

498 10.01.2017

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Теодора Петрова Попова, двМН

от ЛТУ-София, ФВМ, Катедра „Инфекциозна патология и ХТКХЖП“

за дисертация за присъждане на научната степен „Доктор на науките“ 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

на доц. д-р Валентина Стаматова Урумова

от ВМФ на Тракийски университет в Стара Загора

Дисертационният труд е представен на 309 страници, като това е напълно достатъчен обем за такава дисертация. Трудът е оформлен добре съгласно общоприетите изисквания и включва необходимите раздели, общо 11 на брой. След заглавната страница и съдържанието (общо 4 стр.) следват въведение, което е представено на 4 стр., литературен обзор, обхващащ 96 стр., цел и задачи – на 3 стр., използваните материали и методи са описани на 28 стр., получените резултати са отразени на 67 стр., обсъждането – на 42 стр., включващо обобщение на 3 стр., направените изводи са 18 на брой, представени на 4 стр., приносите – 7 на брой на 1,5 стр., след които на 1,5 стр. са формулирани 6 препоръки за практиката, на следващите 2 стр. са представени публикациите във връзка с дисертационния труд (14 на брой), а литературният указател обхваща 690 източника, описани на 56 стр.

Темата на представения проект за дисертация е особено актуална, тъй като нарастването на антибиотичната резистентност днес достига пандемични размери. Клиничният и търговският натиск за използване на антибиотици при хора и животни, глобалната мобилност на населението и храните, са основни фактори за разпространението на полирезистентни бактериални клонове и гени за устойчивост, което неминуемо ще продължи и в бъдеще. Това се отнася и за проблема за пренасяне на резистентни бактериални щамове, включително и патогенни, от животните на хората посредством хранителните продукти от животински произход. Това са предимно

представители на семейство *Enterobacteriaceae* и главно вида *Escherichia coli*, както и ентерококи, стафилококи и др. Мониторингът напоследък показва, че антибиотикотерапията индуцира развитие на устойчиви мутанти не само при причинителите на инфекции, но и при представителите на нормалната микрофлора на пациентите, както и в околната среда. Резистентността обхваща и най-значимите за терапевтичната практика групи антимикробни средства като бета-лактамните антибиотици и дори цефалоспорините от последните поколения, аминогликозидите, тетрациклините, флуорохинолоните и сулфонамидите. Създадени са редица инициативи с цел насърчаване на разумното използване на антимикробни средства. Лабораторната микробиологична диагностика и тестването за чувствителност към антибиотици и химиотерапевтици при избора на терапия трябва да се използват все повече за стимулиране на правилното приложение на тези средства. Нужно е осъществяване на постоянен мониторинг на чувствителността на клинични бактериални щамове към широкоспектърни антимикробни лекарства с доказан ефект и към техни производни и аналоги с оглед преценка на перспективността им за приложение в съвременната терапия на инфекциите. Изборът на агенти за лечение на съответните инфекции постоянно намалява. Това води до повишена заболеваемост и смъртност, както и до нарастване на разходите за здравопазване. На това тревожно явление са посветени редица световни форуми през последните години като Срещата на върха на Световната ветеринарна асоциация, проведена през октомври 2011 г. по време на Световния ветеринарен конгрес в Кейптаун, Южна Африка, организирана с подкрепата на високо ниво на FAO (Food and Agriculture Organization), Световната организация за здравеопазване на животните (World Organization for Animal Health) и Световната здравна организация. Изтъкнато е, че управлението на риска от устойчивост трябва да бъде стабилно базирано на научна оценка и да се извършва мониторинг на резистентността. Всеки е засегнат и е отговорен да работи за запазване на ефективността на антимикробните вещества (World Veterinary Association, 2011). Нивото на интерес към микробната резистентност, генерирано от Европейския ден на антибиотиците, който се провежда всяка година на 18 ноември, продължава да расте. Едно от най-значитените събития в тази насока е стартът на План за действие срещу микробната резистентност на Европейската комисия, излагащ 12 конкретни мерки през следващите пет години. В Комюнике на Австралийската ветеринарна асоциация (AVA) от 12.11.2012 г., публикувано по време на провеждане на първата по рода си Австралийска седмица за безопасно приложение на антибиотиците (12-18 ноември

