

РЕЦЕНЗИЯ

Върху дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен „Доктор” по научна специалност «Ветеринарна Микробиология», област на висше образование 6.0 Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина.

Автор на дисертационния труд: асистент Марияна Петрова Николова, Тракийски университет, гр. Стара Загора

Тема на дисертационния труд: „Проучване на видовия състав и чувствителността към антимикробни средства при бактериен шамов, изолирани от говеда с клиничен и субклиничен мастит“

Рецензент: проф. д.н. Теодора Петрова Попова, Лесотехнически университет, гр. София, област на висше образование „Аграрни науки и ветеринарна медицина“, професионално направление: 6.4. Ветеринарна медицина, научна специалност “Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на заразните заболявания по животните”, определена за член на Научното жури със Заповед №3252/25.09.2023 г. на Ректора на Тракийски университет.

• Кратко представяне на кандидата.

Марияна Петрова Николова е завършила полувисше образование през 1997 г. в Медицински колеж „Мара Малеева“, гр. Пловдив със специалност „Медицинска сестра“ и висше образование през 2004 г. в Тракийски университет (ТрУ), гр. Стара Загора с образователна степен „Магистър“, професионална квалификация „Ветеринарен лекар“, специалност „Ветеринарна медицина“. Работила е като медицинска сестра в Хирургично отделение в Общинска Болница в гр. Пазарджик (1997-1998 г.), като продавач на лекарства във фирма „Макрофарм“ АД, гр. Ст. Загора (2005 г.), Медицински представител, Управител на дрогерия в „Парагон Трейдинг ООД“, гр. Ст. Загора (2005 – 2015 г.), с което е натрупала богат опит като медицински специалист. През 2015 г. постъпва на работа в Тракийски университет, гр. Стара Загора на длъжност „Главен специалист - Медицински лаборант“, Организатор упражнения по Ветеринарна микробиология и „Старши експерт-Ветеринарен лекар“ (2015 – 2019 г.). От 2019 г. до сега тя е асистент, преподавател по Ветеринарна микробиология и вирусология в същата катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“.

Със Заповед №1117/31.03.2023 г. на Ректора на ТрУ Марияна Николова е зачислена в докторантура на самостоятелна подготовка с научен ръководител проф. д.н. Валентина Стаматова Урумова. Тя е изпълнила дейностите по обучението, положила е успешно изпитите по индивидуалния учебен план на докторантурата, подготвила е в значителна степен дисертационния си труд, представила е необходимия брой научни публикации и кредити и със Заповед на Ректора на ТрУ №1976/02.06.2023 г. е отчислена с право на защита на дисертацията.

• **Обща характеристика и структура на дисертационния труд.**

Трудът е написан на 170 стандартни страници. Той **включва необходимите раздели**, а именно: съдържание (5 стр.), използвани съкращения (1 стр.), увод (3 стр.), литературен преглед (46 стр.), цел и задачи (1 стр.), материали и методи (18 стр.), резултати (30 стр.), дискусия (19 стр.), обобщение (1 стр.), изводи (2 стр.), приноси (1 стр.), препоръки към практиката (1 стр.), литературен указател (38 стр.), списък на публикациите във връзка с дисертационния труд и участия в научни форуми (1 стр.). Това съотношение между разделите показва, че **дисертационният труд е структуриран правилно.**

• **Актуалност на проблема.**

Млечното говедовъдство е значима част от селското стопанство на нашата страна. Един от основните проблеми при него са маститите (възпаленията на млечната жлеза). Икономическите загуби вследствие на тези заболявания са огромни. Във връзка с това проучванията върху тяхната етиология, терапия и профилактика са винаги актуални. Причините за развитието на субклиничните и клинично проявените мастити са комплексни, но най-често са свързани с проникването и развитието на патогенни микроорганизми в млечната жлеза, като ролята на предразполагащите фактори е съществена. Те са свързани основно с недостатъци в хигиената, особено тази на вимето, травматизъм при доенето, технологичната организация във фермата и др. Терапията се основава на приложение на подходящи антимикробни средства, подбрани в зависимост от вида и чувствителността на микроорганизмите, лактационния период и други фактори. Често обаче тези лекарства се прилагат без предварително лабораторно определяне на чувствителността на етиологичните агенти към тях или пък дозировката, кратността и продължителността на приложението им не са достатъчни за постигане на терапевтичен ефект. От друга страна всичко това способства за селектиране и разпространение на резистентни микробни щамове, което е важен проблем в световен мащаб. Мерките за ограничаване появата и разпространението на микробната резистентност във фермите и

нейният мониторинг са важни за устойчивото развитие на отрасъла, но имат и санитарно-здравно значение, тъй като полирезистентните щамове, причиняващи мастити, могат да се предават и на човека чрез млякото и млечните продукти. Профилактиката, успешната терапия и контрола на тези заболявания са ключови за намаляване на икономическите загуби в отрасъла. Тези проблеми са обект на настоящия дисертационен труд, посветен на проучване на актуалните бактериални причинители на субклинични и клинични мастити при интензивно отглеждани млекодайки крави, както и разпространението на антибиотичната резистентност сред тях, включително на гена *tesA* сред метицилин – резистентни стафилококи. Всичко това показва, че **темата на представения дисертационен труд безспорно е актуална и важна.**

• **Степен на познаване на състоянието на проблема и творческа интерпретация на литературния обзор.**

В **увода** е добре очертана актуалността на проблемите, проучвани в дисертацията, а именно идентифициране на основните видове бактерии, причиняващи скрити и явни мастити при кравите, както и тяхната чувствителност към антимикробни средства.

