

СТАНОВИЩЕ

ОТНОСНО: Дисертационен труд, представен за защита за придобиване на образователната и научна степен “доктор” по научна специалност 4.3. Биологически науки

Тема на дисертационния труд: Фенотипни и генетични методи за откриване на фактори на вирулетност и резистентност на клинични изолати *Enterococcus spp.*

Докторант: Розалина Димитрова Йорданова

Научни ръководители доц. д-р Георги Беев, Проф. Спаска Станилова

От доц. д-р Екатерина Цанкова Крумова

Основната тема на представеният дисертационен труд е фенотипни и генетични методи за откриване на фактори на вирулетност и резистентност на клинични изолати *Enterococcus spp.*

Ентерококите са космополитни микроорганизми и са разпространени повсеместно. Те са устойчиви или толерантни към много антимикробни средства, поради което предизвиканите от тях инфекции се поддават все по-трудно на лечение. Множествено резистентните ентерококи се отнасят към групата на така наречените "терапевтично проблемни микроорганизми", за чието лечение е необходимо спешно разработването на нови антимикробни средства. Всичко това очертава важността на идентифициране на факторите им на вирулетност, които са свързани с инвазивността и тежестта на заболяването.

В този смисъл темата на дисертационната работа е актуална, значима за науката и практиката и е дисертабилна.

Дисертационният труд е структуриран съгласно изискванията за такъв род трудове, включващ Въведение (2 стр.), Литературен обзор (33 стр.), Материали и методи (13 стр.), Резултати (28 стр.), Обсъждане (16 стр.), Изводи и Приноси (2 стр.). От общо 420 използвани литературни източници, голяма част (134) са от последните 10 години. Значителен е броят на включените фигури (15) и таблици (40), които илюстрират получените резултати.

Представената в частта „Литературен обзор” информация е интересна и актуална. Анализирана е голям обем научна информация, касаеща класификация, морфология и физиология на ентерококите, както и тяхната екология и епидемиология. Подробно е разгледан и клиничният спектър на инфекциите, причинени от *Enterococcus*

spp. Сериозно внимание е отделено на методите за идентификация на *Enterococcus* spp., както и на механизмите на резистентност на *Enterococcus* spp. към антимикробни средства. Докторантката очертава и нерешени въпроси, касаещи епидемиологията на резистентните ентерококи и вирулентният им потенциал, свързан с инвазивността и тежестта на причинените от тях заболявания.

Въз основа на представената информация авторката ясно определя целта на дисертационния труд – Проучване факторите на вирулентност, включително quorum-sensing регулиращи гени, детерминиращи биофилм-формираща активност и оценка профила на антибиотична резистентност на клинично значими и коменсални щамове *Enterococcus* spp., изолирани от клинични материали от хоспитализирани пациенти. За постигането на поставената цел са формулирани 8 основни задачи.

Разделът „Материали и методи“ показва разнообразната методична база, използвана при изследванията. Докторантката ползва класически и съвременни микробиологични, молекулярно – биологични и биохимични методи и съвременна апаратура. Описаните методи дават възможност за коректно провеждане на експериментите и получаване на достоверни резултати.

В частите „Резултати“ и „Обсъждане“ е включена голяма по обем експериментална работа. Използвани са 188 (110 клинични и 78 фекални) изолати, идентифицирани като *E. faecalis* и *E. faecium*. Изследвана е антибиотичната им чувствителност и са проучени фактори на вирулентността им, вкл. quorum-sensing детерминирани. Сравнен е патогенния потенциал на двата основни вида ентерококи - *E. faecalis* и *E. faecium*, в зависимост от наличието на гени, кодиращи фактори на вирулентност. Прави впечатление логическата последователност на отделните етапи. Дисертацията е написана на добър научен стил. Получените резултати са ясно илюстрирани с 15 фигури и 40 таблици. Доброто познаване на литературата позволява на авторката умела интерпретация на получените резултати.

