



СТАНОВИЩЕ

От: **доц. Люба Динева Митева, дб**

област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика;

професионално направление: 4.3. Биологически науки

научна специалност: Молекулярна биология

към катедра „Молекулярна биология, Имунология и медицинска генетика“, Медицински факултет, Тракийски университет, гр. Стара Загора

e-mail: lyuba.miteva@trakia-uni.bg

член на научно жури съгласно заповед № 4084/24.10.2025 на Ректора на Тракийски университет

Относно: **дисертационен труд за присъждане на образователно научна степен „Доктор“**

Професионално направление: 6.4 Ветеринарна медицина

Област на висше образование: 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина

докторска програма „Ветеринарна микробиология“

Автор: Радостина Димитрова Стефанова

Тема: Фенотипни и генотипни проучвания върху резистентността към антимикробните средства при шамове *Escherichia coli*, изолирани от кокошеви и водоплаващи птици

Катедра: Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести, Ветеринарномедицински факултет, Тракийски университет

Научен ръководител: проф. дн Валентина Урумова

1. Биографични данни за кандидата

Радостина Димитрова Стефанова е родена през 1994г., завършила средното си образование СУ "Йордан Йовков", гр. Тутракан. В периода от 2013-2018г. изучава и придобива магистърска степен по Ветеринарна Медицина във Ветеринарномедицински факултет, Тракийски Университет, гр. Стара Загора със среден успех от държавни изпити Отличен 5.50. От 2019г. е зачислена в докторантура, редовна форма на обучение по докторска програма „Ветеринарна микробиология“, Професионално направление: 6.4 Ветеринарна медицина, Област на висше образование: 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина към Ветеринарномедицински факултет, Тракийски университет, гр. Стара Загора. В хода на своето обучение, докторантът е преминал редица курсове за придобиване и усъвършенстване на езикови умения, статистически анализ на данни, специфични лабораторни анализи, академично писане и др. През 2022г. след изпълнение на поставените задачи по индивидуален учебен план, Радостина Димитрова Стефанова е отчислена с право на защита със Заповед № 882/31.03.2022г. на Ректора на Тракийски университет, гр. Стара Загора.

2. Структура, актуалност и съдържание на дисертационния труд

Дисертационният труд с автор Радостина Димитрова Стефанова е представен във вид и обем, съответстващ на изискванията на ЗРАСРБ и ПРАСТрУ и съдържа: заглавна страница, съдържание, използвани съкращения, литературен обзор, цел и задачи, материал и методи, резултати, дискусия, заключение, изводи, приноси, препоръки за практиката и библиография.

Дисертационният труд обхваща 149 страници и е онагледен с 21 фигури и 21 таблици. Използвани са внушителен брой - 580 литературни източника, включително данни и доклади от Европейски агенции и органи за контрол и превенция.

Дисертационният труд разглежда един изключително актуален и значим за ветеринарната медицина и общественото здраве проблем – развитието и разпространението на антимикробна резистентност при коменсални щамове *Escherichia coli* от птицевъдството. Темата е в пълно съответствие с приоритетните изследователски направления на Европейския съюз и Световната здравна организация в областта на т.нар. „One Health“ подход, при който здравето на животните, хората и околната среда са тясно взаимосвързани.

Литературният обзор е написан подробно и изчерпателно, като е използван много добър научен стил и демонстрира отлична осведоменост по темата, включително международни регулации, стратегии и насоки за ограничаване на антибиотична резистентност. Разгледани са различните механизми използвани от прокариотите и в частност от коли бактериите определящи резистентността им към различни антимикробните средства, включително бета-лактамазите, хинолоните, тетрациклините. Обърнато е специално внимание да наличните данни за нивото на разпространение на резистентността към антимикробни средства сред колищамовете в световен мащаб, с фокус върху коменсалните коли бактерии при бройлери, пуйки и други стопански птици. Логично продължение на литературния обзор е изведена **целта на дисертационния труд**, а именно *„Да се направи проучване, анализ и оценка на някои фенотипни и генотипни характеристики на резистентността към антимикробни средства при коменсални коли бактерии, изолирани от различни видове стопански птици и от торова постеля“* за постигането на която са поставени ясно и точно формулирани общо 3 главни задачи и 8 подзадачи.

