



До Председателя на Научно жури  
определено със заповед  
№ 4084/24.10.2025 г.  
на Ректора на Тракийски университет  
гр. Стара Загора

## РЕЦЕНЗИЯ

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

**Автор:** д-р Радостина Димитрова Стефанова - редовен докторант, отчислен с право на защита в област на висше образование 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина по докторска програма “Ветеринарна микробиология” към катедра “Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести” на Ветеринарномедицинския факултет при Тракийски университет (ТрУ), гр. Стара Загора;

**Тема** на дисертационния труд: “Фенотипни и генотипни проучвания върху резистентността към антимикробните средства при щамове *E. coli*, изолирани от кокошеви и водоплаващи птици”

**Изготвил:** акад. Христо Миладинов Найденски, д-р от Института по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН с компетентност по инфекциозна микробиология, антимикробна резистентност, молекулярна биология, имунология, епизоотология, експериментални животински модели.

**Декларирам**, че не съществуват условия за конфликт на интереси между мен и кандидата д-р Радостина Димитрова Стефанова 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 ТрУ – Стара Загора.

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е задъбочено по своя характер и мащабно по обем проучване върху един от много актуалните за човечеството въпроси, а именно антимикробната резистентност (АМР). Темата е водеща в дългогодишната изследователска дейност на проф. дн Валентина Урумова - научен ръководител на докторанта, което предопределя в голяма степен успешното изпълнение на поставените цел и задачи в настоящия дисертационен труд.

Тенденцията за все по-широкото разпространение на резистентните бактерии сред хората, домашните и диви животни, и различните екологични ниши в околната среда се изучава и дискутира като сериозен проблем на общественото здраве, обуславящ до голяма степен огромните икономически загуби, дължащи се на неуспешната терапия на бактериалните инфекции и особено в случаите на опортюнистични инфекции. Това наложи през 2019 г. СЗО със съдействието на Световната Организация за Здравеопазване на Животните (OIE) да представи глобален план за действие, включващ основните насоки, отнасящи се до намаляване употребата на антимикробни средства в хуманната и във ветеринарната медицина, а така също и до утвърждаването на стандарти за мониториране на тяхната употреба. Основният подход при представянето на данните, свързани с мониторинга върху употребата на антимикробните средства в животновъдството, се отнася най-вече до отчитане на ежегодните количества на продажбите, докато по-ограничена е цялостната информация относно индивидуалното им потребление на ниво ферма.

Ето защо настоящото проучване е много навременно и документира редица важни аспекти от процесите и механизмите на АМР, повишавайки

нашите научни познания и осведомеността на регулаторните органи, както за вземането на адекватни управленски решения, така и за справяне с предизвикателствата на този глобален феномен за медицината и човечеството като цяло.

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд включва общо 148 стр. и е написан съгласно стандартните изисквания с основни раздели: Литературен обзор (48 стр.), Собствени изследвания, включващи Цел и задачи (1 стр.) и Материали и методи (10 стр.), Резултати (26 стр.), Дискусия и заключение (11 стр.), Изводи (1 стр.), Приноси (1 стр.), Препоръки за практиката (1 стр.) и Използвана литература (39 стр.).

Най-важните получени резултати са обобщени в 7 извода, а научното и приложно значение е представено в общо 4 приноса. На база проведените проучвания и анализ на резултатите са представени 4 препоръки, 1 от които се отнася до практикуващи ветеринарни специалисти и 3 до БАБХ като компетентен орган. Научните факти са подходящо онагледени с 21 таблици и също толкова цветни фигури, отразяващи резултатите от микробиологичните и молекулярно-биологичните изследвания. За изготвянето на дисертацията е използван голям набор от литературни източници – общо 580 заглавия, от които 151 (26%) са от последните 10 години, като от тях 40 (7%) са от последните 5. Публикациите във връзка с дисертацията са 3, като една от тях е самостоятелна за д-р Стефанова, а в останалите две е втори автор, което е показателно за нейното активно участие в разработването на темата.

В разделът **Литературен обзор** се представят подробности свързани с общите характеристики и механизми на действие на антимикробните средства и на възникващата антимикробна резистентност. На клетъчно и молекулярно ниво са разгледани процесите водещи до намаления импорт

на антибактериални средства в бактериалната клетка, настъпващите модификации в таргетните структури на антибактериалните агенти, механизмите за тяхното инактивиране, за техния активен ефлукс от бактериалната клетка и др. Обстоен анализ е направен и по отношение употребата на антимикробните средства в птицевъдството не само в Европа, но и в редица други страни с развито животновъдство. Придържайки се към темата на дисертацията, мащабен преглед е направен и относно разпространението на резистентността сред вида *Escherichia coli* като резидентни бактерии и полезни индикатори за наблюдение и анализиране на съпътстващите процеси.

