

ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
Стара Загора

Вх. № 3043 д. № ..  
Получено на 01.12 2022 г.



ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ. МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

**СТ А Н О В И Щ Е**

**От доц. д-р Тончо Господинов Динев;**  
*Катедра "Биологически науки" към АФ при ТрУ*  
*Научна специалност: „Микробиология“, ПН: 4.3 Биологически науки*

Относно: дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен  
**„доктор“ по научна специалност „Микробиология“** в МФ на ТРУ

Автор на дисертационния труд: Розалина Димитрова Йорданова  
Тема на дисертационния труд: „Фенотипни и генетични методи за откриване на фактори на вирулентност и резистентност на клинични изолати *Enterococcus* spp.“  
Научни ръководители: доц. д-р Георги Беев  
проф. дбн Спаска Станилова

**Основание** за представяне на становището: Участие в състава на научното жури по защита на дисертационния труд съгласно Заповед № 3738/17.11.2022г. на Ректора на ТрУ. Като член на научното жури декларирам, че нямам общи статии с кандидата.

**1. Информация за дисертанта**

Дисертантът се е обучавал по докторска програма към катедра “Здравни грижи” към МФ на ТрУ по научна специалност „Микробиология“. Обучението е осъществено в свободна форма през периода 2016 - 2022г.

**2. Обща характеристика на представения дисертационен труд**

Дисертационният труд съдържа 151 стандартни машинописни страници и е онагледен с 40 таблици и 15 фигури. Основният текст включва: Въведение; Литературен обзор; Цел и задачи; Материали и методи; Резултати; Обсъждане; Изводи; Приноси; Литература и Публикации. Библиографията обхваща 420 литературни източника, от които 1 на кирилица и 419 на латиница.

Обектът на това проучване е откриването на фактори на вирулентност и резистентност на клинични изолати *Enterococcus* spp. Предвид тяхното повсеместно разпространение като част от нормалната флора на стомашно-чревния тракт и урогениталната система, наличието на вирулентни фактори, увеличаващи тяхната патогенност, както и широко разпространената сред тях резистентност към много терапевтични агенти, темата е актуална, а научният принос – значим.

### 3. Оценка на получените научни и научно-приложни резултати

Научната разработка е обширна и задълбочена. Направен е задълбочен преглед на съвременната научна литература по извършените в световен мащаб изследвания на *Enterococcus* spp. в няколко направления, по важните от които засягат факторите на вирулентност и патогенност, фенотипните и молекулярно-генетичните методи за идентификация на тези бактерии, както и механизмите им на резистентност към антимикробни средства. За постигане на поставената цел за проучване на факторите на вирулентност, включително quorum-sensing регулиращи гени, детерминиращи биофилм-формираща активност, както и за оценка на профила на антибиотична резистентност на клинично значими и коменсални щамове *Enterococcus* spp., изолирани от клинични материали от хоспитализирани пациенти, успешно са постигнати осем задачи, свързани с горепосочените изследвания в тази посока. Задачите включваха и разработване за нуждите на клиничната практика на модифициран мултиплексен PCR за едновременно откриване на гени (*cylA*, *gelE*, *esp*, *asa1*), кодиращи фактори на вирулентност и мултиплексен PCR за доказване на наличието на гени за антимикробна резистентност (*TEM*, *emeA*, *aac(6')/aph(2'')*, *vanA*, *vanB*) сред клиничните изолати *Enterococcus* spp., което представлява значим методологичен принос в това направление.

Използвани и най-важното усвоени от докторанта са съвременни научно-изследователски методи и техники, по-важните от които са екстрахиране на геномна ДНК, мултиплексен PCR, диск дифузионен метод на Kirby-Bauer. Статистическата обработка на данните е извършена с помощта на съвременни статистически методи, включени в пакета Statistica 12.

