

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“

Мая Ангеловска

Разпространение и характеристика на ентеропатогенни щамове *Y.*
enterocolitica, изолирани от свине

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен „доктор“

Област: Природни науки, математика и информатика
Професионално направление: Биологични науки Научна
специалност: 01.06.12 Микробиология

Научен ръководител: чл.-кор. Христо Найденски, д-р

София, 2023

Дисертационният труд съдържа 157 страници, съдържаща се от 26 фигури и 16 таблици. Цитирани са 294 източника. Дисертационният труд е одобрен и насрочен за защита от Националния семинар по „Инфекциозна микробиология“ при Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН, чието заседание беше проведено на 25.09.2023 година. Докторантът е отчислен с право на защита със Заповед № I-79 /30.6.23 година на директора на ИМикБ – БАН, Проф. д-р Пенка Петрова, дн.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на от..... в заседателната зала на Института по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“ бл. 26 на открито заседание на Научно жури.

Материалите по защитата са налични в на разположение в ИМикБ – БАН и са публикувани на интернет страницата на ИМикБ – БАН.

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“

Мая Ангеловска

Разпространение и характеристика на ентеропатогенни щамове *Y.*
enterocolitica, изолирани от свине

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен „доктор“

Област: Природни науки, математика и информатика Професионално
направление: Биологични науки Научна специалност: 01.06.12
Микробиология

Научен ръководител: чл.-кор. Христо Найденски, д-р

Членове на научното жури: Проф. Мария Ангелова, д-р
Доц. д-р Виолета Вълчева
Акад. Ангел Гълъбов, д-р
Проф. Румен Караколев д-р
Доц. д-р Михаил Илиев

София, 2023

Използвани съкращения

ДНК –	PBS – фосфатно буферен разтвор
дезоксирибонуклеинова киселина	TSB/ TSA – соево казеинов бульон/агар
<i>16S rRNA</i> – ген за малката субединица на рибонуклеинова киселина	CIN – cefsulodin–irgasan–novobiocin (цефсулодин – иргасан - новобиоцин)
Kb – килобаза	КОН – калиева основа
Mb – мегабаза	ISO – Международна организация за стандартизация
kDa – кило далтона	LAMP – примково - медираната изотермална амплификация
бд – базови двойки	FIP – прав вътрешен праймер
PFGE – гел електрофореза в пулсово поле	F3 – прав външен праймер
<i>Yersinia</i>	VIP – обратен вътрешен праймер
PCR – полимеразна верижна реакция	V3 – обратен външен праймер
Ail – протеинът за прикрепяне и навлизане	LF – примков прав праймер
YstA – йерсинозен ентеротоксин	LB – примков обратен праймер
YadA – <i>Yersinia</i> адхезин А	LB – Backward loop primer
ST – стабилен токсин	CFU – колония формиращи единици
ЛПЗ – липополизахарид	CR-MOX – Конго рот магнезиево оксалатен агар
MyfA – Мукоиден <i>Yersinia</i> фактор	BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
T3SS – Тип 3 секретиреща система	<i>SpeI</i> – разграждащ ензим от <i>Sphaerotilus sp</i>
Yop – <i>Yersinia</i> ефекторни протеини	
EFSA – Европейска агенция за безопасност на храните	
ECDC – Европейски център за предпазване и контрол на заболяванията	

I Въведение

Yersinia enterocolitica е зоонозен патоген, причинител на йерсиниозата при хората и животните. Това заболяване е трето по значимост сред най-докладваните хранителни зоонози в страните от Европейския Съюз. Свинете са основния източник на инфекцията. Те носят патогените асимптоматично в лимфоидната тъкан на тонзилите, Пайеровите плаки и др., и лесно могат да я разпространяват в процеса на клане. От там *Y. enterocolitica* преминава върху свинете за клане, откъдето би могла да попадне в хранителната верига. Хората се заразяват посредством замърсени с бактерии, предимно сурови или термично необработени храни. Характеристиката на изолираните щамове е важна, тъй като при тях се наблюдава вътревидова хетерогенност. Според биохимичните характеристики са обособени шест биотипа 1А, 1В, 2, 3, 4 и 5, които се различават между си спрямо патогенността, екологичните ниши и разпространението им. *Y. enterocolitica* 4/О:3 е познат като „свински” биосеротип, с преимущество спрямо останалите биосеротипове при изолирането им в случаи на йерсиниоза. Патогенността на *Y. enterocolitica* се дължи на присъствието на вирулентни фактори, които биват както хромозомно кодирани, така и плазмидно. Между най-използваните за доказване, свързани с клиничната проява на инфекцията са Ail протеинът, кодиран от *ail* гена, *Yersinia*

термоустойчивият ентеротоксин (*ystA* ген) и *Yersinia* адхезин (*yadA* ген). Генотипирането на изолираните *Y. enterocolitica*, чрез PFGE все още представлява златен стандарт за проучване на разпространението на патогените щамове и проследяване на тяхната взимовръзка. *In vitro* изследванията показват, че *Y. enterocolitica* изолирана от свинете е чувствителна към широк спектър на антибиотици като: тетрациклини, аминогликозиди, втора и трета генерация на цефалоспорини и квинолонови антибиотици с генетична резистентност най-често към аминопеницилини и първа генерация на цефалоспорини. Въпреки това, разпространените на щамове, показващи различни профили на резистентност към използваните антибиотици, не трябва да се подценява. Поради това, определяне на чувствителността към антибиотици, които се използват за лечение на заболяването е необходим процес при характеризиране на изолираните щамове.

Конвенционалните методи за доказване на *Y. enterocolitica* са трудоемки и отнемат много време. Приложението на молекулярно-биологични методи, които да са чувствителни, икономични, лесни, ефективни и бързи може да допринесе за диагностика на йерсиниозата. LAMP методът, като изотермичен метод позволява многократна амплификация на ДНК в постоянни условия. Така, за използването му няма условие за наличие на специално оборудване и скъпа техника. Методът се отличава с

висока специфичност към прицелния ген и способност за доказване на гени в малко количество ДНК за кратък период.

II Цел и задачи

Целта на дисертационния труд е да се проучи разпространението на ентеропатогенни щамове *Y. enterocolitica*, изолирани от свине на възраст за клане, посредством конвенционални и съвременни молекулярни методи, както и да се разработи бърз и икономически изгоден протокол за качествено определяне на *Y. enterocolitica* в проби изолирани директно от тонзили и фецес на свинете за клане.

За постигане на поставената цел бяха разработени следните задачи:

1. Събиране на проби за изследване от тонзили и фецес от свинете на възраст за клане, произхождащи от различни ферми на територията на България
2. Изолиране и идентифициране *Y. enterocolitica* от пробите според БДС *EN ISO 10273:2003*
3. Определяне на вирулентния профил на изолираните щамове *Y. enterocolitica*
4. Установяване на вътревидовото генетичното разнообразие на изолираните щамове *Y. enterocolitica*
5. Доказване на антибиотични резистентни профили на изолираните щамове *Y. enterocolitica*

6. Оптимизиране на протокол за примково-медирана ДНК амплификация (LAMP), с праймери по литературни данни и определяне на тяхната специфичност към различни бактериални видове.

7. Определяне на чувствителността на LAMP протокола

Сравнителен анализ на резултатите между резултатите получени от LAMP протокола и класическият PCR.

III Материали и методи

1. Събиране на проби и данни

За целта на настоящата работа през период от пет години (януари 2016 – декември 2021), бяха изследвани проби от 601 свине. Пробите бяха взети от кланица за свине в Костинброд, Западна България, която обслужва ферми от цяла България. От всички 601 свине стерилно бяха взети по една двойка тонзили (*tonsilla veli palatini*) (n=601) и 189 броя фецес (n=189). Всички изследвани свине бяха с произход от седем свинеферми или заводи за отглеждане на свине за угодяване (I – VII), разпределени в 4 различни географски области на Р. България.

2. Микробиологични и биохимични тестове за изолиране и доказване на *Y. enterocolitica*

Присъствието на *Y. enterocolitica* в закланите свине беше доказано според БДС EN ISO 10273:2003 (ISO, 2003), с малки изменения по отношение на времето за култивиране според (Van

Damme *et al.*, 2010). Предварителната идентификация включва тестове за хидролиз на уреа, деаминация на фенилаланин, присъствие на каталаза и цитохром Ц оксидаза уреазна. За биотипизация бяха използвани тестовете за доказване на трехалоза, туин естераза / липаза, пиразинамидаза, ескулин / салицин и индол, спрямо схемата на ISO (2003). Идентификационната схема включва и тестове за декарбоксилиране на аргинин, лизин и орнитин, ферментация на въглехидратите: захароза, лактоза, рамноза, мелибиоза, хидролиза на цитрат, продукция на сероводород и усвояване на манитол, арбитол, инозитол.