В **литературния преглед** са разгледани основните фактори, които са от значение за появата, развитието и разпространението на маститите при кравите. Описано е икономическото значение на тези заболявания, ролята на околната среда, размера на стадото, доилната техника, последователността на издождането (първо на здравите и след това на болните животни), замърсяването на пода и постелята, хигиената на вимето и краката на кравите. Не е пропусната и съществена роля на човешкия фактор. Подходящо е описано устройството на вимето, значението на породата, възрастта, периода на лактация, храненето и имунния статус на животните. Обстойно са разгледани причинителите на мастити при говедата с акцент върху най-често изолираните видове, а именно *Staphylococcus aureus*, коагулаза-отрицателните стафилококи, най-проблемните стрептококи - *Streptococcus agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, както и други бактериални видове като *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Klebsiella* spp., *Pasteurella* spp. и др. Изтъкнати са техните фактори на патогенност, механизмите на проникването им в тъканта на млечната жлеза и развитието на възпалителен процес. Представена е класификацията на маститите при кравите, както и критериите за различаване на субклиничните мастити, латентните инфекции и секреторните разстройства на млечната жлеза. Във втората част на прегледа са разгледани основните антимикробни средства за лечение на маститите (бета-лактамни антибиотици, тетрациклини, аминогликозид-аминоциклитоли, макролиди, линкозамиди, хинолони и рифампицини), както и тяхната фармакокинетика и възможности

за разпределението им в тъканите. Представени са структурата, механизмите на действие на антибиотиците от разглежданите групи и тези на развитие на резистентност към тях от страна на микроорганизмите. В третата част е направен ретроспективен преглед на проучванията, свързани с отнасянията към антимикробни средства и антибиотичната резистентност при бактериите, основни причинители на мастити при кравите, а в четвъртата част са представени същността и генетичните (хромозомни и извънхромозомни) и биохимични механизми на тази резистентност. В обзора има някои текстови пасажии без посочени литературни източници, напр. на стр. 53, 54 и др. Също така изброяването в текста на цитираните източници би трябвало да бъде в една приета последователност – по азбучен ред на фамилиите на водещите автори или хронологично – от най-рано публикуваните към най-новите. Такъв подход липсва както в прегледа на литературата, така и в дискусията. Считам, че би било по-правилно вместо „антимикробна резистентност“ да се използват термините „микробна резистентност“ или „антибиотична резистентност“, тъй като антимикробен е ефектът на антибиотиците, а устойчивостта към тях се изгражда от микроорганизмите и в този смисъл тя е микробна. Важно е също изписването на мерните единици в целия труд да бъде уеднаквено и да е по международния стандарт, напр. в различните части на дисертацията сега милилитрите се срещат изписани като „ml“ „mL“ или „мл“.

Литературният преглед е написан и структуриран много добре. От него личи отличната осведоменост на докторанта по темата на дисертационния труд.

• **Цел, задачи, хипотези и методи на изследване. Съответствие на избраната методика на изследване с поставената цел и задачи на дисертационния труд.**

Целта на дисертационния труд е правилно и ясно формулирана. Тя предвижда проучвания върху най-широко разпространените и актуални бактериални причинители на субклинични и клинични мастити при интензивно отглеждани млекодайки говеда в нашата страна, както и техните отнасяния към антимикробни средства и свързаната с това резистентност. За изпълнението ѝ са поставени **шест задачи**, които са **добре формулирани и подходящи за постигане на целта на дисертацията.** Те включват скринингови проучвания във ферми с млекодайки говеда от различни географски райони в страната за наличие на мастити и получаване на проби от тях, извършване на микробиологични изследвания на пробите за изолиране, идентифициране и типизиране на микробните изолати и формиране на микробна сбирка, лабораторно определяне броя на соматичните клетки в млечните проби и съотнасянето им с вида на изолираните микроорганизми, генотипна идентификация на някои от най-значимите причинители на мастити, изследване

на чувствителността на изолираните бактерии към антимикробни средства и фенотипен анализ на наличната резистентност, както и проучване върху разпространението на *tesA* сред метицилин – резистентни стафилококи, изолирани от млечни проби.

В раздела „**Материали и методи**” много добре са описани изследваните животновъдни обекти (8 млечни говедовъдни ферми, 4 в Северна и 4 в Южна България), извършените скринингови проучвания в тях с помощта на бързи маститни тестове, вземането на проби при спазване на правилата за асептика и антисептика, автоматизираното изброяване на соматичните клетки във взетите проби, използваната апаратура и консумативи. Подробно и ясно е описан подходът при извършването на бактериологичните изследвания, фенотипното определяне на стафилококовите и стрептококовите изолати и на Грам-отрицателните бактерии. Приложените методи и използваните материали за определяне на чувствителността на щамовете към антимикробни средства също са добре представени, както и за генетичната идентификация на изолираните стафилококи, стрептококи и на ген *tesA* при метицилин резистентни стафилококи. Този раздел е добре онагледен с 3 таблици и 10 цветни фотографии, ясно представящи някои използвани уреди, обекти и етапи от работата. **Подбраните методи на изследване са подходящи, класически и съвременни, и изцяло съответстват на поставената цел и задачите на дисертационния труд.**