В следващия раздел **„Материали и Методи“** докторанта представя информация за произхода, категории птици от които са изолирани коли щамовете и последователно са представени използваните класически и съвременни микробиологични и молекулярни подходи за анализ. За целите на проучването са събрани проби от различни видове стопански птици, отглеждани в общо 8 стопанства от Южна и Североизточна България, от които са получени общо 619 броя клоакални тампонни проби от здрави птици и 12 проби от торова постеля. Изолирани са общо 505 бр. колищамове. Описани са подробно култивационните методи, методи за идентификация на колонииите, методи за определяне на резистентност/чувствителност към седем антибактериални средства и анализ на резистентните щамове за наличието на 6 таргетни гени, детерминиращи резистентност към цефалоспориините, тетрациклините и флуорираните хинолони.

В разделът **„Резултати“** са представени получените собствени данни относно разпространение на резистентността към изследваните антимикробни средства сред коменсалните коли бактерии. Направен е задълбочен сравнителен анализ между различни стопанства и в зависимост от вид на стопански птици. Изследвано е разпространението на

резистентност сред изолираните щамове *E. coli*, определени са минималните инхибиторни концентрации (MIC) на аминопеницилини, тетрациклин и цiproфлoксацин, както и наличието на гени детерминиращи резистентност към антимикробни средства чрез TaqMan базиран qPCR. Най-висок процент на резистентност е установен към тетрациклин и ампицилин при щамове от изолирани от патици. Широко разпространена е и резистентността към цiproфлoксацин при щамове *E. coli* изолирани от кокошки-носачки. По отношение на разпространението на гените, определящи резистентност към тетрациклин, е установено доминиращо присъствие на *tetA* ген при коли бактериите, изолирани от стопански патици, пуйки и от торова постеля. Докладвано е широко разпространение на ген *qnrS* сред коли щамове, изолирани от бройлери, родители за бройлери и кокошки-носачки. Не са установени гените *qnrA* и *qnrB1*, определящи плазмидно-медираната резистентност към флуорираните хинолони при щамове коли бактерии изолирани от бройлери и от кокошки-носачки.

Резултатите са представени ясно и логично в четири раздела в зависимост от вида стопански птици, следвайки обща схема с използване на таблици и фигури, което не само улеснява тяхното разбиране, но и представя аналитичната мисъл на автора.

Разделът „Дискусия“ следва последователността на получените резултати и показва възможности на докторанта за подбор и интерпретация на релевантна научна литература и данни, за интерпретация и дискусия на получените данни. Поставен е акцент върху сравнително високия процент резистентност към тетрациклините и цiproфлoксацина при коменсални коли бактерии, разглеждан в контекста на по-широката употреба на тези антибиотици във ветеринарномедицинската практика. Обърнато е внимание към установения полирезистентен профил на коли щамове изолирани от стопански птици и торова постеля.

Въз основа на проведените изследвания, получените резултати и анализ на данните са формулирани общо 7 извода, 4 приноси на своя дисертационен труд, от които 2 са категоризирани като оригинални, и са отправени 4 препоръки към практиката.

3. Наукометричните критерии

Резултатите от проведеното проучване във връзка с дисертационния труд са публикувани в **3 пълнотекстови научни публикации** в реферирани в Scopus списания с SJR и са представени на три научни форума. С това докторанта изпълнява изискванията за придобиване на ОНС „Доктор“.

4. Автореферат

Представеният автореферат от 48 стр. коректно отразява основното съдържание на дисертационния труд.

5. Заключение

Представеният дисертационен труд с автор **Радостина Димитрова Стефанова** е посветен на актуална тематика в унисон с национални, европейски и световни стратегии и програми по отношение на употребата на антимикробните средства в животновъдството и ветеринарната медицина. Изпълнени са поставените цел и задачи, получените собствени резултати са обсъдени логично и е коректно, формулирани са основни изводи и приноси. Структурата, съдържанието и качествата на дисертационен труд отговарят на изискванията за оформяне на дисертационен труд и отразяват уменията на докторанта да

обобщава научна информация, да провежда експериментална работа и да анализира своите резултати

Въз основа на гореизложеното давам своето **положително становище** на настоящия дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ и убедено предлагам на уважаемите членове на научното жури също да гласуват положително за **присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ на Радостина Димитрова Стефанова по научна специалност „Ветеринарна микробиология“, професионално направление 6.4 Ветеринарна медицина, област на висшето образование 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина.**

гр Стара Загора

12.12.2025 г.