3. Молекулярно-биологични тестове за доказване на *Y. enterocolitica*

- Изолиране на ДНК от колония и директно от тонзилите и фецесите на свинете
- Качествен и количествен анализ на получената ДНК посредством гел електрофореза, спектрофотометрично и флуориметрично.
- Амплификация на участък от гена за *16S rRNA*, *ail*, *ystA* и *yadA* чрез PCR
- Секвенционален анализ на продуктите за *16S rRNA*
- Гел електрофореза за доказване на получените продукти от PCR LAMP

- Макрорестрикционен анализ с ендонуклеази *SpeI* и *NotI* / *XbaI* посредством PFGE

- Диск дифузионен метод за определяне на чувствителност към антибиотици

4. Оптимизация на LAMP протокол

За разработка на LAMP протокола бяха проведени следните тестове: Оптимизация на праймери, тестови за специфичност и чувствителност. Резултатите бяха отчитани посредством използване на багрило хидроксинафтол синьо и електрофоретично чрез агарозна гел електрофореза

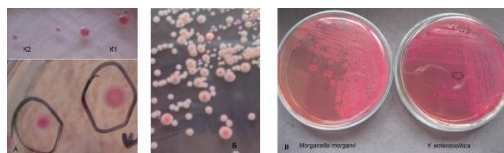
5. Изкуствено заразяване на фецес

6. qPCR за оценка на чувствителността на протокола

IV Резултати

1. Доказване на *Y. enterocolitica* чрез БДС EN ISO 10273:2003

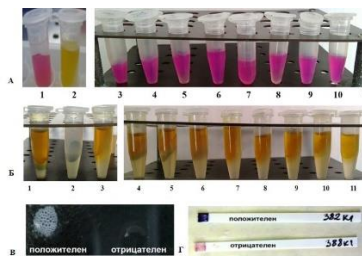
След обогатяване изолирани и подбрани бяха общо 1200 колонии, 920 колонии с прозрачен ореол, т.н. “*bull's-eye*“ тип. От тях 666 колонии бяха изолирани от тонзилите (n = 666), докато 254 колони от фецесите (n = 254). Изолираните колонии не бяха идентични спрямо макро морфологичните параметри (фигура 1).



Фигура 1 Изглед на колонии, култивирани на CIN агар за 48 часа при 28 °С

А: k1-типични за *Y. enterocolitica* колонии; k2- нетипични колонии, наподобяващи *Y. pseudotuberculosis*, гледани с невъоръжено око. Б: Смесена култура от типични и нетипични колонии, гледани микроскопски, увеличение 5 х. В: Макроскопска разлика в колониите между *Y. enterocolitica* и *Morganella morganii*

За всички изолати беше направена проверка за чистота на културите. Всички изолати бяха тествани микроскопски и бяха определени като Грам - отрицателни с пръчковидна форма на клетката. След като не бяха установени други съществени различия в макро морфологията, освен по-горе описаните характеристики на двете групи колонии изолатите бяха проследени по схемата за предварителна идентификация.



Фигура 2 Тестове от схемата за първично идентифициране на изолатите

А- Уреазна активност на изолатите: 1= положителна контрола *Y. enterocolitica* 8081 (O:8), 2 = отрицателна контрола *E. coli* ATTC 35218, 3 = 10 изолати (положителни); Б- Деаминация на фенилаланин: 1 = положителна контрола *M. morgani*, 2= неинкулирана еприуветка, 3= отрицателна контрола *Y. enterocolitica* 8081 (O:8), 4 - 5 = положителни изолати 6-11 = отрицателни иолати; В- Каталазна активност на изолатите: ляво; положителен резултат, дясно отрицателен резултат; Г- оксидазна активност: положителен и отрицателен резултат на изолати номер на проби по случаен избор: изолати Т382 и Т388

След обобщаване на резултатите от фенотипните и прелиминарните биохимични тестове, 136 изолати бяха охарактеризирани като *Y. enterocolitica*.

Таблица 1 Изолране и предварителна идентификация на *Y. enterocolitica* според БДС EN ISO 10273:2003

Култивир ане	Хидрол иза на уреа (+)	Каталаз на на активно ст (+)	Оксидаз на на активно ст (-)	Деаминир ане на триптофан (-)	Положите лни колонии
CIN агар 920	333 (37%)	471 (51%)	181 (19%)	510 (55%)	136 (15%)

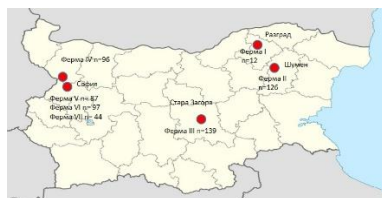
(+) положителни, (-) отрицателни

Идентификацията на изолатите беше определна посредством PCR чрез доказване на фрагмент от рибозомалния оперон т.н. *16S*

rRNA ген, експресиращ се с постоянна честота в бактериалната ДНК. Интактността на геномната ДНК изолирана позволи провеждане на всички заложиени молекулярно биологични тестове. Положителен резултат беше отчетен при 43 изследвани щамове и всички получени ампликони бяха напълно идентични и отговаряха на големината на търсения продукт 328 бд. Не бяха наблюдавани неспецифични ампликони с различен размер, което подчертава отсъствието на полиморфизми между изследваните изолати. Тези изолати бяха изолирани от 40 свине. Установено е, че в 6,7 % (40/601) от свинете за клане беше доказана *Y. enterocolitica*.



A



Фигура 3 Доказване на *Y. enterocolitica* и нейно географско разположение

Установено беше, че всички положителни свине произхождат от шест ферми (ферми II–VII), намиращи се в Стара Загора, София и Шумен (фигура 3). Не бяха изолирани положителни щамове от свинете произхождащи от Разградска област (0 / 12 свине). Всички

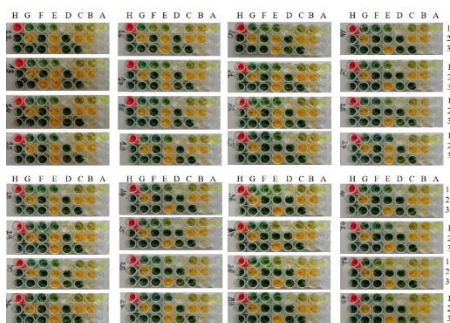
положителни изолати бяха доказани през зимния период на събиране на пробите за изследване – по време на всички посещения в периода от октомври до март (2016- 2021). Нито един щам на *Y. enterocolitica* не беше изолиран през летния период.

Y. pseudotuberculosis не беше доказан в нито една от изследваните свине за клане.

С цел потвърждаване на идентификацията бяха анализирани секвенираните последователности за *16S rRNA* на 43 щамове, използвайки платформата BLAST. Анализът показва три попадения с най-висок резултат отговарящ на щам *Y. enterocolitica*. При сравнение с *Y. enterocolitica* щам KNG22703 (CP011286.1) беше показан 99 % и 100% идентичност за 39 от нашите изолати, с изключение на щамове -18, 28, 37 и 43. При тях бяха доказани 98 %, 95 %, 92 % и 99% идентичност на изследваната последователност.

- Определяне на биохимичните и патогените характеристики на изолираната *Y. enterocolitica*

Доказани бяха свойства характерни за *Y. enterocolitica* при усвояването на моно-, ди- и полизахаридите, алкохолните захари и аминокиселините (Фигура 4).

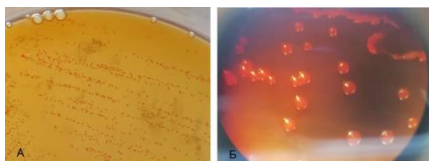


Фигура 4 Биохимични тестове за определяне на биотипове на *Y. enterocolitica*

Легенда: A1: β -галактозидаза B1: малонат, C1:цитрат, D1: сероводород, E1: лизин, F1: орнитин, G1:аргинин, H1: уреаза, A2: β -глюкуронзидаза, B2: манитол, C2: трехалоза, D2:лактоза, E2: целобиоза, F2:мелибиоза, G2: сорбитол, H2: салицин, A3: β -ксилозидаза, B3 ескулин, C3: рафиноза, D3: инозитол, E3:захароза, F3: арабитол, G3: адонитол, H3 дулцитол.

Беше доказано, че 43 щама *Y. enterocolitica* не ферментираат рамноза, рафиноза, мелибиоза и лактоза. Установено беше, че изолираните *Y. enterocolitica* усвояват захароза трехалоза и продуцират β галактозидаза, съответстващо на усвояване на глюкозата. При всички щама беше наблюдавано отсъствие на лизин декарбоксилазна, аргинин, дехидролазна активност, както и произвеждане на сероводород. Нито един щам не показва положителен тест за усвояване на цитрата като единствен източник на въглерод. Изолираните от нас *Y. enterocolitica* (1 – 43) бяха отрицателни по отношение на пиразинамидазна активност. Липсата на ензим пиразинамидаза както и отрицателни тестове за хидролиза на ескулин / усвояване на салицил, отсъствие на ензим

триптофаназа, който катализира разграждането на триптофан до индол са показатели пряко свързано с патогенността на щамовете. При 43 щама *Y. enterocolitica* бяха доказани: пиразинамидаза (-), хидролиза на ескулин (-) и усвояване на салицил (-). Резултатите показаха, че е налично 6,7 % носителство на потенциално патогенни изолати между изследваните свине. Фенотипно беше доказано присъствие на вирулентния плазмид при общо 24 щама чрез абсорбция на багрилото Конго рот на CRMOX агар (фигура 5).