Постигнатите резултати включват: установена е по-висока честота на разпространение на факторите на вирулентност (хемолизин, желатиназа, способност за образуване на биофилм) сред клиничните изолати *E. faecalis*, в сравнение с *E. faecium*. Доказано е, че почти половината от проучените клинични щамове *Enterococcus* spp. са множественорезистентни, като най-често наблюдаваният профил на антибиотична резистентност сред тях е *A-Cp-G (HLGR)*. Сред клиничните изолати, включително множественорезистентните *Enterococcus* spp., доминират гените, определящи високо ниво на резистентност към аминогликозиди (*aac(6')/aph(2'')*) и хинолони (*emeA*). Щамовете *E. faecium* се характеризират с по-висока устойчивост към антибиотици, в сравнение с *E. faecalis*. Констатираната HGAR при изследваните щамове е по-висока от средната за Европа през последните години. Разпространението на проявяващи резистентност към ванкомицин ентерококи е по-ниско от средното за Европа през последните години, като е установен висок процент щамове, притежаващи *vanA* ген. Гените, кодиращи quorum-sensing факторите на вирулентност (*esp*, *asa1*), преобладават сред щамовете *Enterococcus* spp., изолирани от хемокултури, в сравнение с неинвазивните. Сравнително нисък процент от проучените фекални щамове ентерококи формират биофилм. Налице е статистически значима разлика между клинични и фекални щамове ентерококи по отношение на биофилм-формиращата им способност. Налице е статистически значима разлика между биофилм „+“ множественорезистентни *Enterococcus* spp. и биофилм „+“ резистентни към една или две групи антибиотици *Enterococcus* spp.

Основавайки се на задълбочения анализ на получените резултати, докторантът е направил 11 извода с важно научно и научно-приложно значение.

#### **4. Оценка на научните и научно-приложни приноси**

Разработена е методика, основана на мултиплексен PCR анализ, едновременно определящ няколко параметъра по отношение на основните ентерококови видове - *E. faecalis* и *E. faecium*. Потвърден е по-високият потенциал на вирулентност на щамовете *E. faecalis* спрямо *E. faecium*, на основата на преобладаване на изолати притежаващи гени, кодиращи фактори на вирулентност. Разработена и въведена е модифицирана методика за едновременно доказване на гени (включително quorum-sensing детерминирани) (*cylA*, *gelE*, *esp*, *asaI*), кодиращи фактори на вирулентност (хемолизин, желатиназа, биофилм), чрез молекулярно-генетични техники сред клинични щамове ентерококи. За първи път в страната е разработена и въведена мултиплексна PCR методика за доказване присъствието на гени (*TEM*, *emeA*, *aac(6')/aph(2'')*, *vanA*, *vanB*), кодиращи антимикробна лекарствена резистентност сред клинични щамове ентерококи.

Гореспоменатите приноси са с голямо научно и научно-приложно значение и са важно допълнение в клиничната практика на откриването и борбата с вирулентни и резистентни спрямо химиотерапевтици *Enterococcus* spp.

#### **5. Оценка на публикациите по дисертацията**

Представеният от докторанта списък с публикациите, свързани с дисертацията включва 5 публикации, в две от които докторанта е единствен автор, а във всяка от останалите е водещ автор. Една от статиите, в които докторанта е водещ автор, е в списание с импакт фактор (Applied Sciences), като прави впечатление, че импакт фактора на списанието за 2021 е равен на **2.838**, квантил **Q2**. Това е важен показател за актуалността и значимостта на проблемите, разглеждани в настоящия дисертационен труд. Налице е и едно цитиране. С горепосочената публикационна активност докторанта покрива изискванията в това отношение на МФ при ТрУ за присъждане на ОНС „Доктор“.

#### **6. Оценка на автореферата**

Авторефератът е съставен съгласно изискванията: включва основните моменти на разработената дисертация, като по-детайлно са представени използваните материали и методи, получените резултати, тяхното анализиране и обсъждане, както и направените изводи. Добавени са научните приноси и списък с публикациите свързани с дисертацията. Налично е и кратко резюме на английски език.

#### **7. Критични бележки, препоръки и въпроси**

Като цяло нямам критични бележки към докторанта. Единствено мога да препоръчам при описването на използваната литература в бъдещи трудове в съответния раздел да се използва една и съща схема за описване на всички цитирани източници. Тази малка техническа забележка обаче не намалява по никакъв начин стойността на настоящия задълбочен изследователски труд, в който експерименталните данни са получени чрез използването на съвременни методики.

#### **8. Заключение**

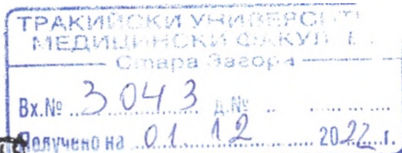
В заключение от извършения по-горе анализ на представените материали и документи от Докторанта се вижда, че покрива напълно всички изисквания за присъждане на ОНС „Доктор“ по научна специалност „Микробиология“ в ПН 4.3. Биологически науки. По мое мнение с този научен труд на кандидата се правят редица значими научни и научно-приложни приноси в областта на микробиологията.