2012), се подчертава отговорната роля на ветеринарномедицинската дейност за намаляване на появата и разпространението на устойчивост към антимикробни средства. Микробната резистентност е темата и на Световния ветеринарен ден през 2012 г. (BVA, 2012). Поради тревогата от тази криза, Световната здравна асамблея през май 2015 прие нов Световен план за действие относно тази резистентност, който очертава пет стратегически цели. Целта на проекта е да се гарантира за възможно най-дълго време успешно лечение и превенция на инфекциозните заболявания с ефективни, безопасни и качествени лекарства, използвани по отговорен начин и достъпни за всички, които се нуждаят тях.

Извършените проучвания, представени в дисертационния труд, обхващат над четири годишен период и са проведени върху микроорганизми, изолирани от 7 свинекомплекса в различни райони на нашата страна. Представеният труд е една актуална и полезна съвременна разработка, имаща за цел да изясни разпространението и генотипните характеристики на антибиотичната резистентност при резидентни *Escherichia coli* и *Enterococcus* spp. у нас.

Въведението много добре насочва към проблема за селектирането и разпространението на микробни щамове, показващи резистентност и полирезистентност към антимикробни средства, разрастващ се поради масираната им употреба в съвременното интензивно животновъдство. Изтька се необходимостта от мониторинг и контрол на тяхното разпространение поради все по-трудната терапия на инфекциите и риска за предаване на съответните генетични детерминанти за резистентност от животните към околната среда и към микробните популации на човека по хранителната верига.

В литературния обзор е направена подробна характеристика на основните групи използвани във ветеринарномедицинската практика химиотерапевтични средства и на механизмите на микробна резистентност към тях. Обстойно са разгледани бета-лактамните антибиотици (пеницилини и цефалоспорини), бета-лактамазите и чувствителността им към бета-лактамазни инхибитори, както и разпространението им при представители на сем. *Enterobacteriaceae*, изолирани от животни. Описани са аминогликозид-аминоциклическите, употребата им във ветеринарномедицинската практика, механизмите на бактериална устойчивост към тях - аминогликозид-модифициращите ензими, детерминиращите ги гени и епидемиологията на

аминогликозидната резистентност. Отразени са също основните данни за тетрациклиновите антибиотици, приложението им в хуманната и ветеринарната медицина, главните механизми на резистентност към тези антибиотици, детерминиращите ги гени, както и разпространението на тетрациклиновата резистентност и нейното значение за общественото здраве. Следва характеристика на макролидните антибиотици, линкозамидите и стрептограмините. Представени са тяхната структура, спектъра и начините на действието им, употребата им във ветеринарномедицинската практика и механизмите на бактериална устойчивост към тях, включително при ентерококите и някои други актуални зооантропонозни бактерии. Отразени са и някои основни химиотерапевтици като сульфонамидите, както и хромозомно и плазмидно детерминираната микробна устойчивост към тях. Ръзгледани са също важни генетични фактори като интегрони и мобилни касети и ролята им за разпространението на полирезистентност сред резидентни колибактерии при селскостопанските животни. В обобщението на представените литературни данни, с което завършва обзора, е изтъкната ролята на масовата употреба на антибиотиците и химиотерапевтиците от различните класове при хората и при животните като основен фактор за нарастващата резистентност на бактериите. Подчертава се значението на тяхното изучаване в различни аспекти с оглед разработването на ефективни системи за справяне с проблема. Изтъкнато е значението на проучването на ролята на резидентната микрофлора като резервоар на различни генетични детерминанти на резистентност, както и изучаването на предпоставките и механизмите за трансфер на гени за устойчивост между микробните видове.

От тази информация произтича целта на дисертацията, а именно да се направи проучване, анализ и оценка на някои фенотипни и генотипни особености на резистентността към основните групи антимикробни средства на резидентни щамове *Escherichia coli* и *Enterococcus* spp., изолирани от различни категории свине и от заобикалящата ги среда. За изпълнението на тази цел са очертани **6 основни задачи**, включващи създаване на колекция от резидентни колибактерии и ентерококки, изолирани от различни възрастови и технологични групи свине и от торовите лагуни в свинефермите, както и извършване на фенотипен и генотипен анализ на устойчивостта им към антибиотици и химиотерапевтици.