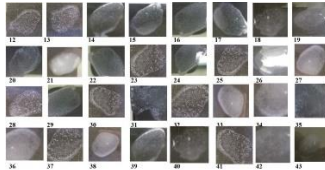
Фигура 5 Плазмид положителни и Конго рот (+) колонии на *Y. enterocolitica*

Легенда: А) Изглед на колонии на изолат номер 11 след 24 часа култивиране гледани с невооружено око; Б) Изглед на колонии на изолат номер 5 след 24 часа култивиране, гледани увеличение 5X.

Температурно-зависимата автоаглутинация беше сравнителен тест за фенотипно доказване на вирулентния плазмид при нашите щамове. Чрез теста за автоаглутинация беше доказано плазмид носителство при 39 от изследваните *Y. enterocolitica* щамове. След обобщение на тестовете 43 щама *Y. enterocolitica* бяха определени в биотип 4.

На 43те щама *Y. enterocolitica* беше определена принадлежност към серологична група. Доказано беше, че

всички щама показват еднакви характеристики по отношение на наличие на серологична група, в резултат, че всички бяха доказани че принадлежат към серотип O:3 (фигура 6).



Фигура 6 Положителен тест за наличие на серологична група O:3

Легенда: шам №12 шам №43 *Y. enterocolitica*, изолирана от нас със съответваща номерация

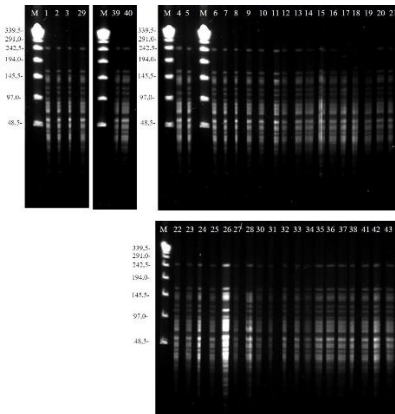
2. Доказване на вирулентните характеристики на изолираната *Y. enterocolitica*

Гените *ail* и *ystA* бяха доказани в изолираната ДНК беше на всички 43 щама *Y. enterocolitica*. Резултатите бяха получени на база амплифициран продукт с големина 163 бд и 145 бд (съответно) охарактеризирани на гел електрофореза. Електрофоретичният анализ на PCR продуктите, показва наличие на продукт с големина 849 бд, отговарящ на положителен продукт за *yadA* на при 41 от изследваните проби. От получените резултати за доказване на вирулентните детерминанти на *Y. enterocolitica* беше установено присъствието на *ail* и *ystA* положителни изолати сред свинете за клане 40 от 601 свине, което отговаря на 6,7 %. Плазмид-носителството на изолираната *Y. enterocolitica* от тонзилите и

фецесите на свинете за клане отговаря на 6.3 %, наличие на *yadA* ген в 38 от 601 свине.

3. Генетично разнообразие на изолираните *Yersinia enterocolitica*

ДНК на четиридесет и три щама беше подложена на разрязване с режещи ендонуклеази *SpeI*, допълнително по един претставител на различните профили са разградени с *NotI*.

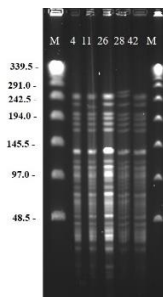


Фигура 7 PFGE пулсотипове на изолираната *Y. enterocolitica* след разграждане с *SpeI*

Легенда: M= *Pulse Marker* 50 -1000 kb. 1- 41- *Y. enterocolitica* изолирана от свинете

От фигура 7 се вижда, че след разграждане на ензима бяха получените пулсотипове които изглеждат еднакво, гледани с невъоръжено око. Различия между тях бяха трудно видими. Представителни щамове: 4, 11, 26, 28 и 42, подбрани чрез оглед с

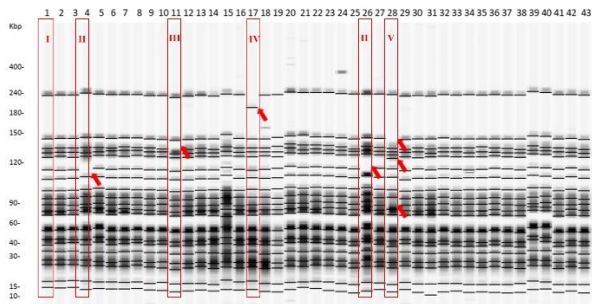
невъоръжено око, след рестрикция с *SpeI* бяха подложени на рестрикция с ензим *NotI*



Фигура 8 PFGE пулсотипове на изолираната *Y. enterocolitica* след рестрикция с *NotI*

Легенда: М= Pulse Marker 50-1000 Кб Щамове *Y. enterocolitica*, подредени по ред 4, 11, 26, 28, 42.

От фигура 8 се вижда, че и този ензим би дал добро разграничаване на щамове от този вид и с него беше потвърдено голямото генетично сходство между представителните щамове и наличието само на няколко различни получени фрагменти между тях. С цел ясно разграничение и пълна информация за вътревидовото разнообразие, снимките от електрофорезата компютърно бяха обработени чрез програма GelCompar (Applied Maths, Koprijk, Belgium)

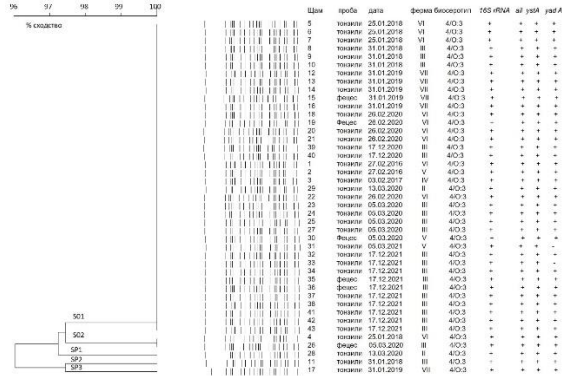


Фигура 9 Анализ на пулсотиповете, получени след рестрикция с *SpeI* на 43-те щама *Y. enterocolitica*, изолирани от свинете за клане

Легенда: Означенията над всяка пътека съответстват на номерата на щамовете (1 – 43), С римски номера са обозначени обособените пулсотипове. Стрелките показват на различията възниквали във фрагментите Използван маркер с големина 50 - 1000 Kb

От фигура 9 се вижда обособяване на пет пулсотипове (I, II, III, IV и V), обградени с червени правоъгълници. Пулсотиповете бяха охарактеризирани с малки различия между си. Пулсотип I беше най-многоброен и преобладаващ в голяма извадка от щамове (n=38). Пулсотип II беше доказан при щамове с номера 4 и 26, пулсотип III, пулсотип IV и пулсотип V бяха доказани в по един щам. Броят на фрагментите, получени след рестрикция, беше различен за различните пулсотипове: между 19 и 20. Спрямо големина на фрагментите най-големият получен след разграждане фрагмент беше с дължина от 240 kb, докато най-късият беше с дължина 15 kb (фигура 9). На база на тази информация беше

построена дендограма, която схематично изобразява разновидността на получените пулсотипове.



Фигура 10 Дендограма получена вследствие кластерен анализ Групирането беше определено чрез Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) с 97 % сходство. Определена беше корелация по Дайс с толерантност от 2,5 % и оптимизация от 0,5. На фигурата са описани номер на щам, дата на изолиране, произход на изолирания щам брой на ферма , както и получените вирулентни показатели

Нашите щамове бяха групирани в два кластери обозначени с S01 и S02, както и в три единични пулсотипове: SP1, SP2 SP3. В кластер S01 бяха обединени 38 щам. обединява щамове, които бяха изолирани както от тонзилите, така и от фецесите на свинете. Пулсотипът в кластер S01 беше доказан в щамовете от всички „положителни“ ферми (ферми II–VII). По отношение на разпределение по години, в кластера са обединени щамове, които бяха изолирани през всички години от изследваната времева рамка (2016 – 2020). В кластер S02 са групирани два щама Y.

enterocolitica: щам 4 и щам 26 и двата показващи идентичен пулсотип. Двата щама бяха изолирани от свине, произхождащи от различни ферми (III и VI), които са разположени в две различни географски области (Стара Загора и София). Двата щма бяха изолирани вследствие на събиране на проби в различни години. В трите единични пулсотипове SP1, SP2 и SP3 беше групиран само по един щам щам.

