



До Председателя на Научно жури  
определено със заповед  
№ 113/17.10.2022 г.  
на Декана на Медицински факултет  
при Тракийски университет  
гр. Стара Загора

## РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“

**Автор:** д-р Розалина Димитрова Йорданова, докторант към катедра „Здравни грижи“ на Медицински факултет при Тракийски университет, гр. Стара Загора, отчислен с право на защита, по докторска програма „Микробиология“, професионално направление 4.3. Биологически науки, област на висшето образование 4. Природни науки, математика и информатика.

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

**Изготвил:** чл.-кор. Христо Миладинов Найденов, от Института по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН с компетентност по инфекциозна микробиология, молекулярна биология, имунология, епизоотология, експериментални животински модели.

Декларирам, че не съществуват условия за конфликт на интереси между мен и кандидата д-р Розалина Димитрова Йорданова по смисъла на ал. 1, точки 2а, 3, 4 и 5 от ДР на ЗРАСРБ. Предоставените ми дисертационен труд, автореферат и други документи по процедурата за защита са коректно подготвени и съответстват на ЗРАСРБ и на Правилника за неговото приложение в Тракийски университет – Стара Загора.

Ентерококите са част от нормалната микрофлора на чревния тракт при човека и животните, и като такива са широко разпространени в околната среда – почва, вода, храни и др. Натрупаните експериментални данни първоначално класифицират тези коковидни бактерии в род *Enterococcus* (в самото начало на

20-ти век), а само три години по-късно (1906 г.) те биват прекласифицирани в род *Streptococcus* (до 1984 г.). Интензивните молекулярно-генетични проучвания привеждат нови факти, което обуславя тяхното причисляване (заедно със стрептококите от група D) към два самостоятелни рода – род *Enterococcus* и род *Lactococcus*. Фекалните стрептококи са прекласифицирани съответно като *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*. Повишеният интерес към тези убиквитерно разпространени микроорганизми се поражда от все по-често наблюдавания процес на трансформация на *Enterococcus* spp. от чревни комменсали към патогени, съпроводен с повишаване на антибиотичната им резистентност, особено тази към vancomycin, високо ниво на резистентност към аминогликозиди и резистентност към пеницилин. От значение е и появилата се устойчивост към нови антимикуробни средства като linezolid, quinopristin/dalfopristin и daptomycin. Ето защо ентерококите вече не се считат за безопасни микроорганизми, означавани с абривиатурата GRAS (Generally Recognized As Safe). Някои от видовете като *E. faecalis* и *E. faecium* се оказват основна причина за тежки инфекции, свързани с продължителен болничен престой и висок леталитет. Причиняваните от тях инфекции са най-често на уринарния тракт, включително катетър-асоциирани уроинфекции, инфекции на кръвта, ендокарда, коремната област, билиарния тракт, хирургичните рани, раните от изгаряне и др. В асоциация с други патогени, в т.ч. и облигатни анаероби, предизвикват смесени инфекции. Ентерококите са патогенни както за пациенти в интензивни отделения, така и при хоспитализирани пациенти с тежки основни заболявания, с увредена имунна система и възрастни хора.

Всички тези накратко представени характеристики на ентерококите, налагат необходимостта от разработването и въвеждането в ежедневната клинична практика на методи за по-бърза и надеждна видова идентификация на основните ентерококови видове, причинители на инфекции при хора, както и на методи за едновременно доказване на гени, кодиращи основни фактори на вирулентност и антимикуробна лекарствена резистентност сред представителите на род *Enterococcus*. Те са особено належащи и същевременно перспективни с оглед на мерките за превенция, което подчертава актуалността и значимостта на провежданите изследвания, предмет на настоящия дисертационен труд.

Дисертационният труд е написан съгласно стандартните изисквания с основни раздели: Увод (2 стр.), Литературен обзор (33 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (13 стр.), Резултати (28 стр.), Обсъждане на резултатите (17 стр.), Изводи(1 стр.), Справка за приносите на дисертационния труд (1 стр.) и Литература (44 стр.) Най-важните получени резултати са обобщени в 11 извода, а научното и приложно значение е представено в 4 приноса.