В раздела **Материали и методи** са описани изследваните **седем големи свиневъдни стопанства** в България и антибиотичната политика в тях. Проучванията обхващат четиригодишен период, от началото на 2012 г. до началото на 2016 г.

Изследванията са върху фенотипния и генотипния профил на резистентността на резидентни щамове на *E. coli*, изолирани от свине и от торови лагуни в тези стопанства. В четири от тях са направени такива проучвания върху устойчивостта на резидентни щамове ентерококи, изолирани от свине и от торови лагуни. За изследванията на резистентността на щамове на *E. coli* са получени общо 574 преби, от които 470 анални тампонни преби от здрави животни от различни категории и 104 преби от торови лагуни. Изследвани са 540 бактерийни изолата, всичките определени като резидентни щамове от вида *E. coli*, от които 449 са от свине и 91 - от лагуни. За изследванията на *Enterococcus spp.* са получени 280 анални тампонни преби от свине и 60 преби от торовите лагуни. Анализирани са общо 271 щама (168 *Enterococcus faecalis* и 103 *Enterococcus faecium*), от които 234 от свине и 37 - от лагуни.

Хранителните среди и тестове, използваните за изолиране и идентифициране на колибактериите и ентерококите, са класически и съвременни, правилно подбрани. Те са произведени от водещи фирми в световен мащаб, което е гаранция за точността на получените резултати. Фенотипният анализ на чувствителността на изолираните бактерии към антимикробни средства обхваща 11 такива средства от 5 класа, използвани в терапията и метафилактиката на бактериалните инфекции при свинете. Приложени са класическите диск-дифузионен метод, както и определяне на минималните инхибиращи концентрации. За контрол на тези методи коректно са използвани контролни бактериални щамове – *E. coli* ATCC 25922 и *E. faecalis* ATCC 29212. При оценката на резултатите при определяне на МИК са взимани пред вид препоръчителните граници на разреждането на използваните антибиотици съгласно EUCAST (2015) за тестваните видове бактерии. За определяне на продукция на бета-лактамази с разширен спектър на действие при щамовете на *E. coli* са използвани съвременни фенотипни методи. Подробно са описани и приложените генетични методи, китове и позитивни контролни щамове за установяване на гени за резистентност при изследваните колибактерии и ентерококи.

Резултатите са представени в последователност, съответстваща на поставените задачи. Те са добре описани и отразени в 23 таблици (от № 9 до № 31) и 27 фигури, от които ясно могат да се видят и сравнят получените данни. В първия подраздел освен данни за периода на изследването 2012 - 2016 г. са представени и такива за резистентност сред изолирани от свине патогенни щамове *E. coli* за два други периода – 2000 - 2004 г. и 2010 - 2015 г. Направено е сравнение на развитието на устойчивост и е изтъкнат селективният натиск в антибиотикотерапията в интензивното свиневъдство

през последните години. Установено е нарастване на процента на резистентните щамове към повечето от изследваните антимикробни средства през последните години, особено през периода 2010 - 2015 г. Регистрирани са различия в устойчивостта на бактериите в отделните изследвани свинекомплекси. Фенотипният анализ на резистентността при изследваните представители на вида *E. coli* в свиневъдните стопанства включва и определяне на кумулативните проценти на минималните инхибиращи концентрации на осем от тестваните антимикробни вещества, както и установяване на доминиращите картини на резистентност.

Във втората част от раздела „Резултати“ са представени данните, получени при изследванията на генотипния профил на резистентността към няколко антимикробни средства при резидентни щамове на *E. coli*, изолирани от свине и от торови лагуни. Установено е носителството на определени гени за резистентност. Генетичните изследвания са добре онагледени и със снимки на електрофоретични профили на амплификационните продукти на изследваните гени. Получените резултати са подробно описани и ясно представени нагледно в таблици и фигури.

Третата част от този раздел представя резултатите от изследванията на фенотипния профил на устойчивостта към антимикробни средства при резидентни ентерококи, изолирани от здрави свине от различни категории и от торови лагуни. В последната част от раздела „Резултати“ са представени данните, получени при изследванията на генотипния профил на резистентността към еритромицин при ентерококковите щамове.

