

До Председателя на Научно жури
определенено със заповед
№ 3252/25.09.2022 г. на Ректора на
Тракийски университет
гр. Стара Загора

РЕЦЕНЗИЯ

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

Автор: ас. Марияна Петрова Николова, докторант на самостоятелна форма на обучение към катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести“ на ВМФ, по научна специалност „Ветеринарна микробиология“, област на висше образование 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина.

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

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

Декларирам, че не съществуват условия за конфликт на интереси между мен и кандидата ас. Марияна Петрова Николова по смисъла на ал. 1, точки 2а, 3, 4 и 5 от ДР на ЗРАСРБ. Предоставените ми дисертационен труд, автореферат и други документи по процедурата за защита са коректно подгответи и съответстват на ЗРАСРБ и на Правилника за развитие на академичния състав в Тракийски университет – Стара Загора.

1. Биографични данни на докторанта.

Асистент Марияна Николова завършила Медицински колеж „Мара Малеева“ в гр. Пловдив през 1997 г., а през 2004 г. Ветеринарномедицинския факултет при Тракийски университет, гр. Стара Загора. Работила е в Общинска болница гр. Пазарджик и в компаниите „Макрофарм“ АД и Парагон Трейдинг ООД в гр.

Стара Загора като дилър респ. медицински преставител. През 2015 г. започва работа като Главен специалист-Медицински лаборант в Тракийския университет, а от 2016 г. работи като Старши експерт-Ветеринарен лекар - до октомври 2019 г. Впоследствие и досега е асистент и преподавател по Ветеринарна микробиология и вирусология във ВМФ на ТрУ.

2. АНАЛИЗ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

2.1. Актуалност на дисертационния труд

Представеният дисертационен труд е мащабно по своя характер проучване върху един от значимите здравни проблеми при млекодайните крави, а именно възпаленията на млечната жлеза. Този въпрос е с подчертана актуалност не само поради съществуващият риск за опазване на общественото здраве (възникване на инфекциозни заболявания при хората като консуматори на мляко и особено при децата), но и поради реалната възможност за селектиране и разпространение на бактериални щамове, резистентни към различни групи химиотерапевтици, което ограничава тяхната терапевтична ефективност. Ето защо избраната тема на изследване, широката гама от проучвани бактериални видове, форми на възпалителния процес на млечната жлеза, параметри на антимикробната резистентност и множеството класически и съвременни методи за тяхното определяне и характеризиране подчертават значимостта на разработваната тема и нейната медицинска, ветеринарномедицинска, социална и икономическа значимост.

2.2. Описание на дисертацията

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е съобразен с общите изисквания и е структуриран по стандартен начин. Обхваща общо 170 страници, илюстриран е със 17 фигури и 19 таблици. Дисертационният труд има пропорционално разпределение на отделните части: Увод – 3 страници, Литературен преглед - 46 страници, Цел и задачи-1 стр., Материали и методи - 18 стр., Резултати - 30 стр., Дискусия – 21 стр., Обобщение – 1 стр., Изводи – 2 стр., Приноси – 1 стр., Препоръки към практиката – 1 стр., Литературен указател - 38 стр. Списък на публикациите и участия в научни форуми – 1 стр.

В дисертацията са цитирани много голям брой литературни източници – общо 314. Литературната справка е актуална, което се доказва от факта, че по-голямата част от цитираните публикации са от последните 10 години.