За най-широко употребяваните групи антибиотици - бета-лактами, хинолони и тетрациклини умело са представени известните структурни характеристики и особености, както и най-новите научни данни свързани с механизмите на тяхната резистентност. В детайли са описани редица хромозомни мутации, водещи до намален импорт или повишен експорт от бактериалната клетка, както и редица плазмиди детерминиращи антимикробна резистентност, наличието на гени на резистентност, определящи продукцията на протективни таргетни протеини, модифициращи ензими, ефлуксни помпи и др.

Литературният обзор завършва с обобщение, оставайки впечатление за висока компетентност по темата и за един задълбочен анализ на актуалното състояние на АМР, свързано с употребата на антимикробни средства в птицевъдството и съществуващият риск за опазване здравето на хора, животни и околната среда. Умело се доказва, че начините на приложение на антимикробните средства и тяхното количество са рисков фактор за възникване на определени бактериални инфекции, които са в зависимост и от технологичните особености на отглеждане на различни

категории птици. Подчертава се и реалната възможност за селектиране и разпространение на бактериални щамове, резистентни към различни групи химиотерапевтици, което ограничава тяхната терапевтична ефективност.

Представените данни извеждат в логична последователност **целта и задачите** на дисертационния труд, разкриващи не само изследователския капацитет и експертиза на докторанта, но и потенциалното практическо приложение на получените резултати. Подразделът **Материали и методи** излага подробно и компетентно използвания методичен арсенал, който включва множество класически микробиологични и съвременни молекулярно-биологични методи за фенотипно и генотипно определяне и характеризирание на резистентността към широка група антимикробни средства, включващи бета-лактамни антибиотици, хинолони и тетрациклини.

В разделът **Резултати** са представени стегнато и систематизирано получените експериментални данни от изследваните общо 619 броя клоакални тампонни проби от здрави птици (бройлери, кокошки-носачки, родители за бройлери, пуйчета на 9-дневна възраст, възрастни пуйки над една година, стопански патици) и 12 проби от торова постеля. Птиците са отглеждани в 3 птицекомбината, 3 стопанства за патици, 1 пуйкоферма и 1 стопанство за отглеждане на кокошки-носачки. Обобщени и анализирани са данните за изолиране и идентифициране на коменсалните коли бактерии, включващи набор от най-често използваните биохимични тестове и китове за идентификация на ентеробактерии и неферментативни бактерии от системата CRYSTAL.

Компетентно са описани резултатите от фенотипния анализ на резистентността при изолираните коменсални коли бактерии към седем антимикробни средства, принадлежащи към четири различни класа, а

именно: Бета-лактамни антимикробни средства: ампицилин, амоксицилин/клавуланова киселина, цефотаксим, цефтазидим, цефотаксим/клавуланова киселина, цефтазидим/клавуланова киселина; Аминогликозид-аминоциклитоли – гентамицин; Тетрациклини – тетрациклин; Флуорирани хинолони – ципрофлоксацин.

Обобщените данни за фенотипа на резистентност сочат най-висок процент (съответно 81.7% и 75.3%) към тетрациклин и към ампицилин при щамовете, изолирани от патици. Широко разпространение на резистентност към ципрофлоксацин (75.0%) се доказва при щамовете от кокошки-носачки, докато резистентните към тетрациклин коли щамове, изолирани от пуйки са 71.8%, респективно 70.5% към ампицилин. Резистентността към ципрофлоксацин при коли щамовете, изолирани от бройлери е 70.7%. По отношение на цефалоспорините от трета генерация, по-висока превалентност на резистентни щамове е установена при коменсалните коли бактерии изолирани от бройлери, в сравнение с установената при щамовете от родители за бройлери и при щамовете от пуйки.

Генетичният анализ на резистентните коли щамове се свежда до определяне на някои генетични платформи, детерминиращи резистентност към цефотаксим и цефтазидим, като ген *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, а също така и на плазмидно-детерминирани гени, определящи резистентност към флуорираните хинолони (*qnrS*, *qnrA* и *qnrB*) и гените, определящи резистентността към тетрациклиновите антибиотици - *tet A* и *tet B*.