В раздела „Обсъждане“ са дискутирани резултатите от различните групи изследвания. Този раздел от дисертационния труд също е правилно структуриран в последователност, следваща задачите и съответните на тях резултати от предходния раздел. Дадени са обяснения на получените данни и са направени сравнения с резултати от други автори извън нашата страна. Личи добрата информираност на автора по отношение на схемите на метафилактика и терапия с антибиотици, прилагани в свиневъдството у нас при отделните възрастови категории животни и в случаи на различни инфекции. Разделът завършва с обобщение на резултатите от извършените фенотипни и генотипни анализи на устойчивостта при колибактериите и ентерококите, изолирани от здрави свине и от торови лагуни. В него се изтъква установената висока резистентност на изследваните щамове на *E. coli* към тетрациклиновите антибиотици, следвана от тази към аминогликозидите стрептомицин и спектиномицин. Подчертава се превалентността на детерминиращите ги гени, особено при свинете за утоляване и в

торовите лагуни, където очевидно се осъществява генетичен обмен. Съществен резултат е установеното ниско ниво на резистентност към гентамицин и стрептомицин при ентерококите, което показва, че в настоящия момент у нас не съществува риск за разпространение на такава устойчивост в околната среда и хранителните продукти от животински произход. Такъв обаче може да се очаква във връзка с установената макролидна резистентност при тези бактерии.

От резултатите от значителните по мащаб изследвания авторът е направил **18 извода**. Те ясно отразяват най-същественото от получените резултати. **Приносите** на дисертационния труд са седем, пет от които са оригинални за нашата страна и два – потвърдителни. От дисертацията произтичат **шест препоръки за практиката** с ценна практическа насоченост, от които би имало значителна полза за ограничаване и контрол на микробната антибиотична резистентност в свиневъдството у нас.

Представени са **14 публикации** във връзка с дисертационния труд. Осем от тях са отпечатани в чуждестранни списания на английски език (пет от тях с импакт фактор, който е общо 1,836 и три с импакт ранг – общо 0,534), една е в сборник от научна конференция в чужбина, четири от публикациите са също на английски език в български научни списания и една е на български в сп. „Животновъдни науки“. В 7 от тях авторът на дисертацията е водещ, а четири са самостоятелни (три от тях са с импакт фактор), от което личи неговото значително лично участие при разработването на настоящия труд. Представени са 11 цитирания, 5 от които са в списания с импакт фактор, като този фактор от цитатите е 5,191.

Дисертацията завършва с **литературен указател**, в който са включени 690 източника. От тях 4 са на кирилица и 686 – на латиница. Девет продента от източниците са от последните пет години, а заедно с тях тези от последните 10 години са общо 27%.

Нямам критични бележки по същността на дисертационния труд, по отношение на количеството извършени изследвания, използваните материали и методи, получените резултати, тяхното представяне и анализ, изводи, приноси и препоръки за практиката. Това е един значителен, актуален и стойностен труд. Много повече обаче би могло да се желае по отношение на написването му. Би могло да се положат усилия за стиловото му усъвършенстване и за отстраняване на множеството правописни и печатни грашки. Желателно би било и да се отстроят и някои терминологични грешки. Например на много места бозаещите прасета са отразени като „бозайници“ (категория

