, резистентни към гентамцин.

При ентерококите доминиращо е доказано и наличието на ген *ermB*. Най-широко разпространение на този генетичен детерминант има сред щамовете, изолирани от торовите лагуни, следвано от тези, произхождащи от свинете за угояване.

В разделът „Обсъждане“ получените резултати са интерпретирани професионално в контекста на данни и становища и на други изследователи по проблемите на резистентността.

В резултат от проучването са направени 18 извода и са изведени 7 приноса, от които 5 са определени като оригинални, с които съм напълно съгласна. Формулирани са и 6 базови препоръки за практиката, които също считам като особено полезен принос от разработката. Получените от изследванията резултати, доц. Валентина Урумова е публикувала в 14 научни статии и съобщения, 8 от които са в периодични научни издания с импакт-фактор.

Познавам доц. д-р В. Урумова от близо 20 години като изключително целенасочен, съвестен и трудолюбив преподавател

и учен . Тези мои лични впечатления произлизат и от взаимното сътрудничество на катедрите по Микробиология и съвместната ни работа по проблемни щамове *Enterococcus spp.* и *Salmonella spp.*, причинители на зооантропонози. Поради това съм убедена в точността и коректността на нейните резултати , предвид отговорността й на учен-изследовател, доказал се в областта на ветеринарномедицинската микробиология.

**В ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Дисертационният труд на доц. д-р Валентина Стаматова Урумова 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“ представлява солидна разработка от областта на ветеринарната микробиологи, предоставяща резултати с безспорна научна стойност и обществена полезност. Проведените комплексни проучвания, касаещи фенотипни и генотипни анализи на антимикробната резистентност при резидентни за свинете щамове колибактерии и ентерококки са извършени на най-съвременно методологично ниво и в обем гарантиращ тяхната достоверност. Направените изводи и препоръки са коректни и изключително полезни. Поради всичко посочено ,считам, че дисертационния труд е мащабно проучване върху значими за теорията и клиничната практика труд .

Оценявам високо постигнатото и давам своя положителен вот ,като препоръчвам и на останалите членове на научното жури да се присъединят към мнението ми за присъждане на научното звание „Доктор на науките“ на доц. д-р Валентина Стаматова Урумова.

22.12.2016 г.  
Стара Загора

Проф. Д-р Грозданка Томова Лазарова, д.м.

