

НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР  
ПО ЗАРАЗНИ И  
ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ  
№ 496  
13.03.2013  
Бул. „Янко Сакъзов“ № 26  
София 1504, тел: 9446990

## РЕЦЕНЗИЯ

**За защита на дисертационен труд за присъждане на  
образователната и научна степен :”доктор”**

в областта на висшето образование:

4. „Природни науки, математика и информатика”,  
по професионално направление: 4.3. „Биологични науки”  
и научна специалност „Микробиология”, шифър 01.06.12

**Автор: Елина Георгиева Добрева**

**Тема: Молекулярно - генетични проучвания за характеризиране  
на клинични изолати *Clostridium difficile***

**Научни ръководители:**

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

**Рецензент:** Съгласно Заповед № 539/28.12.2012г на Директора на НЦЗПБ

**Доц. Д-р Емма Едмонд Кьолеян, дм,**

Началник, Отделение по Клинична микробиология,

Медицински институт – МВР,

научна специалност „Микробиология”;

тел. 9821451, 0889441417; E-mail: [emma\\_keuleyan@yahoo.com](mailto:emma_keuleyan@yahoo.com)

## Кратки данни за кандидата

Дисертационният труд е изработен в Националния референтен център по ВБИ/ днес НРЛ „Контрол и мониториране на антибиотичната резистентност” към Отдел „Микробиология”, НЦЗПБ. Елина Добрева е магистър по микробиология - завършила е специалност „Молекулярна Микробиология” в Биологичния факултет на СУ „Климент Охридски”. Дисертантката има придобита специалност „Микробиология” и от 2010 г е свободен аспирант на НЦЗПБ по темата.

## Актуалност на дисертационния труд

В групата на „възникващите” микроорганизми, причинители на инфекции, се отнася *Clostridium difficile*. Открит през 1935 г и считан тогава като не-патогенен, днес *C. difficile* (CD) е доказан причинител на антибиотик-свързаната диария (в ~ 25 % от случаите), както и на псевдо-мембранозния колит и неговите живото - застрашаващи усложнения мегаколон, дебело-чревна перфорация и перитонит. *C. difficile* – асоциираната инфекция (CDAD) е типично свързана с медицинското обслужване, и по-рядко може да има амбулаторно проявление. Развитието на CDAD е най-често последица от продължителното приемане на широкоспектърни антибиотици, водещи до редуцията на нормалната чревна флора и позволяващи благоприятното развитие на *C. difficile*. Случаите на CDAD се увеличават глобално, свързано с честото предписване на антибиотици, не-рационалната антибиотична политика, увеличаването на увредени пациенти в напреднала възраст, както и такива със злокачествени образувания. Персистирането на причинителя в болничната среда, вкл. по ръцете на медицинския персонал, е пряко свързано с образуването на устойчиви спори, които не се повлияват от алкохолни дезинфектанти. Водещ патогенетичен фактор в развитието на заболяването е продукцията на токсини: токсин А, с характер на ентеротоксин, и токсин В, цитотоксин, кодирани съответно от гени *tcdA* и *tcdB*, разположени в острова

на патогенността на *C. difficile* PaLoc. Някои щамове продуцират допълнителен, Binary toxin, идентичен с  $\epsilon$ -токсина на *Clostridium perfringens*, който се кодира от гени, *cdtA* и *cdtB*, и води до допълнително дезорганизиране на ентероцита и утежняване на заболяването. Друг специфичен ген е *gluD*, кодиращ ензима glutamate dehydrogenase, излъчван във фецеса. През последните 10 години особена тревога по света предизвика епидемичното разпространение на хипер-вирулентен северо-американски клон, с делеция на негативния регулатор на гените *tcdA* и *tcdB*, продуциращ и бинарния токсин и характеризизиращ се с допълнителна антибиотична резистентност, вкл. към хинолони: *C. difficile* 027 NAP 1. Следователно, доказването на заболяването, бързото идентифициране на продукцията на токсини и епидемиологичното типичане на щамовете са от първостепенно значение в грижата за пациента, излекуването, спасяването на човешки живот, мерките в контрола на инфекциите и профилактиката на случаите. Докато в Канада, САЩ, Япония, Австралия, Западно- и Централно-Европейските страни методите на диагностика са вече рутинни, то в повечето Източно-Европейски страни и у нас опитът е скромнен. По-интензивните проучвания датират отскоро и се базират главно на културелното изследване, което също е трудно и бавно, тъй като става въпрос за взискателен анаеробен микроорганизъм, съчетано с тестове за токсигенност, с не абсолютна чувствителност (с EIA ~ 25 % от резултатите са фалшиво отрицателни). Златен стандарт в доказването на заболяването след изолирането на културата са тестовете за цитотоксичност, които са бавни, изискват клетъчна култура и антитела, и неудобни за практиката. Развитието на методите на молекулярната диагностика и генетично типичане предлага качествено нов подход за бързо и коректно поставяне на диагнозата и за епидемиологично типичане, позволяващо проучването на динамиката на щамове и гени, което определя тематиката като изключително актуална.