животни, обхващаща всички млекопитаещи), напр. на стр. 113 в средата, стр. 142 и 143, в табл. 14 и 15 на стр. 153 и 154, на стр. 172 долу, на стр. 174, 180 долу, 185 долу, 205 горе и в извод № 11 на 247 стр. ■ Прави впечатление отъствието на списък с използваните съкращения, който традиционно се прилага в началото на дисертациите, макар че липсата на такъв не е проблем за специалистите, които го четат. ■ Литературният обзор е необичайно обширен, но това не би трябвало да се счита за недостатък, тъй като е личен избор на автора и показва добрата му литературна осведоменост. Добре би било включването на повече автори от последните 5-10 години, тъй като прави впечатление малкият им дял за сметка на преобладаващото количество автори от миналия век. ■ Като слабост може да се оцени недостатъчното включване на литературни източници от български автори (само четири източника на кирилица), а такива не липсват. Например в областта на антибиотичната резистентност на патогенни бактерии в свиневъдството у нас от години работят проф. Симеон Йорданов и доц. Албена Димитрова от НДНИВМИ-София, които не са цитирани. ■ Показаните в литературния обзор и в „Материали и методи“ схеми и протоколи би могло да се представят като фигури и таблици със съответната номерация, напр. на стр. 46, 101, 102, 130-134. ■ Пропуснато е да се посочи произхода на някои от използваните материали като напр. IMViC-теста на стр. 114, реактива на Ковач и тези за MR и VP на стр. 115. ■ Направеното подробно описание на биохимичните тестове е излишно, тъй като те са класически и добре известни, както и на диск-дифузионния метод на стр. 119. ■ В „Материали и методи“ не е отразен използвания метод за изчисляване на статистическата достоверност на резултатите. ■ Заглавията на някои от таблиците и фигурите не са достатъчно прецизирани, като напр. на табл. 8 на стр. 125, фиг. 1 на стр. 159, фиг. 4 на стр. 161. ■ Част от годините, включени в двата сравнявани периода (2010-2015 и 2012-2016 г.) се припокриват (табл. 9 на стр. 138), като в случая би трябвало да се съпоставят периодите 2010-2011 и 2012-2016 г.. ■ В разделите „Резултати“ и „Обсъждане“ при отразяване на данните от фенотипните изследвания за резистентност процентите на установените устойчиви щамове са поставени в скоби, което не е необходимо. ■ В раздела „Резултати“ при посочване на изследваните свиневъдни комплекси не е нужно навсякъде след съответните номера да се изписват в скоби и имената им. ■ При данните за статистическата достоверност на резултатите не става ясно за разликите им с кой от показателите се касае. Вероятно разликите са спрямо най-ниската отчетена стойност, най-често при бозаещите прасета, но това би било добре да се посочи (в табл. 15 на стр. 154, в текста горе на стр. 156, табл. 19 на стр. 169, в текста долу на стр. 169). ■

стр. 173 и горе на стр. 174, в табл. 21 на стр. 174, табл. 22 на стр. 178, табл. 24 на стр. 189, табл. 25 на стр. 189, табл. 26 на стр. 191, табл. 27 на стр. 193, табл. 31 на стр. 202). • На табл. 20 (172 стр.) и 23 (188 стр.) липсват означения съгласно дадената легенда, а на табл. 30 (200 стр.) е пропусната легендата с названията на антибиотиците. • В същата таблица 20 са представени 64 резистентни шама, а в текста под нея се посочват като такива 65 шама. • В раздела „Обсъждане“ някои пасажи са дадени като резултати, напр. на стр. 204.

Посочените бележки по никакъв начин не омаловажават високата стойност на дисертационния труд, който е значим, актуален и съвременен.

В заключение считам, че представеният от доп. д-р Валентина Стаматова Урумова дисертационен труд е напълно достатъчен по обем, изпълнен компетентно на високо ниво и заслужава висока оценка. Той представя извършен за пръв път в България комплексен фенотипен и генотипен анализ на резистентността към основни класове антимикробни средства на шамове *Escherichia coli* и видове от род *Enterococcus*, представители на резидентната чревна микрофлора на различни възрастови и технологични категории свине и изолати от торови лагуни около свиневъдни столованства. Темата е особено актуална и с важна практическа насоченост, както и използваният материали и методи. Литературната осведоменост на автора е много добра. Изследваниета са изпълнени на съвременно ниво, а получените резултати са представени и анализирани компетентно. От тях произхождат много полезни за практиката препоръки. Трудът отговаря в значителна степен на препоръчителните критерии за получаване на тази научна степен, заложени в Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за развитие на академичния състав в Тракийския университет. Това ми дава основание да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури да гласуват за присъждане на научната степен „Доктор на науките“ по научната специалност „Ветеринарна микробиология“ на доп. д-р Валентина Урумова.

30.12.2016 г.

гр. София

Изготвил:

(проф. д-р Т. Попова, двми)