Научните факти са подходящо онагледени с 40 таблици и 15 фигури, отразяващи резултатите от микробиологичните, биохимичните и молекулярно-биологичните изследвания. За изготвянето на дисертационният труд е използван широк набор от литературни източници – цитирани са общо 420 заглавия, от които 137 (33%) са от последните 10 години, като от тях 48 (11%) са от последните 5 години. Публикациите във връзка с дисертацията са 4 и във всички д-р Йорданова е първи автор, което е показателно за нейното водещо участие в разработването на темата.

В разделът **Литературен обзор** се представят подробности свързани с таксономията на бактериите от род *Enterococcus*, като в таблица се прилага списък на видовете ентерококи, включени в този род към 2022 г. Специално внимание е отделено на морфологичните и физиологични особености, и свързаните с тях екологични и епидемиологични особености. Многобройни литературни източници разкриват факторите на патогенност и вирулентност при род *Enterococcus* – агрегираща субстанция, ентерококовия повърхностен протеин (Esp), протеиновия токсин – цитолизин, желатиназата, хиалуронидазата, колаген-свързващи протеини, ентерококовия ендокардитен антиген, пилите, quorum-sensing дерминирани фактори и др. Много компетентно е описанието на клиничния спектър на инфекциите, причинени от род *Enterococcus*, както и методите за идентификация на причинителите – фенотипни (конвенционални и автоматизирани) и молекулярно-генетични. Заедно с представените данни за механизмите на резистентност към антимикробни средства – бета-лактамни антибиотици, аминогликозиди, гликопептиди, макролиди, линкозамиди и др., този раздел не само отразява постиженията до този момент, но и поставя коректно нерешените до момента

въпроси. Това определя и необходимостта от проведеното изследване и ориентира читателя към новите насоки в разработката.

Върху основата на направения преглед на достъпната литература са изведени целта на проучването и свързаните с нейното изпълнение изследователски задачи, някои от които с потенциално практическо приложение на резултатите. Те са обособени в раздел **Цел и задачи**, като поставените общо 8 на брой изследователски задачи са логично свързани и представят ясно и конкретно изследваните параметри и аспекти на сравняване чрез умелото съчетаване на класически и молекулярно-генетични подходи .

Разделът **Материали и методи** представя богата гама добре описани класически микробиологични и биохимични методи, подбрани в съответствие с поставените цели и задачи. Много добро впечатление прави и прилагането на съвременни молекулярни методи, които обогатяват и надграждат използваният методичен инструментариум, и са важен критерий, подчертаващ многостранната методична подготовка на кандидата.

В разделът **Резултати** са представени стегнато и систематизирано получените експериментални данни от видовата идентификация на изследваните клинични изолати от род *Enterococcus*, проведена чрез използването на фенотипни методи - конвенционални биохимични и автоматизирани системи. Всичките 110 изолирани щамове са подложени и на мултиплексен PCR, като при сравнителният анализ са получени седем несъответствия. Според локализацията на инфекцията (кръв, урина, уретрални катетри, раневи секрети, пунктати, коремни аспирати, вагинални секрети, проби от дихателната система и кожа), преобладават изолатите от урина – 37 щамове са от вида *E. faecalis* и 5 от *E. faecium*, следвани от раневите секрети - 36 от *E. faecalis* и 2 от *E. faecium*. Допълнително са изследвани и фекални проби, като са изолирани няколко вида ентерококи - *E. faecalis* (42 щамове), *E. faecium* (12), *E. gallinarum* (15), *E. casseliflavus* (8) и 1 от вида *E. hirae*. Изследванията върху антибиотичната резистентност на всички клинични изолати сочат високи нива на резистентност към бета-лактамите (59% за *E. faecalis* и 100% за *E. faecium*), а също и към хинолоните (51% за *E. faecalis*, 100% за *E. faecium*) и аминогликозидите (54% за *E. faecalis* и 91% за *E. faecium*). Всички щамове *E.*