• **Онагледеност и представяне на получените резултати.**

Резултатите от извършените изследвания са представени **прегледно и ясно**, в последователност, съответстваща на поставените задачи и са **напълно достатъчни** за постигане на целта на разработката. Те са много добре обобщени, систематизирани и изложени в раздел „Резултати”, като са отразени **в 14 таблици**, от които ясно могат да се видят и сравнят получените данни. Общият брой на таблиците в дисертацията е 19, но 2 от тях са в литературния преглед и 3 – в раздела „Материали и Методи“. Резултатите са онагледени със **7 фигури**, две от които включват снимки (фигурите в дисертацията са общо 17, като останалите десет фигури със снимки, представящи етапи от работата, апаратура и резултати, са в раздел „Материали и Методи“), както и 5 графики, показващи резултати от генетичните анализи. Представен е броя на изследваните животновъдни ферми и крави, на взетите проби за микробиологично изследване, на изолираните бактериални щамове при случаите на клинични и субклинични форми на възпаление на млечната жлеза, както и разпределението им в проучваните осем ферми. Добре е показано установеното

съотношение между броя на соматичните клетки и бактериалните изолати. Ясно са представени видовото разпределение на стафилококовите и стрептококовите щамове, изолирани при клинични и субклинични мастити и резултатите от генетичните анализи за идентифициране на изолираните *S. aureus*, *S. epidermidis* и *S. agalactiae*. Би било полезно да се посочи в колко и кои от изследваните млечни проби се установяват комбинации от патогенни микроорганизми и дали *S. uberis* например се изолира самостоятелно или предимно в комбинации, тъй като за този вид е известно, че се развива предимно съвместно с някой от останалите етиологични агенти. Отнасянията на изолираните от млечни проби стафилококи и стрептококи към различни класове антимикробни средства също са дадени прегледно и ясно, в сравнителен аспект. От обобщените данни може да се видят и сравнят броят и чувствителността на бактериалните щамове от различните ферми, видовото разпределение на резистентността сред изолираните стафилококови и стрептококови щамове и техните доверителни интервали. Би било интересно да се направи успоредно проучване за използваните антимикробни средства през предходните години в изследваните ферми и сравнение с настоящите резултати, свързани с установената устойчивост на изолираните бактерии. Резултатите, отнасящи се до определените MIC₉₀ за девет от проучените химиотерапевтици при стафилококите и стрептококите, изолирани при субклинични и клинични мастити при говеда, са добре представени в таблици, а някои са документирани и на снимки. Установените картини на резистентност при стафилококите и стрептококите, изолирани от млечните проби, също са значими резултати. Също така е направен генетичен анализ за определяне на гена *tesA* при изолираните стафилококи, което е показателно за съвременното ниво на работа. Представените резултати са допълнително пояснени в текста към таблиците и фигурите. Начинът на представянето и сравняването на получените данни показва, че авторът владее приложените методи на изследване, както и обработката, обобщаването и компетентното анализиране на резултатите. От този раздел от дисертацията безспорно се вижда, че **поставените задачи са изпълнени и целта на работата е постигната.**

• Обсъждане на резултатите и използвана литература.

Разделът „Дискусия“ също е обстоен и пълноценен. Той **включва компетентен анализ на данните от извършените комплексни проучвания, като тук също изпъква високата литературна осведоменост на докторанта и умението му да тълкува и сравнява резултатите.** В този раздел получените резултати са задълбочено интерпретирани и сравнявани с тези на други автори от редица райони на света. Във връзка с мониторинга на разпространението на маститните заболявания като слабост е посочено отсъствието на национални системи за регистриране на хуманното отношение към кравите

и нивата на мастити в повечето Европейски страни. Авторът правилно констатира, че разликите в състоянието на отделните ферми се дължи на климатичните фактори в различните географски райони, условията и хигиената на отглеждане и доене, породата на животните, компетентността на персонала, диагностичните методи, редовния скрининг, практиките на управление и контрол, както и стратегиите при профилактиката на възпаленията на млечната жлеза. В резултат на своите проучвания и на тези на други изследователи докторантът потвърждава, че клиничните и субклиничните мастити при кравите се причиняват от Грам-положителни микроорганизми с водеща роля на патогенните стрептококи и стафилококи. Посочените фактори са от основно значение и за установеното сходство в разпространението на патогенните микроорганизми в някои от изследваните ферми. Коментирано е значението на броя на соматичните клетки като индикатор за настъпили промени в качеството на млякото най-често поради възпаление на млечната жлеза и по-рядко вследствие на секреторно разстройство, връзката на резултатите с микробната етиология, както и на предимствата от комбинирането на този тест с културалните изследвания. Ценна е дискусията за ролята на *S. aureus* като значим причинител на клинично проявени и по-рядко на субклинични мастити. Обсъдено е и значението в този аспект и на останалите изолирани бактерии, както и интересната находка, че понастоящем коагулаза-негативните стафилококи показват по-висока резистентност към повечето от тестваните антимикробни средства в сравнение със *S. aureus* и възможната им роля като резервоар на гени за резистентност. Допусната е фактическа грешка в изречението „В нашето проучване с най-голяма честота на разпространение бяха коагулаза-негативните стафилококи *S. uberis*, следвани от стрептококите от вида *S. agalactiae*.“ на стр. 109 и пропуск в първата част на следващото изречение. Обсъдено е разпространението на мултирезистентни щамове стафилококи и стрептококи предимно поради неправилната употреба на антимикробни средства, като е изтъкнато, че различните модели на устойчивост най-вероятно се дължат на употребата на различни антибиотици в съответните ферми и региони. Отбелязана е обаче опасността от наличието на мултирезистентни щамове *S. aureus* към оксацилин, ампицилин, цефокситин и тетрациклин във връзка с разпространението на метицилиновата резистентност, която е от значение за общественото здраве. Тя се основава на придобиване на мобилен генетичен елемент (стафилококова касетна хромозома SCC), съдържащ гена *tesA*, кодиращ синтеза на алтернативен пеницилин-свързващ протеин (PBP2a) с намален афинитет към пеницилиназа-резистентните пеницилини като метицилин и оксацилин, както и към останалите бета-лактамни антибиотици. Дискутирано е разпространението на този ген сред

стафилококовите щамове. Разделът уместно завършва с **обобщение** на резултатите от направените проучвания.