## **Структура и раздели на дисертационния труд**

Структуриран е съобразно изискванията на Правилника за прилагане на Закона за развитието на академичния състав в Р България. Той започва с *Титулна страница, Съдържание, Основни означения и съкращения, Въведение и актуалност на проблема* – 2 страници, *Литературен обзор* – 33 стр., *Цел и задачи* – 1 стр., *Материали и методи* – 17 стр., *Резултати и дискусия* – 31 стр., *Резюме на получените резултати и изводи* – 1 стр., *Декларация за оригиналност и Приноси* – 1 стр., *Библиография* – 9 стр., *Публикации и участия в научни форуми във връзка с дисертацията* – 3 стр., общо 102 страници.

**Литературният обзор** започва академично с данни за таксономията и класификацията на микроорганизмите, исторически данни, информация за културелното изолиране на *C. difficile*. Описани са клиничните и епидемиологичните аспекти на заболяването, механизмите на предаване на инфекцията, честотата на разпространение, предразполагащите фактори за колонизиране и заболяване, вкл. ролята на fomites (неудошевени предмети от болничната среда), както и ръцете на медицинския персонал, подчертано е значението на предшестващата антибиотична (и друга) терапия, допълнителното финансово натоварване на болниците, перспективата за пациента – не-редки релапси и ре-инфекции, засегнат е имунният отговор на макроорганизма, дефинирани са курсовете на антимикробна терапия на CDAD. Методите за доказване на *C. difficile* са представени детайлно и прецизно. Генетичните методи за доказване на гените на *C. difficile* като *tcdA*, *tcdB*, *gluD*, и други, са базирани главно на тяхното амплифициране, и с REAL time PCR, но възпроизводимостта на методите може да е ниска, поради наличието на разграждащи нуклеази. Задълбочено са описани генетичните методи за епидемиологично типизиране, между които се открояват особено два: електрофорезата в променливо електрично поле (PFGE), с отлична дискриминативна способност и репродуцируемост, и PCR- риботипизиране на 16S – 23S междугенен spacer, с преимущества по провеждането и възможност за между-лабораторно сравняване на резултатите. От методите, базирани на

амплифициране, като PCR-риботипиране, се препоръчва Мултилокусен анализ на вариабилен набор на тандемно повторени последователности (Multi Locus Variable number tandem-repeat Analysis, MLVA). MLVA може да бъде използван както за установяване на филогенетичните връзки на щамовете, така и при разшифроването на епидемични взривове с *C. difficile*.

Изложеното дотук дава възможност да се формулира **целта** на проучването – с молекулярно-биологични методи да се охарактеризират българските щамове *C. difficile*, а именно – с PCR-методи за доказване на гените, детерминиращи токсините, както и чрез генотипиране.

Във връзка с поставената цел са формулирани **7 задачи**, най-важните от които са:

- разработване, оптимизиране и прилагане на duplex EvaGreen Real-time PCR за идентификация на CD и едновременно доказване на токсин В (на гена *tcdB*)
- разработване, оптимизиране и прилагане на PCR методи за доказване на токсин-кодиращите гени *tcdA*, *cdtA* и *cdtB*
- молекулярно типирание на клиничните изолати чрез PCR-риботипиране и MLVA 7 – метод.

