



## РЕЦЕНЗИЯ

Върху дисертационен труд на тема: Фенотипни и генотипни проучвания върху резистентността към антимикробните средства при щамове *E. coli*, изолирани от кокошеви и водоплаващи птици за получаване на образователна и научна степен "Доктор", област на висше образование 6. "Аграрни науки и ветеринарна медицина", професионално направление „Ветеринарна медицина“

**Автор на дисертационния труд:** д-р. Радостина Димитрова Стефанова, докторант редовна форма на обучение, в катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“ Секция „Ветеринарна микробиология“ към факултет по Ветеринарна медицина при Тракийски университет (ТРУ) в 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. Дисертационният труд е написан на 148 страници и включва: Литературен обзор, Собствени изследвания, Материали и методи, Цел и задачи на проучването, Резултати, Дискусия, Заключение, Приноси, Изводи, Препоръки за практиката, Използвана литература. Дисертационния труд е онагледен с 21 таблици и 21 фигури. Използваните литературни източници са 580, от които един е на български, а останалите са на латиница.

**Рецензент:** проф. Райко Димитров Пешев, д.н., НДНИВМИ гр. София, област на висше образование 6. "Аграрни науки и ветеринарна медицина", професионално направление 6.4. "Ветеринарна медицина", научна специалност "Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на

заразните заболявания по животните”, определен за член на научното жури със заповед. № 4084/24.10.2025 г. на Ректора на ТРУ.

**Автобиографични данни на докторанта:**

Д-р Радостина Димитрова Стефанова е родена на 01.05.1994 г. Средното си образование е завършила през 2013 г. в СУ "Йордан Йовков", гр. Тутракан. Висшето си образование завършва през 2018 г. в ТРУ гр. Стара Загора, като магистър по ветеринарна медицина. От 2019 до 2022 г. е редовен докторант по докторска програма "Ветеринарна микробиология" в ТРУ гр. Стара Загора. От 2013 до 2021 г е присъствала на 9 курса за повишаване на квалификацията си. През 2020 г. е участвала в 6 Online семинари, отнасящи се до молекулярните и имунологичните методи в биологичните науки, провеждани от фирма MERCK.

Резистентността към антимикробни средства (АМС) в последните години придобива все по-сериозно значение за общественото здраве. В раздел литературен обзор последователно са отразени данните за употребата АМС в птицевъдството и разпространение на резистентността на *Escherichia coli* вследствие употребата им. От официалните данни, представени от различни европейски институции се вижда как през последните 20-30 години количествата на използваните АМС в животновъдството са се увеличили от 640 тона през 2010 г. до 1052,1 тона през 2030 г. Това именно беше причината Световната здравна организация (СЗО) и Световната Организация за Здравеопазване на Животните (WOAH) през 2019 г. да представят план за действие, за оптимизиране употребата на антимикробни средства в медицината и ветеринарната медицина, а така също и да бъдат въведени стандарти за мониториране на тяхната употреба. WOAH определя като “критично-значими” АМС за употреба във ветеринарната медицина (VCIA) цефалоспорините от 3-та и 4-та генерации, флуорирани хинолони и полимиксините. Това са АМС, които са стратегически и резистентността към тях ще доведе до големи проблеми при

лечението на бактериални инфекции при хората и животните. Огромните количества АМС, които се влагат в животновъдството са причина и за изграждане на резистентност на бактериите към тях.