В резултат на извършените проучвания са формулирани **12 извода**, които ясно и точно отразяват резултатите в последователността на поставените задачи.

• **Приноси на дисертационния труд.**

Приносите, произтичащи от извършените изследвания и анализи, са **четири** на брой, ясно формулирани. **Три от тях са потвърдителни и един е оригинален за нашата страна.** Важен принос представляват извършените сравнителни изследвания и аналитична оценка на най-често срещаните бактериални видове, причиняващи мастити при кравите в осем ферми от различни региони на нашата страна. Направеният комплексен фенотипен анализ и оценка на резистентността на изолираните стрептококови и стафилококови щамове към няколко антимикробни средства също е ценен принос, както и направеният генетичен анализ за присъствие на ген *mecA* при стафилококовите щамове с фенотипен профил на метицилинова резистентност. Оригиналният принос на дисертацията е свързан с извършената генетична идентификация на някои от стрептококовите (*S. agalactiae*) и стафилококовите щамове (*S. aureus*, *S. epidermidis*), изолирани от млечни проби от крави със субклинични и клинични мастити, посредством qPCR в диагностичен алгоритъм.

Препоръките за практиката също са четири, добре формулирани. Тяхното приложение би било полезно при терапията и контрола на маститите при кравите у нас.

Литературният указател включва много голям брой литературни източници – 314 бр. и показва отличната информираност на автора за състоянието на проблема в нашата страна и в чужбина. Шест от източниците са на кирилица, а останалите 308 - на латиница. Делът на източниците от последните 10 години е значителен – 70 % (222 бр.), което е свидетелство за **добрата осведоменост на автора на съвременно ниво** и следенето на актуалната литература. Тези от периода 2001-2011 г. са 28 % (85 бр.), а най-малко (2%, 7 бр.) са тези от 2000 г. и преди това. Литературният указател е добре оформен съгласно стандартните изисквания.

• **Оценка на степента на личното участие на дисертанта в приносите.**

Ас. М. Николова е водещ автор на всички публикации и участия в научни конференции, представени във връзка с дисертацията, което е показател за активното ѝ участие нейното разработване. Това проличава също от представянето на материала на предварителната защита и компетентното участие във възникналата дискусия. Подробното

и ясно описание на приложените методи в дисертацията, умелото обобщаване и документиране на резултатите, както и аналитичното им обсъждане също показват висока компетентност и значителен опит в лабораторната работа. От всичко това личи, че **трудът е нейно лично дело**, осъществено под вещото ръководство на научния ѝ ръководител проф. д.н. Валентина Урумова.

- **Критични бележки, препоръки и въпроси.**

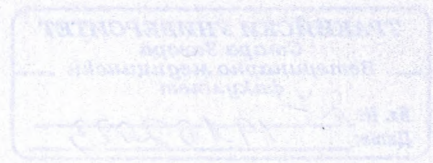
Моите бележки, въпроси и препоръки по проекта на дисертационния труд бяха представени на Разширения катедрен съвет при предварителното обсъждане на дисертацията. Те бяха взети пред вид от автора в голяма степен. Забелязват се обаче печатни, правописни и стилови грешки, но в бъдещата работа те трябва да се избягват.

- **Авторефератът е добре оформен технически и естетически. Той отразява обективно структурата и съдържанието на дисертационния труд.** Написан е на 52 страници и пълноценно представя резултатите от изследванията, изложени в дисертацията. Включва необходимите раздели съгласно общоприетите изисквания, както и 17 таблици и 17 фигури, представящи резултатите.

- **Публикувани статии и цитирания. Преценка на публикациите по дисертационния труд. Отражение в науката – използване и цитиране от други автори.**

Приложеният списък на публикациите, свързани с дисертацията, включва **три** заглавия. Те са на английски език, като в тях Марияна Николова е водещ автор. Отпечатани са през 2021 и 2022 г. в реферирани научни списания, две от които са индексирани в Web of Sciences („Tradition and modernity in veterinary medicine“ и „Trakia Journal of Sciences“), а една е с импакт ранг (Scopus) – **SJR: 0,128**, публикувана в сп. „Veterinarija ir Zootechnika“. **Тези научни публикации и получените от тях точки са достатъчни за защита на дисертационния труд.** Една от тези публикации е **цитирана** в списание „Veterinary Sciences“, което е с импакт ранг (Scopus) - **SJR: 0,52**. Това е престижен показател за значимостта на публикуваните резултати и отражението им в науката.

Марияна Николова има и две участия с доклади на международни научни форуми – Международната научна конференция „Tradition and Modernity in Veterinary medicine“ (16-18.04.2021 г.) и „XV Международен конгрес на микробиолозите в България“, Копливщица (15-8.10.2022 г.).