4. Чувствителност към антибиотици на изолираната *Y. enterocolitica*

Изолираните щама (n=43) бяха тествани спрямо действието на 15 антибиотици, принадлежащи към 8 класа и един неклассифициран антибиотик. На база резултатите определени спрямо тристепенната класификация: чувствителни, резистентни и такива с междинна резистентност бяха обособени три профила на резистентност (таблица).

Таблица 2 Профили на резистентност на *Y. enterocolitica*, изолирани от свинете

Антибиотик		Резистентен профил		
		*		
		I	II	III
Група**	Генеричко име	41/43	1/43	1/43
Пеницилини	ампицилин	-	-	-
Цефеми	цефамандол	-	-	-
	цефтриаксон	+	+	+
Аминогликозиди	амикацин	+	+	+
	гентамицин	+	+	+
	стрептомицин	+	-	+

Фениколи	хлорамфеникол	+	-	-
Тетрациклини	тетрациклин	+	-	-
	доксоциклин	+	+	-
Квинолонови	налидикисова киселина	+	-	-
	ципрофлоксацин	+	+	+
	левофлоксацин	+	-	-
Антагонисти на фолатния метаболизъм	триметоприм/сулфаметазол	+	+	-
Аминокумарини	новобиоцин	-	-	-
други	бацитрацин	-	-	-

Легенда: *Наличие на три резистентни профили, ** Фармакологична класификация, определена според Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2021). (+) чувствителен щам, (-) резистентен щам

Спрямо представените резултати бяха обособени три профила на резистентност при изолираните щама *Y. enterocolitica*. Сред 95,3 % (41 / 43) от щамовете беше установен профил с резистентност към три групи антибиотици: бета лактами, второ поколение цефалоспорини и циклични пептиди. Резистентен профил I: ампицилин / цефамандол / новобиоцин / бацитрацин. На другите два профила бяха определени по 2,3 % от изследваните щама (1 / 43). И при двата профила беше наблюдавана мултирезистентност към повече от четири групи антибиотици. Резистентен профил II с резистентност към антибиотици принадлежащи към седем групи: бета лактами, второ поколение цефалоспорини, циклични пептиди, тетрациклини, амфениколи, аминогликозиди и флуорохинолони. Резистентен профил II: ампицилин / цефамандол / новобиоцин / бацитрацин / тетрациклин / налидикисова киселина/

хлорамфеникол / стрептомицин и левофлоксацин. Докато третият резистентен профил (Профил III) описва резистентност към осем групи на антибиотици: бета лактами, цефалоспоринови второ поколение, циклични пептиди, тетрациклини, амфениколи, аминогликозиди сулфонамиди. Резистентен профил III: ампицилин/ цефамандол / новобиоцин / бацитрацин / тетрациклин / доксоциклин / налидиксозна киселина / хлорамфеникол/ триметоприм / сулфметазол.

5. Създаване на банка на щамове и тяхна ДНК

След охарактеризиране на щамове спрямо всички показатели беше създадена колекция от щамове и техния ДНК материал, които могат да послужат за бъдещи изследвания по тази тематика. Обозначението е еднозначно и идентифицира основните характеристики на изолирания щам и вирулентните показатели на неговия геномен материал

щам	Изоляция	Дата на изолиране	Ферма	Биосеротип и фаготип	<i>16S rRNA</i>	<i>ail</i>	<i>ystA</i>	<i>yadA</i>
1	T	27.02.2018	VI	4/O:3/VIII	+	+	+	+
2	T	27.02.2016	VI	4/O:3/VIII	+	+	+	+
3	T	03.02.2017	IV	4/O:3/VIII	+	+	+	+
4	T	25.01.2018	VI	4/O:3/VIII	+	+	+	+
5	T	25.01.2018	VI	4/O:3/VIII	+	+	+	+
6	T	25.01.2018	VI	4/O:3/VIII	+	+	+	+
7	T	25.01.2018	VI	4/O:3/VIII	+	+	+	+
8	T	31.01.2018	III	4/O:3/VIII	+	+	+	+
9	T	31.01.2018	III	4/O:3/VIII	+	+	+	+

10	T	31.01.2018	III	4/O:3/VIII	+	+	+	+
11	T	31.01.2018	III	4/O:3/VIII	+	+	+	+
12	T	31.01.2019	VII	4/O:3	+	+	+	+
13	T	31.01.2019	VII	4/O:3	+	+	+	+
14	T	31.01.2019	VII	4/O:3	+	+	+	+
15	Φ	31.01.2019	VII	4/O:3	+	+	+	+
16	T	31.01.2019	VII	4/O:3	+	+	+	+
17	T	31.01.2019	VII	4/O:3	+	+	+	+
18	T	26.02.2020	VI	4/O:3	+	+	+	+
19	Φ	26.02.2020	VI	4/O:3	+	+	+	+
20	T	26.02.2020	VI	4/O:3	+	+	+	+
21	T	26.02.2020	VI	4/O:3	+	+	+	+
22	T	26.02.2020	VI	4/O:3	+	+	+	+
23	T	05.03.2020	III	4/O:3	+	+	+	+
24	T	05.03.2020	III	4/O:3	+	+	+	+
25	T	05.03.2020	III	4/O:3	+	+	+	+
26	Φ	05.03.2020	III	4/O:3	+	+	+	+
27	T	05.03.2020	III	4/O:3	+	+	+	+
28	T	13.03.2020	II	4/O:3	+	+	+	+
29	T	13.03.2020	II	4/O:3	+	+	+	+
30	Φ	05.03.2020	V	4/O:3	+	+	+	+
31	T	05.03.2020	V	4/O:3	+	+	+	-
32	T	17.12.2020	III	4/O:3	+	+	+	+
33	T	17.12.2020	III	4/O:3	+	+	+	-
34	T	17.12.2020	III	4/O:3	+	+	+	+
35	Φ	17.12.2020	III	4/O:3	+	+	+	+
36	Φ	17.12.2020	III	4/O:3	+	+	+	+
37	T	17.12.2020	III	4/O:3	+	+	+	+
38	T	17.12.2020	III	4/O:3	+	+	+	+
39	T	17.12.2020	III	4/O:3	+	+	+	+
40	T	17.12.2020	III	4/O:3	+	+	+	+
41	T	17.12.2020	III	4/O:3	+	+	+	+
42	T	17.12.2020	III	4/O:3	+	+	+	+
43	T	17.12.2020	III	4/O:3	+	+	+	+

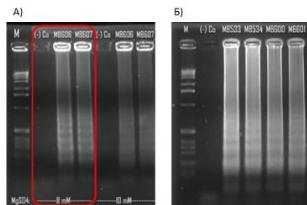
Легенда: T = тонзилы, Φ = фецес

6. Оптимизация на LAMP протокол за доказване *phoP* гена на патогените *Y. enterocolitica*

За нуждите на оптимизационната схема най-първо изолираната ДНК от 32 щама, беше количествено определена. Последователно, беше определена оптималната концентрация на Mg_2SO_4 в буфера да бъде отговаряща на 8 mM. Оптимален добив на продукт беше получен за време от 30 минути на 65 °C и допълнително време на удължение от 10 минути за температура от 80 °C. Следователно, всички останали LAMP реакции впоследствие бяха провеждани спрямо тези условия.

• Селективност на праймерите за доказване на *phoP* чрез LAMP

Наличен стълбовиден „ladder-like” продукт беше показател за положителен резултат. От фигура 11 се вижда, че беше получен реакционен продукт за шестте патогенни щама *Y. enterocolitica*. ДНК на всички шест щама беше успешно разпозната от праймерите за *phoP* гена.

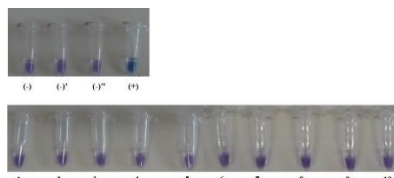


Фигура 11 Специфичност на LAMP протокола за доказване на *phoP* гена на патогени щамове *Y. enterocolitica*

Легенда: А – Оптимизация на Mg_2SO_4 на два патогени щама *Y. enterocolitica*: = *Y. enterocolitica* 4/O:3; = *Y. enterocolitica* 4/O:3. С червен правоъгълник е

отбелязана оптималната концентрация на Mg_2SO_4 . Б – Специфичност на LAMP протокола за останалите 4 патогени щама *Y. enterocolitica*: = *Y. enterocolitica* O:3; MB534= *Y. enterocolitica* O:9;= *Y. enterocolitica* O:8;1= *Y. enterocolitica* O:5,27.

