

РЕЦЕНЗИЯ

от професор д-р Румен Веселинов Караколев, от Националния диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт /НДНИВМИ/ – ИРЛ Велико Търново, рецензент на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор” в професионално направление Биологични науки, научна специалност Микробиология 01.06.12

**Тема: „РАЗПРОСТРАНЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НА ЕНТЕРОПАТОГЕННИ
ЩАМОВЕ *YERSINIA ENTEROCOLITICA*, ИЗОЛИРАНИ ОТ СВИНЕ ”**

Автор на дисертационния труд: Мая Ангеловска от Институт по микробиология „Стефан Ангелов”, Българска академия на науките.

Биографични данни за кандидата

Авторът на представения дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор” по шифър 4.3. направление „Биологични науки” (специалност «Микробиология», 01.06.12). Мая Ангеловска е родена на 02 май 1982 г. Завършва средно образование в гр. Битоля, Северна Македония. През периода 2000-2006 г. се обучава в Софийски университет «св. Климент Охридски» и придобива последователно квалификация Бакалавър по специалност молекулярна биология и Магистър по молекулярна биология – вирусология.

През периода 2006-2007 г. е специалист биолог-вирусолог в Институт по микробиология «Стефан Ангелов» на БАН, а от 2012 г. до сега е специалист-микробиолог в същия институт. Научните интереси на кандидата са свързани с конвенционални методи за доказване на патогени, методи за изолиране и идентификация на хранителни патогени, молекулярни методи за доказване и типизация на патогенни бактерии, молекулярно доказване на вирулентни фактори, определяне на антибиотична чувствителност (метод на микротитруване и агар-дифузионни методи) и др.

Мая Ангеловска е участвала в редица международни научни конгреси и конференции, работила е като член на научни колективи по проекти, финансирани от Фонд научни изследвания на МОН.

Оценка на дисертационния труд

Структура

Дисертационния труд на тема: „РАЗПРОСТРАНЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НА ЕНТЕРОПАТОГЕННИ ЩАМОВЕ *YERSINIA ENTEROCOLITICA*, ИЗОЛИРАНИ ОТ СВИНЕ” е написан на 157 страници, структуриран е по общоприетите изисквания и съдържа следните раздели: Въведение - 3 стр., Литературен преглед - 45 стр., Цел и задачи - 1 стр., Материал и методи - 14 стр., Резултати - 42 стр., Обсъждане на резултатите - 16 стр., Изводи - 1 стр., Приноси - 1 стр., Използвана литература - 20 стр.

Дисертацията съдържа 26 фигури и 16 таблици. В литературния списък са включени 294 литературни източника.

Актуалност

Yersinia enterocolitica предизвиква нестихващ интерес сред международната научна общност, тъй като е причинител на зооноза – йерсиниозата при човека и животните. Това е третото по значимост заболяване сред най-разпространените в страните от Европейския съюз. Ето защо, темата на представената дисертация е изключително актуална, като си има предвид и факта, че свинете са основен източник и безсимптомен носител на йерсинии в тонзилите и Пайеровите плаки, а при клане се създават условия за контаминиране на околната среда, създават се условия за попадането им в хранителната верига.

Литературен преглед

В обем от 45 страници е извършен подробен преглед на литературни източници, свързани с разглежданите проблеми в дисертационния труд. Литературният обзор е целенасочен, обширен и същевременно аналитичен, като включва наши и чужди автори. Застъпени са литературни източници от последните години, като не са пренебрегнати и по-стари автори с основополагащи изследвания по отделните теми. Това показва добра литературна осведоменост, откроява се умение за анализ и интерпретация на литературни данни и създава необходимата база за собствените изследвания на автора. В края на раздела е отредено място за анализ на нерешени проблеми по темата, свързани оценката на разпространението и качествено определяне на *Y. enterocolitica* от заклани свине. Това дава възможност на кандидата много точно да формулира целите и задачите на своите собствени проучвания.

