

Рецензия

за защита на дисертационен труд
за присъждане на

образователна и научна степен „Доктор“

в област на висше образование

4. „Природни науки, математика и информатика“ по
професионално направление 4.3. „Биологически науки“ и
научна специалност „Микробиология“ шифър 01.06.12

на тема

„Молекулярно-биологични проучвания за характеризиране на клинични изолати *Clostridium difficile*“

Автор на дисертацията

Елина Георгиева Добрева

Научен ръководител

Доц. д-р Росица Вачева-Добревска, дм
Проф. д-р Тодор Кантарджиев, дмн, мзм

Рецензент

Съгласно Заповед № 539 от 28.12.2012 на Директора на НЦЗПБ

Проф. Д-р Людмила Боянова Георгиева, дм, дмн

Професор в Катедра медицинска микробиология

На Медицински университет- София

Тел. 08877 39 086; e-mail l.boyanova@hotmail.com

Научна специалност – микробиология

Декларирам, че нямам общи научни трудове с докторанта.

ДАННИ ЗА КАНДИДАТА

Елина Добрева придобива магистърска степен по микробиология, Специалност „Молекулярна Микробиология“ в Биологическия факултет на СУ Климент Охридски. Има специалност по микробиология и от 2010 г. е свободен аспирант в НЦЗПБ по представената тема. Понастоящем работи в НРЛ „Контрол и мониториране на антибиотична резистентност“, сектор ВБИ, отдел Микробиология, като биолог.

АКТУАЛНОСТ НА ТРУДА

Съвременен проблем с голяма тежест е *Clostridium difficile*-асоцираната болест, които се свързва с постантибиотична диария, или нейната специфична само за *C. difficile* и тежка по клиничната си картина форма-псевдомембранозния колит.

В последните години, проблемът на *Clostridium difficile*-асоцираната болест се увеличи след появата на хипервирулентни щамове *C. difficile*, продуциращи десетки пъти повече токсини и предизвикващ тежки колити, и още по-висок леталитет. Тази инфекция вече трябва да се диагностицира с най-съвременни средства при всички хоспитализирани пациенти и дори вече при някои извънболнични пациенти. Това показва сериозната тежест и актуалността на темата на дисертацията.

Диагностиката на *C. difficile*-асоцираната болест на съвременно ниво трябва да включва молекулярните методи за бързо и акуратно доказване на инфекцията и за на свързаните с клиничната картина екзотоксини на тези бактерии.

СТРУКТУРА И РАЗДЕЛИ НА ПРЕДСТАВЕНИЯ ТРУД

Представеният дисертационен труд е оформен в както следва – въведение (2 стр.), литературен обзор (33 стр.), цел и задачи (1 стр.), материал и методи (17 стр.), резултати и обсъждане (32 стр.), изводи (1 стр.), приноси и практическа насоченост (1 стр.) и литература (9 стр.), както и публикации и участия в научни форуми във връзка с дисертацията.

Във **ВЪВЕДЕНИЕТО** се обосновава актуалността и тежестта на проучвания проблем.

ЦЕЛТА е определена като апробиране, оптимизиране и прилагане на молекулярно-биологични методи за характеризиране на клинични изолати *C. difficile* в България. За постигане на целта логично са поставени 7 задачи. Хубав подход е, че се цели охарактеризиране на щамовете с комплексното им проучване вкл. с културелни методи, имуноензимен анализ и молекулярно типизиране с PCR-риботипиране и мултилокусен анализ на тандемно повторени последователности -MLVA7 метод.

В **ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР** личи задълбочено и добре осмислено познаване на проблема от дисертанта. Той обхваща спектъра от интересните исторически данни за *C. difficile* до най-съвременните данни за този клостридиален вид и за диагностиката и терапията на свързаните инфекции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ. За период от 4 години са изследвани фекални проби от голям брой (108) болни с диария след антибиотична терапия от 9 болници.

Използвани са три групи методи, вкл. класически методи като:

- културелно изследване
- имуноензимен тест за доказване на токсини А/В на *C. difficile* и
- латекс аглутинация за доказване на причинителя,

както и молекулярни методи за доказване на гени на *C. difficile*, напр.

- Real time PCR метод за доказване на гените за синтеза на ензима глутамат дехидрогеназа и за цитотоксина (токсин В),
 - PCR за доказване делецията в *tcdA* гена,
 - PCR-метод за доказване на *cdtA* и *cdtB* гените
- и методи за молекулярно типирание на изолатите като
- PCR-риботипиране и
 - MLVA

Използването на този набор методи позволява задълбочено и комплексно охарактеризиране на щамовете.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. **Резултатите** са подробно описани, добре илюстрирани и анализирани, като **изводите** отговарят на поставените задачи. Въведена е допълнителна хлороформна екстракция при екстрахирането на ДНК от *C. difficile*.