*faecalis* са доказано чувствителни към ванкомицин, докато четири щамове *E. faecium* (три от хемокултури и един от урина) са резистентни към този гликопептиден антибиотик. Тревожен е и фактът за наличието на множествена лекарствена резистентност, доказана при 39% от клиничните изолати на *Enterococcus* spp., като освен към три групи антибиотици, резистентност е доказана и към четири групи (7 щамове) и дори към пет – при един щам *E. faecium*, изолиран от урина. С използването на мултиплексен PCR е потвърдено наличието на редица гени, отговорни за антимикуробната резистентност. В преобладаващ брой щамове, изолирани от урина и раневи секрети се доказва едновременна експресия на *aac(6)/apf(2)* и *emeA* гените. В посочените клинични материали се изолират и щамове, притежаващи три гена за антимикуробна резистентност, а един от изолатите показва наличие и на четири - *aac(6)/apf(2)+emeA+vanA+TEM*, от общо петте проучвани гена. Присъствието на *vanB* ген не е доказано сред MDR ентерококите, а *vanA* и *emeA* гените са открити поотделно в два от тестваните щамове *E. faecalis*, изолирани от урина. Важна информация относно патогенният потенциал на ентерококите предоставят и проведените изследвания върху тяхната биофилмообразуваща способност, фенотипно доказаната продукция на цитолизини (хемолизин), екстрацелуларната металоендопептидаза – желатиназа и разпространението на quorum-sensing регулиращите гени *asa1* и *esp*. Използването на три класически метода за изследване на биофилмообразуващата активност дава надеждни данни за този параметър и позволява тяхното обективно сравняване между отделните изолати. Анализът на данните показва способност за биофилмообразуване при 48% от клиничните изолати, като не се доказва значима разлика между видовете *E. faecalis* и *E. faecium*. Сравнявайки способността за формиране на биофилм между клинични и фекални изолати се установява положителна зависимост между двете групи, което определя и тяхното значение за появата и разпространението на ентерококовите инфекции. Към достоинства на дисертационния труд следва да се прибави и проучването върху връзката между множествената резистентност (MDR) и биофилмообразуването при клинични изолати от род *Enterococcus*. Получените резултати показват, че няма статистическа разлика между биофилм-

положителните и биофилм-отрицателните щамове с доказана множествена лекарствена резистентност в съответният вид - *E. faecalis* , респ. *E. faecium*. Сред изолатите от отделните MDR видове *E. faecalis* и *E. faecium*, преобладават тези с биофилмобразуваща активност като разликата е статистически достоверна. Доказано е също, че преобладаваща продукция на цитолизин и желатиназа се установява предимно при ентерококите, изолирани от урина и раневи секрети. Едновременната продукция на тези два фактора на вирулентност при клинични щамове *E. faecium* не е наблюдавана. Добавяйки към тези данни и резултатите от мултиплексния PCR за наличието на гените *cytA* и *gelE*, кодиращи синтеза съответно на цитолизин и желатиназа може да се направи изводи, че изследваните детерминанти на вирулентността са разпространени в различни пропорции във всеки отделен щам. Сравнителният анализ между множествената лекарствена резистентност и разпространението на гените *asa1* и *esp* сред клинични изолати на род *Enterococcus* сочи статистически значима разлика между щамовете положителни за тези два гена (заедно и поотделно) и притежаващи гените за антимикробна резистентност – *emeA*, *TEM*, *aac(6’)/apf(2’)* или *vanA*.

Получените оригинални научни резултати са интерпретирани компетентно и задълбочено в раздела **Обсъждане на резултатите**. Тук се разкриват и уменията на докторанта да планира, провежда и анализира резултатите от много комплексни експерименти и същевременно на базата на доброто познаване на проблема и световната литература по него да прави компетентни обсъждания, анализи и заключения. Умелата съпоставка на собствените резултати с тези на други автори от страната и чужбина очертават още по-добре важните приноси на този дисертационен труд за диагностиката, патогенезата и терапията на ентерококовите инфекции.

Приемам направените 11 извода, които имат фундаментално микробиологично и епидемиологично значение, както и представените приноси на дисертационния труд, разкриващи потенциалната възможност за приложение в микробиологичната диагностична и клинична практики, насочени към опазване здравето на хората, безопасността на храните и др. Авторофератът отразява обективно същностните характеристики и параметри

на дисертационния труд и дава цялостна представа за изпълнението на поставените цели и задачи, и направените въз основа на проведените изследвания и получените резултати изводи и приноси.

Като предварителен рецензент бях направил някои забележки и препоръки, които са взети под внимание при изготвянето на окончателният вариант на дисертационния труд. Бих препоръчал за в бъдеще да се прецизира употребата на понятията „фактори на вирулентност“ и „вирулентни фактори“ които в българският език имат различен смисъл.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е цялостна, логично поставена и прецизно изпълнена работа, с използването на набор от добре усвоени класически и съвременни методи. В него ясно се открояват редица оригинални научни и научно-приложни приноси по един актуален и важен за микробиологията и епидемиологията въпрос.

