



СТАНОВИЩЕ

от Проф. Д-р Емма Едмонд Кълеян – Христова, дм

Началник, Лаборатория Микробиология, Вирусология и Болнична хигиена

- УМБАЛ „Лозенец“ - София

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'
профессионален направление 4.3. Биологически науки в област на висшето образование
4. Природни науки, математика и информатика
Докторска програма по **Микробиология**.

Автор: Д-р Гергана Ботева Ленгерова

Форма на докторантурата: редовна

Катедра: Медицинска микробиология и имунология „Проф. д-р Елисей Янев“.
Медицински Университет - Пловдив и секция „Иновативни диагностични методи“ към
Научно-изследователски институт на Медицински университет - Пловдив

**Тема: „Проучване на съвременни микробиологични методи за бърза
диагностика при пациенти с бактериемии и фунгемии“**

Научен ръководител: Доц. д-р Михаил Петров, дм, мзм.

Консултант по статистика: Доц. Ралица Райчева, дм

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният комплект материали на електронен носител е в съответствие с чл.70 (1) от I.Раздел. Придобиване на образователна и научна степен „ДОКТОР“ и научна степен „ДОКТОР НА НАУКИТЕ“ в МУ-Пловдив; Правилник на МУ-Пловдив от 28.01.2021 г. и включва следните документи:

- Заявление до Ректора на МУ-Пловдив за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд
- автобиография в европейски формат с подпись на докторанта
- нотариално заверено копие от диплома за висше образование
- заповеди за записване в докторантурата, за отчисляване с право на защита
- заповед за провеждане на изпит от индивидуалния план и съответен протокол за издържан изпит или докторантски минимум по специалността
- протокол от катедрен съвет за предварително обсъждане на досертационния труд и взетите решения за разкриване на процедура и за състав на научно жури
- дисертационен труд
- автореферат
- списък на научните публикации по темата на дисертацията
- копия на научните публикации
- списък на участията в научни форуми
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи
- други документи, свързани с хода на процедурата

Докторантът е приложил четири публикации.

Бележки и коментар по документите.

Д-р Гергана Ленгерова завършва висше образование по медицина в Медицински университет – Пловдив през 2016 г. От 2017 г е асистент в Катедра Микробиология и имунология „Проф. Д-р Елисей Янев“ на Медицински университет – Пловдив, където е активен участник в многостраницата дейност – учебна, диагностична и научна. За близо 6-годишния период в Катедрата непрекъснато повишава квалификацията си: провежда 6 едноседмични стажове по програма Erasmus – в Латвия, Турция, Германия, Португалия; участва в 3 обучителни курса и лятно училище на ESCMID; участник е в 5 научни проекта. Д-р Ленгерова е член на ESCMID и на национални научни организации: МНД „Асклепий“, СУБ, БАМ, Българско микробиологично дружество, Българско дружество по генетика и геном на човека, и вече е автор/съавтор на 14 публикации и има завидните 50 конгресни участия с доклад или постер.

2. Актуалност на тематиката

Темата на дисертацията е изключително значима и актуална: няма по-важен проблем в Клиничната микробиология от хемокултурелната диагностика, с пряко отношение към прогнозата на пациенти с живото-застрашаващи инфекции на сърдечно-съдовата система. Повече от похвално е, че един млад научен работник се заема с тази нелека и комплексна задача. Акцентът на работата са въвеждането на бързи методи за диагностика, което е от значение за бързата клинична диагноза и назначаването на най-подходящото антибиотично лечение. В допълнение дисертантката обогатява работата с икономически анализ.

3. Познаване на проблема

Литературният обзор, започващ с историческото развитие на проблема, богатата литературна справка, цитираща 375 литературни източника и цялото съдържание демонстрират високата литературна осведоменост и нейното осъзнано прилагане в дисертационната разработка.