Въз основа на извършената експериментална работа са оформени 11 извода и 4 приноса с теоретичен (2) и приложен (1, 3, 4) характер. В теоретичен аспект са получени нови данни за вирулентния потенциал на изследваните щамове. Потвърден е по-високият потенциал на вирулентност на щамове *E. faecalis* спрямо *E. faecium*, на база на преобладаване на изолати притежаващи гени, кодиращи фактори на вирулентност. В приложен аспект са разработени методики с важно значение за клиничната практика: методика, основана на мултиплексен PCR анализ, едновременно определящ няколко параметъра по отношение на основните ентерококови видове - *E.*

faecalis и *E. faecium*; методика за едновременно доказване на гени (включително quorum-sensing детерминирани) (*cylA*, *gelE*, *esp*, *asa1*), кодиращи фактори на вирулентност (хемолизин, желатиназа, биофилм), чрез молекулярно-генетични техники, сред клинични щамове ентерококи и мултиплексна PCR методика за доказване присъствието на гени (TEM, *emeA*, *aac(6')/aph(2'')*, *vanA*, *vanB*), кодиращи антимикробна лекарствена резистентност сред клинични щамове ентерококи .

Авторефератът е представен в изискуемия от учебното заведение срок. В него са посочени всички важни акценти от представения дисертационен труд. В този смисъл изготвения автореферат съответства напълно на дисертационния труд.

Във връзка с дисертацията са публикувани 5 научни труда, три от които са публикуван в сборници от конференции, а другите две – в научни списания, едното от които е с импакт фактор. Във всички представени публикации докторантката е водещ автор. Докторантката е участвала в 4 научни форума по тематиката и в разработването на 3 научни проекта..

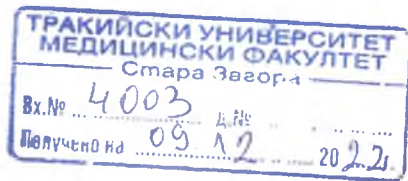
В заключение считам, че докторантката Розалина Димитрова Йорданова е изпълнила цялата програма за обучение и експериментална работа, придобила е знания и компетентност в областта на докторантурата. Докторантската разработка и представените за защитата документи от Розалина Йорданова отговарят напълно на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника на Тракийски университет, Медицински факултет, Стара Загора и покриват наукометричните показатели за придобиване на образователната и научна степен „доктор”.

Въз основа на гореизложеното, убедено изказвам своето положително становище и препоръчвам на Уважаемото научно жури да присъди на Розалина Димитрова Йорданова образователната и научна степен „Доктор”

Изготвил становището:

(доц. д-р Е. Крумова)

София, декември 2022 г.



SCIENTIFIC STATEMENT

Subject: evaluation of a PhD thesis for an educational and scientific degree "Doctor" in the field of Higher education 4. Natural sciences, mathematics and informatics, professional field, 4.3 Biological sciences

Dissertation topic: Phenotypic and genetic methods for detection of virulence and resistance factors of clinical isolates of *Enterococcus* spp.

Doctoral student: Rosalina Dimitrova Yordanova

Scientific supervisors Assoc. Dr. Georgi Beev, Prof. Spaska Stanilova

From Assoc.Prof. Ekaterina Tsankova Krumova, PhD

The main topic of the presented dissertation is phenotypic and genetic methods for the detection of virulence and resistance factors of clinical isolates of *Enterococcus* spp.

Enterococci are cosmopolitan microorganisms and are distributed everywhere. They are resistant or tolerant to many antimicrobial agents, which is why the infections they cause are increasingly difficult to treat. Multidrug-resistant *enterococci* belong to the group of so-called "therapeutically problematic microorganisms", for the treatment of which the development of new antimicrobial agents is urgently needed. All this underlines the importance of identifying their virulence factors, which are related to invasiveness and disease severity.

In this sense, the topic of the dissertation work is relevant, significant for science and practice, and dissertationable.

The dissertation work is structured according to the requirements for this kind of works, including an Introduction (2 pages), Literature review (33 pages), Materials and methods (13 pages), Results (28 pages), and Discussion (16 pages). Conclusions and Contributions (2 pages). Out of a total of 420 used literary sources, a large part (134) are from the last 10 years. The number of included figures (15) and tables (40) illustrating the obtained results is significant.