2.3. Познаване на проблема - оценка на литературния преглед

Представеният литературен преглед показва добрата информираност на докторанта по проблемите на маститните заболявания при млекодайните крави, тяхната диагностика, лечение и превенция, етиологичните агенти свързани с възпаленията на млечната жлеза и техните отнасяния към химиотерапевтиците, респективно наличната резистентност към тях. Направен е последователен и задълбочен анализ на факторите, повлияващи появата и разпространението на бактериалните мастити в говедовъдните ферми – оконна среда, доилна техника, постеля, хигиената на вимето и краката и други, както и основните бактериални видове, причиняващи мастити – *Staphylococcus aureus* и коагулаза-негативните стафилококки, *Streptococcus agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* и други. Сериозно внимание е обърнато и на класификацията на маститите и антимикробните средства за терапия на бактериалните мастити при говедата, като са разгледани и въпросите свързани с техните фармакодинамични и фармакокинетични характеристики, както и целевото място за инокулиране на съответното терапевтично средство. Подробно са описани бета-лактамните химиотерапевтици, тетрациклините, аминогликозидите, макролидите, линкозамиди, флуорирани хинолони и рифамицините. Умело и аналитично е представен ретроспективен преглед на проучванията, свързани с отнасянията към антимикробни средства и наличието на антимикробна резистентност при бактериите, причиняващи мастити при говедата. Приятно впечатление прави и доброто познаване на същността и механизмите на антимикробната резистентност, като достатъчно изчерпателно са описани генетичните детерминанти и биохимичните механизми на този феномен. Целият литературен преглед е написан на добър научен стил и ясно проличават задълбочените знания и информираност на ас. Николова. Целите и задачите на дисертацията са формулирани ясно и напълно отговарят на представените в дисертацията анализи и резултати.

2.4. Материали и методи

Разделът "Материали и методи" е развит подробно и задълбочено. В изследванията върху общо 8 млечни говедовъдни ферми по отношение разпространението на клинични и субклинични мастити са използвани различен набор от методи. Клиничично проведеният бърз маститен тест дава информация за съдържанието на соматични клетки в мляко, а тяхното количествено определяне се извършва чрез специализираната автоматизирана система Ecoscope (Everest-Индия). Класически микробиологични методи са използвани за предварителна идентификация на бактериите, изолирани от млечните преби и охарактеризиране на техните морфологични особености. Набор от биохимични методи доказват специфични характеристики на стафилококите и стрептококите – цитохромоксидазна и каталазна активности, плазмокоагулаза, разграждане на манитол, хидролиза на ескулин, продукция на СAMP-фактор, и др. като краен етап в диагностичния алгоритъм за фенотипното определяне на щамовете е използван надеждният тест STREPTO 24test на фирмата (Erba Lachema, Чехия). За фенотипно определяне на чувствителността на микроорганизмите към антимикробни средства са използвани стандартизираните диск-дифузионен метод и метода за определяне на минималните инхибиращи концентрации (MIC), или с търговския Е-тест. Чувствителността на стафилококите е определена към единадесет клинично важни химиотерапевтични средства, а при стрептококовите изолати са включени девет антимикробни субстанции. qPCR със високоспецифични TaqMan сонди за провежданни за окончателна видова идентификация на стафилококите и стрептококите, както и за доказване на гена тесA при метицилин резистентни стафилококи.

2.5. Оценка на получените резултати

В първата част от раздела „Резултати“, ас. Николова представя данните от разпределението на стафилококовите и стрептококовите щамове, изолирани от млечни преби от крави в изследваните осем ферми от различни региони на страната за периода 2020-2022 г. Изследвани са общо 346 преби, от които бяха изолирани 272 бактериални щама. В най-голям брой преби (151) се доказва

Наличието на изолати принадлежащи към *Streptococcus* spp., респективно 55.5%. От тях 40.4% (61 изолата) са определени като *S. agalactiae*, 34.4% (52 изолата) като *S. uberis* и 25.2% (38 изолата) са отнесени към вида *S. dysgalactiae*. На второ място по честота на изолиране са представителите на род *Staphylococcus*. Те са установени при 110 от изследваните преби или 40.4% от тях, като 70.9% (78 изолата) са определени към групата на коагулаза-негативните стафилококи, а 29.1% (32 изолата) към групата на коагулаза-позитивните стафилококки. В 4% (11 изолата) са идентифицирани други 6 таксона, определени като *Trueperella pyogenes*, 3 щама като *E.coli*, и по 1 щам от видовете *Pasteurella multocida*, *Nocardia* spp., *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter* spp. Направен е и обстоен анализ на разпределението на отделните бактериални видове изолирани от ферми, разпределението по случаите на клинични и субклинични мастити, както и в зависимост от броя на соматичните клетки, като за целта е определено точното процентно съотношение.