4. Методика на изследването

Авторката използва разнообразни методики: наред с класическите методи за изследване на хемокултури: автоматизирано и компютризирано апаратно култивиране и отчитане, последвано от микроскопски и културелен метод, биохимична идентификация и антибиограма; апробира новите методи, ускоряващи микробиологичната диагноза, а именно: два молекуларно-генетични метода за директна идентификация от положителната хемокултура: флуоресцентна *in situ* хибридиизация (FISH) след микроскопски препарат по Грам, и мултиплексна PCR – point of care test BioFire, Biomerieux, France, както и мас-спектрофотометрия MALDI-tof, но освен за биохимична идентификация от колония върху твърда хранителна среда (т.е., след прилагане на културелния метод), и за директно установяване на причинителя от позитивната хемокултура, за което прилага собствен алгоритъм. В допълнение е извършен задълбочен статистически анализ за икономическа и медицинска оценка на новите методи.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертацията е написана на 197 страници и е богато онагледена с 14 таблици и 68 демонстративни и естетически фигури; добавени са и 6 приложения.

След кратко **Въведение** в тематиката, започва **Литературният обзор**, състоящ се 31 страници и запознаващ с инфекциите на кръвта, тяхната етиология, микробиологичните методи за доказването им и описание на методи за бърза диагностика, както и

икономическата им оценка. Следва **формулиране на целта**: да се проучат и оценят диагностичните възможности на бързите микробиологични методи при пациенти с бактериемии и фунгемии от позитивни хемокултури - FISH, MALDI-TOF MS и мултиплексен PCR, и следните **задачи**: 1. Да се установи етиологичната структура на бактериемите 2015-2020 в УМБАЛ „Св. Георги“ - Пловдив, 2. Да се анализира антибиотичната чувствителност на причинителите, 3. Да се апробират методите за бърза диагноза, 4. Да се анализират икономическите им и здравни характеристики, 5. Да се предложи алгоритъм за оптимизиране на хемокултурелната диагностика.

В раздела **Материали и методи**, общо 11 страници, методите за бърза диагностика: Молекулярно-генетични методи, мултиплексен PCR, Флуоресцентна *in situ* хибридиизация и чрез QuickFISH BC тест, и MALDI-TOF MS, са описани на 3 страници.