Нашият LAMP протокол идентифицира всичките шест щама на патогенна *Y. enterocolitica* като положителни. От проведена реакция и електрофоретично отчитане на рвзултатите не беше получен реакционен продукт от нито един от тестваните щамове принадлежащи към видове различни от патогенна *Y. enterocolitica*. По време на теста не беше наблюдавана неспецифична амплификация на ДНК от гореспоменатите щамове. На база това беше установено, че праймерите бяха селективни за *phoP* на патогенн *Y. enterocolitica* и не разпознават региони, присъстващи при други щамове, принадлежащи към род *Yersinia* или в тестваните бактерии извън рода. С добавяне на багрило хидроксинафтол синьо – HNB към реакционната смес беше проверена способността на багрилото да разграничи положителните проби от отрицателните.



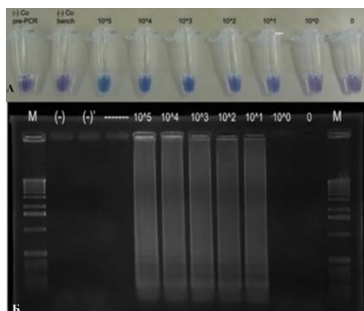
Фигура 12 Отчитане на теста за селективност посредством хидроксинафтол синьо

Легенда: М = ДНК маркер; (-) (-)' (-)'' = отрицателна контрола Мастер микс и вода накапена в различно помещение (+) = положителна контрола (ДНК от шам IP864). Изследвани щамове със съответваща номерация. 1= *Y. mollaretii*; 2= *Y. bercovierii*; 3= *Y. frederiksenii*; 4 = *Y. kristensenii*; 5 = *Y. intermedia*; 6 = *Y. rhodei*, O.8; 7 = *Y. aldovae*; 8 = *Y. pseudotuberculosis*; 9 = *Y. pseudotuberculosis*; 10 = *Y. pseudotuberculosis*.

От фигура 12 се вижда, че нито един от тестваните щамове, принадлежащи към род *Yersinia* не беше променил цвета в сравнение с положителната проба. Във виолетово бяха оцветени отрицателните проби, а в синьо положителните. Всички тествани щамове бяха доказани като отрицателни по отношение на присъствие на *phoP* гена на патогенна *Y. enterocolitica* когато реакцията беше визуализирана чрез багрило.

- **Чувствителност на LAMP реакцията**

Чувствителността на LAMP реакцията беше използвана ДНК, изолирана от шам *Y. enterocolitica* 4/O:3 (IP8944) и пригответените серийни разреждания. Резултатите бяха отчитани чрез електрофореза в агарозен гел и визуално чрез багрило (фигура 13)



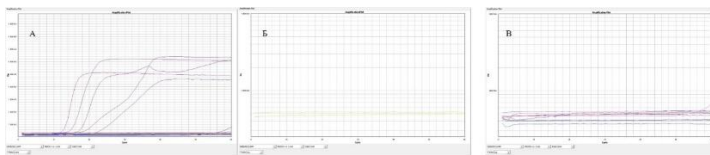
Фигура 13 Чувствителност на LAMP реакцията

Легенда: А- Визуализация на продуктите посредством багрило HNB. В Визуализация на продуктите от реакцията чрез агазорна гел електрофореза. М = ДНК маркер 100 бд; (-) (-)' = отрицателна контрола Мастер микс и вода накапена в различно помещение ; *Y. enterocolitica* IP864 в различни концентрации (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 и 0 копии на ДНК).

Както се вижда от фигурата, чрез електрофоретичен анализ беше установен положителен резултат стълбовиден продукт при разреждания на ДНК от 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 и 10^5 за 50 μ l реакционна смес. Най-малкото разреждане което отговара на границата на доказване на положителен резултат в LAMP реакцията, беше само 10 ДНК копия в 50 μ L реакционна смес. Багрилото също може да разграничи положителните от отрицателните проби.

- Отчитане на LAMP посредством qPCR

За да проследим протичането на амплификацията на LAMP протокола проведохме анализ при който реакцията беше отчитана в реално време чрез количествена полимеразно верижна реакция (qPCR) – фигура 13.



Фигура 14 Чувствителност на LAMP протокола отчитан с qPCR

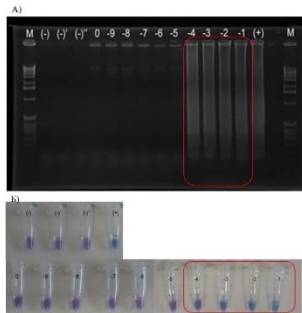
Легенда: А Сериенни разреждания на контролен щам *Y. enterocolitica* IP684 от 10^{-5} до 10^5 ДНК копия / реакция; Б Отрицателна контрола В щамове от род *Yersinia*, различни от *Y. enterocolitica*;

Резултатите показаха, че амплификация беше доказана само при използваните разтвори на ДНК с концентрация от 10^5 до 10^1 копия за контролния щам *Y. enterocolitica* IP684 ДНК (фигура 14 – А). Праймерите за LAMP показват флуоресциращ сигнал, отчетен след около 12 цикъла на реакцията, при разреждането с 10^5 ДНК копия и максимален сигнал получен на 15 цикъла. За разреждането на *Y. enterocolitica* с 10 копия ДНК флуоресциращ сигнал беше доказан при 22 цикъла, докато максимален сигнал беше получен на около 40 цикъла от реакцията. Резултатите бяха сравнени с отрицателна контрола, при която не беше наблюдаван никакъв сигнал и не беше отчетено наличие на специфична или неспецифична амплификация.

- **Оценка на LAMP протокола за доказване на *Y. enterocolitica* в изкуствено и естествено контаминирани проби от свине**

За доказване на *Y. enterocolitica* в изкуствено контаминирани проби беше използван щам *Y. enterocolitica* 4/O:3 от който бяха

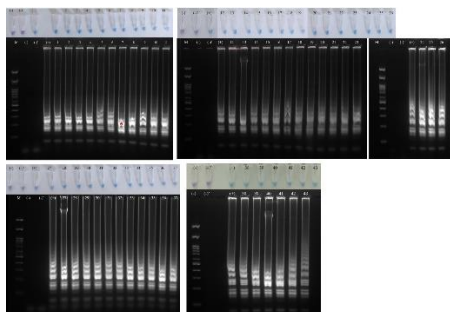
подготвени разреждания със съответна концентрация. Получените LAMP продукти бяха отчитани и по двата начина чрез гел електрофореза и чрез багрило. Както се вижда от фигура 15 беше наличен стълбовиден продукт, отчитан електрофоретично, както и синьо оцветяване беше доказано при четири от разрежданията: 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} . Тези резултати бяха охарактеризирани като положителни. Резултатите бяха сравнени с положителна контрола. Спрямо получените положителни резултати беше установена че долна граница на доказване на генът *phoP* в ДНК на използвания шам е отчитана при разреждане 10^{-4} . Изолиранта от фецеси ДНК беше използвана за доказване на патогенна *Y. enterocolitica* чрез qPCR. Резултатите показаха съвпадение в границата на доказване на *Y. enterocolitica* посредством LAMP и qPCR.



Фигура 15 LAMP протокол за доказване на *phoP* гена в изкуствено заразен фецес

Легенда: А) Отчитане на LAMP реакцията посредством електрофореза; Б) Отчитане на LAMP реакцията чрез багрило хидроксинафтол синьо. (+) = положителна контрола ДНК от шам *Y. enterocolitica* 4/O:3 MB60; M= ДНК маркер; (-), (-)' (-)''= отрицателна контроли с мастер микс и вода накапена в различни помещения. -9 до 1: ДНК изолирана от заразените фецеси в съответна бактериална суспензия, кореспондираща на тази номерация; 0 = ДНК изолирана от неконтаминиран фецец..

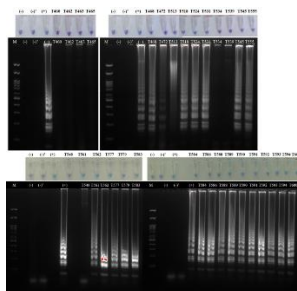
Оптимизираният LAMP протокол беше използван за доказване на *phoP* гена в ДНК изолирана от колонии на 43 щама *Y. enterocolitica* 4/O:3 от настоящата разработка. Наличието на *phoP* гена беше доказано във всички тествани ДНК проби. Резултатите бяха отчитани чрез гел електрофореза и чрез багрило. Резултатите са представени на фигура 16.



Фигура 16 Доказване на *phoP* гена в *Y. enterocolitica* 4/O:3 щама, изолирани в настоящото изследване

Легенда: Визуализация посредством невооръжено око и агарозна гел електрофореза. Номерът на епруветки / патеки 1 – 43 отговарят на *Y. enterocolitica* 4/O:3 от 1 до 43; (-), (-)' = отрицателни контроли (+) = положителна контрола *Y. enterocolitica* 1B / O:8. M = ДНК маркер.