Резултатите от генетичния анализ на стафилококковите щамове потвърждава презуптивната фенотипна идентификация, респективно по отношение на вида *S. aureus* (32 щама), а по отношение на групата на коагулаза-негативните стафилококки от общо 78 щама, 8 щама (10.2%) са идентифицирани като *S. epidermidis*. Този анализ потвърждава и 100% от определените фенотипно 61 щама като *S. agalactiae*.

Като **втора част** са обособени резултатите от отнасянията на изолираните от млечни преби стафилококки и стрептококки към различни класове химиотерапевтични средства. От всички 110 щама стафилококки чувствителност към оксацилин показваха 95 щама (86.4%), а останалите 15 щама (13.6%) показваха резистентност или интермедиерна чувствителност. Висок процент на съхранена сензитивност, почти 100% (с изключение на един щам) бе доказан спрямо цефалотина (първа генерация цефалоспорини) и (94.6%) спрямо цефокситина (втора генерация цефалоспорини). Напълно е запазена чувствителността на стафилококките (100%) и към аминогликозидния антибиотик гентамицин. По отношение на линкомицина се установява 50% резистентност, а спрямо тетрациклина - 37.3%.

Изследваните 151 стрептококови щама показваха различен профил на резистентност към изследваните химиотерапевтици. По отношение на ампицилина, резистентност се доказва при 37 щама, респективно 24.5%, спрямо цефалотина 36.4% резистентност, 21.9% спрямо еритромицина, 32.5% към гентамицина, 34.4% към рифампицина. Най-висока устойчивост е установена към тетрациклина - 73.5%. От голям научен и практически интерес са данните от видовото разпределение на резистентността по групи химиотерапевтици сред изолираните стафилококови и стрептококови щамове, и техните доверителни интервали. За коагулаза-негативните стафилококи, най-висок процент резистентност се доказва към линкомицин и тетрацилин (64.1% и 41% респ.) като резистентни щамове не са наблюдавани към комбинацията амоксицилин/claveуланова киселина и гентамицин. Щамовете *S. aureus* са резистентни на първо място към ампицилин (43.7%), след това към тетрацилин (28.1%) и линкомицин (15.6%). Най-висок процент на резистентност при щамовете *Streptococcus agalactiae* се наблюдава към тетрацилин (90.2%), след това към гентамицин (70.5%) и цефалотин (57.3%). Щамовете *S. uberis* са най-устойчиви към линкомицин, тетрацилин и рифампицин, съответно 78.8%, 57.7% и 50%, а щамовете *S. dysgalactiae* - към тетрацилин (68.4%), линкомицин (63.2%) и еритромицин. С важно клинично значение са и резултатите от фенотипното определяне на мултирезистентните профили при стафилококите. При 15.4% от мултирезистентните коагулаза-негативни стафилококи се установява наличие на резистентност към бета-лактамните химиотерапевтици и линкомицин, а при 9.4% от коагулаза-позитивните стафилококи мултирезистентните профили се отнасят до бета-лактамите оксацилин, ампицилин, цефокситин и тетрацилин.

Профили на полирезистентност са установени при 29.1% от изследваните стрептококови щамове като най-широкото им разпространение е сред вида *S. agalactiae* - 29.5% и резистентност към цефалотин, гентамицин и тетрацилин (8.2%). При *S. dysgalactiae* с най-голяма честота на разпространение е резистентността към еритромицин, линкомицин и тетрацилин (13.1%), като тази честота е сходна и при *S. uberis* (7.7%) и включва резистентност към еритромицин, линкомицин, цефалотин и тетрацилин.

