

С Т А Н О В И Щ Е

от проф. Мария Богомилова Ангелова, дбн, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН

върху дисертационен труд, представен пред научно жури, сформирано със заповед № I-115/2.10.2023 на Директора на Института по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН

за получаване на образователната и научна степен “Доктор” в Професионално направление: 4.3. Биологични науки (Микробиология)

Автор: Мая Ангеловска

Тема: **Разпространение и характеристика на ентеропатогенни щамове *Yersinia enterocolitica*, изолирани от свине**

Научен ръководител: чл.-кор. проф. Христо Найденски, дмн

Актуалност и значимост на дисертационната теза

Yersinia enterocolitica е един от най-важните ентеропатогени, а йерсиниозата е една от водещите зоонози в Европа. Публикуваните данни от ESFA за 2020 г доказват глобалното разпространение на това заболяване. Този патоген е отговорен за инфекции при човека, особено при малки деца и пациенти със съпътстващи патологии, което е предпоставка за развитието на системни заболявания. Въпреки сериозните проблеми, данните за разпространението на *Y. enterocolitica* сред хора и животни са недостатъчни.

Прасетата са най-важният резервоар за *Y. enterocolitica*. Известно е, че при клане бактерията може да премине от сливиците към всички органи и така да се стигне до замърсяване на трупа. В резултат на това има риск от предаване на патогена към хората. Поради психрофилната си природа *Y. enterocolitica* расте и се размножава при ниски температури по време на съхранението на хранителните продукти. Това е причината, поради която охладените и замразени храни могат да бъдат потенциални резервоари и източници на инфекция, както и фактори, отговорни за предаването на патогенни щамове. Ето защо, оценката на микробиологичния риск от присъствието на *Y. enterocolitica* при прасета за клане е от особено голямо значение. Използваните методи за доказване на бактерията са трудоемки и изискват много време. Необходимо е да се разработят достатъчно ефективни методи, съчетаващи молекулярно-биологични и конвенционални подходи за бърза идентификация на *Y. enterocolitica* в проби от прасета, предназначени за клане. Всичко това подчертава актуалността и перспективността на избраната тема. Искам да отбележа, че интересът на учените към проблема непрекъснато нараства, за което говори огромният брой публикации в последните години. Голяма част от тях са посветени на характеристиката на това патогенно заболяване в национален мащаб за различни европейски страни. С тази дисертация и България се присъединява към общите усилия. Още повече, че у нас все още няма ефикасни методи, внедрени във ветеринарно-медицинската практика.

Познаване на проблема

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 158 компютърни страници и е илюстриран с 16 таблици и 26 фигури. Искан да отбележа отличното качество на снимките. Литературният обзор е изготвен целенасочено и конкретно. В него са отразени 294 публикации на латиница, кореспондиращи с поставените задачи. Тук подробно са разгледани всички аспекти на проблема за йерсиниозата, като са включени изследвания от последните години, но без да се пренебрегва историческата справка. В края е обособен подраздел, в който са изтъкнати нерешените въпроси и е аргументирана необходимостта от разработката. Според мен това е много добра идея, която заедно с включените в обзора 2 фигури и 5 таблици улеснява читателя да оцени актуалността на дисертационната теза.

Целта на настоящата дисертация е изведена от необходимостта с научни подходи да се разработи надежден метод за определяне на *Y. enterocolitica* и да се предаде на лабораторната практика. Тя е ясна, добре формулирана и обединява всички направления на експерименталната работа. За реализирането на тази цел са формулирани 8 конкретни, взаимно обвързани задачи, които включват всички задължителни критерии за създаване на нов метод. Още тук се вижда сериозният обем работа, поставена пред докторантката.

Методика на изследването

Разделът "Материали и методи" демонстрира изключително широк набор от методи. Те са съобразени с конкретните изисквания на експеримента. Включени са рутинни микробиологични методи, както и най-съвременни молекулярно-биологични, биохимични и др. като напр. PCR и RT PCR, LAMP и др. Трябва да се отбележи, че всички методи са описани много подробно, което позволява тяхното коректно възпроизвеждане.

Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Раздел „Резултати” показва мащабността на разработката. Още първите редове впечатляват с броя обработени 790 проби, събрани от ферми в различни райони на страната и в различни сезони. На тази широка база са изолирани 920 колонии, които по своите макроморфологични характеристики съответстват на представителите на род *Yersinia*. Ангеловска е направила биохимични тестове на всички и установява, че 136 (21%) от тях вероятно принадлежат към вида *Y. enterocolitica*. Следва молекулярно-генетична идентификация на изолатите. Много подробно са анализирани статистически обработените данни за всеки отделен щам. Следващите стъпки в проучването касаят охарактеризирането на щамовете като биотип, серотип и фаготип и чувствителността им към антибиотици. Интерес представляват експериментите за идентификацията на гените, отговорни за патогенния потенциал. Получени са данни за наличието на гените *ail*, *ystA* и *yadA* в 43 от изолираните щамове, представена е и детайлна интерпретация за тяхното присъствие или отсъствие. Фигурите в този подраздел още веднъж подчертават сериозният обем на

изследванията. В резултат на извършеното е създадена колекция от щамове и техния ДНК материал, а това може да бъде основа за бъдещи изследвания. Трябва да се подчертае и анализът, който прави Ангеловска относно регионалното разпределение на инфектираните прасета, съпоставката между отделните ферми и значението на сезона.