Цел и задачи

Авторът си поставя целта да проучи разпространението на ентеропатогенни щамове *Y. enterocolitica*, изолирани от свине на възраст за клане чрез конвенционални и съвременни молекулярни методи, както и да се разработи бърз и икономически изгоден протокол за качествено определяне на *Y. enterocolitica* в проби директно от тонзилите и фецес на свинете за клане.

За постигане на целта са определени за решаване осем отделни задачи, които са правилно поставени и ясно следват логиката на експерименталния дизайн на за реализиране на избраната цел.

Материали и методи

Изследванията са проведени с помощта на съвременни лабораторни методи, като се започва със златния стандарт за доказване на патогена в храни (БДС EN ISO 10273:2003) и се премине към молекулярнобиологични тестове, определяне на биотип, серотип и плазмид-носителство, определяне на чувствителност към антибиотици и примково-медирана изотермална амплификация (LAMP). Методите са ясно и точно описани и дават обективна възможност за постигане на поставените цели и задачи и очакваните резултати.

Резултати, обсъждане, изводи и приноси

Получените резултати съответстват на поставените задачи, изложени са ясно и изчерпателно. Дисертационният труд е богато онагледен с достатъчен брой таблици и фигури с необходимата информационна стойност. Обсъждането на резултатите е компетентно и подробно извършено, отличава се с аналитично мислене и способност за сравнения, открояване на новите научни данни и приносите на автора.

По отношение на поставената цел, а именно – проучване разпространението на ентеропатогенни щамове *Y. enterocolitica*, изолирани от свине и лабораторни методи за тяхното определяне, авторът подлага на изследване общо 601 материала от заклани свине в кланица, която обслужва различни региони в България. От тези материали, стерилно са взети по една двойка тонзили, опаковани поотделно и надписани. След разрез на дебелото черво са събрани 189 броя проби фецес от същия брой свине за клане, като се осигурява съответствие между номерата на събраните тонзили и фецес. Всички проби произхождат от седем

свиноферми за угодяване и обхващат 4 различни географски области на България.

В хода на собствените проучвания, авторът изолира и идентифицира патогена чрез БДС EN ISO 10273:2003, извършва видова идентификация на изолатите чрез секвениране на гените 16SrRNA, определя биохимичните и патогенни характеристики на изолатите. Проследено е гететичното разнообразие и чувствителността към антибиотици на йерсиниите и е създадена банка щамове и тяхна ДНК.

За оптимизацията на LAMP протокола са използвани 32 предварително идентифицирани и познати щамове, описани надлежно в табл. 4.1. За доказване на патогена чрез оптимизирания LAMP протокол е използвано директно изолиране на геномна ДНК от по 30 проби от свине (тонзили и фецес). Изолираната ДНК е послужила, като матрица за доказване на *ail* гена чрез конвенционален PCR.

Резултатите показват, че *ail* генът е открит само в осем ДНК проби (8/30), изолирани директно от тонзилите и четири ДНК проби (4/30), изолирани директно от фецесите. Положителните проби за патогенен *Y. enterocolitica*, чрез PCR доказване са 12. При резултатите от LAMP анализа не се наблюдават несъответствия между получените LAMP продукти при отчитането им чрез багрило и електрофоретично. От тридесетте проби от тонзили, които са изследвани, положителен LAMP продукт за *phoP* гена, е доказан в двадесет и пет проби (25/30).

В резултат от извършените собствени изследвания, авторът установява присъствие на *Y. enterocolitica* в 6,7% от свинете заклани в различни области на България. Посочва се, че географското разположение не оказва влияние върху присъствието на патогена. *Y. enterocolitica* е изолирана само през студения период – октомври/март.

Друг основен извод показва, че от изследваните свине се изолира само *Y. enterocolitica* биотип 4/серотип O:3.

Установено е високо носителство на вирулентните детерминанти между щамовете *Y. enterocolitica*, изолирани от свинете за клане.