Недостатъчно изяснен е въпроса, свързан с данните относно количеството на използваните АМС в птицевъдството. Данните за употребата на АМС и развитието на резистентност при коли бактериите, изолирани от бройлери и птиче месо, за отделните региони в света са разнообразни. През 2006 г. в ЕС беше забранено използването на АМС, стимулиращи растежа на стопанските животни и сега АМС се използват на популационно ниво за терапия и метафилактика на бактериалните заболявания. Приложението на антибиотици в птицевъдството създава възможност за постигането на добри икономически показатели, но също така представлява огромен риск за разпространението на резистентност сред обитаващи организма патогенни бактерии, а чрез хранителната верига резистентните щамове могат да се трансферират и при хората. Прекомерната употреба на различни АМС, е причина за развитие в микроорганизмите на допълнителни видове механизми на устойчивост към АМС, водещи и до мултирезистентност (MDR). Едни от най-значимите мултирезистентни микроорганизми, които се срещат в момента, са *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, носещи  $\beta$ -лактамази с разширен спектър (ESBL), резистентните към ванкомицин ентерококи (VRE), метицилин-резистентните *Staphylococcus aureus* (MRSA), резистентни на ванкомицин MRSA и *Mycobacterium tuberculosis*, характеризиращи се с широка лекарствена резистентност (XDR).

В зависимост от специфичните им структури и мишени за въздействие в бактериалната клетка АМС могат да бъдат разглеждани като средства, инхибиращи различни процеси, протичащи в бактериалните клетки. За различните АМС са описани механизмите на въздействието им и

механизмите на резистентност. В раздел литературен обзор са отразени общите механизми на действие на АМС и механизми на резистентност на микроорганизмите. Механизмите на действие на АМС могат да бъдат осъществени чрез инхибиране на синтеза на клетъчната стена, протеиновата синтеза, синтеза на нуклеиновите киселини, дезорганизиране на клетъчните мембрани и други метаболитни пътища. Описани са последователно различните класове АМС как действат и какво инхибират. Механизмите на резистентност могат да бъдат вродени и придобити. Основните механизми на резистентност към антибактериалните средства са свързани с намален импорт, модифициране и инактивиране на таргетните структури в бактериалната клетка и въздействие върху активния ефлукс.

Развитието и обmena на генетични фактори, определящи резистентността към АМС, изолирани от резидентните чревни бактерии при стопанските птици, както и сред чревните бактерии, контаминиращи птичите продукти, са комплексен феномен, предизвикан от различни фактори с биотичен и абиотичен характер. В тази връзка може да се каже, че усилията, свързани с ограничаване на възможностите за разпространение на тези генетични детерминанти, се отнасят до осъществяването на координация на процесите в мулти-дисциплинарен аспект. От една страна, тези аспекти засягат развитието на нови АМС, а от друга страна, се отнасят до развитието и употребата на алтернативни продукти. Подходите в управлението на системата и усилията, свързани с употребата на по-малко количества АМС за превенция на инфекциозните заболявания в интензивния животновъден сектор представляват част от тази мултидисциплинарна система.

Освен широката употреба на АМС и някои други лекарствени средства, съдържащи метали, като тези съдържащи цинк, е причина за селективен натиск и създаване възможности за експресиране и развитие на

механизмите на ко-резистентност и на кръстосана резистентност. Друга, не по-малко важна причина са вертикалния и псевдовертикален пренос на генетичните фактори. Други важни фактори, влияещи върху възможностите за разпространение на гените, определящи резистентност към АМС, са системите за биобезопасност, употребата на измиващи и дезинфектиращи средства, които също могат да провокират ко-селективен пренос на генетични платформи. Може да се обобщи, че развитието и разпространението на резистентността към АМС при резидентните колибактерии са резултат от разнообразни фактори, като селективния натиск от употребата на тези средства при стопанските животни, в това число и при стопанските птици, и въздействието на АМС върху процесите специфичните резистентни клонове, а така също разпространението на характерните генетични елементи, като плазмидите чиито гени, определят резистентността към АМС. От така представения литературен обзор се вижда, че докторантката е запозната със световната литература по проблема за антимикробната резистентност (АМР) и правилно интерпретира данните представени от чужди автори. Използвани са много автори, поради факта, че АМР е със сравнително нова история и проучванията върху нея е от голям интерес. Обзорът е структуриран правилно, като умело са синтезирани и описани най-важните начини за постигане на АМР от коли бактериите.