В заключение считам, че представеният от ас. Марияна Николова дисертационен труд отговаря на критериите и показателите за придобиване на ОНС „Доктор“, заложен в ЗРАСРБ, Правилника за приложението му и Вътрешния правилник за развитие на академичния състав в Тракийския университет в гр. Стара Загора. Темата на дисертацията е актуална и с практическа насоченост. Литературната осведоменост на докторанта е много добра, както и умението му да ползва литературната информация в научноизследователската си работа. Дисертационният труд е достатъчен по обем и добре конструиран. Научните статии, свързани с него, са публикувани в реферирани списания, индексирани в Web of Sciences, а една от тях – и в Scopus, със **SJR: 0,128**, като са достатъчни за придобиване на тази образователна и научна степен. Една от публикациите вече е цитирана в рефериран и индексиран в Scopus научен журнал (**SJR: 0,52**). Изследванията са проведени на съвременно ниво, с достатъчно на брой материали, а получените резултати са представени ясно и компетентно анализирани. От тях произхождат полезни за практиката приноси. Въз основа на представената по-горе информация изказвам убеждението си, че ас. Марияна Николова е отлично подготвен и перспективен специалист със задълбочена теоретична и практическа подготовка по научната специалност, с умения да прилага съвременни методи на научни изследвания, да обработва, сравнява и тълкува получените резултати, както и да ги представя в стойностни научни публикации.

Всичко това ми дава основание да дам своя **положителен вот** и да предложа на уважаемите членове на Научното жури също да гласуват **положително** за придобиване от **асистент Марияна Петрова Николова** на образователната и научна степен „Доктор“ по **научна специалност «Ветеринарна Микробиология»**, област на висше образование 6.0 Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина.

11.10.2023 г.

гр. София

Изготвил

(проф. д-р

заличено съгл.

чл. 23 от ЗЗЛД

REVIEW

on a dissertation work for obtaining the educational and scientific degree "Doctor" (PhD) in the scientific specialty "Veterinary Microbiology", field of higher education 6.0 Agricultural sciences and veterinary medicine, professional area 6.4. Veterinary Medicine.

Author of the dissertation: assistant professor Mariyana Petrova Nikolova, Thrakia University, Stara Zagora

Dissertation topic: " Research on species composition and sensitivity to antimicrobial means of bacterial strains, isolated from cattle with clinical and subclinical mastitis"

Reviewer: prof. Teodora Petrova Popova, PhD, DSc., University of Forestry, city of Sofia, field of higher education "Agrarian sciences and veterinary medicine", professional area 6.4. "Veterinary medicine", scientific specialty "Epizootology, infectious diseases and prevention of contagious diseases in animals", appointed as member of the Scientific jury by Order No. 3252/25.09.2023 of the Rector of Trakia University in Stara Zagora.

• Brief presentation of the candidate.

Mariyana Petrova Nikolova has graduated semi-higher education in 1997 at "Mara Maleeva" Medical College, Plovdiv with a degree in "Medical nurse" and higher education in 2004 at Thrakia University (TrU), Stara Zagora with Master's educational degree, professional qualification "Veterinarian", specialty "Veterinary Medicine". She worked as a nurse in the Surgical Department of the Municipal Hospital in the city of Pazardzhik (1997-1998), as a medicine seller in the company "Macropharm" LTD, the city of St. Zagora (2005), Medical Representative, Drugstore Manager at "Paragon Trading OOD", St. Zagora (2005 – 2015), with which she gained extensive experience as a medical specialist. In 2015, she started working at Thrakia University, Stara Zagora, as "Chief Specialist - Medical Laboratory Assistant", Organizer of exercises in Veterinary Microbiology and "Senior Expert - Veterinary Doctor" (2015 - 2019). From 2019 until now, she is an assistant professor of Veterinary Microbiology and Virology in the same department "Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases".

By Order No. 1117/31.03.2023 of the Rector of TrU, Mariyana Nikolova is enrolled in a doctoral course of independent study with supervisor Prof. Valentina Stamatova Urumova, PhD, DSc. She has completed the training activities, successfully passed the exams according to the individual study plan of the doctoral program, prepared her dissertation work to a significant

extent, submitted the required number of scientific publications and credits and by Order of the Rector of TrU No. 1976/02.06.2023. has been deducted with the right to defend the dissertation.

- **General characteristics and structure of the dissertation work.**

The work is written in 170 standard pages. **It includes the necessary sections**, namely: contents (5 pages), abbreviations used (1 page), introduction (3 pages), literature review (46 pages), aim and objectives (1 page), materials and methods (18 pages), results (30 pages), discussion (19 pages), summary (1 page), conclusions (2 pages), contributions (1 page), recommendations for practice (1 page), bibliography (38 pages), list of publications related to the dissertation work and participation in scientific forums (1 page). This ratio between the sections indicates that **the dissertation is structured correctly**.