С това дисертационният труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ на тема „Фенотипни и генетични методи за откриване на фактори на вирулентност и резистентност на клинични изолати *Enterococcus* spp.“ отговаря на изискванията на чл.12 от ЗРАСРБ, поради което препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да гласуват единодушно с положителен вот за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ на д-р Розалина Димитрова Йорданова по професионално направление 4.3. Биологически науки, област на висшето образование 4. Природни науки, математика и информатика.

12.12.2022 г.

София

  
чл.-кор. Христо Найденски, д-р



To the Chairlady of the Scientific Jury  
Order № 113/17.10.2022  
of the Dean of the Medical Faculty  
Thrakia University, Stara Zagora

## REVIEW

On a dissertation for awarding the educational and scientific degree "Doctor" (PhD)

**Author:** Dr. Rozalina Dimitrova Yordanova, PhD student at the Department "Healthcare" of the Faculty of Medicine at Trakia University, Stara Zagora, dismissed with the right of defense, in the doctoral program "Microbiology", professional direction 4.3. Biological Sciences, area of higher education 4. Natural Sciences, Mathematics and Informatics.

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

**Reviewer:** Prof. Hristo Miladinov Najdenski, DSci, Corr.member of BAS, the Stefan Angelov Institute of Microbiology (Bulgarian Academy of Sciences) with expertise in infectious microbiology, molecular biology, immunology, epizootology, experimental animal models.

**I declare** that there are no conditions for a conflict of interest between me and the candidate Dr. Rozalina Dimitrova Yordanova within the meaning of Paragraph 1, points 2a, 3, 4 and 5 of the Additional Provisions of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria. The dissertation, abstract and other documents submitted to me for the defense procedure have been correctly prepared and correspond to the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations for its application at Thrakia University - Stara Zagora.

Enterococci are part of the normal microflora of the intestinal tract in humans and animals, and as such are widely distributed in the environment - soil, water, food, etc. Accumulated experimental data initially classified these coccoid bacteria in the genus *Enterococcus* (at the very beginning of the 20th century), and only three



years later (1906) they were reclassified in the genus *Streptococcus* (until 1984). Intensive molecular genetic studies brought new facts, which led to their classification (along with streptococci of group D) to two separate genera - genus *Enterococcus* and genus *Lactococcus*. Faecal streptococci have been reclassified as *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, respectively. The augmented interest in these ubiquitous microorganisms arises from the increasingly observed transformation process of *Enterococcus* spp. from intestinal commensals to pathogens, accompanied by an increase in their antibiotic resistance, especially that to vancomycin, high-level aminoglycoside resistance and penicillin resistance. Emerging resistance to new antimicrobials such as linezolid, quinopristin/dalfopristin and daptomycin is also relevant. That is why enterococci are no longer considered safe microorganisms, denoted by the abbreviation GRAS (Generally Recognized As Safe). Some of the species such as *E. faecalis* and *E. faecium* appear to be the main cause of severe infections associated with prolonged hospital stay and high mortality. The infections they cause are most often of the urinary tract, including catheter-associated uroinfections, infections of the blood, endocardium, abdominal region, biliary tract, surgical wounds, burn wounds, etc. In association with other pathogens, including obligate anaerobes, they cause mixed infections. Enterococci are pathogenic both for patients in intensive care units and in hospitalized patients with severe underlying diseases, with impaired immune systems and the elderly.

All these briefly presented characteristics of enterococci necessitate the development and introduction into daily clinical practice of methods for faster and reliable species identification of the main enterococcal species that cause infections in humans, as well as methods for simultaneous proof of genes encoding main factors of virulence and antimicrobial drug resistance among representatives of the genus *Enterococcus*. These methods are particularly urgent and at the same time promising in terms of prevention measures, which emphasizes the relevance and significance of the research conducted, being the subject of this dissertation.

The dissertation is written according to the standard requirements with main sections: Introduction (2 pages), Literature review (33 pages), Aim and tasks (1 page), Materials and methods (13 pages), Results (28 pages) , Discussion of the results (17 pages), Conclusions (1 page), Reference to the contributions of the dissertation work (1 page) and References (44 pages) The most important results obtained are summarized in 11 conclusions, and the scientific and applied importance is presented in 4 contributions.

