

по процедура за защита дисертационния труд на Елина Георгиева Добрева – биолог в в  
"Национален Референтен Център по Вътреболнични инфекции" на тема  
"Молекулярно-биологични проучвания за характеризирание на клинични изолати  
*Clostridium difficile*" с научен ръководител доц. д-р Росица Вачева, дм за придобиване  
научно-образователната степен „ДОКТОР“ в област висше образование 4. Природни  
науки, математика и информатика, направление 4.3 Биологически науки и научната  
специалност „Микробиология“

от проф. д-р Иван Гергов Митов, дмн, Ръководител Катедра по медицинска  
микробиология при Медицински факултет при МУ-София

*C. difficile* е част от нормалната чревна флора на малка част от хората. Носителството и колонизацията се увеличават в хоспитализираните пациенти. След 1970 г. стана известно, че токсин продуциращи *C. difficile* са отговорни за антибиотик-асоциирани гастроинтестинални инфекции, вариращи от леки самоограничаващи се диарии до остър живото-застрашаващ псевдомембранозен колит. Заболяванията (с ендегенен или екзогенен произход) се развиват основно в индивиди на антибиотична, цитостатична или имуносупресивна терапия и развитие на дисбактериоза.

В микробиологичната диагностика изолацията на бактерия установява колонизация, но не и заболяване, дори и при наличие на клинични симптоми. Необходимо е доказване на продукция на характерните за вирулентните щамове екзотоксини. За целта се предлагат редица фирмени имуноензимни и латекс-аглутинационни тестове за фекален антиген, които не притежават необходимата чувствителност. Понастоящем на преден план излизат тестовете за доказване токсин кодиращите гени в ДНК, екстрахирана от клиничния материал.

След 2003 г. в Америка и Европа се регистрират вътреболнични инфекции, причинени от високо вирулентен и резистентен към хинолони щам, характеризиращи се с тежко протичане и висока смъртност. Установено е, че повишената вирулентност се дължи на мутации, които неутрализират гените регулиращи продукцията на бактериалните ентеро- и цитотоксини. Навлизането на молекулярно-биологичните методи създава нови възможности за развитие и усъвършенстване диагностиката и охарактеризирането потенциалната патогенност на щамовете *C. difficile*. Всичко това обуславя актуалността на дисертационния труд и необходимостта от проведените молекулярно-биологични проучвания за характеризирание на клинични изолати *C. difficile*.

Трудът е написан на 102 стр., от които 90 текст и 12 - литературни източници. Заглавието отразява същността на работата. Изложението е съразмерно разпределено в 7 раздела: въведение, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, резюме и изводи.



Дисертационният труд е оптимално онагледен с 28 фигури и 15 таблици.

Литературната справка отразява съвременното състояние на проблема и показва много добрата осведоменост на автора. Включва множество източници, повечето от които от последните 10 години. Изчерпателно са изброени и използвани в обзора и обсъждането впечатляващите достижения на българските автори работещи по проблема.

Литературният обзор дава изчерпателна информация за *C. difficile* като условно-патогенен и патогенен причинител, биологичните му особености, екзотоксинна производителност, епидемиологичните особености на разпространението му в природата и сред хората и животните, рисковите фактори за възникване на инфекция, класическите и съвременни имунологични и молекулярно-биологични методи в диагностиката и научните изследвания.

Представените в края на съвременните генетични методи с техните големи възможности за проучване на *C. difficile* и причинените от бактерия инфекции обуславя прецизно формулираните цел и задачи, свързани с епидемиологичното типизиране и изследване на генетичните локуси на лекарствена резистентност на българските изолати, и които напълно отговарят на замисъла на труда и постигнатите резултати.

За провеждане на изследванията са използвани голям набор класически и съвременни методи: културелни и за идентификация на изолатите; методи за изолация на ДНК; различни варианти на PCR и RT-PCR, вкл. мултилокусен анализ (MLVA); електрофорезни методи. Използвана е софтуерна програма за анализ на електрофоретичните профили.

Извършена е значителна по обем и разнообразна по характер експериментална работа. В резултат е оптимизиран EvaGreen RT-PCR метод за идентификация на клиничните изолати за доказване на гените, кодиращи цитотоксина – *tcdA* и делеция в гена, която го инактивира. Установено е, че по-сигурен метод за доказване на делецията е конвенционалният PCR метод. Оптимизирани са PCR методите за доказване на токсин-кодиращите гени, както и за дискриминиране на токсин А продуциращите от токсин А негативните щамове, на базата на делеция в *tcdA* гена. По доказването на екзотоксини А, В и бинарния токсин в изследваните пациенти е доказана циркулацията и относителния дял на три токсигенни и един нетоксигенен варианти *C. difficile*. Определени са циркулиращите в страната риботипове: 001, 002, 012, 014/020, 017, 023, 046, 070, 078 – всичките свързани с тежки инфекции и висок леталитет. От важно значение за практиката е доказването риботипове 017 и 014/020, разпространени с най-висока честота в България, и които са асоциирани с епидемии и в Европа. Посредством MLVA7 метода е осъществено епидемиологично типизиране на

клиничните изолати. Сред клиничните изолати с риботип 017 и 014/020 са доказани два клъстъра, откриващи се в едни и същи болници. MLVA методът се препоръчва за субтипизиране на генетично близки и епидемично свързани изолати. Посочените резултатите имат важен приносен характер за охарактеризиране на клиничните изолати *C. difficile* и в епидемиологичните проучвания на разпространението на патогенни и високо вирулентни щамове, както и анализирането на вътреболничните инфекции.

Трудът е оформен съобразно изискванията за докторските дисертации в медико-биологичната област. Към него мога да посоча единични критични бележки, които не могат да променят неговата висока научна стойност. В редица страници е оставяно празно място, което е могло да бъде избегнато чрез адекватно форматиране на фигурите, таблиците и текста. Спорно е навлизането на термини като патоген и ентеропатоген, вместо утвърдените патогенен или ентеропатогенен причинител (бактерий). Неправилно е използването на „вирулентни гени“ вместо „гени на вирулентност“ (вирулентни са бактериите). Използвани са термини на английски (напр. alignment или size marker), без да е направен опит за превод или описание на същността им. Заглавията в литературната справка не са номерирани.

Резултатите от обемната изследователска работа са публикувани в 5 статии в български списания, в 3 от които Елина Добрева е водещ автор. Две от статиите са в списание с импакт фактор. Резултатите представляват интерес и трябва да бъдат публикувани в реферирано международно списание. Изследванията са представени и на 8 научни форума, с което рецензираният труд е станал достояние на научната общественост, без да е изчерпан напълно неговият материал.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Дисертационният труд на Елина Добрева представлява първото задълбочено изследване върху генетичните характеристики на циркулиращите в България щамове *C. difficile* и техния патогенен потенциал. Достоянство на труда е постигането на оригинални приноси с научен и приложен характер. Резултатите от изследванията на българските изолати се съобщават за първи път в научната литература. Ето защо подкрепям и си позволявам да препоръчам на научното жури да присъди на Елина Добрева научно-образователната степен “Доктор” по научната специалност „Микробиология”.

РЕЦЕНЗЕНТ:



(Проф. д-р И. Митов, дмн)

16.03.2013 г.