- **Timeliness of the problem.**

Dairy cattle breeding is a significant part of our country's agriculture. One of its main problems is mastitis (inflammation of the mammary gland). The economic losses due to these diseases are huge. In this regard, studies on their etiology, therapy and prevention are always up-to-date. The reasons for the development of subclinical and clinically manifested mastitis are complex, but most often they are related to the penetration and development of pathogenic microorganisms in the mammary gland, and the role of predisposing factors is essential. They are mainly related to deficiencies in hygiene, especially that of the udder, traumatism during milking, technological organization on the farm, etc. The therapy is based on the use of appropriate antimicrobial agents, selected depending on the type and sensitivity of microorganisms, the lactation period and other factors. Often, however, these drugs are administered without prior laboratory determination of the sensitivity of the etiological agents to them, or the dosage, frequency and duration of their administration are not sufficient to achieve a therapeutic effect. On the other hand, all this contributes to the selection and spread of resistant microbial strains, which is an important problem worldwide. Measures to limit the emergence and spread of microbial resistance in farms and its monitoring are important for the sustainable development of the sector, but also have a sanitary and health significance, since multiresistant strains causing mastitis can also be transmitted to humans through milk and dairy products. Prevention, successful therapy and control of these diseases are key to reducing economic losses in the branch. These problems are the subject of the current dissertation, dedicated to the study of the current bacterial causes of subclinical and clinical mastitis in intensively reared dairy cows, as well as the spread of antibiotic resistance among them, including the *mecA* gene among

methicillin-resistant staphylococci. All this shows that **the topic of the presented dissertation is undoubtedly current and important.**

• **Degree of knowledge of the state of the problem and creative interpretation of the literature review.**

In the introduction, the relevance of the problems studied in the dissertation is well outlined, namely identification of the main bacterial species causing latent and clinical mastitis in cows, as well as their susceptibility to antimicrobial agents.

In the literature review, the main factors that are important for the occurrence, development and spread of mastitis in cows are examined. The economic importance of these diseases, the role of environment, herd size, milking technique, sequence of milking (healthy first and then sick animals), floor and litter contamination, udder and cow foot hygiene are described. The essential role of the human factor has not been overlooked. Udder structure, importance of breed, age, lactation period, nutrition and immune status of animals are appropriately described. The causative agents of bovine mastitis are extensively reviewed, with an emphasis on the most commonly isolated species, namely *Staphylococcus aureus*, the coagulase-negative staphylococci, the most problematic streptococci - *Streptococcus agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, as well as other bacterial species such as *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Klebsiella* spp., *Pasteurella* spp. and others. Their pathogenicity factors, the mechanisms of their penetration into the mammary tissue and the development of an inflammatory process are highlighted. The classification of mastitis in cows is presented, as well as the criteria for distinguishing between subclinical mastitis, latent infections and secretory disorders of the mammary gland. In the second part of the review, the main antimicrobial agents for the treatment of mastitis (beta-lactam antibiotics, tetracyclines, aminoglycoside-aminocyclitols, macrolides, lincosamides, quinolones and rifampicins) are considered, as well as their pharmacokinetics and possibilities for their distribution in tissues. The structure, mechanisms of action of antibiotics from the considered groups and those of the development of resistance to them by microorganisms are presented. In the third part, a retrospective review of the studies related to attitudes to antimicrobial agents and antibiotic resistance in bacteria, the main causative agents of mastitis in cows, was made, and in the fourth part, the nature and genetic (chromosomal and extrachromosomal) and biochemical mechanisms of this resistance are presented. There are some textual passages in the overview without cited literary sources, e.g. on pp. 53, 54, etc. Also, the listing in the text of cited sources should be in an accepted sequence - alphabetically by the surnames of the leading authors or chronologically - from the earliest published to the most recent. Such an approach is missing from both the literature review and the discussion. I think it would be more correct to use the terms "microbial resistance" or "antibiotic resistance" instead of "antimicrobial resistance", since

antimicrobial is the effect of antibiotics, and resistance to them is built by microorganisms, and in this sense it is microbial. It is also important that the spelling of the units of measurement throughout the work be uniformed and follow the international standard, e.g. in various parts of the dissertation, milliliters are now found written as "ml" "mL" or „мл“.

The literature review is written and structured very well. It shows the doctoral student's excellent knowledge of the topic of the dissertation.

• **Purpose, tasks, hypotheses and research methods. Correspondence of the chosen research methodology with the set goal and tasks of the dissertation work.**

The purpose of the dissertation work is correctly and clearly formulated. It envisages studies on the most widespread and current bacterial causes of subclinical and clinical mastitis in intensively bred dairy cattle in our country, as well as their reactions to antimicrobial agents and the related resistance. For its implementation, **six tasks** are set, which are **well formulated and suitable for achieving the aim** of the dissertation. They include screening studies in farms with dairy cattle from different geographical regions of the country for the presence of mastitis and obtaining samples from them, performing microbiological studies of the samples for isolation, identification and typing of the microbial isolates and forming a microbial collection, laboratory determination of the number of somatic cells in milk samples and their correlation with the species of microorganisms isolated, genotypic identification of some of the most important causative agents of mastitis, study of the sensitivity of isolated bacteria to antimicrobial agents and phenotypic analysis of available resistance, as well as a study on the distribution of *mecA* gene among methicillin-resistant staphylococcal isolated from milk samples.

In the "Materials and methods" section, the researched livestock sites (8 dairy cattle farms, 4 in Northern and 4 in Southern Bulgaria), the screening studies carried out in them with the help of rapid mastitis tests, the sampling in compliance with the rules for asepsis and antisepsis, the automated enumeration of somatic cells in the samples taken, the equipment and consumables used are presented. The approach to carrying out bacteriological studies, the phenotypic determination of the staphylococcal and streptococcal isolates and Gram-negative bacteria is described in detail and clearly. The applied methods and materials used for determining the susceptibility of strains to antimicrobial agents are also well presented, as well as for the genetic identification of isolated staphylococci, streptococci and the *mecA* gene in methicillin-resistant staphylococci. This section is well illustrated with 3 tables and 10 color photographs clearly representing some of the equipment used, objects and stages of the work. **The chosen**

research methods are appropriate, classic and modern, and fully correspond to the set aim and tasks of the dissertation work.