Установени са три профила на резистентност срещу най-често използваните антибиотици, както и присъствие на мултирезистентни щамове *Y. enterocolitica*. Изолираните щамове са тествани спрямо действието на 15 антибиотици, принадлежащи към 8 класа и един неклассифициран антибиотик. Прави впечатление, че всички изпитвани 43 щамове са чувствителни към гентамицин, цефтриаксон, амикацин и ципрофлоксацин и показват универсален профил по отношение на резистентност към бацитрацин, ампицилин, цефамандол и новобиоцин. При два щамове се наблюдава мултирезистентност – те са резистентни допълнително и към още три други антибиотици: тетрациклин, налидиксова киселина и хлорамфеникол. Спрямо представените резултати

са обособени три профила на резистентност при изолираните *Y. enterocolitica*.

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

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

Обобщавайки получените научни данни, си позволявам да изтъкна, че предложения за рецензия дисертационен труд е изпълнен на високо професионално и научно равнище, отличава се с ясни и точни научнообосновани заключения и изводи. Очевидно, свинете от кланица са източник на ентеропатогенни щамове *Y. enterocolitica*, които след попадане в хранителната верига могат да причинят инфекции при хората. Доказването на ентеропатогена в хранителни проби се осъществява рутинно чрез ISO 10273:2003, което отнема много време и е с по-ниска чувствителност. Затова е необходимо въвеждане на нови, по-бързи методи с по-висока чувствителност, които директно да доказват патогените в храни, или проби от свине. Авторът доказва, че LAMP с всички негови предимства оправдава използването му като бърз диагностичен метод в нискобюджетни лаборатории и в полеви условия.

Оформени са 9 извода и 3 оригинални приноса.

Публикации във връзка с дисертацията

Мая Ангеловска е представила 2 публикации във връзка с дисертацията. От тях 1 публикация е в списание Antibiotics, индексирано в Scopus, Web of Science и други бази данни и е с висок IF (4,8 за 2022). И в двете публикации е водещ автор, което показва умения за самостоятелна и екипна работа и отразява целенасочената научноизследователска дейност, свързана с разработването на дисертационния труд. Авторът е приложил списък с 12 участия в международни научни форуми с разработки във връзка с дисертацията.

Препоръки за практиката

Получените научни данни относно оптимизирането на LAMP протокола за директно доказване на *phoP* гена на ентеропатогенни *Y. enterocolitica* в тонзили и фецес на свине за клане, са оформени, като препоръка за практиката, тъй като те представляват интерес за хуманната и ветеринарна лабораторна практика и за лабораторния контрол по безопасност на храните.

Автореферат

Представеният автореферат е правилно структуриран, илюстриран е с необходимите фигури и таблици, съдържа 50 страници и ясно отразява целта, задачите, резултатите, изводите и приносите от дисертационния труд.

Заклучение

Дисертационният труд на Мая Ангеловска на тема: „РАЗПРОСТРАНЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НА ЕНТЕРОПАТОГЕННИ ЩАМОВЕ *YERSINIA ENTEROCOLITICA*, ИЗОЛИРАНИ ОТ СВИНЕ” удовлетворява в необходимата степен изискванията на ЗРАСРБ и представлява задълбочена научна разработка със значителни оригинални приноси за микробиологията, хуманната медицина, ветеринарната медицина и безопасността на хранителните продукти от животински произход.

Това ми дава основание да изразя своята **положителна оценка** за дисертацията, представените научни трудове и научната дейност на кандидата.

Като имам предвид посочените по-горе мотиви, предлагам на уважаемите членове на научното жури да гласуват положително за присъждане на Мая Ангеловска на образователната и научна степен „Доктор” по шифър 4.3. професионално направление Биологични науки, научна специалност 01.06.12 Микробиология.

12.10.2023 г.
Велико Търново

Изготвил: На основание
чл. 2 от ЗЗЛД
(проф. д-р Румен Караколев) /