Разделът **Резултати** е диференциран съответно на поставените задачи и обхваща 65 стр., в които са коректно описани получените резултати, по правило се съпоставят с международния и /или национален опит, както и са придружени от кратко обсъждане/интерпретация. От постъпилите за изследваие 10 173 хемокултури, по 1 за пациент (от хемокултурелен сет), положителни са 3166 (31.1 %), като се регистрира нарастване на броя им по години. Относителният дял на Грам (+) бактерии е 68.9 %, на Грам (-) – 28.4 %, а на медицински значимите гъбички – 2.7 %. Водещи изолати са съответно CONS, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*. Табл. 6 на стр. 62 от дисертацията илюстрира богатото разнообразие на изолирани причинители, идентифицирани с MALDI-tof. Антибиотичната чувствителност на изолатите, както се очаква, е значително редуцирана, особено при пациенти от интензивно отделение (КАРИЛ). Проблемната антибиотична резистентност при Грам (+) микроорганизми е както следва: MRSA – 19.2 %, PNSSP – 68.6 %, VRE – 4.5 %, като едва 25.1 % от ентерококите са чувствителни на ciprofloxacin. При Грам (-) бактерии над 80 % от *Klebsiella* spp и *Enterobacter* spp са ESBL – продуценти, в допълнение, *Klebsiella* spp са устойчиви на карбапенеми в 17.7 %. Чувствителни на тегрепенем са едва 4.5 % от *Acinetobacter baumannii*. Особено внимание заслужава частта с апробираните нови методи, където участват по 72 пациента. Прилагането на технологията FISH установява: при 10 (15.9 %) от изследваните хемокултури - *Staphylococcus aureus*, при 20 (31.6%) – CoNS, при 4 (6.4 %) - *Enterococcus faecalis* и при 4 (6.4 %) - *Enterococcus faecium*. От Грам (-) микроорганизми се идентифицират: *Escherichia coli* (n=7; 11.1 %), *Pseudomonas aeruginosa* (n=6; 9.5 %) и *K. pneumoniae* (n=5; 7.9 %), а от медицински значимите гъбички - *C. albicans* (n=4; 6.4 %) и *Candida parapsilosis* (n=2; 3.2%). Другият бърз метод за директно идентифициране от хемокултури – mPCR- доказва типични причинители на бактериемии при 65 (90.3 %) от хемокултурите, а при останалите 7 (9.7 %) с класическите методи се установяват *Corynebacterium* spp., *Kocuria* spp., и други, които не участват в хемокултурелния панел. Авторката, ръководена от опитен статистик, провежда икономически и здравен анализ на използването на бързите методи. Групата пациенти с бързи тестове се сравнява с групата пациенти с рутинни тестове, като леталитетът в двете групи е еднакъв ($z=0.1$, $p=0.942$). Подобно, преките и непреките разходи в двете групи не са статистически значими, в т.ч. и разходите за терапия. Оказва се, обаче, значима разлика по отношение на клиничните пътеки, което дава повод за диференциране по тежестта на състоянието и последиците. Медианата на леглодните на пациентите в много тежко състояние със смяна на антимикробното лечение и използван бърз метод е 25.5 дни срещу 34 дни престой на пациенти със стандартно културелно изследване. Разликата от 10.5 дни допринася за спестяване на около 12 500 лева. Медианата на разходите за лечение в групата пациенти с бързи тестове е 27 809.20 лв., а при тези с рутинното изследване - 40 234.58 лв. за пациентите с културелно изследване, с разлика 12 425.38 лева. При анализиране на индиректните разходи се установяват: най-ниски разходи за групите пациенти, диагностицирани с FISH (19 388.80 лв.) и mPCR (22 781.84 лв.), следвани от MALDI-TOF MS (27 144.32 лв.) и културелно изследване (32 960.96 лв.). На база на тези данни е изработен оптимизиран алгоритъм за диагностика.

В раздела **Обсъждане**, на 27 стр., се анализира нарастването на хемокултурелните изследвания по години, разпределението по пол и възраст, динамиката на антибиотичната резистентност, с многобройни сравнения с международната литература, и разбира се,

значението на бързите методи. Коментира се, че флуоресцентната *in situ* хибридизация (FISH), която ускорява идентифицирането на най-честите бактерии и дрождеподобни гъбички, причинители на бактериемия/фунгемия – 10 вида, показва 100 % съвпадение с конвенционалните методи, и бива категоризирана като полезно допълнение към рутинните методи с цел бърза идентификация. По отношение на FilmArray Blood culture mPCR високата цена на панела (около 350 лв.) е от една страна, но от друга е бързият и надежден тест за откриване на чести причинители на инфекции директно от положителни хемокултури, съкрашавайки времето за идентификация до 70 минути, с чувствителност на метода 90.1%. С много висока оценка е MALDI-TOF MS, чрез който авторката успява да намали времето за идентификация на бактериите и медицински значимите гъбички до няколко минути, с висока чувствителност (94.4 %) и възможност за доказване на над 2000 микроорганизма, и с намаляването на разходите в пъти в сравнение с конвенционалното изследване и генното секвениране. За пациентите, диагностицирани с бързи тестове, се установява около два пъти повече прицелна антибиотична терапия и те са с два пъти по-висок разход за лечение. Авторката обобщава, че „ключов елемент за ефективно управление на заболяването е идентификацията и оптимизацията при избора на пациенти, подходящи за диагностициране с бързи тестове“.