Scientific facts are adequately illustrated with 40 tables and 15 figures reflecting the results of microbiological, biochemical and molecular biology studies. A wide range of references was used for the preparation of the dissertation - a total of 420 titles were cited, of which 137 (33%) from the last 10 years, and of these 48 (11%) from the last 5 years. There are 4 publications related to the dissertation, and Dr. Yordanova is the first author in all of them, which is indicative of her leading participation in the development of the topic.

The **Literature review** section presents details related to the taxonomy of bacteria of the genus *Enterococcus*, with a table listing the species of enterococci included in this genus as of 2022. Special attention is paid to morphological and physiological features, and the associated ecological and epidemiological features. Numerous literary sources reveal the factors of pathogenicity and virulence in the genus *Enterococcus* - aggregating substance, enterococcal surface protein (Esp), protein toxin - cytolysin, gelatinase, hyaluronidase, collagen-binding proteins, enterococcal endocarditis antigen, pili, quorum-sensing determined factors, etc. The description of the clinical spectrum of infections caused by the genus *Enterococcus* is very competent, as well as the methods for identifying the causative agents - phenotypic (conventional and automated) and molecular biology. Together with the presented data on the mechanisms of resistance to antimicrobial agents - beta-lactam antibiotics, aminoglycosides, glycopeptides, macrolides, lincosamides, etc., this section not only reflects the achievements up to this point, but also correctly poses the unresolved questions. This determines the necessity of the conducted research and orients the reader to the new directions in the dissertation.

Based on the review of the available literature, the purpose of the study and the research tasks related to its implementation, some of which have a potential practical application of the results, are derived. They are identified in the **Aim and tasks** section, and the 8 research tasks set in total are logically connected and present clearly and concretely the studied parameters and aspects of comparison through the skillful combination of classical and molecular genetic approaches.

The **Materials and methods** section presents a wide range of well-described classic microbiological and biochemical methods, selected in accordance with the set goals and objectives. A very good impression is also made by the application of modern molecular methods, which enrich and upgrade the used methodological tools, being an important criterion and emphasizing the multifaceted methodological preparation of the candidate.

In the **Results** section, the obtained experimental data from the species identification of the examined clinical isolates of the genus *Enterococcus*, carried out by using phenotypic methods - conventional biochemical and automated systems, are presented in a concise and systematized manner. All the 110 isolated strains were also subjected to multiplex PCR, and seven mismatches were obtained in the comparative analysis. According to the localization of the infection (blood, urine, urethral catheters, wound secretions, punctures, abdominal aspirates, vaginal secretions, samples from the respiratory system and skin), urine isolates predominate - 37 strains are proved as *E. faecalis* and 5 as *E. faecium*, followed by wound secretions - 36 from *E. faecalis* and 2 from *E. faecium*. Fecal samples were additionally examined, and several types of enterococci were isolated - *E. faecalis* (42 strains), *E. faecium* (12), *E. gallinarum* (15), *E. casseliflavus* (8) and 1 species of *E. hirae*. Antibiotic resistance studies of all clinical isolates indicated high rates of resistance to beta-lactams (59% for *E. faecalis* and 100% for *E. faecium*) and also to quinolones (51% for *E. faecalis*, 100% for *E. faecium*) and the aminoglycosides (54% for *E. faecalis* and 91% for *E. faecium*). All strains of *E. faecalis* were found to be sensitive to vancomycin, while four strains of *E. faecium* (three from blood cultures and one from urine) were resistant to this glycopeptide antibiotic. The fact of the presence of multiple drug resistance (MDR), proven in 39% of clinical isolates of *Enterococcus* spp., is also worrying, as, in addition to three groups of antibiotics, resistance was also proven to four groups (7 strains) and even to five - in one strain *E. faecium* isolated from urine. Using multiplex PCR, the presence of a number of genes responsible for antimicrobial resistance has been confirmed. Simultaneous expression of the *aac(6')/apf(2'')* and *emeA* genes was demonstrated in a predominant number of strains isolated from urine and wound secretions. In the indicated clinical materials, strains possessing three genes for antimicrobial resistance were also isolated, and one of the isolates showed the presence of four - *aac(6')/apf(2'')+emeA+vanA+TEM*, out of the total of five studied genes. The presence of a *vanB* gene was not demonstrated among the MDR enterococci, and the *vanA* and *emeA* genes were detected separately in two of the tested *E. faecalis* strains isolated from urine.