В съответствие с поставените задачи са проведени експерименти за разработване на нови молекулярни методи за установяване наличието на *Y. enterocolitica*. В резултат на много подробно проучване са получени данни за оптимизиране на LAMP протокола на базата на доказване на *phoP* гена при патогенните щамове. В разработката са включени логически следващи съвременни методични подходи за определяне концентрацията на ДНК, селективността на праймерите, чувствителността на LAMP реакцията и нейното отчитане в реално време (*qPCR*). Така оптимизираният протокол показва 100% ефективност при изкуствено заразени проби от свински фецес. Същият резултат относно диагностичната специфичност, чувствителността и точността на LAMP реакцията е постигната и при щамове, изолирани посредством ISO стандарта и такива изолирани директно от тъканите на тонзилите и фецесите на свине за клане. Получените данни доказват, че оптимизираният LAMP протокол за доказване на патогенни *Y. enterocolitica* директно от тонзилите и фецесите е по-чувствителен от конвенционалния PCR метод.

Представянето на резултатите е съчетано с умела дискусия по всички етапи от разработката на базата на подходящи литературни източници. Този раздел демонстрира също сериозната експериментална работа на докторантката и нейните задълбочени познания в тази област. Прави впечатление подхода ѝ да обсъжда много подробно всеки етап от проучването, да оценява чувствителността на метода, да предлага по-добри условия за избягване на фалшиво положителни резултати и замърсяването на пробите, да сравнява постигнатото с данните на други автори. В края на дискусията Мая Ангеловска подчертава предимствата на новия протокол и обосновава необходимостта от въвеждането му в лаборатории и при полеви условия.

Искам със задоволство да подчертая много доброто оформление на дисертацията, стегнатия научен стил, на който е написана, коректното отразяване на резултатите в таблици и фигури, както и тяхното професионално представяне.

Според мен, изводите са логично следствие от експерименталните данни и дават необходимата информация за стойността на проведените изследвания. Трябва да се изтъкне, че поставената цел е постигната. Приемам формулировката на приносите и искам да подчертая тяхното значение в теоретичен и в научно-приложен аспект. Оценявам положително и направената препоръка за практиката.

Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Данните от дисертацията са включени в 2 научни статии и 12 участия в научни форуми. Статиите са журнални и са отпечатани в списание *Antibiotics* с квантил Q1 и *Acta*

Microbiologica Bulgarica с кватил Q4. Статията в Antibiotics вече имат 2 цитата, въпреки че е публикувана през 2023 г. Докладите са представени на 9 международни и 3 национални форума. Това ми дава основание да считам, че резултатите на Мая Ангеловска са станали достояние на нашата и международната научна общност. Във всички статии и в 9 участия докторантката е на първо място, което доказва нейният значим дял в разработването на дисертационния труд.

Лични впечатления

Познавам Мая Ангеловска от работата ѝ в Института по микробиология. За мен тя е един перспективен млад учен със способност да преодолява трудностите и да се справя с предизвикателствата. Убедена съм, че и занапред Ангеловска ще работи в областта на микробиологията със същото желание и ентузиазъм.

Заклучение

В заключение искам да подчертая, че докторантката е изпълнила изискванията на ЗРАСРБ, като и тези в Правилника към него на ИМикБ, БАН за придобиване на образователната и научна степен "доктор". Материалът, който представя Мая Ангеловска е дисертабилен, темата е актуална и предлага съвременно ниво на важен за теорията и практиката въпрос. Проведените експерименти са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки. Извършена е огромна експериментална работа, като поставеният проблем е многостранно и детайлно проучен на съвременно ниво, направени са съществени приноси, формулирано е предложение за приложение в практиката. Към тази характеристика на дисертационния труд искам да добавя, че според мен, Мая Ангеловска излиза от докторантурата като добре подготвен специалист в областта на инфекциозната микробиология и молекулярната биология, усвоила е голям брой съвременни методи, получила е опит при интерпретиране на научни данни. Всичко това ѝ дава квалификация на млад учен, достоен конкурент на колеги от чуждестранни лаборатории.

Въз основа на направения разбор и на доказаното израстване на докторантката, предлагам на уважаемите членове на научното жури, сформирани със заповед № I-115/2.10.2023 на Директора на Института по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН да присъдят на **Мая Ангеловска** образователната и научна степен "**доктор**" по научно направление 4.3 Биологични науки (Микробиология).

27. 10. 2023 г

София

.....
/проф. Мария Ангелова, дбн/