От така анализирани данни произлизат и поставените цели и задачи в дисертационния труд, а именно: *Да се направи проучване, анализ и оценка на някои фенотипни и генотипни характеристики на резистентността към АМС коменсални коли бактерии, изолирани от различни видове стопански птици и от торова постеля.* За постигането на целта са заложили и съответните задачи, отнасящи се до: 1. Да се създаде сбирка от коменсални коли бактерии, изолирани от различни видове стопански птици. 2. Да се извърши фенотипен анализ на коменсални коли бактерии, изолирани от различни видове стопански птици и от торова

постеля за установяване на резистентността към: бета-лактамни АМС, гентамицин, тетрациклин и ципрофлоксацин. 3. Да се направи генотипен анализ на резистентността към някои групи АМС при коменсални коли бактерии, изолирани от различни видове стопански птици и от торова постеля. Заложено е проучване върху разпространението на ген bla CTX-M-1, определящ продукцията на бета-лактамази с разширен спектър на действие (ESBL), на гените tetA и tetB, детерминиращи ефлуксни помпи, при резистентните към тетрациклин коли бактерии, на плазмидно-детерминираните гени qnrS, qnrA и qnrB-1 при резистентните към ципрофлоксацин коли бактерии.

Считам, че целите и задачите са правилно поставени, което гарантира получаването и на коректни резултати.

В раздел Материали и методи дисертантката описва изолирането и идентифицирането на коли бактериите за двугодишен период, от януари 2020 г. до декември 2021 г. Описани са стопанствата, от които са изолирани коменсалните коли бактерии. Клоакалните тампон проби са получени от различни видове стопански птици: бройлери, кокошки носачки, родители за бройлери, пуйки и стопански патици. АМС в различните стопанства се използват по различен начин, или с терапевтична цел, или за адаптиране на подрастващите птици. Изследвани са общо 619 броя клоакални тампонни проби от здрави птици и 12 проби от торова постеля. Общият брой коли щамове, изолирани от различните категории птици и стопанства са 505. За култивиране на тампон пробите за изолиране и идентифициране на чистите бактериални култури са използвани различни хранителни среди. Проведени са редица микробиологични тестове: за индол и подвижност, за утилизиране на цитрата в Симонс цитрат агар, тест с метилрот, тест на Фогес Проскауер, използване на полуавтоматичната система CRYSTAL (Becton Dickenson, USA). Определянето на резистентността към проучваните АМС на изолираните коменсални коли бактерии е проведено чрез фенотипни и

генетични методи. От фенотипните методи са използвани диск - дифузионния метод и метода за определяне на минималните инхибиторни концентрации - МИС, чрез техниките на микро/макро - разреждания в бульон и Е - тест. От генетичните методи за определяне на някои генетични особености, детерминиращи резистентност към цефалоспорините от трета генерация, тетрациклините и флуорираните хинолони е използвана полимеразно верижна реакция с TaqMan хидролитични сонди. Генетичният анализ на резистентните коли щамове е извършен за установяване на някои генетични платформи, определящи резистентността към цефотаксим и цефтазидим, като гените, отговорни за бета лактами bla CTX-M-1, плазмидно-детерминираните гени, определящи резистентността към флуорираните хинолони, qnrS, qnrA и qnrB и гените, които определят резистентност към тетрациклиновите антибиотици, tet A и tet B. Статистическата обработка на данните е извършена с програма GraphPad.