Генетичният анализ за определяне на *tesA* гена при *Staphylococcus* spp. изолирани от млечни преби при говеда показва, че при коагулаза-негативните щамове, показали резистентност към оксацилин и цефокситин (12 щама резистентни към оксацилин и 3 щама резистентни към цефокситин), 4 щама са носители на *tesA*, а при *S. aureus* са определени 3 щама носители на този ген (3 щама резистентни към оксацилин и цефокситин).

В своята цялост, резултатите от проведените изследвания са илюстрирани с богати на информация таблици и фигури, повечето от които цветни снимки. Дискусията е проведена задълбочено и компетентно в светлината на многобройните литературни данни и получените собствени оригинални резултати.

2.6. Изводи и приноси

Резултатите от дисертационния труд на ас. Николова дават основание на докторанта да изведе 12 извода и 4 потвърдителни приноса, които напълно приемам. Направени са и важни препоръки за практиката, които би следвало да се вземат под внимание при изготвянето на мониторингови програми на резистентността към антимикробните средства по отношение на най-често изолираните от млечни преби бактериални видове, изолирани от говеда.

3. Публикационна активност

Във връзка с дисертациата са публикувани 3 научни труда, от които един е в списание, реферирано в WoS и е с ИФ (ИФ=0,12), а другите 2 статии са в специализирани международни списания, официални издания на Лесотехническия университет – София и на Тракийския университет – Стара Загора. Резултатите са докладвани на 2 научни международни форума, проведени в България. Личният принос на ас. Николова в подготовката и публикуването на научните трудове се отразява от факта, че тя е първи автор във всички публикации и в научните съобщения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е цялостна, логично поставена и прецизно изпълнена работа, с използването на

набор от добре усвоени класически и съвременни методи. В него ясно се открояват редица оригинални научни и потвърдителни приноси по един актуален и важен за микробиологията и епидемиологията въпрос.

С това дисертационният труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ на тема „Проучване на видовия състав и чувствителността към антимикробни средства при бактерийни щамове, изолирани от говеда с клиничен и субклиничен мастит“ отговаря на изискванията на чл.12 от ЗРАСРБ и на ПРАСТрУ, поради което препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да гласуват единодушно с положителен вот за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ на ас. Марияна Петрова Николова по професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина, област на висше образование 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина и научна специалност „Ветеринарна микробиология“.

27.10.2023 г.

София

чл.-кор. Христо

заличено съгл.

чл. 23 от ЗЗЛД

Бр. № В
Дата: 30.10.2023

To the Chairman of the Scientific Jury
determined by order
No. 3252/25.09.2022
of the Rector of Trakia University
Stara Zagora, Bulgaria

REVIEW

on a dissertation thesis for awarding the educational and scientific degree
"Doctor"

Author: assistant professor Mariyana Petrova Nikolova, PhD student of an independent form of education at the Department of "Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic Diseases" of the Faculty of Veterinary Medicine, in the scientific specialty "Veterinary Microbiology", field of higher education 6. Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, professional direction 6.4. Veterinary Medicine.

Dissertation title: "Study of species composition and antimicrobial susceptibility of bacterial strains isolated from cattle with clinical and subclinical mastitis"

Prepared by: Prof. Hristo Miladinov Najdenski, DSci, from the "Stephan Angeloff" Institute of Microbiology at the Bulgarian Academy of Sciences with expertise in infectious microbiology, molecular biology, immunology, epizootiology, experimental animal models.

I declare that there are no conditions for a conflict of interest between me and the candidate assistant Mariyana Petrova Nikolova in the sense of paragraph 1, points 2a, 3, 4 and 5 of the additional regulations of ZRASRB. The dissertation work, abstract and other documents submitted to me for the defense procedure are correctly prepared and comply with the ZRASRB and the Regulations for the Development of the Academic Staff at Trakia University - Stara Zagora.