**Като член на състава на научното жури по обявения конкурс давам изцяло положителната си оценка и препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури и на Факултетния съвет към МФ при ТрУ да присъдят на д-р Розалина Димитрова Йорданова ОНС „Доктор“ по научна специалност „Микробиология“ в професионално направление 4.3. Биологически науки**

29.11.2022г.  
гр. Стара Загора

Подпис: ..  
/доц. д-р Тончо Динев/





## FACULTY OF MEDICINE, TRAKIA UNIVERSITY

### STATEMENT

by **Assoc. Prof. Dr. Toncho Gospodinov Dinev,**

*Department of Biological Sciences, Faculty of Agriculture, Trakia University,  
Scientific specialty: "Microbiology", Professional field. 4.3 Biological Sciences.*

**Subject:** PhD thesis in the scientific specialty of "Microbiology" at the Faculty of Medicine of Trakia University.

Author of the PhD Thesis:	Rosalina Dimitrova Yordanova
PhD Thesis topic:	"Phenotypic and genetic methods for detection of virulence and resistance factors of clinical <i>Enterococcus</i> spp. isolates."
Scientific supervisors:	Assoc. Prof. Dr. Georgi Beev Prof. DSc. Spaska Stanilova

**Reason** for submitting the statement. Participation in the Scientific Jury of the competition, according to Order № 3738/17.11.2022г. of the Rector of TrU. As a member of the Scientific Jury, I declare that I have no common articles with the candidate.

#### 1. Information about the PhD student

The PhD student was trained in the PhD program at the Department of Health Care at the Faculty of Medicine of TrU in the scientific specialty "Microbiology". The training was carried out in free form during the period 2016 - 2022.

#### 2. General characteristics of the submitted PhD thesis

The PhD thesis contains 151 standard typewritten pages and is illustrated with 40 tables and 15 figures. The main text includes: Introduction; Literature review; Aim and Objectives; Materials and Methods; Results; Discussion; Conclusions; Contributions; References and Publications. The bibliography comprises of 420 references, of which 1 in Cyrillic and 419 in Latin.

The object of this study was the discovery of virulence and resistance factors of clinical isolates of *Enterococcus* spp. Given their ubiquity as part of the normal flora of the gastrointestinal tract and urogenital system, the presence of virulence factors that increase their pathogenicity, and the widespread resistance among them to many therapeutic agents, the topic is up to date and the scientific contribution is significant.

#### 3. Evaluation of the obtained scientific and applied results

The scientific work is extensive and thorough. An in-depth review of the current scientific literature on the worldwide studies of *Enterococcus* spp. has been carried out in several directions, the most important of which concern virulence and pathogenicity factors, phenotypic and molecular genetic methods for the identification of these bacteria, as well as their mechanisms of resistance to antimicrobial agents. To achieve the stated goal of investigating virulence factors, including quorum-sensing regulatory genes determining biofilm-forming activity, and to evaluate the antibiotic resistance profile of clinically relevant and commensal *Enterococcus* spp. strains isolated from clinical materials of hospitalized patients, eight tasks related to the above-mentioned studies in this direction were successfully achieved. The tasks also included the development for clinical practice of a modified

multiplex PCR for the simultaneous detection of genes (*cylA*, *gelE*, *esp*, *asaI*) encoding virulence factors and a multiplex PCR to demonstrate the presence of antimicrobial resistance genes (*TEM*, *emeA*, *aac(6')/aph(2'')*, *vanA*, *vanB*) among clinical isolates of *Enterococcus* spp., which represents a significant methodological contribution in this direction.

Modern research methods and techniques were used and most importantly mastered by the PhD student, the more important of which are genomic DNA extraction, multiplex PCR, Kirby-Bauer disk diffusion method. Statistical processing of the data was performed using modern statistical methods included in Statistica 12 package.