В раздел Резултати първоначално са дадени данни за разпространението на резистентността към изследваните АМС сред коменсалните коли бактерии, изолирани от бройлери и кокошки носачки. От две стопанства Градус и Пилко са изолирани общо 145 коли щамове. В стопанството в с. Цалапица от 100 клоакални проби от кокошки са изолирани общо 76 коли щамове. При проучване на фенотипните профили на резистентността към изследваните АМС при коменсалните коли бактерии, изолирани от бройлери и кокошки носачки от двете стопанства, е установена резистентност по отношение на ципрофлоксацин (68.3%), тетрациклин (66.9%) и резистентност към ампицилин (53.8%) и към комбинацията амоксицилин/клавуланова киселина (44.1%). При проучване на генотипните профили на коли бактериите, изолирани от бройлери и кокошки – носачки, от изследваните 221 коли щамове, при осем от резистентните щамове (5.5%) към аминопеницилините и цефалоспорините е наблюдавано наличие на ген bla CTX-M-1. При проучване на

резистентността на коли бактериите, изолирани от родителски стада за бройлери, са изследвани 123 клоакални проби от родители за бройлери и са изолирани общо 101 коли щама. Най-висок процент на резистентни коли бактерии, изолирани от родители за бройлери, е определен към тетрациклин (61.4%) и към цiproфлoксацин (58.4%). При четири от резистентните щамове към аминопеницилините и цефалоспорините (3.9%) е наблюдавано наличие на ген bla CTX-M-1. При 55 от щамовете е установен ген qnrS. При 56 от щамовете, резистентни към тетрациклин (55.4%), е установено присъствие на ген tetA, а при шест щама (5.9%) е наблюдавано присъствие и на ген tetB. От стопански патици и пуйки са получени 110 клоакални тампонни. При изследванията на фенотипните профили на колибактерии, изолирани от патици, е установена резистентност към ампицилин, тетрациклин и цiproфлoксацин. При коли бактериите, изолирани от пуйки, е установена резистентност към тетрациклин (71.8%) и ампицилин (70.5%), като по-високи стойности са определени при изолатите от пуйчета на 9-дневна възраст (73.5%), в сравнение с нивата на резистентност, установени при щамовете, изолирани от 12-месечни пуйки. При изследване на генотипните профили на коли бактериите, изолирани от водоплаващи птици и от пуйки, е установен полирезистентен профил, към ампицилин, тетрациклин и цiproфлoксацин, а при водоплаващи птици - към тетрациклин и цiproфлoксацин. При 12 проби от торовата постеля, шест от които от стопанство за отглеждане на бройлери и шест от торовата постеля на стопанство за отглеждане на пуйки, са изолирани 12 коли щама. При изследване на фенотипните им профили при бройлерите най-висока резистентност има към аминопеницилини, тетрациклин и цiproфлoксацина. При щамовете, изолирани от торова постеля, в стопанството за отглеждане на пуйки най-висока резистентност има към тетрациклин (71.8%), след това към ампицилин (70.5%) и към цiproфлoксацин (58.9%). Генотипните профили на резистентността към

изследваните антимикробни средства срещу коли бактериите, от изследваните 12 щама, изолирани от торова постеля, при пет от резистентните щамове към аминопеницилините и цефалоспорините (41.6%) е наблюдавано наличие на ген blaCTX-M-1. При 8 от резистентните към ципрофлоксацин щамове, е наблюдавано разпространение на ген qnrS. При един от коли щамовете, резистентни към ципрофлоксацин, е установено наличие и на ген qnrB1. При 9 от колищамовете, експресиращи резистентност към тетрациклин (75.0%), е установен ген tetA, респективно при два щама (16.7%) е наблюдавано присъствие и на ген tetB.

В раздел Дискусия са обсъдени резултатите от проучванията на дисертантката и получените данни са сравнени с данните на други автори, работили по проблемите с резистентността на бактериите към АМС. От дискусията се вижда, че тя познава световната литература и интерпретира правилно данните, получени от нея. В раздел Изводи има посочени 7 извода. Считаю, че изводите напълно отговарят на получените резултати. Приемаю приносите с тази уговорка, че приносите не може да са потвърдителни, или са оригинални или не са приноси. Може би е правилно приноси с практическо значение и приноси с научно значение. Приемаю четирите препоръки, които са направени за практиката. Представен е списък на публикациите, свързани с дисертационния труд. Дисертантката има 3 съобщения в научни списания и 3 участия в международни научни конференции, с което отговаря на ЗРАСРБ, Правилника за приложението му и критериите, възприети от ВМФ на ТРУ гр. Ст. Загора.