- **Illustration and presentation of the obtained results.**

The results of the conducted research **are presented clearly**, in a sequence corresponding to the set tasks and are **completely sufficient** to achieve the aim of the development. They are very well summarized, systematized and presented in the "Results" section, being reflected in **14 tables** from which the obtained data can be clearly seen and compared. The total number of tables in the dissertation is 19, but 2 of them are in the literature review and 3 in the "Materials and Methods" section. The results are illustrated with **7 figures**, two of which include photographs (the figures in the dissertation are 17 in total, and the remaining ten figures with photographs representing stages of the work, equipment and results are in the "Materials and Methods" section), as well as 5 graphs, showing results of the genetic analyses. The number of examined livestock farms and cows, the samples taken for microbiological examinations, the isolated bacterial strains in the cases of clinical and subclinical forms of mammary gland inflammation, as well as their distribution in the eight studied farms, are presented. The established correlation between somatic cell counts and bacterial isolates is well shown. The species distribution of the staphylococcal and streptococcal strains isolated in clinical and subclinical mastitis and the results of the genetic analyzes to identify the isolated *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. agalactiae* are clearly presented. It would be useful to indicate in how many and in which of the milk samples examined combinations of pathogenic microorganisms are detected and whether *S. uberis* for example is isolated alone or mainly in combinations, as this species is known to co-develop most often with other of main etiological agents. The sensitivity of staphylococci and streptococci isolated from milk samples to different classes of antimicrobials is also given in a clear and comparative manner. From the summary data, the number and susceptibility of bacterial strains from different farms, the distribution of resistance among the isolated staphylococcal and streptococcal strains and their confidence intervals can be viewed and compared. It would be interesting to do a parallel study on the antimicrobial means used in the previous years in the studied farms and a comparison with the current results related to the established resistance of the isolated bacteria. The results regarding the determined MIC₉₀ of nine of the studied chemotherapeutics for the staphylococci and streptococci isolated from subclinical and clinical mastitis in cattle are well presented in tables and some are also documented in photos. The established resistance pictures in the staphylococci and streptococci isolated from the milk samples are also significant results. A genetic analysis was also performed to determine the *mecA* gene in the isolated staphylococci, which is indicative of the contemporary level of work. The presented results are further explained in the text accompanying the tables and figures. The

way of presenting and comparing the obtained data shows that the author has mastered the applied research methods, as well as the processing, summarization and competent analysis of the results. From this section of the dissertation, it can be clearly seen that **the tasks set have been fulfilled and the purpose of the work has been achieved.**

• **Discussion of results and literature used.**

The Discussion section is also thorough and comprehensive. **It includes a competent analysis of the data from the complex studies carried out, and here also stands out the high literary awareness of the doctoral student and her ability to interpret and compare the results.** In this section, the obtained results are thoroughly interpreted and compared with those of other authors from a number of regions of the world. In connection with the monitoring of the spread of mastitis diseases, the absence of national systems for recording the humane treatment of cows and the levels of mastitis in most European countries is indicated as a weakness. The author correctly states that the differences in the condition of individual farms are due to climatic factors in different geographical areas, the conditions and hygiene of rearing and milking, the breed of animals, the competence of the staff, diagnostic methods, regular screening, management and control practices, as well as strategies in the prevention of inflammation of the mammary gland. As a result of his studies and those of other researchers, the doctoral student confirmed that clinical and subclinical mastitis in cows is caused by Gram-positive microorganisms with the leading role of pathogenic streptococci and staphylococci. The mentioned factors are also of fundamental importance for the established similarity in the spread of pathogenic microorganisms in some of the studied farms. The importance of the somatic cell count as an indicator of changes in milk quality most often due to inflammation of the mammary gland and less often due to a secretory disorder, the relationship of the results to microbial etiology, and the advantages of combining this test with cultural studies are commented. The discussion about the role of *S. aureus* as a significant cause of clinically manifested and less often of subclinical mastitis is valuable. The importance in this aspect of the other isolated bacteria is also discussed, as well as the interesting finding that currently coagulase-negative staphylococci show higher resistance to most of the antimicrobials tested compared to *S. aureus* and their possible role as a reservoir of genes for resistance. A factual error is made in the sentence "In our study, coagulase-negative *S. uberis* was most prevalent, followed by *S. agalactiae* streptococci" on page 109 and an omission in the first part of the following sentence. The spread of multi-resistant strains of staphylococci and streptococci is discussed, mainly due to the inappropriate use of antimicrobial agents, and it is pointed out that the different resistance patterns are most likely due to the use of different antibiotics in the respective farms and regions. However, the danger of the presence of *S. aureus*

strains multiresistant to oxacillin, ampicillin, cefoxitin and tetracycline has been noted in relation to the spread of methicillin resistance, which is of public health concern. It is based on the acquisition of a mobile genetic element (staphylococcal cassette chromosome SCC) containing the *mecA* gene encoding the synthesis of an alternative penicillin-binding protein (PBP2a) with reduced affinity for penicillinase-resistant penicillins such as methicillin and oxacillin, as well as for other beta- lactam antibiotics. The distribution of this gene among staphylococcal strains has been discussed. The section appropriately ends with a **generalization** of the results of the studies carried out.

As a result of the studies carried out, **12 conclusions** are formulated, which clearly and accurately reflect the results in the sequence of the set tasks.