The results obtained include: a higher prevalence of virulence factors (haemolysin, gelatinase, biofilm-forming ability) among clinical isolates of *E. faecalis*, compared to *E. faecium*. Almost half of the clinical *Enterococcus* spp. strains studied have been shown to be multidrug resistant, with *A-Cp-G (HLGR)* being the most commonly observed antibiotic resistance profile among them. Among the clinical isolates, including multidrug-resistant *Enterococcus* spp., genes conferring high-level resistance to aminoglycosides (*aac(6')/aph(2'')*) and quinolones (*emeA*) dominate. Strains of *E. faecium* are characterized by higher antibiotic resistance compared to *E. faecalis*. The HGAR found in the strains studied was higher than the European average in recent years. The prevalence of vancomycin-resistant enterococci was lower than the European average in recent years, with a high percentage of strains carrying the *vanA* gene. Genes encoding quorum-sensing virulence factors (*esp*, *asaI*) predominate among enterococcal strains isolated from haemocultures compared to non-invasive ones. A relatively low percentage of the fecal enterococcal strains studied formed biofilms. There was a statistically significant difference between clinical and faecal enterococcal strains in terms of their biofilm-forming ability. There is a statistically significant difference between biofilm '+' multidrug-resistant *Enterococcus* spp. and biofilm '+' resistant to one or two antibiotic groups *Enterococcus* spp.

Based on the in-depth analysis of the results obtained, the PhD student has drawn 11 conclusions with important scientific and applied significance.

#### **4. Evaluation of the scientific and applied contributions**

A methodology based on multiplex PCR analysis was developed, simultaneously determining several parameters in relation to the main enterococcal species - *E. faecalis* and *E. faecium*. The higher virulence potential of *E. faecalis* relative to *E. faecium*, based on the prevalence of isolates possessing genes encoding virulence factors. A modified methodology was developed and introduced for simultaneous demonstration of genes (including quorum-sensing determinants) (*cylA*, *gelE*, *esp*, *asaI*) encoding virulence factors (hemolysin, gelatinase, biofilm) by molecular genetic techniques among clinical enterococcal strains. For the first time in the country, a multiplex PCR methodology was developed and introduced to demonstrate the presence of genes (*TEM*, *emeA*, *aac(6')/aph(2'')*, *vanA*, *vanB*) encoding antimicrobial drug resistance among clinical strains of enterococci.

The aforementioned contributions are of great scientific and applied importance and are an important addition to the clinical practice of detection and control of virulent and chemotherapeutic-resistant *Enterococcus* spp.

#### **5. Evaluation of the dissertation publications**

The list of publications related to the dissertation presented by the PhD student includes 5 publications, in two of which the PhD student is the sole author and in each of the others the leading author. One of the papers in which the PhD student is the leading author is in a journal with an impact factor (Applied Sciences), and it is notable that the journal's impact factor for 2021 is equal to **2.838**, quartile **Q2**. This is an important indicator of the relevance and importance of the issues addressed in this PhD thesis. There is also one citation. With the abovementioned publication activity, the PhD student meets the requirements in this respect of the Faculty of Medicine at Takia University for the award of PhD degree.

#### **6. Evaluation of the PhD thesis abstract**

The PhD thesis abstract is built up according to the requirements: it includes the main points of the developed PhD thesis, with a more detailed presentation of the materials and methods used, the results obtained, their analysis and discussion, as well as the conclusions drawn. Scientific contributions and a list of publications related to the dissertation were added. A short abstract in English is also available.

#### **7. Critical remarks, recommendations and questions**

In general, I have no critical remarks about the PhD student. The only thing I can recommend is that when describing the literature used in future papers, the same scheme should be used to describe all sources cited. However, this minor technical remark does not in any way diminish the value of the present thorough research work, in which the experimental data was obtained using state-of-the-art methodologies.

#### **8. Conclusion**

In conclusion, from the above analysis of the materials and documents submitted by the PhD student, it can be seen that she fully meets all the requirements for the award of the PhD degree in scientific specialty of "Microbiology" in professional field 4.3. "Biological Sciences". In my opinion, this PhD thesis of the candidate makes a number of significant scientific and applied contributions in the field of microbiology.

**As a member of the Scientific Jury of the aforementioned competition I give my fully positive assessment and recommend the esteemed members of the Scientific Jury and the FC of MF at TrU to award Dr. Rozalina Dimitrova Yordanova with PhD degree in the scientific specialty of "Microbiology", professional field 4.3 "Biological Sciences"**

29.11.2022  
Stara Zagora Town

Prepared by:.....  
/Assoc. Prof. Dr. Toncho Dinev/