Подпис:

А А А
А А А

доц. Люба Митева, дб



STATEMENT

By: **assoc. prof Lyuba Dineva Miteva, PhD**

Higher Education Field: 4. Natural sciences, mathematics and informatics,

Professional Field: 4.3. Biological Sciences,

Scientific Specialty: Molecular biology

Department of Molecular biology, Immunology and medical genetics

Medical Faculty, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria

e-mail: lyuba.miteva@trakia-uni.bg

Member of the Scientific Jury pursuant to Order No. 4084/24.10.2025 of the Rector of Trakia University

Regarding: **Thesis for Awarding the Educational and Scientific Degree "PhD"**

Professional Field: 6.4 Veterinary Medicine

Higher Education Field: 6. Agricultural Sciences and Veterinary Medicine

Scientific specialty: "Veterinary Microbiology"

Author: Radostina Dimitrova Stefanova

Title: Phenotypic and Genotypic Studies on Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Strains Isolated from Chickens and Waterfowl

Department: Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases,

Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University

Scientific Supervisor: Prof. D.Sc. Valentina Urumova

1. Biographical Data of the Candidate

Radostina Dimitrova Stefanova was born in 1994, and completed her secondary education at "Yordan Yovkov" High School, Tutrakan. From 2013–2018, she studied and obtained a Master's degree in Veterinary Medicine at the Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora, graduating with an excellent average grade of 5.50 from state examinations. Since 2019, she has been enrolled in full-time PhD studies in the PhD Program "Veterinary Microbiology," Professional Field: 6.4 Veterinary Medicine, Higher Education Field: 6. Agrarian Sciences and Veterinary Medicine, at the Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora. During her studies, the PhD student attended several courses for acquiring and improving language skills, statistical data analysis, specific laboratory analyses, academic writing, etc. In 2022, upon completing the tasks set out in her individual curriculum, Radostina Dimitrova Stefanova was deregistered with the right to defense, in accordance with Order No. 882/31.03.2022 of the Rector of Trakia University, Stara Zagora.

2. Structure, Relevance, and Content of the PhD Thesis

The PhD thesis, authored by Radostina Dimitrova Stefanova, is presented in a format and volume compliant with the requirements of the ZRASRB and PRASTrU (national and university regulations). It includes: title page, table of contents, abbreviations used, literature review, aim

and objectives, material and methods, results, discussion, conclusion, findings, contributions, recommendations for practice, and bibliography. The PhD thesis covers 149 pages and is illustrated with 21 figures and 21 tables. An impressive number of 580 literature sources were used, including data and reports from European agencies for control and prevention.

The PhD thesis addresses an extremely **topical and significant problem** for veterinary medicine and public health: the development and spread of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains from poultry farming. The topic is in full compliance with the priority research areas of the European Union and the World Health Organization, particularly in the field of the so-called "One Health" approach, where the health of animals, humans, and the environment are closely interconnected.

The Literature Review is written in detail and comprehensively, employing a very good scientific style and demonstrating excellent awareness of the topic, including international regulations, strategies, and guidelines for limiting antibiotic resistance. It examines various mechanisms used by prokaryotes, and specifically by *E. coli* bacteria, determining their resistance to different antimicrobial agents, including beta-lactamases, quinolones, and tetracyclines. Special attention is paid to the available data on the global prevalence of antimicrobial resistance among *E. coli* strains, focusing on commensal *E. coli* bacteria in broilers, turkeys, and other farm poultry.

The aim of the dissertation thesis is logically derived from the literature review, namely: "To conduct a study, analysis, and assessment of some phenotypic and genotypic characteristics of antimicrobial resistance in commensal *E. coli* bacteria isolated from various types of farm poultry and litter". To achieve this, a total of 3 main objectives and 8 sub-objectives are clearly and precisely formulated.

