

Рецензия

за защита на дисертационен труд
за присъждане на
образователна и научна степен „Доктор”
по научна специалност 01.06.12 „Микробиология”
на тема

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ТОКСИГЕННОСТТА И РЕЗИСТЕНТНОСТТА КЪМ ФЛУОРОХИНОЛОНИ НА ЩАМОВЕ *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

Автор на дисертацията
Владимир Евгениев Толчков

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

Рецензент

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.

КРАТКИ ДАННИ ОТ ПРОФЕСИОНАЛНАТА БИОГРАФИЯ НА ДОКТОРАНТА

Владимир Евгениев Толчков е роден на 15 декември 1977 г. През 2001 г. се дипломира като магистър по молекулярна биология със специализация генетика в Софийски университет „Св. Климент Охридски“ Биологически факултет.

Работил е биолог в институт по обща ботаника, Фридрих Шилер Университет, Йена, Германия, в института по молекулярна биология на БАН и като биоинформатик в „Металайф“ ЕООД.

От 2009 г. е Докторант в Националния център по заразни и паразитни болести.

АКТУАЛНОСТ НА ТРУДА

Сериозен проблем на нозокомиалните инфекции е *Clostridium difficile*-асоцираната болест, които може да се прояви като постантибиотична диария, или нейната най-тежка форма-псевдомембранозния колит.

Напоследък, проблемът нараства с появата на щамове *C. difficile*, продуциращи многократно по-голямо количество екзотоксини и предизвикващ тежки колити, сепсис и по-висок леталитет. Затова трябва вече да се диагностицира при всички болни с нозокомиална диария и при някои извънболнични пациенти. Това показва актуалността и значимостта на темата на настоящия труд.

Важен път към разрешаването на проблемите на *C. difficile*-асоцираната болест (CDAD) е използването на молекулярните методи

за бърза и прецизна диагностика на инфекцията и за определяне на клинично важните токсини и антибиотична резистентност.

СТРУКТУРА И РАЗДЕЛИ НА ПРЕДСТАВЕНИЯ ТРУД

Представеният дисертационен труд е оформен в както следва – въведение (1 стр.), литературен обзор (23 стр.), цел и задачи (1 стр.), материал и методи (16 стр.), резултати и обсъждане (27 стр.), изводи (1 стр.), приноси (1 стр.), литература (15 стр.) и списък на публикации и участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд (2 стр.).

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

ЛИТЕРАТУРНИЯТ ОБЗОР обобщава различни аспекти на проблема за *C. difficile* от историческите данни до съвременните генетични методи за неговото проучване и до клиничната характеристика и терапевтичните насоки за свързаната инфекция. На стр. 29 е допусната грешка, в смисъл, написано е, че CDAD се лекуват класически със широкоспектърни антибиотици, а всъщност тези инфекции често се причиняват от употребата на такива антибиотици. Следва да се напише, че терапията на CDAD се извършва с перорален метронидазол, или перорален ванкомицин за по-тежките форми.

ЦЕЛТА е ясно формулирана: да се проучат генетично факторите на токсигенност и резистентност към флуорохинолони на клинични щамове *C. difficile* у нас и съпоставени с контролни щамове.

За постигане на целта логично са поставени **5 ЗАДАЧИ**. Важно е, че успоредно със задачите за доказване на гените за токсините, генните вариации и гените за гирази, се цели и оптимизиране на работните процеси.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Работено е с общо 57 щама *C. difficile*, от които 19 от холандски център и 38 наши щамове от пациенти с псевдомембранозен колит. Тук

би могло да се препоръча обединяване на точките 2.3-2.6, както и 2.7 и 2.8.

Приложената методика е на съвременно равнище и комбинира класически методи /култивиране, определяне на минималната потискаща концентрация на хинолоните/ така и молекулярни методи като PCR и PCR-секвениране на гените за токсигенност и антибиотична резистентност. Това дава възможност за комплексно анализиране на щамовете.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите са добре представени, онагледени и дискутирани, като изводите съответстват на поставените задачи.

1. Направено е оптимизиране на методиката за изолиране на клостридиална ДНК за работа директно от агарова среда в аеробни условия. Удължена е инкубацията с литичния буфер и е въведено допълнително механично въздействие с често вортексиране.
2. Оптимизирани са на условията на амплификация на *gyrA* и *gyrB* гените на *C. difficile* за проучване на резистентността към флуорохинолони.
3. Установени са две вариации на гена *tcdC* с гел електрофореза. Направено е секвениране на гена за доказване различията на вариациите като по-късата вариация на гена се свързва с делеция на гена, кодиращ негативния регулатор на експресия на токсините и по-висока вирулентност.
4. Определена е резистентността на изследваните щамове към антибиотици. Въпреки, че изследваните щамове са относително малко, е установена висока честота на резистентност към хинолони.
5. При проучването на генните вариации на *gyrA* и *gyrB* са установени вариации, свързани с по-силна резистентност към хинолоните.

ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

- ❖ Цитирани са 125 литературни източници, един от които на кирилица и останалите на латиница.
- ❖ Общо около 13% от всички цитирани публикации са от последните 5 години, а преобладаващата част са от последните 10 години.

ПРИНОСИ

В дисертационния труд на кандидата има **ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ**, от които ми направи впечатление

- ❖ установяването на вариации на гена *tcdC*, който е негативният регулатор на токсините А и В, върху агарозен гел и откриване на две вариации с използваната праймерна двойка,

Владимир Толчков има също така **ПОТВЪРДИТЕЛНИ** за нашата страна научно-теоретични приноси напр. за първи път у нас е генетично определена резистентността на *C. difficile* към флуорохинолони.

В дисертацията се открояват някои полезни **НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ приноси** относно генетичните изследвания на *C. difficile* напр.

- ❖ оптимизирана техника за изолиране на ДНК от култури на агарова среда в аеробни условия и
- ❖ подобряване на условията на амплификация на *gugA* и *gugB* гените във връзка с резистентността на *C. difficile* към флуорохинолони.

ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Кандидатът представя **6 ПУБЛИКАЦИИ**, отпечатани в периода **2010-2012 г.**, в 5 от които е първи автор. Оттук се вижда личното му участие и неговата изразена активност. Той има участие и в книгата

Лабораторен наръчник по клинична микробиология. Импакт факторът на Владимир Толчков е 0.204.

Кандидатът има и 4 участия в **НАУЧНИ ФОРУМИ**, от които едно международно участие на конгрес в Италия.

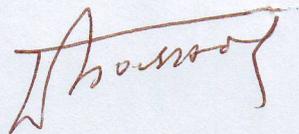
ПРЕПОРЪКИ ЗА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Някои технически грешки са споменати по-горе. Те не засягат по същество получените резултати и обсъждането.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представеният дисертационен труд обхваща един актуален и много тревожен проблем както в микробиологията, така и в клиничната практика, проблемът за токсигенните *C. difficile* щамове, който особено се изостри с появата на хипервирулентинните щамове и техните тежки клинични последици. Проучването на кандидата дава ценни резултати за генетичната характеристика на вирулентността и резистентността на *C. difficile* у нас.

Оценявам положително значението и актуалността на разработената тема, съвременните методи на изследването и получените резултати и приноси на кандидата, затова убедено мога да предложа на членовете на уважаемото жури да гласуват положително за присъждане на образователната и научна степен „доктор” на Владимир Евгениев Толчков.



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

София, 05.12.2012 г.