1. Biographical data of the doctoral student.

Assistant Professor Mariyana Nikolova graduated from Mara Maleeva Medical College in Plovdiv in 1997, and in 2004 from the Faculty of Veterinary Medicine at Trakia University, Stara Zagora. She worked at the Municipal Hospital in the city of Pazardzhik and in the companies "Macropharm" AD and Paragon Trading OOD in the

city of Stara Zagora as a dealer, respectively, medical representative. In 2015, she started working as a Chief Specialist-Medical Laboratory Assistant at the Trakia University, and from 2016 she worked as a Senior Expert-Veterinary Doctor - until October 2019. Subsequently, and until now, she has been an assistant and lecturer in Veterinary Microbiology and Virology at the FVM of the Trakia University.

2. ANALYSIS OF THE DISSERTATION

2.1. Actuality of the PhD thesis

The presented PhD thesis is a large-scale study on one of the significant health problems in dairy cows, namely inflammation of the mammary gland. This issue is of particular relevance not only because of the existing risk for the protection of public health (occurrence of infectious diseases in people such as milk consumers and especially in children), but also because of the real possibility of selection and spread of bacterial strains resistant to different groups chemotherapeutics, which limits their therapeutic effectiveness. That is why the chosen topic of research, the wide range of studied bacterial species, forms of the inflammatory process of the mammary gland, parameters of antimicrobial resistance and the multitude of classic and modern methods for their determination and characterization emphasize the importance of the developed topic and its medical, veterinary, social and economic importance.

2.2. PhD thesis description

The PhD thesis submitted for review complies with the general requirements and is structured in a standard way. Covering a total of 170 pages, it is illustrated with 17 figures and 19 tables. The dissertation has a proportional distribution of individual parts: Introduction - 3 pages, Literature Review - 46 pages, Aim and Tasks - 1 page, Materials and Methods - 18 pages, Results - 30 pages, Discussion - 21 pages, Summary - 1 p., Conclusions – 2 p., Contributions – 1 p., Recommendations for Practice – 1 p., Literature Index - 38 p. List of Publications and Participation in Scientific Forums – 1 p.

A very large number of literary sources are cited in the dissertation, in total 314. The literature reference is up-to-date, which is proven by the fact that the majority of cited publications are from the last 10 years.

2.3. Knowing the problem – evaluation of the literature review

The presented literature review shows the PhD student's good knowledge of the problems of mastitis diseases in dairy cows, their diagnosis, treatment and prevention, the etiological agents associated with inflammation of the mammary gland and their relation to chemotherapeutics, respectively the available resistance to them. A consistent and thorough analysis of the factors affecting the occurrence and spread of bacterial mastitis in cattle farms - environment, milking technique, bedding, udder and foot hygiene, etc., as well as the main bacterial species causing mastitis - *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci, *Streptococcus agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* and others. Serious attention has also been paid to the classification of mastitis and antimicrobial agents for the therapy of bacterial mastitis in cattle, and issues related to their pharmacodynamic and pharmacokinetic characteristics, as well as the target site for inoculation of the respective therapeutic agent, have also been considered. Beta-lactam chemotherapeutics, tetracyclines, aminoglycosides, macrolides, lincosamides, fluorinated quinolones and rifamycins are described in detail. A retrospective review of studies related to antimicrobial exposures and the presence of antimicrobial resistance in bovine mastitis bacteria is skillfully and analytically presented. A good impression is also made of the good knowledge of the nature and mechanisms of antimicrobial resistance, as the genetic determinants and biochemical mechanisms of this phenomenon are described in sufficient detail. The entire literature review is written in a good scientific style and the in-depth knowledge and awareness of Assistant Professor Nikolova are clearly visible. The objectives and tasks of the dissertation are clearly formulated and fully correspond to the analyzes and results presented in the dissertation.