**Материали и методи.** Подробно е описана процедурата по изолиране на *C. difficile* от подбора на пациентите и правилата за вземането и транспортирането на материалите за микробиологично изследване, процедурите по култивиране и идентификация на *C. difficile* с препарат по Грам, латекс-аглутинационен тест и провеждането на ензимен имуен анализ (ЕИА). Ударението е поставено върху молекулярно-генетичните методи. Документирани са процедурите по изолиране на ДНК от *C. difficile*, и пространно са описани Real time PCR-методите: Duplex EvaGreen Real time PCR за идентифициране на гените *gluD* и *tcdB*, както и EvaGreen Real time PCR за определяне на гена *tcdA*, вкл. експериментите по проучване на чувствителността и специфичността на методите. Протоколирани са PCR методите: PCR метод за доказване на делецията в гена *tcdA*, PCR метод за

доказване на гените *cdtA* и *cdtB*; както и условията по електрофоретичното разделяне на ампликоните с капилярна електрофореза. Описани са детайлно методите за типирание на щамовете *C. difficile*: PCR-риботипиране и MLVA 7 – метод.

Най-значимата част от дисертацията е разделът **Резултати и дискусия**. За четири годишен период (2008-2012 г) са изследвани 120 фецеса на 108 пациента от 9 болници в страната, подбрани според критериите на ESCMID. Културелното изолиране е на Бруцела агар с 10 % овнешка кръв (селективна и неселективна). Резултатите от ИЕА (СТАВ, ImmunoCard toxins A & B, Meridian, USA) са положителни при 27 % от изследваните клинични проби и в 87 % от изследваните култури. Латекс-аглютинационната проба с Culturette CDT, BD, USA, доказваща глутамат-дехидрогеназата, идентифицира културите в 95 %.

Описанието на генетичните изследвания започва с изолирането на ДНК с модифициран Qiagen-метод.

Разработени са две групи PCR- методи - EvaGreen Real time PCR и конвенционален. Апробиран и усъвършенстван е Duplex EvaGreen Real time PCR метод за успоредно доказване на CD и на токсин В (чрез амплификация на гените *gluD* и *tcdB*). Той е приложим както при изследване на чисти култури, така и на клинични материали; с него е доказан *tcdB* в 91% от случаите. Разработен е и single EvaGreen Real time PCR метод за доказване на гена *tcdA*. Токсин А (+) се оказват 62 % от изолатите, докато при 28 % се установява делеция. Поради получаване на големи ампликони, се препоръчва при изследване за *tcdA* да се ползва конвенционална PCR, последвана от електрофореза. Продукцията на бинарния токсин е установена при 9 % от случаите.

Типизирането има голямо значение при обследването на вътреболнични взривове. PCR-риботипиране по Videt et al. е приложено при 25 референтни и 32 клинични щамата и се разграничават 9 риботипа.

Най-чести при българските щамове се оказват следните риботипове: 017 – в 28 %, 014/020 – в 16 %, 046 – 9 %. Риботип 017 се открива в щамове от три болници, при тежко болни пациенти, четирима от които завършват летално.

MLVA 7– методът (комбиниране на 7 локуса), изпълнен по van den Berg, позволява допълнително дискриминиране. Доказани са общо 25 MLVA 7-генотипа. Така щамовете с риботип 017 (A+B+CDT-) се разпределят в 3 MLVA 7- типа: 18, 19 и 25.

Основните резултати в дисертационния труд се припокриват напълно **с приносите:**

- Изследваните 32 клинични щамове, след сравнение с 25 референтни щамове, предоставени от ECDC, се отнасят към 9 риботипа: 001, 002, 012, 014/020, 017, 023, 06, 070, 078. Допълнително, прилагането на MLVA 7– метода, позволява по-нататъшно субтипизиране, общо 32 MLVA 7 суб-типове.
- Най-честите български риботипове са с относителен дял: 017 – 28 % и е различен от ECDC, 014/028 – 16 %, 046 – 9 %.
- Именно данните за риботип 017 са, че българските щамове са с характеристика A-B+, CDTA/B-. Епидемиологичните данни сочат, че се касае за 8 пациенти в напреднала възраст от софийски болници с тежка CDAD, с тежки съпътстващи заболявания; болшинството са получили терапия с ciprofloxacin, широкоспектърни пеницилини, пеницилин/инхибитор или цефалоспорин от I генерация, и при 4 е имало неблагоприятен изход.
- В помощ на рутинната диагностика са разработени и оптимизирани PCR методи за доказване на гените *tcdA*, *tcdB*, *gluD*, *cdtA* и *cdtB*, за препоръчване поне към 2 гена едновременно. Така PCR методи за доказване на *tcdA*, *tcdB*, *cdtA/B* са предназначени за бързо разграничаване на токсигенните от нетоксигенните щамове.

