

№ 3 987
07.12.2012

бул. „Янко Сакъзов“ № 26
София 1504, тел: 9446966

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Стефана Донева Събчева, д.м.
ръководител на Лаборатория по клинична микробиология в СБАЛО, София
член на научното жури съгласно заповед № 504/27.11.2012 г. на Директора на
Националния Център по Заразни и Паразитни Болести

на дисертационния труд на Владимир Евгениев Толчков
“Молекулярно-генетични проучвания върху токсигенността и резистентността към
флуорохинолони на щамове *Clostridium difficile*”
за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”
по научна специалност 01.06.12 Микробиология

Научни ръководители:

Доц. д-р Мая Станкева Марина, дм
Проф. д-р Тодор Веселов Кантарджиев, дмн, мзм

Владимир Толчков е роден на 15.12.1977 г. Завършва Гимназия No199 в град Москва, Русия. През 1996-2001 г. следва в Софийския университет „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет. Магистър е по молекулярна биология със специализация генетика. От 2009 г. е редовен докторант в Националния Център по Заразни и Паразитни Болести. Специализирал е в Института по обща ботаника на Университета “Фридрих Шилер” в Йена, Германия (2002-2004). Работил е като биолог в Института по молекулярна биология на БАН (2004-2008) и като биоинформатик в „Металайф“ ЕООД през 2008. За този период Владимир Толчков е натрупал значителен опит в областта на микробиологията, генетиката и биоинформатиката умело използван в разработването на представения ми за рецензиране дисертационен труд.

Предмет на дисертационния труд са молекулярно-генетични проучвания върху токсигенността и резистентността към флуорохинолони на референтни и клинични щамове *Clostridium difficile*. Дисертацията е написана на 100 страници и е структурирана по общоприетата схема: използвани съкращения – 1 стр., въведение – 1 стр., литературен обзор- 25 стр., цел и задачи – 1 стр., материал и методи – 17 стр., резултати и обсъждане – 32 стр., резюме на резултатите и изводи – 1 стр., декларация за оригиналност и приноси - 1 стр., литература – 16 стр., публикации и участия в научни форуми във връзка с дисертацията - 2 стр. Спазени са

препоръчителните съотношения между отделните части на труда. Много добре е онагледен с таблици и фигури.

В технически план може да се препоръча известно оптимизиране в подредбата на фигурите и текста, за да се избегнат някои от оставените празни абзаци. Цялостно работата се отличава със стегнат научен стил, без технически грешки. Сравнително малко са и използваните чуждици и то главно такива, които са утвърдени в научната практика.

Въведението е направено умело и убедително представя актуалността и важността на молекулярно-генетичните проучвания върху патогеността и резистентността на *Clostridium difficile* в България.

Литературният обзор е конкретен и в логична последователност са разгледани въпросите за клиничната значимост на *Clostridium difficile*, причинител на псевдомембранозен колит и вътреболнични инфекции с голямо обществено значение, водещи до икономически загуби за милиарди долари годишно в световен мащаб. Анализирани са генетичните проучвания у нас, свързани с изследването на патогеността и епидемиологията на *Clostridium difficile*, както и случаите на изолирането и идентификацията на *Clostridium difficile* от фецеси на новородено (общо 54 материала), извършени от научния ръководител на дисертанта. Проследени са хронологично класическите фенотипни и генетичните методи за различаването на патогенните и непатогенни щамове *Clostridium difficile* в лабораторната практика, обект на настоящия дисертационен труд. Подробно са анализирани генетичните механизми на резистентност към флуорохинолони, поради факта че флуорохинолоните са самостоятелен рисков фактор за възникването на CDI. Обоснована е необходимостта от приложението на молекулярни методи за идентификация и типизиране на този организъм, което е от изключителна важност за точната диагностика и правилното назначаване на терапия.

В съответствие с най-новите научни изследвания по проблема правилно е формулирана целта на дисертационния труд: проучване на факторите на токсигенност и резистентност към флуорохинолони на клинични български щамове *Clostridium difficile* в сравнение с контролни щамове. Логично са изведени

5 конкретни задачи в изпълнение на поставената цел: (1) оптимизиране на протокол за изолиране на кlostридиална ДНК за работа директно от култура в аеробни условия; (2) оптимизиране на условията на амплификация на гените, кодиращи токсините А и В; (3) разграничаване на вариации на гена *tcdC* с двойки описани праймери; (4) секвениране на гена *tcdC* за доказване различията на вариациите; (5) оптимизиране на условията на амплификация на гените, кодиращи гирази - *gyrA* и *gyrB*, част от ензимната система на флуорохинолоновата резистентност.

Използваният набор от методи е съвременен и същевременно адаптиран и напълно приложим у нас. Изключително точно и подробно са описани използваните от дисертанта методи за култивиране на *Clostridium difficile*; определяне наличието на токсини; екстракция на геномна ДНК; определяне на концентрацията и чистотата на екстрахираните ДНК; размножаване на гените *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *gyrA* и *gyrB*; агарозната гел електрофореза; секвенирането на *tcdC*, *gyrA* и *gyrB*; биоинформатичния анализ на получените данни и определянето на антибиотичната резистентност.

Получените резултати и тяхното обсъждане следват стриктно поставените задачи. Резултатите за добре онагледени с 21 фигури и обобщени в 7 таблици. Проучванията на дисертанта, проведени чрез прецизно изпълнени експерименти и умело модифицирани от него методи водят до следните основни резултати:

1) Оптимизирана е методика за изолиране на ДНК от *C. difficile* директно от култури на твърда хранителна среда без използването на специално оборудване за работа с анаероби.

2) Осъществена е амплификация на гените *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *gyrA* и *gyrB* с помощта на полимеразна верижна реакция показваща висока специфичност и задоволителен добив.

3) Оптимизирани са термодинамичните параметри за амплификация на гените *gyrA* и *gyrB*, с използването на описани праймери.

4) След амплификацията на негативния регулатор на токсините А и В - *tcdC* са установени минимални видими на агарозен гел вариации на този ген. Чрез

секвениране се доказва че те се дължат на генетични вариации, неописани от други автори, използващи същата праймерна двойка.

5) Установена е връзка между констатираната резистентност към флуорохинолони и генотипните вариации на *gyrA* и *gyrB*.


Направените 5 извода са логично следствие от цялата разработка и дават информация за стойността на проведените експерименти. Представена е декларация за оригиналност, в съответствие с новите изисквания на правилника и са формулирани точно и обективно 6 приноса с научно-теоритичен, методичен и научно-приложен характер.

Резултатите от дисертационния труд са представени в 7 статии, една от които е с импакт фактор, и в 4 научни форума у нас и в чужбина.

В заключение искам да подчертая, че материалът е дисертабилен, темата е актуална и клинично значима, докторантът е усвоил съвременни методи, експериментите са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки. Открояват се оригинални научни и приложни приноси.

Считам, че рецензирания дисертационен труд отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и Правилника на НЦЗПБ. Това ми дава основание убедено да подкрепя присъждането на образователната и научна степен "Доктор" по научната специалност 01.06.12 - Микробиология на Владимир Евгениев Толчков.

Гр. София
06.12.2012

Рецензент:.....
(доц. д-р Стефана Събчева, дм)