2.4. Materials and methods

The Materials and methods section is developed in detail and in depth. A different set of methods was used in the studies on a total of 8 dairy cattle farms regarding the prevalence of clinical and subclinical mastitis. The clinically conducted rapid mastitis test provides information on the content of somatic cells in milk, and their quantification is carried out using the specialized automated Ecoscope system (Everest-India). Classical microbiological methods were used for the preliminary

identification of the bacteria isolated from the milk samples and the characterization of their morphological features. A set of biochemical methods prove specific characteristics of staphylococci and streptococci - cytochrome oxidase and catalase activities, plasma coagulase, mannitol degradation, esculin hydrolysis, CAMP-factor production, etc. As the final step in the diagnostic algorithm for the phenotypic determination of the strains, the reliable test STREPTO 24test of the company Erba Lachema (Czech Republic) was used. For the phenotypic determination of the susceptibility of microorganisms to antimicrobial agents, the standardized disc-diffusion method and the method for determining the minimum inhibitory concentrations (MIC) or with the commercial E-test were used. The susceptibility of staphylococci was determined to eleven clinically important chemotherapeutic agents, and for streptococcal isolates nine antimicrobial substances were included. qPCR with highly specific TaqMan probes for definitive species identification of staphylococci and streptococci, as well as for the demonstration of the *mecA* gene in methicillin-resistant staphylococci.

2.5. Evaluation of the obtained results

In the first part of the "Results" section, Assistant Professor Nikolova presents the data on the distribution of staphylococcal and streptococcal strains isolated from milk samples from cows in the studied eight farms from different regions of the country for the period 2020-2022. A total of 346 samples were studied, from which 272 bacterial strains were isolated. In the largest number of samples (in total 151), the presence of isolates belonging to *Streptococcus* spp., respectively 55.5%, was demonstrated. Of these, 40.4% (61 isolates) were identified as *S. agalactiae*, 34.4% (52 isolates) as *S. uberis* and 25.2% (38 isolates) were assigned to the species *S. dysgalactiae*. In second place in terms of frequency of isolation are representatives of the genus *Staphylococcus*. They were found in 110 of the examined samples or 40.4% of them, with 70.9% (78 isolates) assigned to the coagulase-negative group staphylococci, and 29.1% (32 isolates) to the group of coagulase-positive staphylococci. In 4% (11 isolates) another 6 taxa identified as *Trueperella pyogenes*, 3 strains as *E.coli*, and 1 strain each of the species *Pasteurella multocida*, *Nocardia* spp., *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* spp. A comprehensive analysis of the distribution of individual bacterial species isolated from farms, the distribution of

cases of clinical and subclinical mastitis, as well as depending on the number of somatic cells, was also made, and for this purpose, the exact percentage ratio was determined.

The results of the genetic analysis of the staphylococcal strains confirmed the presumptive phenotypic identification, respectively with regard to the species *S. aureus* (32 strains), and with regard to the group of coagulase-negative staphylococci out of a total of 78 strains, 8 strains (10.2%) were identified as *S epidermidis*. This analysis also confirmed 100% of the phenotypically determined 61 strains as *S. agalactiae*.

As a second part, the results of the assignments of staphylococci and streptococci isolated from milk samples to different classes of chemotherapeutic agents are distinguished. Of all 110 staphylococcal strains, 95 strains (86.4%) showed sensitivity to oxacillin, and the remaining 15 strains (13.6%) showed resistance or intermediate sensitivity. A high percentage of retained sensitivity, almost 100% (except for one strain) was demonstrated against cephalothin (first generation cephalosporins) and (94.6%) against cefoxitin (second generation cephalosporins). The sensitivity of staphylococci (100%) to the aminoglycoside antibiotic gentamicin is completely preserved. In relation to lincomycin, 50% resistance was found, and in relation to tetracycline - 37.3%.

All the studied 151 streptococcal strains showed a different resistance profile to the investigated chemotherapeutics. With regard to ampicillin, resistance was demonstrated in 37 strains, respectively 24.5%, to cephalothin 36.4% resistance, 21.9% to erythromycin, 32.5% to gentamicin, 34.4% to rifampicin. The highest resistance was found to tetracycline - 73.5%. Of great scientific and practical interest are the data on the species distribution of resistance by groups of chemotherapeutics among isolated staphylococcal and streptococcal strains, and their confidence intervals. For coagulase-negative staphylococci, the highest percentage of resistance was demonstrated to lincomycin and tetracycline (64.1% and 41% resp.) as resistant strains were not observed to the combination of amoxicillin/clavulanic acid and gentamicin. *S. aureus* strains were first resistant to ampicillin (43.7%), then to tetracycline (28.1%) and lincomycin (15.6%). The highest percentage of resistance among *Streptococcus agalactiae* strains was observed to tetracycline (90.2%), then