Данните относно разпространението на различни гени на резистентност сред коменсалните коли бактерии, изолирани от различни видове стопански птици и от торова постеля показват най-широко разпространение на гена *bla<sub>CTX-M-1</sub>* сред щамовете от торовата постеля (41.6% ) и сред щамовете изолирани от бройлери (5.5%). При щамовете от

родители за бройлери и от пуйки е установено присъствие на гена *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, съответно 3.9% и 2.6%. По отношение разпространението на гените, определящи резистентност към тетрациклин, доминиращо е присъствието на гена *tetA* (81.7%) и съответно на *tetB* (48.4%) при коли бактериите, изолирани от стопански патици. Също така висок процент на разпространение на гена *tetA* е установен при коменсалните коли бактерии от бройлери (73.1%), от пуйки (71.8%) и от торова постеля (75%). По-широко разпространение на гена *qnrS* е наблюдавано при щамовете, изолирани от бройлери (73.1%), след това при кокошки-носачки (65.8%), от торова постеля (66.7%) и от родители за бройлери (54.4%). По-широко разпространение на гена *qnrB-1* е установено при щамовете, изолирани от пуйки (12.8%), и в по-слаба степен при щамовете от торовата постеля (8.3%).

Получените оригинални научни резултати са интерпретирани компетентно и задълбочено в раздела **Дискусия**. Тук се разкриват и уменията на докторанта да анализира резултатите от много и комплексни експерименти и същевременно на базата на доброто познаване на темата и световната литература по нея да прави компетентни обсъждания, изводи и заключения. Умелата съпоставка на собствените резултати с тези на други автори от страната и чужбина очертават още по-добре важните научни и научно-приложни приноси на този дисертационен труд.

Приемам направените 7 извода, потвърдителните и оригинални приноси и 4-те препоръки, които имат фундаментално значение за ограничаване разпространението и намаляване негативното влияние на антимикробната резистентност върху здравето на хора и животни.

Като участник в разширения Катедрен съвет бях направил някои забележки и препоръки, които са взети под внимание при изготвянето на окончателният вариант на дисертационния труд.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е цялостна, логично поставена и прецизно изпълнена работа, с използването на редица добре усвоени класически и съвременни методи. В него ясно се открояват редица оригинални научни и научно-приложни приноси по една актуална не само за птицевъдството и ветеринарната медицина проблематика, но и за човечеството като цяло.

С това дисертационният труд за присъждане на ОНС „Доктор“ на тема „Фенотипни и генотипни проучвания върху резистентността към антимикробните средства при щамове *E. coli*, изолирани от кокошеви и водоплаващи птици“ отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и на ПРАСТрУ, поради което препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да гласуват единодушно с положителен вот за присъждане на ОНС „Доктор“ на д-р Радостина Димитрова Стефанова по професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина, област на висшето образование 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина.

18.12.2025 г.

. 23



To the Chair of the Scientific Jury  
determined by order  
№ 4084/24.10.2025  
of the Rector of Thrakia University  
Stara Zagora, Bulgaria

## REVIEW

On the dissertation for the award of the educational and scientific degree "Doctor" (PhD)

**Author:** Dr. Radostina Dimitrova Stefanova - PhD student, enrolled with the right to defend in the field of higher education 6. Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, professional field 6.4. Veterinary Medicine under the doctoral program "Veterinary Microbiology" at the Department of "Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases" of the Faculty of Veterinary Medicine at the Thrakia University (TrU), Stara Zagora;

**Topic of the dissertation:** "Phenotypic and genotypic studies on the resistance to antimicrobial agents in *E. coli* strains isolated from poultry and waterfowl"

**Prepared by:** Acad. Hristo Miladinov Najdenski, DSci from the Institute of Microbiology "Stephan Angeloff" – Bulgarian Academy of Sciences with expertise in infectious microbiology, antimicrobial resistance, 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. Radostina Dimitrova Stefanova 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 (LDASRB). The dissertation work, abstract and other documents provided to me for the defense procedure are correctly prepared and comply with the LDASRB and the Regulations for its application at the Trakia University of Stara Zagora.

The dissertation work presented to me for review is a profound in nature and large-scale in volume study on one of the very topical issues for humanity, namely antimicrobial resistance (AMR). The topic is leading in the long-term research activity of Prof. Dr. Valentina Urumova - scientific supervisor of the PhD student, which largely determines the successful implementation of the set goals and tasks in this dissertation work.