Геномна ДНК изолирана директно от тонзилите (n=30) и фецесите (n=30) на тридесет свине, които предварително бяха охарактеризирани като положителни беше използвана за доказване на патогенни *Y. enterocolitica* чрез оптимизирания LAMP протокол. Изолираната ДНК беше използвана като матрица за доказване на *ail* гена чрез конвенционален PCR.

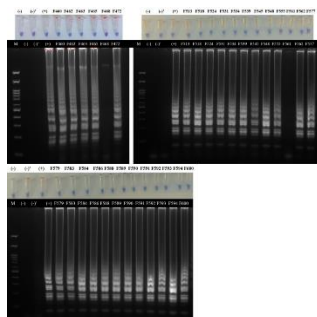


Фигура 17 Доказване на *rhoP* гена в ДНК изолирана директно от тонзилите на положителните свине

Легенда: Номерът на епруветките/ патеките отговаря на номерацията на изследваните тонзили; отбелязани с Т = ДНК изолирана от тонзилите, използваните номера отговарят на номера на свинете. (-) (-)'' = отрицателни контроли (+) = положителна контрола *Y. enterocolitica* 1В/О:8. М = ДНК маркер 100 бд

Установено беше, че от тридесетте проби от тонзили, които бяха изследвани, положителни LAMP продукти за *rhoP* гена бяха доказани при двадесет и пет проби (25 / 30)- фигура 17. Те бяха охарактеризирани вследствие на наличен стълбовиден продукт след проведен електрофоретичен анализ. Наличието на стълбовидния продукт доказва добра концентрация на ДНК в началната позиция. Сред всички положителни проби (25/30) беше наблюдавана ясна синя промяна на цвета. При отчитане на резултатите и по двата начина не бяха установени несъответствия.

Резултатите от тестовете за доказване на гена *rhoP* в ДНК изолирана от фецесите на положителните свине е показана на фигура 18.



Фигура 18 Доказване на *phoP* гена в ДНК изолирана директно от фецесите на положителните свине

Легенда: Номерът на епруветките / патеките отговаря на номерацията на изследваните фецеси; отбелязани с F = ДНК изолирана от фецесите. (-) (-)'' = отрицателни контроли мастер микс и вода добавена в епруветките след добавяне на ДНК; (+) = положителна контрола *Y. enterocolitica* 1В/О:8. М = ДНК маркер 100 бд.

От фигурата се вижда съответствие между електрофоретично отчитане на резултатите и чрез багрило. Положителен резултат беше доказан в двадесет и седем от тридесетте проби (28 / 30) ДНК изолирана директно от фецесите, които бяха тествани. Чрез електрофореза бяха охарактеризирани положителните резултати на 28 проби, като стълбовидни продукти и бяха сравнени с продукта получен от положителната контрола. Отсъствието на продукт при отрицателните контроли позволи валидация на теста. Посредством отчитане на промяна на цвета реакционната смес в епруветките на тези 27 положителни проби бяха синьо оцветени, както и положителната контрола. Отрицателните контроли бяха виолетови.

Посредством конвенционален PCR *ail* гена беше доказан в осем ДНК проби (8/30), изолирани директно от тонзилите и четири ДНК проби (4/30), изолирани директно от фецесите. В сравнение с конвенционалния PCR метод нашият оптимизиран LAMP протокол за доказване на патогенни *Y. enterocolitica* директно от тъканите на тонзилите и фецесите на свинете, без да се следи микробиологичен протокол за набогатяване и изолиране на колонии беше по – чувствителен.

V Обсъждане

Източник на инфекцията при хора са животните, като свинете представляват основен резервоар на ентеропатогени *Y. enterocolitica*. Свинете за угодяване са охарактеризирани като източник на заразяване в кланиците. Поради това, нараства необходимостта от стандартизирани стратегии за оценка на разпространението на *Y. enterocolitica* в популациите от свинете в кланиците, с цел да се осигури ефективен контрол и мерки за превенция. Критерии за проследяване на *Y. enterocolitica* сред свинете за клане се препоръчват от (EFSA, 2009) още през 2009 година, но в България контролът е непостоянен и се осъществява при наличие на възникнала инфекция. В началото на разработката на тази дисертация, съществуваше много малко информация за разпространението на вирулентните фактори, генетичната взаимовръзка както и за присъствието на антибиотични профили на щамовете *Y. enterocolitica* изолирани от свине на кланиците в

България. По време на изследванията, са получени данни относно разпространението на патогените в тонзилите и фецесите на здравите свине за кланица. Повече внимание се обърна на биологичните и серологичните характеристиките на изолираните щамове, както и определянето на генетична взаимовръзка между тях. Освен това, са изследвани техните вирулентни способности, както и тяхната способност *in vitro* да отговорят към активността на подбрани антибиотици, най-често използвани като терапевтици при доказана йерсиниоза. В хода на разработката се очерта необходимост да се разработи и оптимизира бърз, надежден и протокол на LAMP метод за доказване на патогена *Y. enterocolitica* от тонзили и фецеси на свинете за клане. Изолирането на *Y. enterocolitica* от различни източници, включително свински тонзили или фецес е от съществено значение за събиране информация касаеща разпространението на патогените в кланиците. Това дава основа за понататъшно проследяване на предаването им и попадането им в хранителната верига. Съгласно препоръките на EFSA (2009) и ISO (2003), свинските тонзили са предпочитани за изолиране на патогена *Y. enterocolitica*, като се има предвид тропизма на патогените към лимфоидната тъкан. Взимането намазка от тонзили за изследване е по-лесно изпълнимо, но оптимална изолация се постига чрез използване на проба от смиляна тъкан (Van Damme *et al.*, 2013). Подобно на резултатите получени от предишни проучвания на различни

автори ние изолирахме патогенни щамове на *Y. enterocolitica* предимно от тонзилите, а в някой случай изолирахме и от фецеси. Изолирането на патогенни щамове на *Y. enterocolitica* от фецес е ограничена, тъй като отделянето на йерсинии във фецеса се увеличава при прасенца по-млади от 30 дни и намалява когато свинете достигнат възрастта за клане (Fois *et al.*, 2018; Nesbakken *et al.*, 2006). В нашето изследване свинете са на възраст за клане, затова и находката на бактерията във фецесите е по-ниска. PCR методът е по-чувствителен и по-прецизен, но използването му самостоятелно увеличава наличието на фалшиво положителни резултати, възникнали в резултат на присъствие на мъртви бактериални клетки (Fredriksson-Ahoma and Korkeala, 2003; Mazzette *et al.*, 2015). Поради това, ние комбинирахме микробиологични, биохимични и PCR методи като включихме стъпка на обогатяване в PSB бульон, с цел оптимална изолация и доказване на патогенни щамове *Y. enterocolitica*. Нашето изследване показва, че патогенни щамове *Y. enterocolitica* е изолирана от 6,7 % от изследваните свине за клане, което означава, че малка част от българските свине за клане носят тези патогени в тонзилите. ниският процент на присъствие на патогенни *Y. enterocolitica* в нашето изследване е в резултат на изолационната и идентификационната схема. Ние комбинирахме конвенционални микробиологични методи за изолиране и последващо доказване посредством PCR. Този процент е по-нисък в сравнение с

изследванията, показващи присъствие на патогените в другите Европейски страни: Генът за *16S rRNA* е с големина около ~1500 бд и в себе си включва девет вариабилни области, разпръснати в силно запазената 16S последователност на рДНК. Данните от секвенционния анализ показаха различна степен на идентичност на *16S rRNA* последователността при сравнение на нашите щамове с референти такива от базата на данни на NCBI. Високата идентичност от 98-100 %, охарактеризирана при болшинството на щамове е очаквана, тъй като при всички те се доказва положителна реакция за *16S rRNA* гена за *Y. enterocolitica* посредством PCR. При няколко от нашите щамове се доказва по-нисък процент на идентичност с референтни щамове, което се дължи на възникване на точкови мутации. Освен това секвенирането на частична последователност от гена, която е къса не е в състояние да покаже таксономичната точност, която би била постигната при секвениране на пълния ген за *16S rRNA*. Честотата на изолиране на *Y. enterocolitica* 4/O:3 при здрави свине е висока за повечето Европейски страни, И в България доминантен биосеротип, изолиран от здравите кланични свине е 4/O:3. Широкото му разпространение представлява голям риск, касаещ здравето на хората, тъй като лесно може да попадне в хранителната верига чрез процеса на обработка на месото. Съпоставянето на резултатите от доказването на вирулентния плазмид чрез PCR метода и фенотипно на CRMOX хранителна