На 1 страница са описани **Ограничения** на проучването, на 2 стр.– **Заключение, Изводи** – 1 стр. и **Приноси** – 2 стр. Основният извод е, че проучените три метода (FISH, mPCR, MALDI-TOF MS) при тежко болни пациенти имат предимства пред конвенционалните чрез скъсяване на времето за идентификация, и оттам – за прецизното антибиотично лечение, намаляват болничния престой и съответно – икономическите разходи. Приносите определено имат научен и научно-приложен характер: те са свързани с апробирането на 3 най-съвременни метода за бърза диагноза и съпътстващите ги ползи и преимущества за пациентите и здравните заведения и в този смисъл са принос към световната наука. От друга страна, получени са и ценни данни, свързани с динамиката и епидемиологичния мониторинг на хемокултурите: относно етиологичния спектър и нарастващата антибиотична резистентност на изолатите (в България отсъстват задълбочени проучвания през последните години).

Следват разделите **Литература** с 375 източника и **Приложения** – Алгоритми и Фиш за изследване.

6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Д-р Ленгерова, макар и млад научен работник, е със завидна публикационна активност. Тя е първи автор в 3 и втори автор в 1 от общо представени 4 публикации в реферирани списания (IF Macedonian J of Med Sci₂₀₂₂: 1.117; IS Folia medica₂₀₁₉ 0.799, SJR J of IMAB 2021 8.039). И 4-те публикации са свързани с бързи методи за хемокултурелна диагностика, от които 3 апробират точно 3-те бързи метода, обект на дисертацията. Първи автор е и в 2 участия на международни конференции на английски език: 10th и 11th South-East European Conference On Chemotherapy, Infections And Cancer, 2019 и 2021 г. От 11 участия на национални форуми, в 10 е първи автор и в 1 – втори. Участва в 2 национални научни проекти и е водещ изследовател в един институтски: 2018 г.: „Сравнително проучване върху микробиологични методи за бърза диагностика на патогени от хемокултури“ с Ръководител: Доц. д-р М. Петров.

В рубриката „Критични забележки и препоръки“ имам 1 критична бележка: относно ролята на изолираните CoNS от хемокултури на тежко болни пациенти, която се дискутира в дисертацията, но не е взета под внимание експертната препоръка на CDC и други водещи експерти, че са клинично значими при ≥ 2 отделни изолирания на идентичния щам. Препоръката ми е да се направи тази корекция и богатият материал от дисертационния труд да се популяризира, вкл. да се публикува в авторитетни международни издания. И още 1 малка забележка: да не се ползват чуждици (патогени, имплементиране, инхибиция, микродилуционен, регионална и др.), при наличие на подходящи български термини.

7. Автореферат

Авторефератът е написан на 59 страници и следва точно разделите на дисертацията. Написан е според изискванията, на разбираем език, онагледен с необходимите таблици (5 бр.) – и фигури (39 бр.). Приложени са основните разработените алгоритми.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд *съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в Клиничната микробиология и в най-значимата ѝ част – хемокултурелната диагностика* (както в науката, така и в национален машаб) и **отговаря на всички** изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на МУ - Пловдив. Представените материали и дисертационни резултати **напълно** съответстват на специфичните изисквания, приети във връзка с Правилника на МУ – Пловдив за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че докторантката Д-р Гергана Ленгерова **притежава** задълбочени теоретични познания и професионални умения по научна специалност Микробиология, вкл. владее най-съвременни молекуларно-генетични диагностични методи като хибридиционен анализ FISH, мултиплексен PCR point of care test, както и метод от протеомиката – MALDI-tof. Тя **демонстрира убедително** качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване, показано с извършването на такова комплексно изследване, включващо 6-годишен мониторинг на хемокултурите в голяма университетска многопрофилна болница, въвеждане на 3 различни типа бързи методи за диагностика, свързани с оптимизиране на изхода от заболяването и икономическата им и медицинска оценка, както и с апробирането на собствени алгоритми.

Убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жюри да присъди заслужено образователната и научна степен 'доктор'** на д-р Гергана Ботева Ленгерова в докторска програма по Микробиология.

Заличено на основание

Чл.5 §1, б. "В" Регламент (ЕС)2016/679

7. 12. 2022 г.

Изготвил становището:

Проф. Д-р Емма Кълеян, дм