- Разработените и усъвършенствани методи за епидемиологично типирание (PCR- риботипирание и MLVA 7 – метод) позволяват да се направят базисни научни заключения относно произхода, еволюцията и движението на щамовете, в Европа и в света
- Тези методи са идеални за проучване на епидемични взривове, позволявайки да се докаже/отхвърли свързаността на щамовете и се трасира пътя на инфекцията.

Разделът **Библиография** обхваща 164 литературни източника, вкл. пет на кирилица. Общо 69 от източниците са от последните 10 години.

Дисертационен труд е изпълнен и написан с разбиране, задълбочено и многостранно, но същевременно ясно и разбрано, което говори, че дисертантката владее отлично материята и методологията. В допълнение, дисертацията е онагледена с таблици - 17 и перфектно изработени фигури (28 на брой, част от които – визуализиране на доказаните гени след електрофореза, анализ на кривите на топене на изследваните гени, и дендограми).

### **Приноси**

Приносите бяха детайлизирани по-горе. Тук ще акцентирам на най-важните:

- Дисертационният труд има характер на национално проучване за честотата на CDAD
- Апробиран и оптимизиран е EvaGreen Real time PCR метод за успоредно доказване на CD и на токсин В за бърза идентификация
- с генетични методи се характеризират токсигенните варианти на CD и се установява преобладаването на тип (A+B+CDT-) - в 53 % от случаите, докато щамовете с бинарен токсин са 9 %



- с генетични методи е определена епидемиологията на циркулиращите риботипове и техните MLVA 7 субтипове – водещи са щамовете от риботип 017, причиняващи тежки заболявания, и подразделящи се в три MLVA 7 клъстери, установени при епидемично свързани щамове

### **Публикации, свързани с дисертационния труд**

Дисертантката има общо пет публикации, свързани с дисертацията, от които две в Comptes rendus de l'Academie Bulgare des sciences, 2 – в Problems of Infect Parazit Dis, и 1 – в сп. Военна медицина. **Общият Impact Factor (IF) е 0.42.** Взела е активно участие в четири международни конгреса и четири – национални, като е спечелила научна награда и грантове.

### **Критични бележки и препоръки**

При апробацията на дисертацията имах значителен брой критични бележки. Дисертационният труд понастоящем е основно преработен и не съм установила съществени пропуски, с изключение на единични стилови неточности (при превода), правописни грешки или при компютърния набор.

### **Заключение**

Представеният за рецензия дисертационен труд на Елина Добрева има всички необходими качества: актуалност, използване на съвременни методики, рационален подход и много добро изпълнение. Отличава се със стройно и естетическо подреждане на материала, убедителни резултати и богатата дискусия. Отбелязани са основни публикации по диагностиката на *C. difficile* в нашата страна. Очевидно е голям приносът на научните

ръководители, на школата. Трудът е оригинален, с определен базисен научен принос (епидемиологията на щамове *C. difficile* и характеристиката на щамове в България), както и пряк научно-приложен принос към диагностицирането на заболяването у нас (молекулярно-генетични методи за установяване на *C. difficile* и бързо разграничаване на токсигенните от нетоксигенните щамове).

*Считам, че ще бъде полезно, ако дисертацията се публикува като монография: това би било в помощ за клиничните микробиолози и лекарите - клиницисти.*

Препоръчвам на уважаемите Председател и членове на Научното жури съгласно Заповед № 539/28.12.2012 г на НЦЗПБ, да гласуват положително за присъждането на образователната и научна степен „доктор” на Елина Георгиева Добрева за дисертационната ѝ работа, свидетелстваща, че тя е изграден и ерудиран научен работник.

ПОДПИС:   
(Доц. Д-р Емма Кьолеян, дм)

Дата: 12.03.2013  
Гр. София