среда показва по-висока степен на откриване чрез PCR методът, което беше очаквано. Винаги е предизвикателство доказването на плазмидни вирулентни детерминанти, поради тяхната термонестабилност. В настоящото изследване във всички генетично доказани щамове *Y. enterocolitica* се доказват гените *ystA* и *ail* гените, което показва висок патогенен потенциал на свинските щамове *Y. enterocolitica*. *Y. enterocolitica* 4/O:3 е по-малко генетично разнообразен биосеротип. В настоящото изследване след разграждане с ензима *SpeI* открихме висока степен на сходство между получените макрорестрикционни профили – т.н. пулсотипове на геномната ДНК, изолирана от щамове *Y. enterocolitica*. Тази находка предполага изразена генетична хомогенност сред популацията от този вид, като се доказва присъствие на преобладаващ генотип и само няколко изолирани щамове, различни от него. геномът на *Y. enterocolitica* е най- стабилен в сравнение с геномите на останалите два патогенни вида *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* (Najdenski *et al.*, 1995). Високото генетично сходство, наблюдавано между нашите щамове предполага добре изразена хомогенност и консервативност в структурата на цял геном на щамовете от една страна, както и наличие на по-малко генетични събития, водещи до възникване на различни пулсотипове. Това доказателство означава, че този основен преобладаващ генотип е най-добре приспособен и показва висока устойчивост във времето, поради

ниската генетична вариация в него. Следователно, този генотип може да се използва като обект, касаещ борбата с патогена. Увеличението на резистентните профили, получени вследствие на тестване спрямо различни антибиотици е съпоставимо с тяхното несъответно използване при хората, но за нуждите на ветеринарната медицина като стимулатори на растежа. През последните години е установено наличието на резистентни *Y. enterocolitica*, изолирани от кланични свине в много Европейски страни (Fois *et al.*, 2018; Zdolec *et al.*, 2022), но не и в България. Нашите резултати показват наличие на три различни резистентни профили. При два от 43 *Y. enterocolitica* щамове, откриваме резистентност и към тетрациклин, налидиксова киселина и хлорамфеникол и само в 1 / 43 към стрептомицин, триметоприм / сулфаметоксазол, левофлоксацин и доксициклин. За разлика от нашите данни, резистентността към сулфаметоксазол и стрептомицин непрекъснато се съобщава за *Y. enterocolitica*, изолати произхождащи, от свине и хора. Подобно на нашите изследвания не се установена често резистентност към хлорамфеникола. Тетрациклинът, който е между най-значимите антибиотици, използвани в хуманната медицина за лечение на йерсиниоза, широко се използва и за лечение на бактериални инфекции във ветеринарната медицина. Ниското ниво на резистентност на *Y. enterocolitica* срещу тетрациклин в нашето проучване може да се дължи на тяхната рядка употреба в

животновъдството. Присъствието на мултирезистентните щамове *Y. enterocolitica* може да бъде сериозна заплаха за човешкото здраве след тяхно попадане в хранителната верига. Българската агенция за безопасност на храните трябва да обмисли обръщане на повече внимание и предприемане на ефективни мерки при контрола на употреба на антимикробни агенти при селскостопански животни, както и за намаляване на заразяването с резистентни *Y. enterocolitica* в храните.

Примково-медираната изотермична реакция LAMP като метод предлага големи възможности които позволяват използването му за диагностика в лаборатории с ограничени ресурси. Неговото използване за първи път се въвежда през (Notomi *et al.*, 2000). Предимства му са, че е лесно изпълним и позволява високо специфична амплификация на ДНК за кратък период от време около 15-60 минути (Notomi *et al.*, 2000). По тази причина, ние оптимизирахме LAMP протокол за директно доказване на *phoP* гена на патогени *Y. enterocolitica* в проби от свине. В литературата съществуват изследвания за доказване на *Y. enterocolitica* в храни чрез доказване на различни гени (Gao *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2014), но само едно изследване е за доказване на *phoP* гена (Li *et al.*, 2010). Резултатите от тестването на праймерите, както и в изследването на Li *et al.* (2010) показаха висока специфичност спрямо подбора на регион от *phoP*, който присъства само при патогенните щамове *Y. enterocolitica*. Това ги

прави подходящи за доказване на патогенни щамове *Y. enterocolitica*. Оптимизирането на времето за протичане на LAMP реакцията показва, че времетраенето е в правопрпорционална връзка с възникването на фалшиво положителни резултати. Съкращаването му води до намаляване на фалшиво положителни резултати. При сравнение с конвенционалния PCR - добивът на краен амплифициран продукт чрез LAMP е 20 пъти по-висок (Nagamine *et al.*, 2001; Parida *et al.*, 2008). Анализът на данните от отчитане на реакцията в реално време показва специфичност на LAMP праймерите за *Y. enterocolitica*. Долната граница на доказуемост на ДНК при LAMP, води до висока чувствителност на метода. Saharan *et al.* (2014) анализират границата на доказуемост на различни LAMP, протоколи използвани за доказване на различни видове бактерии. Авторите съобщават за чувствителност само 6 копия на реакция за чиста ДНК матрица. Нашите изследвания показват откриване на ДНК при само 96 копия за μl (192 КОЕ), аналогично със степента на откриваемост чрез qPCR метод. Тази висока чувствителност на метода често води и до възникване на проблеми със замърсяване на пробите и впоследствие на възникване фалшиво положителни резултати, както и с наличие на ниска повторяемост. По отношение на вътрешните контроли при експериментите за оптимизацията на протокола въведохме три отрицателни контроли, при което водата се добавяше в физически различни помещения. Особено се

разчиташе на контролата където водата се добавяше в бокса при накапване на ДНК. В нашите експерименти не се получи замърсяване при тази контрола. Отчитане на резултатите чрез агарозна гел електрофореза е лесно изпълнението тъй като, положителен сигнал в пробата отговаря на наличието на стълбовиден продукт и сравняване с положителна контрола. Добавянето на неинтеркалиращите багрила като хидроксиафтол синьо предотвратява замърсяването в резултат на постаплификационно отваряне на епруветките, освен това багрилото няма флуоресциращи характеристики и промяната на цвета при резултатите се отчита без участие на апаратура, а с невъоръжено око (Wong *et al.*, 2018). В нашите експерименти се доказва, че начина на отчитане на реакцията не въздейства върху минималната концентрация на ДНК копия, която да бъде отчитана. Колориметричното отчитането на LAMP реакцията съкращава времето за получаване на резултатите. Резултатите, получени вследствие на оптимизирания протокол позволиха той да бъде използван при 43 щамове *Y. enterocolitica*, предварително изолирани и доказани посредством ISO 10273:2003 стандарта с цел оценка на протокола за клинични изолати. При тях добивът на ДНК е по-висок, понеже изолирането става от колонии на ентеропатогенна *Y. enterocolitica*. Също така приложихме протокола за доказване в ДНК, изолирана директно от тонзилите и фецесите. При този подход, добивът на ДНК е значително по-

нисък, тъй като вероятността за наличие на патогенни бактерии извлечени от 1 g тъкан е по-малка. Нашите резултати показват предимство в доказването на *Y. enterocolitica* чрез LAMP от положителните свине, в сравнение с приложение на конвенционален PCR. Това дава перспектива за внедряване на LAMP протокола като рутинен метод за доказване на *Y. enterocolitica* от свинете за кратък период от време, много преди патогените да бъдат доказани посредством наличните конвенционални методи. Поради способността да доказва ниски концентрации на ДНК от *Y. enterocolitica* LAMP методът може да бъде приложен в началото на инфекцията за скрининг на асимптоматични случаи, каквито са свинете за клане. Доказването на ентеропатогена *Y. enterocolitica* в хранителни проби се осъществява спрямо ISO 10273:2003, което отнема много време и е с по-ниска чувствителност. По тази причина необходимо е въвеждане на нови, по-бързи методи с по-висока чувствителност, които директно да доказват патогените в храни, или проби от свине. LAMP с всички негови предимства оправдява използването му като диагностичен метод в нискобюджетни лаборатории и в полеви условия.

VI Изводи

1. Патогенни *Y. enterocolitica* са разпространена в 6,7 % от свинете за клане, произхождащи от различни области на Р. България.

2. Географският регион на произход на свинете за клане не оказва влияние върху присъствието на *Y. enterocolitica* ($p > 0.05$).

3. *Yersinia enterocolitica* е изолирана само през студения период (октомври-март).

4. В изследваните животни са доказани единствено щамове *Y. enterocolitica*, принадлежаща към биотип 4 / серотип O:3.

5. Изолираните от свине за клане щамове *Y. enterocolitica* показват високо носителство на вирулентните детерминанти *ail*, *ystA* и *yadA*.

6. Установени са три профила на резистентност срещу най-често използваните антибиотици както и наличие на мултирезистентни щамове *Y. enterocolitica*.

7. Доказан е един преобладаващ генотип на *Y. enterocolitica* разпространен през пет годишен период на изследване.

8. Оптимизиран е LAMP протокол за директно доказване на *phoP* гена при ентеропатогена *Y. enterocolitica* в тонзили и фецес на свине за клане.

9. Чувствителността на оптимизираният LAMP протокол за доказване на патогенни *Y. enterocolitica* е еднаква с тази на qPCR за доказване на патогените

VII Приноси

Оригинални приноси

1. За първи път се докладва вътревидово генетично сходство между щамове на *Y. enterocolitica* изолирани от свине от различни ферми в България, през целия пет годишен период на изследване.