to gentamicin (70.5%) and cephalothin (57.3%). *S. uberis* strains were most resistant to lincomycin, tetracycline and rifampicin, respectively 78.8%, 57.7% and 50%, and *S. dysgalactiae* strains - to tetracycline (68.4%), lincomycin (63.2%) and erythromycin. The results of the phenotypic determination of multiresistant staphylococci profiles are also of important clinical importance. In 15.4% of multi-resistant coagulase-negative staphylococci, resistance to beta-lactam chemotherapeutics and lincomycin was found, and in 9.4% of coagulase-positive staphylococci, the multi-resistant profiles refer to the beta-lactams oxacillin, ampicillin, cefoxitin and tetracycline.

Profiles of polyresistance were found in 29.1% of the studied streptococcal strains, with the widest distribution among the species *S. agalactiae* - 29.5% and resistance to cephalothin, gentamicin and tetracycline (8.2%). In *S. dysgalactiae*, resistance to erythromycin, lincomycin and tetracycline (13.1%) was the most prevalent, and this frequency was similar in *S. uberis* (7.7%) and included resistance to erythromycin, lincomycin, cephalothin and tetracycline.

The genetic analysis to determine the *mecA* gene in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine milk samples showed that among the coagulase-negative strains that showed resistance to oxacillin and cefoxitin (12 strains resistant to oxacillin and 3 strains resistant to cefoxitin), 4 strains carried *mecA*, and in *S. aureus* 3 were determined the strain carrying this gene (3 strains resistant to oxacillin and cefoxitin).

In its entirety, the results of the research carried out are illustrated with information-rich tables and figures, most of them with color photographs. The discussion has been conducted thoroughly and competently in the light of numerous literature data and own original results obtained.

2.6. Conclusions and contributions

The results of Assistant Professor Nikolova's PhD thesis give the doctoral student a reason to draw 12 conclusions and 4 corroborative contributions, which I fully accept. Important practice recommendations are also made that should be taken into account when designing antimicrobial resistance monitoring programs for the most commonly isolated bacterial species isolated from cattle in milk samples.

3. Publication activity

In connection with the PhD thesis, 3 scientific papers have been published, one of which is in a journal referenced in WoS and has IF (IF=0.12), and the other 2 articles are in specialized international journals, official publications of the University of Forestry - Sofia and of Trakia University - Stara Zagora. The results were reported at 2 scientific international forums held in Bulgaria. Associate Professor Nikolova's personal contribution to the preparation and publication of scientific works is reflected by the fact that she is the first author in all publications and scientific communications.

CONCLUSION: the PhD thesis submitted for review is a complete, logically laid out and precisely executed work, using a range of well-learned classical and modern methods. It clearly highlights a number of original scientific and confirmatory contributions to a current and important issue for microbiology and epidemiology.

With this, the dissertation work for the award of the educational and scientific degree "Doctor" on the topic "Study of the species composition and sensitivity to antimicrobial agents in bacterial strains isolated from cattle with clinical and subclinical mastitis" meets the requirements of Article 12 of the ZRASRB and the Regulations of the Trakia University for implementing the law on academic staff in the Republic of Bulgaria, which is why I recommend the respected members of the Scientific Jury to vote unanimously with a positive vote to award the educational and scientific degree "Doctor" to Assistant Professor Mariyana Petrova Nikolova in the professional direction 6.4. Veterinary medicine, field of higher education 6. Agricultural sciences and veterinary medicine and scientific specialty "Veterinary microbiology".

27.10.2023 г.

Sofia

Prof. Hrist

заличено съгл.

чл. 23 от ЗЗЛД