The trend of the increasing prevalence of resistant bacteria among humans, domestic and wild animals, and various ecological niches in the environment is studied and discussed as a serious public health problem, largely responsible for the huge economic losses due to unsuccessful therapy of bacterial infections, especially in cases of opportunistic infections. This required the WHO, with the assistance of the World Organization for Animal Health (OIE), to present a global action plan in 2019, including the main guidelines for reducing the use of antimicrobials in human and veterinary medicine, as well as the establishment of standards for monitoring their use. The main approach in presenting data related to the monitoring of the use of antimicrobials in animal husbandry refers mainly to reporting annual sales volumes, while comprehensive information on their individual consumption at the farm level is more limited.

That is why this study is very timely and documents a number of important aspects of the processes and mechanisms of AMR, increasing our scientific knowledge and the awareness of regulatory authorities, both for making adequate management decisions and for addressing the challenges of this global phenomenon for medicine and humanity as a whole.

The dissertation submitted to me for review includes a total of 148 pages and is written according to standard requirements with main sections: Literature review (48 pages), Own research, including Aim and objectives (1 page) and Materials and methods (10 pages), Results (26 pages), Discussion and

conclusion (11 pages), Conclusions (1 page), Contributions (1 page), Recommendations for practice (1 page) and References (39 pages).

The most important results obtained are summarized in 7 conclusions, and the scientific and applied significance is presented in a total of 4 contributions. Based on the conducted studies and analysis of the results, 4 recommendations are presented, 1 of which refers to practicing veterinary specialists and 3 to the Bulgarian Food Safety Authority as a competent authority. The scientific facts are appropriately illustrated with 21 tables and an equally large number of colorful figures reflecting the results of microbiological and molecular biological studies. A large set of literary sources was used to prepare the dissertation - a total of 580 titles, of which 151 (26%) are from the last 10 years, of which 40 (7%) are from the last 5. There are 3 publications related to the dissertation, one of which is an independent one for Dr. Stefanova, and in the remaining two she is a second author, which is indicative of her active participation in the development of the topic.

The **Literature Review** section presents details related to the general characteristics and mechanisms of action of antimicrobial agents and the emerging antimicrobial resistance. At the cellular and molecular level, the processes leading to the reduced import of antibacterial agents into the bacterial cell, the modifications occurring in the target structures of antibacterial agents, the mechanisms for their inactivation, for their active efflux from the bacterial cell, etc. are examined. A thorough analysis has also been made regarding the use of antimicrobial agents in poultry farming not only in Europe, but also in a number of other countries with developed livestock farming. Adhering to the topic of the dissertation, a large-scale review has also been made regarding the spread of resistance among the *Escherichia coli* species as resident bacteria and useful indicators for monitoring and analyzing the accompanying processes.

For the most widely used groups of antibiotics - beta-lactams, quinolones and tetracyclines, the known structural characteristics and features are skillfully presented, as well as the latest scientific data related to the mechanisms of their resistance. A number of chromosomal mutations leading to reduced import or increased export from the bacterial cell are described in detail, as well as a number of plasmids determining antimicrobial resistance, the presence of resistance genes determining the production of protective target proteins, modifying enzymes, efflux pumps, etc.

The literature review ends with a summary, leaving an impression of high competence on the topic and of a thorough analysis of the current state of AMR related to the use of antimicrobial agents in poultry farming and the existing risk to the health of humans, animals and the environment. It is skillfully proven that the methods of application of antimicrobial agents and their quantity are a risk factor for the occurrence of certain bacterial infections, which also depend on the technological features of raising different categories of birds. The real possibility of selection and spread of bacterial strains resistant to different groups of chemotherapeutic agents is also emphasized, which limits their therapeutic effectiveness.

The presented data logically outline the **goal and objectives** of the dissertation, revealing not only the research capacity and expertise of the PhD student, but also the potential practical application of the obtained results. The **Materials and methods** subsection presents in detail and competently the methodological arsenal used, which includes numerous classical microbiological and modern molecular biological methods for phenotypic and genotypic determination and characterization of resistance to a wide group of antimicrobial agents, including beta-lactam antibiotics, quinolones and tetracyclines.

The **Results** section presents concisely and systematically the experimental data obtained from the studied 619 cloacal swab samples from healthy birds (broilers, laying hens, broiler parents, 9-day-old turkeys, adult turkeys over one year old, farm ducks) and 12 samples of manure litter. The birds were raised in 3 poultry farms, 3 duck farms, 1 turkey farm and 1 laying hen farm. The data for the isolation and identification of commensal coli bacteria, including a set of the most commonly used biochemical tests and kits for the identification of enterobacteria and non-fermentative bacteria from the CRYSTAL system, are summarized and analyzed.