Бележки и въпроси към докторантката:

В дисертационния труд не видях освен един да са цитирани и други български автори, работили по проблема за АМР. Бележките които бяха дадени от мен на предварителното представяне на дисертационния труд са отстранени напълно от окончателния вариант на дисертацията.

**Заключение:** Представеният ми за становище дисертационен труд от Радостина Димитрова Стефанова за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по научна специалност “Ветеринарна микробиология” на тема: „Фенотипни и генотипни проучвания върху резистентността към антимикробните средства при щамове *Escherichia coli*, изолирани от кокошеви и водоплаващи птици“ представлява завършено изследване на един актуален за ветеринарно медицинската наука и практика проблем, а именно антибиотичната резистентност на колибактериите изолирани от птици. Извършена е огромна работа по изолацията, идентификацията и определянето на антибиотичната резистентност на голям брой изолати колибактерии с класически бактериологични и молекулярно биологични методи. Трудът има отношение към геномното доказване на гени, свързани с резистентността на коли бактерияте, което е от значение както за ветеринарно медицинската наука и практика, така и за общественото здраве. Поставените цели и задачи в дисертацията са изпълнени успешно, което се вижда и от получените резултати. Смятам, че дисертационният труд изпълнява критериите на ЗРАСРБ и правилника на ВМФ към ТРУ гр. Ст. Загора и му давам положителна рецензия.

Проф. Р.Пешев, д.н.

А Ё ЁА  
А

София

15.12.2025 г.



## REVIEW

On the dissertation on the topic: Phenotypic and genotypic studies on the resistance to antimicrobial agents in E. coli strains isolated from poultry and waterfowl for obtaining the educational and scientific degree "Doctor", field of higher education 6. "Agrarian Sciences and Veterinary Medicine", professional field "Veterinary Medicine"

Author of the dissertation: Dr. Radostina Dimitrova Stefanova, PhD student full-time, in the Department of "Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases", Section "Veterinary Microbiology" at the Faculty of Veterinary Medicine at the Thracian University (TRU) in the city of 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. The dissertation is written on 148 pages and includes: Literature review, Own research, Materials and methods, Aim and objectives of the study, Results, Discussion, Conclusion, Contributions, Conclusions, Recommendations for practice, References. The dissertation is illustrated with 21 tables and 21 figures. The literature sources used are 580, of which one is in Bulgarian, and the rest are in Latin.

Reviewer: Prof. Rayko Dimitrov Peshev, D.S, National Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute, Sofia, Higher Education Area 6. "Agrarian Sciences and Veterinary Medicine", professional field 6.4. "Veterinary Medicine", scientific specialty "Epidemiology, Infectious Diseases and Prevention of Contagious Diseases in Animals", designated as a member of the scientific jury with order. No. 4084/24.10.2025 of the Rector of the University of Veterinary Medicine.

Autobiographical data of the doctoral student:

Dr. Radostina Dimitrova Stefanova was born on 01.05.1994. She completed her secondary education in 2013 in "Yordan Yovkov" school, the city Tutrakan. She completed her higher education in 2018 at the University of Veterinary Medicine, the city of Stara Zagora, as a Master of Veterinary Medicine. From 2019 to 2022 she is a full-time doctoral student in the doctoral program "Veterinary Microbiology" at the University of Veterinary Medicine, the city of Stara Zagora. From 2013 to 2021 she attended 9 courses to improve her qualifications. In 2020 she participated in 6 Online seminars related to molecular and immunological methods in biological sciences, conducted by the company MERCK.