• **Contributions of the dissertation work.**

The contributions resulting from the research and analysis carried out are **four** in number, clearly formulated. **Three of them are confirmatory and one is original to our country.** An important contribution is the comparative research and analytical evaluation of the most common bacterial species causing mastitis in cows in eight farms from different regions of our country. The complex phenotypic analysis and evaluation of the resistance of the isolated streptococcal and staphylococcal strains to several antimicrobial agents is also a valuable contribution, as well as the genetic analysis for the presence of the *mecA* gene in the staphylococcal strains with a phenotypic profile of methicillin resistance. The original contribution of the dissertation is related to the performed genetic identification of some of the streptococcal (*S. agalactiae*) and staphylococcal strains (*S. aureus*, *S. epidermidis*) isolated from milk samples from cows with subclinical and clinical mastitis, by means of qPCR in a diagnostic algorithm.

The recommendations for practice are also four, well formulated. Their application would be useful in the therapy and control of mastitis in cows in our country.

The literary index includes a very large number of literary sources - **314** items and shows the author's excellent awareness of the state of the problem in our country and abroad. Six of the sources are in Cyrillic, and the remaining 308 are in Latin. The share of sources from the last 10 years is significant – 70% (222 items), which is a testimony to the **good conversance of the author at a contemporary level** and the monitoring of current literature. Those from the period 2001-2011 are 28% (85 items), and the least (2%, 7 items) are those from 2000 and before. The bibliography is well designed according to standard requirements.

- **Assessment of the degree of the dissertation student's personal involvement in the contributions.**

Assistant Professor M. Nikolova is the lead author of all publications and participation in scientific conferences presented in connection with the dissertation, which is an indicator of her active participation in its development. This is also evident from the presentation of the material of the preliminary defense and the competent participation in the resulting discussion. The detailed and clear description of the applied methods in the dissertation, the skillful summarization and documentation of the results, as well as their analytical discussion also show high competence and significant experience in laboratory work. From all this, it is clear that the work is **her personal work**, carried out under the expert guidance of her scientific supervisor, Prof. D. Sc. Valentina Urumova.

- **Criticisms, recommendations and questions.**

My notes, questions and recommendations on the draft of the dissertation work were presented to the Extended Departmental Council during the preliminary discussion of the dissertation. They were taken into account by the author to a great extent. However, typographical, spelling and stylistic errors are noted, but should be avoided in future work.

- **The Abstract** is well formed technically and aesthetically. It objectively reflects the structure and content of the dissertation work. It is written on 52 pages and fully presents the results of the research presented in the dissertation. It includes the necessary sections according to generally accepted requirements, as well as 17 tables and 17 figures presenting the results.

- **Published articles and citations. Assessment of dissertation publications. Reflection in science - use and citation by other authors.**

The attached list of publications related to the dissertation includes **three** titles. They are in English, and Marijana Nikolova is the lead author. They are published in 2021 and 2022 in refereed scientific journals, two of which are indexed in Web of Sciences ("Tradition and modernity in veterinary medicine" and "Trakia Journal of Sciences"), and one has an impact rank (Scopus) - **SJR: 0.128**, published in "Veterinarija ir Zootechnika" magazine. **These scientific publications and the points obtained from them are sufficient to defend the dissertation.** One of these publications is **cited** in the journal "Veterinary Sciences", which has an impact rank (Scopus) - **SJR: 0.52**. This is a prestigious indicator of the significance of the published results and their impact in science.

Mariyana Nikolova also has two presentations at international scientific forums - the International scientific conference "Tradition and Modernity in Veterinary medicine" (16-18.04.2021) and the "XV International Congress of Microbiologists in Bulgaria", Koprivshitsa (15-8.10. 2022).

In conclusion, I consider that the dissertation work presented by Assistant Professor Mariyana Nikolova meets the criteria and indicators for the acquisition of the educational and scientific degree "Doctor" (PhD) laid down in the Law on the development of the academic staff in the Republic of Bulgaria, the Regulations for its application and the Internal Regulations for the development of the academic staff at the Trakia University in Stara Zagora. The topic of the dissertation is current and has a practical focus. The doctoral student's literary awareness is very good, as is her ability to use literary information in his research work. The dissertation is sufficient in volume and well constructed. The scientific articles related to it have been published in refereed journals indexed in Web of Sciences and one of them in Scopus, with SJR: 0.128, being sufficient to acquire this educational and scientific degree. One of the publications has already been cited in a peer-reviewed and Scopus-indexed scientific journal (SJR: 0.52). The research is conducted at a modern level, with a sufficient number of materials, and the obtained results are clearly presented and competently analyzed. Useful contributions for practice originate from them. Based on the information presented above, I express my conviction that assistant professor Mariyana Nikolova is an excellently prepared and promising specialist with in-depth theoretical and practical training in the scientific specialty, with the skills to apply modern methods of scientific research, to process, compare and interpret the received results, as well as to present them in valuable scientific publications.

I (this gives me the reason to give my positive vote and suggest to the respected members of the Scientific Jury to also vote positively for the acquisition by assistant professor Mariyana Petrova Nikolova of the educational and scientific degree "Doctor" (PhD) in the scientific specialty "Veterinary Microbiology", field of higher education 6.0 Agricultural sciences and veterinary medicine, professional direction 6.4. Veterinary Medicine.

11.10.2023

Sofia

Reviewers' signature

(Prof. Teodora Po

~~~~~  
23 ~~~~~