In the section "**Materials and Methods**," the PhD student presents information regarding the origin and categories of birds from which the *E. coli* strains were isolated, and subsequently presents the classical and modern microbiological and molecular approaches used for analysis. For the purposes of the study, samples were collected from various types of farm poultry raised in a total of 8 farms in Southern and Northeastern Bulgaria, yielding a total of 619 cloacal swab samples from healthy birds and 12 litter samples. A total of 505 *E. coli* strains were isolated. Cultivation methods, colony identification methods, methods for determining resistance/susceptibility to seven antibacterial agents, and analysis of resistant strains for the presence of 6 target genes determining resistance to cephalosporins, tetracyclines, and fluorinated quinolones are described in detail.

In the "**Results**" section, the original data obtained regarding the prevalence of resistance to the investigated antimicrobial agents among commensal *E. coli* bacteria are presented. An in-depth comparative analysis was conducted between different farms and depending on the type of farm poultry. The prevalence of resistance among the isolated *E. coli* strains was investigated, the minimal inhibitory concentrations (MICs) of aminopenicillins, tetracycline, and ciprofloxacin were determined, as well as the presence of genes determining antimicrobial resistance using TaqMan-based qPCR.

The highest percentage of resistance was found towards tetracycline and ampicillin in strains isolated from ducks. Resistance to ciprofloxacin was also widespread in *E. coli* strains isolated from laying hens. Regarding the prevalence of genes determining tetracycline resistance, a dominant presence of the *tetA* gene was found in *E. coli* bacteria isolated from farm ducks, turkeys, and litter. A widespread prevalence of the *qnrS* gene was reported among *E. coli* strains isolated from broilers, broiler breeders, and laying hens. The *qnrA* and *qnrB1* genes, which

determine plasmid-mediated resistance to fluorinated quinolones, were not found in *E. coli* strains isolated from broilers and laying hens.

The results are presented clearly and logically in four sections, depending on the type of farm poultry, following a general scheme utilizing tables and figures, which not only facilitates their understanding but also demonstrates the analytical thinking of the author.

The "**Discussion**" section follows the sequence of the obtained results and showcases the PhD student's ability to select and interpret relevant scientific literature and data. Emphasis is placed on the relatively high percentage of resistance to tetracyclines and ciprofloxacin in commensal *E. coli* bacteria, discussed in the context of the broader use of these antibiotics in veterinary practice. Attention is drawn to the established multi-resistant profile of *E. coli* strains isolated from farm poultry and litter.

Based on the conducted research, the results obtained, and the data analysis, a total of 7 conclusions, 4 contributions of the dissertation thesis (2 of which are categorized as original), and 4 recommendations for practice are formulated.

3. Scientific papers and activities

The results of the study conducted in connection with the PhD thesis have been published in **3 full-text scientific publications** in Scopus-indexed journals with an SJR (SCImago Journal Rank) and were presented at three scientific forums. Thus, the PhD student fulfills the requirements for obtaining the Educational and Scientific Degree "PhD".

4. Abstract

The presented abstract (48 pages) accurately reflects the main content of the PhD thesis.

5. Conclusion

The presented PhD thesis, authored by **Radostina Dimitrova Stefanova**, is dedicated to a topical subject, consistent with national, European, and global strategies and programs concerning the use of antimicrobial agents in animal husbandry and veterinary medicine. The set aim and objectives have been fulfilled, the obtained original results are discussed logically and correctly, and fundamental conclusions and contributions are formulated. The structure, content, and qualities of the PhD thesis meet the requirements and reflect the PhD student's skills in summarizing scientific information, conducting experimental work, and analyzing her results.

Based on the above, I give my **positive opinion** on the current PhD thesis for obtaining the educational and scientific degree "PhD". I confidently propose that the esteemed members of the scientific jury also vote positively **for the award of the educational and scientific degree "PhD" to Radostina Dimitrova Stefanova in the scientific specialty "Veterinary Microbiology," professional field 6.4 Veterinary Medicine, higher education field 6. Agricultural Sciences and Veterinary Medicine.**

Stara Zagora
December 12, 2025

Signature: 
Assoc. Prof. Lyuba Miteva, PhD