In recent years, antimicrobial resistance (AMR) has become increasingly important for public health. The literature review section consistently reflects data on the use of AMR in poultry farming and the spread of resistance in *Escherichia coli* due to their use. Official data presented by various European institutions shows that over the past 20-30 years, the quantities of antimicrobials (AM) used in livestock farming have increased from 640 tons in 2010 to 1052.1 tons in 2030. This was precisely the reason why the World Health Organization (WHO) and the World Organization for Animal Health (WOAH) in 2019 presented an action plan to optimize the use of antimicrobials in medicine and veterinary medicine, as well as to introduce standards for monitoring their use. WOAH defines AM for use in veterinary medicine (VCIA) as "critically important" cephalosporins of the 3rd and 4th generations, fluorinated quinolones and polymyxins. These are AM, which are strategic and resistance to them will lead to major problems in the treatment of bacterial infections in humans and animals. The huge amounts of AM, which are used in animal husbandry, are also the reason for the development of resistance of bacteria to them.

The issue related to the data on the amount of AM used in poultry farming is not sufficiently clarified. Data on the use of AM and the development of resistance in *coli* bacteria isolated from broilers and poultry meat for individual

regions in the world are diverse. In 2006, the use of AM, stimulating the growth of farm animals, was banned in the EU and now AM are used at the population level for therapy and metaphylaxis of bacterial diseases. The use of antibiotics in poultry farming creates an opportunity to achieve good economic indicators, but also poses a huge risk for the spread of resistance among pathogenic bacteria inhabiting the body, and through the food chain resistant strains can also be transferred to humans. The excessive use of various AM is the reason for the development of additional types of resistance mechanisms to AM in microorganisms, leading to multidrug resistance (MDR). Some of the most significant multidrug-resistant microorganisms that are currently encountered are *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL), vancomycin-resistant enterococci (VRE), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant (VRSA) and *Mycobacterium tuberculosis*, characterized by broad drug resistance (XDR).

Depending on their specific structures and targets for action in the bacterial cell, AM can be considered as agents that inhibit various processes occurring in bacterial cells. The mechanisms of their action and mechanisms of resistance are described for different AM. The literature review section reflects the general mechanisms of action of AM and mechanisms of resistance of microorganisms. The mechanisms of action of AM can be carried out by inhibiting cell wall synthesis, protein synthesis, nucleic acid synthesis, disorganization of cell membranes and other metabolic pathways. The different classes of AM are described sequentially, how they act and what they inhibit. The mechanisms of resistance can be innate and acquired. The main mechanisms of resistance to antibacterial agents are associated with reduced import, modification and inactivation of target structures in the bacterial cell and impact on active efflux.

The development and exchange of genetic factors determining resistance to AM isolated from resident intestinal bacteria in poultry, as well as among

intestinal bacteria contaminating poultry products, is a complex phenomenon caused by various factors of biotic and abiotic nature. In this regard, it can be said that efforts related to limiting the possibilities for the spread of these genetic determinants relate to the implementation of coordination of processes in a multidisciplinary aspect. On the one hand, these aspects concern the development of new AM, and on the other hand, they relate to the development and use of alternative products. Approaches to system management and efforts related to the use of smaller amounts of AM for the prevention of infectious diseases in the intensive livestock sector are part of this multidisciplinary system. In addition to the widespread use of AM, some other drugs containing metals, such as those containing zinc, are a cause of selective pressure and create opportunities for the expression and development of mechanisms of co-resistance and cross-resistance.

Another, no less important reason is the vertical and pseudo-vertical transfer of genetic factors. Other important factors influencing the possibilities for the spread of genes determining resistance to AM are biosafety systems, the use of washing and disinfectants, which can also provoke co-selective transfer of genetic platforms. It can be summarized that the development and spread of resistance to AM in resident coliform bacteria are the result of various factors, such as the selective pressure from the use of these agents in farm animals, including poultry, and the impact of AM on the processes of specific resistant clones, as well as the spread of characteristic genetic elements, such as plasmids whose genes determine resistance to AM. From the literature review presented in this way, it is clear that the doctoral student is familiar with the world literature on the problem of AMR and correctly interprets the data presented by foreign authors. Many authors have been used, due to the fact that AMR has a relatively new history and research on it is of great interest. The review is structured correctly, as the most important ways to achieve AMR from coli bacteria have been skillfully synthesized and described.