2. За първи път в България от свинете за клане са изолирани мултирезистентни щамове *Y. enterocolitica* с резистентни профили към повече от четири групи на антибиотици, което е сериозен риск за човешкото здраве след разпространение на тези щамове в хранителната верига.

3. Създадена е банка от щамове *Y. enterocolitica* биосеротип 4/O:3, изолирани от свинете за клане

Препоръки за практиката

1. Отчитането на резултатите чрез използване на багрило позволява оптимизираният LAMP протокол да бъде внедрен в полеви условия, както и в лаборатории с ограничени ресурси.

VIII Публикувани резултати по темата на дисертацията

Научни публикации

1. Prevalence, Genetic Homogeneity, and Antibiotic Resistance of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Strains Isolated from Slaughtered Pigs in Bulgaria. **Maya Angelovska**; Maya Margaritova Zaharieva; Lyudmila L. Dimitrova; Tanya Dimova; Irina Gotova; Zoltan Urshev; Yana Ilieva; Mila Dobromirova Kaleva; Tanya Chan Kim; Sevda Naydenska; Zhechko Dimitrov; Hristo Najdenski. Antibiotics 2023, Volume 12, Issue 4, 716 **Q1**

2. *Yersinia enterocolitica* - Isolation, Pathogenicity, and Prevalence in Farms for Slaughtered Pigs. **Maya Angelovska**, Maya M. Zaharieva, Hristo Najdenski. Acta microbiologica bulgarica 2023, Volume 39, Issue 2, 118-129. **Q4** —

Участия по научни форуми

1. 8th Balkan Congress of Microbiology Microbiologia Balkanica 2013. Prevalence of Human Enteropathogenic *Yersinia spp.* in Pigs at Slaughter. Maya Gatzovska, Tanya Dimova, Maya M. Zaharieva, Trayana Draganova, Iva Tsvetkova, Hristo Najdenski. October 2-5. 2013, Veliko Tarnovo, Bulgaria. Постерен доклад.

2. Thirteenth Congress of Bulgarian Microbiologists with International participation 2014. Prevalence of Enteropathogenic *Yersinia* in tonsils of Slaughter pigs. Maya Gatzovska, Tanya Dimova, Maya M. Zaharieva, Trayana Draganova, Iva Tsvetkova, Hristo Najdenski. 07-10 October 2014 Tryavna, Bulgaria. Постерен доклад.

3. Second National Food Conference with International Participation. Study of Pigs at slaughter for pathogenic *Yersinia* strains. Maya Gatzovska Tanya Dimova Maya M Zaharieva Trayana Draganova Iva Tsvetkova Hristo Najdenski. March 20th-21st 2015, Sofia Постерен доклад.

4. Workshop on food-borne Pathogens and Food safety. Detection of *Yersinia enterocolitica* in pig faeces by using Loop mediated DNA Amplification. Maya M. Zaharieva, Maya Gatzovska, Els van Collie,

Mark Heyndricks, Hristo M. Najdenski. 26.05.2016 - 27.05.2016.
Постерен доклад.

5. International Scientific Conference Microbiology for better health and Industry. 2017 Seventy Years The Stephan Angeloff Institute Of Microbiology-BAS. Detection of *Yersinia enterocolitica* in pig faeces and tonsils by LAMP. Maya M. Zaharieva, Maya Gatzovska, Victoria Teneva, Els van Collie, Mark Heyndricks, Hristo M. Najdenski. March 14-15.2017. Постерен доклад.

6. Food 3 International Conference the challenges for quality and safety along the food chain. 2017. Detection of *Yersinia enterocolitica* pig faeces and tonsils by LAMP. Maya M. Zaharieva, Maya Angelovska, Victoria Teneva, Els van Collie, Mark Heyndricks, Hristo M. Najdenski. March 23-25, 2017 NBU, SOFIA, BULGARIA. Постерен доклад.

7. 10th Scientific Conference of the Bulgarian Focal Point of EFSA “10 years of food science in service of consumers” 2017. New approaches for fast detection of *Yersinia enterocolitica* and surveillance in slaughter pigs, Maya Zaharieva, Maya Angelovska, Lyudmila Dimitrova, Iva Tsvetkova, Victoria Teneva, Els van Collie, Mark Heyndricks, Hristo Najdenski. 31 October – 2 November 2017, Sofia. Устен доклад.

8. Microbiologia Balcanica 2017. 10th Balkan congress of microbiology. 2017. New approaches for fast detection of *Yersinia enterocolitica* and surveillance in slaughter pigs. Maya M. Zaharieva,

Maya Angelovska, Lyudmila Dimitrova, Iva Tsvetkova, Victoria Teneva, Els van Collie, Mark Heyndricks, Hristo M. Najdenski. November 16th – 18th, 2017, Sofia. Постерен доклад.

9. 4th Congress of Microbiologists in Bulgaria with International Participation. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in fattening pigs originated from different regions of Bulgaria. Maya Gatzovska, Maya Zaharieva, Lyudmila Dimitrova, Viktoria Teneva, Iva Tsvetkova, Tanya Dimova, Els van Collie, Mark Heyndricks, Hristo Najdenski. October 10th-13th, 2018, Hisarya, Bulgaria. Постерен доклад.

10. Втори интердисциплинарен докторантски форум посветен на 150 та годишнина на Българската академия на науките. Доказване на *Yersinia enterocolitica* в тонзили и фецеси от свине за клане. Мая Ангеловска, Мая Захариева, Людмила Димитрова, Ива Цветкова, Таня Димова, Елз ван Коли, Марк Хейндрикс и Христо Найденски. 29-31 август 2019г. Боровец- Постерен доклад.

11. Научна конференция 120 години Национален Диагностичен Научно-Изследователски Ветеринарно Медицински институт и 140 години от рождението на неговия патрон проф. д-р Георги Павлов. Доказване на *Yersinia enterocolitica* в тонзили и фецеси от свине за клане с класически микробиологични и PCR базирани методи. Мая Захариева, Мая Ангеловска, Людмила Димитрова, Мила Калева, Елз Ван Коли, Марк Хендрикс, Христо Найденски. 21.10 2021, София, България. Постерен доклад

12. Seventh International Conference ecological engineering and environment protection EEEP 2021. “New approaches for fast detection of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in raw meat and milk samples”. Maya M Zaharieva, Maya Angelovska, Lyudmila Dimitrova, Mila Kaleva, Tanya Kim, Yana Ilieva, Els van Collie, Mark Heyndricks, Hristo Najdenski. 30 September - 3 October 2021, Varna, Bulgaria. Постерен доклад.

Цитирания в публикации (справка Google scholar 02.10.2023)

2 цитирания от които 1 автоцитат:

- Mabekoje, O.O., Jibril, F.L., Baba, J. and Isah, R.M., 2023. Biotyping and Serological Characterization of *Yersinia enterocolitica* Isolates In Human and Pigs in Selected Farms and Hospital in Shango Community, Minna, Niger State, Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*,27(6), pp.1319-1330.

- Angelovska, M., Zaharieva, M.M. and Najdenski, H., *Yersinia enterocolitica*-Isolation, Pathogenicity, and Prevalence in Farms for Slaughtered Pigs. *ACTA MICROBIOLOGICA BULGARICA*, p.118.

IX Благодарности

Изказвам благодарност на научния си ръководител чл. - кор. Христо Найденски, за визията, насоките и научният му принос към работата, за експертното му мнение, за подкрепата и търпението му през тези години. Благодаря за предоставената възможност и условия да работя с методи от инфекциозната микробиология и молекулярна биология,

на доц. Мая Захаријева, която ме въведе в света на LAMP метода и позволи да ползвам всички нейни реактиви и ресурси, за несебичното споделяне на знания, съвети и посоки,

на всички колеги от департамент „Инфекциозна микробиология“, за препоръките и че ме приеха като част от колектива, на доц. Късовски и специалист Ива Цветкова, които споделяха техния опит, което допринесе експериментите да текат по-леко,

На всички колеги от ИМикБ за колегиалното отношение, на Ръководството и колегите от административното обслужване за одзивчивостта и навременното им съдействие,

На моите приятели доц. Любка Думанова, доц. Таня Димова, главен асистент Петър Грозданов и главен асистент Лора Симеонова за приятелската помощ и подкрепа, посоките, идеите, житейските опити и ценните съвети, но най-вече за вятъра в гърб през целия период,

На сем. Нинови, моето семейство тук в София които безрезервно отвориха домът и сърцата им докато работех по дисертацията, за сърдечността, топлината и обичта им,

На родителите си, съпругът ми и децата ми – за тяхната безусловна любов и подкрепа, че винаги са до мен, за компромисите, търпението и вярата в мене. Обичам ви много!