2. Разработен е PCR метод за определяне на делеция в *tcdA* гена и разграничаване на непродуциращите токсин А щамове. Определено е, че за доказване на тази делеция, класическата PCR техника е по-подходяща от EvaGreen Real time PCR. Аналогично е доказано, че класическата PCR техника трябва да се предпочита пред EvaGreen Real time PCR за доказване на гените *cdtA* и *cdtB*.

3. Въведен и оптимизиран е двоен EvaGreen Real time PCR метод за идентификация на щамовете *C. difficile* с *gluD* гена и успоредно доказване на *tcdB* гена за цитотоксина. Това е от значение защото MLVA е силно дискриминативен метод за генотипиране на *C. difficile* и може да разграничи щамове с един и същ PCR риботип, което го прави подходящ за епидемиологични проучвания, особено на епидемични взривове.

4. Други значими резултати от проучването са определянето на честотата на токсигенните варианти на *C. difficile* у нас, като продуциращите токсин А,

токсин В и бинарен токсин щамове са намерени в 9.4% от щамовете. Установено е честото разпространение на риботип 017 у нас, който се свързва с тежка клинична картина поради високата си спорулираща активност и силна резистентност към действието на много дезинфектанти. Риботипове 078 и 012 също са установени, макар и по-рядко. Щамовете с тези риботипове се считат понастоящем за хипервирулентни щамове. Установено е, че всички намерени у нас риботипове на *C. difficile* са свързани с тежко протичане на *C. difficile* асоциираната болест.

ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

- ❖ Цитираните литературни източници са 165, от които повечето (160) са на латиница.
- ❖ Цитирани са публикации с историческа стойност (от 1935 г) до най-съвременни от последните години. Така е представена цялостна картина на началото и развитието на проучванията на *C. difficile*.

ПРИНОСИ

В дисертационния труд на Елина Добрева могат да се установят **ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ** относно

- ❖ двойния EvaGreen Real time PCR метод за идентификация на щамовете и успоредно доказване на гена за цитотоксина, който е обект само на единични публикации в световен мащаб и е оптимизиран в настоящето проучване.

За съжаление, тези приноси са представени на конгрес, но все още не са публикувани, предстои тяхното изнасяне пред международната общност.

Дисертантът има редица **ПОТВЪРДИТЕЛНИ** за нашата страна научно-теоретични приноси, между тях

- оптимизиране на метода за екстрахиране на ДНК от *C. difficile*

- определянето за първи път у нас на честотата на четирите токсигенни варианта на *C. difficile*
- доказване са неописани до сега за нашата страна риботипове.
- генетично определяне щамовете *C. difficile* с неактивен токсин А.

От стойност са **НАУЧНО-ПРИЛОЖНИТЕ ПРИНОСИ** за въвеждането на два молекулярни метода за типирание на щамовете в епидемични ситуации и при вътреболнични инфекции.

ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Елина Добрева представя **5 публикации**, в 2 от които е първи автор. Публикациите са в наши списания, като две от тях имат импакт фактор.

Тя е първи автор на една от публикациите в списание с импакт фактор (Comptes rendus de l'academie Bulgare des sciences, с импакт фактор 0.210). Общият **ИМПАКТ ФАКТОР** на публикациите е 0.420.

Кандидатът има и **8 конгресни участия**, от които 4 в чужбина и, което е от значение, е първи автор на общо 4 от конгресните участия. Един от постерите у нас е спечелил наградата „Най-добър постер на конгреса, а един от постерите в чужбина е със спечелен грант на ESCMID Study group for *Clostridium difficile*.

ПРЕПОРЪКИ ЗА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Някои от изреченията (напр. стр. 6, ред 12; стр. 7 ред 1-2) следва да се придружат с подходяща референция. Цитираните в текста референции следва да се коригират напр (Al Saif N., 1996) следва да се даде като (Al Saif and Brazier, 1996). Също така (Боянова Л., М. Марина, Т. Кантарджиев, И. Митов 2008) следва да се представи като (Боянова и съавт., 2008).

Някои думи следва да се дадат на български като напр. „релапсите“ да се дадат като „рецидивите“.

Приносите трябва да се групират в три групи като оригинални, потвърдителни за страната и научно-приложни.

Тези препоръки не намаляват по същество стойността на дисертационния труд, защото са от технически характер.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Като имам предвид нарастващата честота и тежест на *C. difficile* асоциираната болест, комплексната характеристика на причинителя е понастоящем от много голямо значение и полза. Изпозваните методи, получените резултати и установените приноси в настоящата дисертация ме карат убедено да предложа на членовете на уважаемото жури да присъдят образователната и научна степен „доктор“ на **Елина Георгиева Добрева**.



Проф. Д-р Людмила Боянова Георгиева, дм, дмн.

София, 04.03.2013 г.