The information presented in the "Literature review" section is interesting and up-to-date. A large volume of scientific information concerning the classification, morphology, and physiology of *enterococci*, as well as their ecology and epidemiology, is analyzed. The clinical spectrum of infections caused by *Enterococcus* spp is also discussed in detail. Serious attention is paid to the methods of identification of *Enterococcus* spp., as well as to the resistance mechanisms of

Enterococcus spp. to antimicrobial agents. The doctoral student also outlines unresolved issues regarding the epidemiology of resistant enterococci and their virulent potential, related to the invasiveness and severity of the diseases they cause.

Based on the presented information, the author clearly defines the purpose of the dissertation work - Study of virulence factors, including quorum-sensing regulatory genes, determining biofilm-forming activity and assessment of the antibiotic resistance profile of clinically relevant and commensal strains of *Enterococcus* spp., isolated from clinical materials of hospitalized patients. To achieve the set goal, 8 main tasks have been formulated.

The Materials and Methods section shows the diverse methodological base used in the research. The doctoral student uses classic and modern microbiological, molecular-biological and biochemical methods and modern equipment. The described methods make it possible to conduct the experiments correctly and obtain reliable results.

A large volume of experimental work is included in the "Results" and "Discussion" sections. 188 (110 clinical and 78 fecal) isolates identified as *E. faecalis* and *E. faecium* were used. Their antibiotic sensitivity was investigated and their virulence factors were studied, incl. quorum-sensing determinative. The pathogenic potential of the two main species of enterococci, *E. faecalis* and *E. faecium*, were compared, depending on the presence of genes encoding virulence factors. The logical sequence of the individual stages is impressive. The dissertation is written in a good scientific style. The obtained results are clearly illustrated with 15 figures and 40 tables. Good knowledge of the literature allows the author a skillful interpretation of the obtained results.

Based on the experimental work carried out, 11 conclusions and 4 contributions of theoretical (2) and applied (1, 3, 4) nature were formed. From a theoretical aspect, new data on the virulence potential of the studied strains were obtained. The higher virulence potential of *E. faecalis* strains compared to *E. faecium* is confirmed, based on the predominance of isolates possessing genes encoding virulence factors. In the applied aspect, methodologies with important importance for clinical practice have been developed: a methodology based on multiplex PCR analysis, simultaneously determining several parameters in relation to the main enterococcal species - *E. faecalis* and *E. faecium*; methodology for simultaneous proof of genes (including quorum-sensing determined) (*cylA*, *gelE*, *esp*, *asa1*) encoding virulence factors (hemolysin, gelatinase, biofilm), by molecular genetic techniques, among clinical strains of enterococci and multiplex

PCR methodology for proving the presence of genes (TEM, emeA, aac(6')/aph(2"), vanA, vanB) encoding antimicrobial drug resistance among clinical strains of enterococci.

The dissertation abstract is submitted within the deadline required by the school. It contains all the important highlights of the presented dissertation work. In this sense, the prepared abstract fully corresponds to the dissertation work.

In connection with the dissertation, 5 scientific papers have been published, three of which have been published in conference proceedings, and the other two in scientific journals, one of which has an impact factor. In all presented publications, the Ph.D. student is the lead author. The doctoral student participated in 4 scientific forums on the subject and in the development of 3 scientific projects.

In conclusion, I believe that the doctoral student Rozalina Dimitrova Yordanova has completed the entire training program and experimental work, and she has acquired knowledge and competence in the field of doctoral studies. The doctoral dissertation and the documents presented for the defense by Rozalina Yordanova fully meet the requirements of the ZRASRB and the Rules of the Thrace University, Faculty of Medicine, Stara Zagora and cover the scientometric indicators for acquiring the educational and scientific degree "doctor".

Based on the above, I confidently express my positive opinion and recommend the Honorable Scientific Jury to award Rosalina Dimitrova Yordanova the educational and scientific degree "DOCTOR".



(Assoc. Prof. E. Krumova, PhD)

Sofia, December 2022