The goals and objectives set in the dissertation work derive from the data analyzed in this way, namely: To conduct a study, analysis and evaluation of some phenotypic and genotypic characteristics of resistance to AM in commensal coli bacteria isolated from different types of farm poultry and from manure litter. To achieve the goal, the corresponding tasks have also been set, relating to: 1. To create a collection of commensal coli bacteria isolated from different types of farm poultry. 2. To perform a phenotypic analysis of commensal coli bacteria isolated from different types of farm poultry and from manure litter to establish resistance to: beta-lactam AM, gentamicin, tetracycline and ciprofloxacin. 3. To perform a genotypic analysis of resistance to some AM groups in commensal coli bacteria isolated from different types of poultry and from manure litter. A study is planned on the distribution of the bla CTX-M-1 gene, determining the production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), of the tetA and tetB genes, determining efflux pumps, in tetracycline-resistant coli bacteria, of the plasmid-determined genes qnrS, qnrA and qnrB-1 in ciprofloxacin-resistant coli bacteria. antimicrobial agents against coli bacteria, of the 12 strains isolated from manure litter, the presence of the blaCTX-M-1 gene was observed in five of the strains resistant to aminopenicillins and cephalosporins (41.6%). In 8 of the strains resistant to ciprofloxacin, the presence of the qnrS gene was observed. In one of the coli strains resistant to ciprofloxacin, the presence of the qnrB1 gene was also found. In 9 of the coli strains expressing resistance to tetracycline (75.0%), the tetA gene was found, and in two strains (16.7%), the presence of the tetB gene was also observed.

In the Discussion section, the results of the dissertation's studies are discussed and the data obtained are compared with the data of other authors who have worked on the problems of bacterial resistance to AM. The discussion shows that she knows the world literature and correctly interprets the data obtained from it. In the Conclusions section, there are 7 conclusions. I believe that the conclusions fully correspond to the results obtained. I accept the contributions

with the proviso that the contributions cannot be confirmatory, because confirming the results from other authors are not contributions. Perhaps it is correct to divide contributions with practical significance and contributions with scientific significance. I accept the four recommendations that have been made for practice. A list of publications related to the dissertation work is presented. The dissertation candidate has 3 communications in scientific journals and 3 participations in international scientific conferences, thereby complying with the Academic Staff Development Act, the Regulations for its application and the criteria adopted in the TRU of St. Zagora.

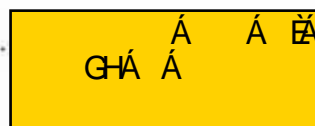
Notes and questions to the doctoral student:

In the dissertation work, I did not see any other Bulgarian authors who worked on the problem of AMR, except for one. The notes that were given by me at the preliminary presentation of the dissertation have been completely removed from the final version of the dissertation.

**Conclusion:** The dissertation work presented to me for review by Radostina Dimitrova Stefanova for the award of the educational and scientific degree "Doctor" in the scientific specialty "Veterinary Microbiology" on the topic: "Phenotypic and genotypic studies on the resistance to antimicrobial agents in *Escherichia coli* strains isolated from poultry and waterfowl" represents a completed study of a topical problem for veterinary medical science and practice, namely the antibiotic resistance of colibacteria isolated from birds. A huge amount of work has been done on the isolation, identification and determination of the antibiotic resistance of a large number of colibacteria isolates with classical bacteriological and molecular biological methods. The work is related to the genomic proof of genes associated with the resistance of colibacteria, which is important both for veterinary medical science and practice, and for public health. The goals and objectives set in the dissertation have been successfully met, which is also evident from the results obtained. I believe that the dissertation meets the

criteria of the Academic Staff Development act and the regulation of TRU at city Stara Zagora and I give it a positive review,

Prof. R. Peshev, D.S.



Sofia

15.12.2025