Important information about the pathogenic potential of enterococci is also provided by the studies conducted on their biofilm-forming ability, the phenotypically proven production of cytolytins (hemolysin), the extracellular metalloendopeptidase - gelatinase and the distribution of the quorum-sensing

regulatory genes *asa1* and *esp*. The use of three classic methods for studying biofilm-forming activity gives reliable data on this parameter and allows their objective comparison between individual isolates. Data analysis showed biofilm-forming ability in 48% of clinical isolates, showing no significant difference between *E. faecalis* and *E. faecium* species. Comparing the ability to form a biofilm between clinical and fecal isolates, a positive correlation was established between the two groups, which also emphasize their importance for the occurrence and spread of enterococcal infections. The research on the relationship between MDR and biofilm formation in clinical isolates of the genus *Enterococcus* should be added to the merits of the dissertation work. The obtained results show that there is no statistical significance between the biofilm-positive and biofilm-negative strains with proven multidrug resistance in the respective species - *E. faecalis* and *E. faecium*. Among the isolates from the individual MDR species *E. faecalis* and *E. faecium*, those with biofilm-forming activity predominate, and the difference is statistically significant. It has also been proven that a predominant production of cytolysin and gelatinase is mainly found in enterococci isolated from urine and wound secretions. Simultaneous production of these two virulence factors in *E. faecium* clinical strains has not been observed. Adding to these data the results of the multiplex PCR for the presence of the genes *cylA* and *gelE*, encoding the synthesis of cytolysin and gelatinase, respectively, it can be concluded that the studied determinants of virulence are distributed in different proportions in each individual strain. The comparative analysis between multidrug resistance and the distribution of *asa1* and *esp* genes among clinical isolates of the genus *Enterococcus* indicated a statistically significant difference between strains positive for these two genes (together and separately) and possessing the antimicrobial resistance genes - *emeA*, *TEM*, *aac(6')/apf(2'')* or *vanA*.

The original scientific results obtained are competently and thoroughly interpreted in the **Results and discussion** section. Here, the skills of the PhD student to plan, conduct and analyze the results of very complex experiments are revealed and at the same time, based on the good knowledge of the problem and the world literature on it, to make competent discussions, analyzes and conclusions. The skillful comparison of the own results with those of other authors from the country and abroad outline even better the important contributions of this dissertation to the diagnosis, pathogenesis and therapy of enterococcal infections.

I accept the 11 conclusions made, which have fundamental microbiological and epidemiological significance, as well as the presented contributions of the dissertation work, revealing the potential possibility of application in microbiological diagnostic and clinical practices aimed at protecting human health, food safety, etc. The thesis objectively reflects the essential characteristics and parameters of the dissertation work and gives a comprehensive idea of the fulfillment of the set goals and tasks, and the conclusions and contributions made on the basis of the research conducted and the results obtained.

As a preliminary reviewer, I had made some observations and recommendations, which were taken into account when preparing the final version of the dissertation. I would recommend that in the future the use of the terms "factors of virulence" and "virulence factors" be clarified, which in the Bulgarian language have different meanings.

**CONCLUSION:** The PhD dissertation submitted for review is a complete, logically laid out and precisely executed work, using a range of well-learned classical and modern methods. It clearly highlights a number of original fundamental scientific and scientific-applied contributions on a current and important issue for microbiology and epidemiology.

With this, the dissertation work for the award of the educational and scientific degree "PhD" on the topic "Phenotypic and genetic methods for the detection of virulence and resistance factors of clinical isolates of *Enterococcus* spp." meets the requirements of Article 12 of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations for its application at the Thrakia University - Stara Zagora, therefore I recommend to the respected members of the Scientific Jury to vote unanimously with a positive vote to award the educational and scientific degree "PhD" to Dr. Rozalina Dimitrova Yordanova in professional field 4.3. Biological sciences, area of higher education 4. Natural sciences, mathematics and informatics.

12.12.2022, Sofia

Signature:



(Prof. Hristo Najdenski)