The results of the phenotypic analysis of resistance in isolated commensal coli bacteria to seven antimicrobial agents belonging to four different classes are competently described, namely: Beta-lactam antimicrobial agents: ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefotaxime, ceftazidime, cefotaxime/clavulanic acid, ceftazidime/clavulanic acid; Aminoglycoside-aminocyclitols – gentamicin; Tetracyclines – tetracycline; Fluorinated quinolones – ciprofloxacin.

The summarized data on the resistance phenotype showed the highest percentage (81.7% and 75.3%, respectively) to tetracycline and ampicillin in strains isolated from ducks. A wide prevalence of resistance to ciprofloxacin (75.0%) was demonstrated in strains from laying hens, while tetracycline-resistant coli strains isolated from turkeys were 71.8% and 70.5%, respectively, to ampicillin. Resistance to ciprofloxacin in coli strains isolated from broilers was 70.7%. Regarding third-generation cephalosporins, a higher prevalence of resistant strains was found in commensal coli bacteria isolated from broilers, compared to strains from broiler parents and turkey strains.

Genetic analysis of resistant coli strains was limited to the identification of some genetic platforms determining resistance to cefotaxime and ceftazidime, such as the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene, as well as plasmid-encoded genes determining

resistance to fluorinated quinolones (*qnrS*, *qnrA* and *qnrB*) and genes determining resistance to tetracycline antibiotics - *tet A* and *tet B*.

Data on the distribution of various resistance genes among commensal coli bacteria isolated from different types of poultry and from manure litter show the widest distribution of the *bla<sub>CTX-M-1</sub>* gene among strains from manure litter (41.6%) and among strains isolated from broilers (5.5%). In strains from broiler parents and turkeys, the presence of the *bla<sub>CTX-M-1</sub>* gene was found, 3.9% and 2.6%, respectively. Regarding the prevalence of genes determining tetracycline resistance, the presence of the *tetA* gene (81.7%) and *tetB* (48.4%) was dominant in coli bacteria isolated from domestic ducks. Also, a high prevalence of the *tetA* gene was found in commensal coli bacteria from broilers (73.1%), turkeys (71.8%) and manure litter (75%). A wider prevalence of the *qnrS* gene was observed in strains isolated from broilers (73.1%), then in laying hens (65.8%), manure litter (66.7%) and from broiler parents (54.4%). A wider prevalence of the *qnrB-1* gene was found in strains isolated from turkeys (12.8%), and to a lesser extent in strains from manure litter (8.3%).

The original scientific results obtained are interpreted competently and thoroughly in the **Discussion** section. This section also reveals the doctoral student's skills in analyzing the results of many and complex experiments and, at the same time, based on good knowledge of the topic and world literature on it, making competent discussions, conclusions and inferences. The skillful comparison of one's own results with those of other authors from the country and abroad outlines even better the important scientific and applied scientific contributions of this dissertation work.

I accept the 7 conclusions made, the confirmatory and original contributions and the 4 recommendations, which are of fundamental importance

for limiting the spread and reducing the negative impact of antimicrobial resistance on human and animal health.

As a participant in the extended Department Council, I had made some remarks and recommendations, which were taken into account in preparing the final version of the dissertation work.

**CONCLUSION:** The dissertation submitted to me for review is a comprehensive, logically structured and precisely executed work, using a number of well-learned classical and modern methods. It clearly highlights a number of original scientific and applied scientific contributions to a topical issue not only for poultry farming and veterinary medicine, but also for humanity as a whole.

Thus, the dissertation for the award of the educational and scientific degree "Doctor" (PhD) on the topic "Phenotypic and genotypic studies on the resistance to antimicrobial agents in *E. coli* strains isolated from poultry and waterfowl" meets the requirements of the LDASRB and the Regulations for its application at the Trakia University (Stara Zagora). Therefore I recommend that the esteemed members of the Scientific Jury vote unanimously with a positive vote for the award of the educational and scientific degree "Doctor" (PhD) to Dr. Radostina Dimitrova Stefanova in the professional field 6.4. Veterinary medicine, field of higher education 6. Agricultural sciences and veterinary medicine.

18.12.2025 r.

. . 23

Signature: