



UNIwersytet Medyczny w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej

ul. dr W. Chodźki 1, 20-093 Lublin; tel. (fax) 81-448-71-00

Lublin, 14 kwietnia 2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej pt.: „Zastosowanie zmodyfikowanej metody cytometrii przepływowej do analizy wybranych elementów morfotycznych w moczu.”, wykonanej przez Panią mgr anal. med. Magdalenę Szmulik, przygotowana na zlecenie Rady Naukowej Wojskowego Instytutu Medycyny Lotniczej w Warszawie

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska **mgr anal. med. Magdaleny Szmulik** dotyczy zastosowania i porównania przydatności technik diagnostycznych opartych na cytometrii przepływowej i realizowanych z użyciem dwóch różnych cytometrów do analizy próbek moczu w oparciu o oznaczenie występowania i liczby wybranych elementów morfotycznych (w tym krwinek białych i czerwonych, bakterii, grzybów drożdżopodobnych). Rozprawę doktorską wykonano pod kierunkiem dr hab. n. med. Agnieszki Woźniak-Kosek w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej WIM-PIB Wojskowego Instytutu Medycyny Lotniczej w Warszawie.

Ocena układu rozprawy

Rozprawa stanowi zwarte opracowanie liczące łącznie 176 stron tekstu, składające się z dziesięciu numerowanych rozdziałów z podrozdziałami, wśród których zostały umieszczone: Wykaz Używanych Skrótów (3 strony), następnie Spis treści (3 strony).

Kolejną część pracy stanowi wstęp (27 stron), Założenia i cel pracy (2 strony), Materiał i metody (18 stron), Wyniki (71 stron), Omówienie wyników i dyskusja (9 stron, w tym wnioski), Streszczenie w języku polskim i angielskim (po 4 strony). Po streszczeniach został podany spis tabel (6 stron) i rycin (9 stron) oraz „Piśmiennictwo”, zawierające 100 pozycji (12 stron).

We Wstępie omówione zostały problemy związane ze stosowaniem podczas analizy moczu, różnych technik diagnostycznych oraz koniecznością wprowadzania nowych rozwiązań, w tym technik opartych na cytometrii przepływowej, ich dostępnością i praktycznym wykorzystaniem. Zebrane zostały informacje na temat analizatorów oraz możliwości, jakie stwarzają automatyzacja procesu diagnostycznego, różne konfiguracje i modyfikacje zarówno sprzętu, oprogramowania jak i stosowanych odczynników oraz procedur diagnostycznych. Wyjaśnione zostały zasady

odczytywania i prezentowania wyników, ich analizy oraz interpretacji i możliwości praktycznego zastosowania w diagnostyce laboratoryjnej. Wątpliwości budzi umieszczenie w tej części bardzo technicznych wiadomości skupiających się na prezentowaniu analizatorów, szczegółach ich budowy, sposobu uzyskiwania i gromadzenia danych oraz ich analizy i interpretacji, prezentowaniu otrzymywanych wyników. Bardziej słusznym wydawałoby się ich umieszczenie w części „Materiał i metody”.

W części „Założenia i cel pracy” sformułowane zostały założenia i cele badawcze oraz hipotezy główna i szczegółowe. Zaskakującym jest, że hipotezy zostały przedstawione w formie pytań. W części „Materiał i metody” podano informacje na temat wykorzystywanych w badaniach analizatorów i odczynników oraz sposobu liczenia elementów morfotycznych, obrazowania oraz interpretacji wyników. Opisane zostały również metody hodowlane wykorzystywane w rutynowej analizie moczu w celu określenia zakażenia układu moczowego (ZUM).

W rozdziale „Wyniki” przedstawiono w różnych konfiguracjach dane otrzymane w wyniku analizy 1131 przypadków, w tym 680 pochodzących od kobiet oraz 451 od mężczyzn. Część określona jako „Omówienie wyników i dyskusja” jest bardzo krótka (9 stron) i zawiera bardzo mało elementów dyskusji. W tej części zawarte zostały również wnioski, które moim zdaniem jako bardzo ważna część każdej pracy naukowej, powinny być ujęte jako niezależny i wyraźnie oznaczony rozdział dysertacji. Tym bardziej, że przedstawione w rozprawie dane i przeprowadzona analiza porównawcza mają znaczenie praktyczne, szczególnie w odniesieniu do procedur diagnostycznych i terapeutycznych.

Ocena przedstawionych danych

Rozprawa doktorska dotyczy oceny przydatności i potencjału laboratoryjnego związanego z wykorzystywaniem dwóch rodzajów cytometrów i metod oceny, w tym ilościowej, występowania wybranych elementów morfotycznych w moczu - obrazowania cyfrowego po wcześniejszym ogniskowaniu hydrodynamicznym oraz fluorescencyjnej cytometrii przepływowej. Głównym celem prowadzonych badań była ocena przydatności zmodyfikowanych technik cytometrii przepływowej w analizie moczu i możliwości skróceniu czasu uzyskania wyniku pozwalającego na ocenę stanu pacjenta pod kątem zakażeń układu moczowego i chorób nerek. Choroby te, mogące mieć przebieg objawowy lub bezobjawowy, należą do najczęściej występujących w różnych grupach wiekowych, zwłaszcza u małych dzieci.

W badaniach porównywano wyniki analizy próbek moczu pod kątem występowania w nim i liczby elementów morfotycznych takich jak leukocyty (WBC) i erytrocyty (RBC) w korelacji z liczbą komórek bakterii. Porównywano dane otrzymane dla tych samych próbek moczu, pochodzące z

analizatora UF-4000 (Sysmex, Kobe, Japonia) z oprogramowaniem do analizy i interpretacji wyników U-WAM tej samej firmy oraz analizatora Iris iQ@200 ELITE/VELOCITY iChem (IRIS Diagnostics, Beckman Coulter, USA), złożonego z podjednostki IRIS VELOCITY iChem służącej do analizy biochemicznej moczu i podjednostki Iris iQ@200 ELITE wykorzystywanej do analizy mikroskopowej moczu oraz oprogramowania APR tej samej firmy, automatycznie rozpoznającego cząstki (ang. *Auto Particle Recognition*). W przypadku obydwu cytometrów najważniejsze różnice dotyczyły budowy analizatorów, wykorzystywanych odczynników i metod analizy oraz sposobu obrazowania wyników. Analizy porównawcze dotyczyły użycia metody obrazowania cyfrowego po wcześniejszym ogniskowaniu hydrodynamicznym (element zmodyfikowanej metody cytometrii przepływowej) oraz metody fluorescencyjnej cytometrii przepływowej. Praktycznym celem badań prowadzonych przez mgr Magdalenę Szmulik była ocena możliwości zastosowanie obydwu analizatorów i cytometrii przepływowej do skrócenia czasu potrzebnego na potwierdzenie ZUM w porównaniu ze znacznie dłużej trwającymi procedurami opartymi na klasycznych metodach hodowlanych.

Autorka w pracy przedstawiła dane otrzymane z wykorzystaniem techniki cytometrii przepływowej na temat występowania elementów morfotycznych i upostaciowanych w próbkach moczu pobranych od pacjentów. Dane te zostały bardzo szczegółowo opracowane i przedstawione w formie tabelarycznej, na rycinach i schematach.

W części „Omówienie wyników i dyskusja” Autorka wskazuje na konieczność modyfikowania i udoskonalania metod diagnostycznych, zwłaszcza w świetle nowych lub ciągle zmieniających się zagrożeń, w tym mikrobiologicznych, i wzrostu znaczenia metod nieinwazyjnych, w tym umożliwiających otrzymywanie wyników w bardzo krótkim czasie, w diagnostyce chorób infekcyjnych i zmian wywoływanych w organizmie pacjenta przez mikroorganizmy. W ocenie tej istotne jest określenie ilościowe i jakościowe występowania np. krwinek białych i czerwonych, nabłonków, wałeczków, kryształków i innych form upostaciowanych oraz bakterii czy grzybów, głównie drożdżaków. Zarówno sama ocena jak i interpretacja otrzymywanych danych wymagają standaryzacji, określenia wartości referencyjnych, szczególnie w świetle obowiązujących norm i rekomendacji, oraz umiejętności manualnych i dużego doświadczenia diagnosty. Udoskonalanie tych technik prowadzi do coraz lepszej diagnostyki tego materiału klinicznego i wzrostu znaczenia otrzymywanych danych, oraz redukcji popełnianych podczas pracy błędów przedanalizycznych i analitycznych.

Wyniki opublikowane przez Doktorantkę wskazują, że metody oparte na cytometrii przepływowej mogą uzupełniać standardowe procedury analizy moczu i stanowić dopełnienie technik manualnych, zwłaszcza w początkowych etapach, gdy potrzebny jest szybki wynik w celu wdrożenia terapii. Są one jednocześnie interesującą alternatywę wobec manualnych metod oceny

różnych parametrów możliwych do określenia w moczu i świadczących o toczącym się procesie zapalnym lub chorobowym. Dotyczy to także elementów morfotycznych, w tym krwinek i drobnoustrojów – bakterii i grzybów, co umożliwia wykorzystywanie technik opartych na cytometrii przepływowej do zwiększania dokładności i szybkości oznaczeń.

Uważam, że oceniana praca wniosła bardzo dużo danych i praktycznych informacji. Szacunek budzi liczba próbek analizowanych z użyciem cytometrów, starania, aby dopracować kryteria oceny otrzymywanych danych i interpretacji wyników w odniesieniu do klasycznych metod mikrobiologicznych, w tym hodowlanych. Badania były szeroko zaplanowane, pracowite, o istotnej wartości poznawczej i praktycznej. Próby ustalenia korelacji pomiędzy np. liczbą białych i czerwonych krwinek i liczbą komórek bakterii i grzybów w odniesieniu do potwierdzenia występowania ZUM zasługują na szczególną uwagę ze względu na szereg trudności i problemów, jakie stają przed diagnostami i lekarzami, zwłaszcza, gdy szybko przekazane i wiarygodne wyniki analiz pozwalają na dobór i wdrożenie odpowiedniej terapii. To z kolei przekłada się na tempo powrotu pacjenta do zdrowia, czas jego pobytu w placówkach szpitalnych i stosowania różnych leków, a tym samym na koszt leczenia. Ma to jeszcze większe znaczenie w przypadku pacjentów pediatrycznych, gdzie zmiany mogą następować bardzo szybko i często, ze względu na niespecyficzny czy skąpoobjawowy przebieg, mogą się wiązać z powikłaniami i stanowić zagrożenie nawet dla życia dziecka. Z tych względów dysertację doktorską oceniam jako wartościową i cenną.

Uwagi

W trakcie czytania rozprawy zauważyłam pewne braki i nieścisłości oraz błędy edytorskie, stylistyczne, interpunkcyjne, drobne pomyłki czy niezręczności językowe, w tym:

- W ocenianej pracy Autorka poświęciła za mało uwagi na scharakteryzowanie, w odniesieniu do aktualnie obowiązujących zaleceń i wytycznych, pozwalających na sklasyfikowanie zakażeń układu moczowego i nerek w różnych grupach wiekowych, zwłaszcza u dzieci, i oznaczenie bakteriurii, w tym znamiennej. Jest to bardzo ważny problem w kontekście poszukiwania nowych, dokładnych metod diagnostycznych.
- Ważnym elementem diagnostyki ZUM, w tym także opartej na punktach odcięcia cut-off, jest ocena liczby mikroorganizmów zdolnych do namnażania (znamienne miano), ponadto ich przynależność gatunkowa i aktywność metaboliczna oraz od kogo pochodził materiał diagnostyczny (wiek pacjenta, zwłaszcza w przypadku dzieci; płeć; niektóre stany fizjologiczne, np. ciąża; oraz niektóre grupy pacjentów) i w jaki sposób został pobrany (środkowy strumień czy cewnikowanie, ewentualnie nakłucie nadłonowe). Przyjęte dla celów pracy kryteria odcięcia w odniesieniu do metod hodowlanych moim zdaniem były zbyt ogólne (jednakowe dla kobiet, w tym

ciężarnych, i mężczyzn), a liczba wykonanych oznaczeń mikrobiologicznych z posiewami materiału diagnostycznego mała, co mogło wpłynąć na liczbę potwierdzonych przypadków ZUM w obydwu grupach. Dopracowania wymagają również algorytmy, w oparciu o które kwalifikowano podejrzenie ZUM z różną swoistością i dokładnością. Jest to istotne, tym bardziej, że w przypadku analizy moczu znaczenie ma nie tylko ocena ogólnej liczby komórek bakterii czy grzybów, ale również liczby komórek określonego gatunku w odniesieniu do pochodzenia materiału diagnostycznego. Niemniej połączenie danych analitycznych i mikrobiologicznych oraz odpowiednie dopracowanie procedur wydaje się być bardzo interesującym kierunkiem poszukiwań nowych rozwiązań diagnostycznych.

- Wynik analizy materiału klinicznego powinien być podawany w przeliczeniu na określone wartości (np. procentowe lub jednostki). Uważam, że w przypadku ocenianej pracy, dla zachowania standardów raportowania wyników badań diagnostycznych oraz dla dobra pracy i unikania niejasności, Doktorantka mogła wprowadzić określenie jednostki miary dla liczonych elementów, np. „jednostka/ μ l; jtk/ μ l”. Nie jest jednoznacznym zapisanie liczby komórek bakterii w formie np. 2100/ μ l. W części Metodyka lub „Wyniki” Doktorantka mogła wskazać, że pod określeniem „jtk/ μ l” kryje się np. liczba RBC, liczba WBC, liczba komórek bakterii, liczba komórek grzybów itd. Ten zapis pozwoliłby na ujednolicenie sposobu prezentowania otrzymywanych danych oraz ułatwił opisywanie parametrów w tabelach czy osi na wykresach, czego również zabrakło.

- Często używane są skróty myślowe typu „zasady pomiaru analizatora A” (bardziej dokładne byłoby określenie np. „zasady pomiaru z użyciem analizatora A”), „wynik RBC czy WBC” , „ocena bakterii” (równie dobrze może to oznaczać ocenę liczby bakterii, ocenę ich cech fenotypowych lub właściwości biochemicznych, a nie liczby bakterii). Określenie „liczenie bakterii” w dysertacji naukowej powinno być bardziej ścisłe, tym bardziej, że w przypadku analizy materiałów biologicznych i organizmów żywych, wyrażenie to może oznaczać zarówno liczenie pojedynczych komórek bakterii, liczenie żywych i aktywnych metabolicznie komórek bakterii lub komórek nieaktywnych metabolicznie, martwych, albo może obejmować wszystkie te formy jednocześnie. Podobnie określenie „ocena bakterii” (np. s. 20) nie pozwala jednoznacznie przyjąć, czy chodzi o liczbę komórek, czy o cechy komórek bakterii, a może jedno i drugie (np. z podziałem na bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne)?

- W całej pracy i bardzo często używane jest słowo „ilość” w odniesieniu do czegoś, co jest policzalne i z tego względu powinno być określane jako „liczba”, np. cząstek, jednostek, komórek (np. „Wszystkie dane przedstawiono jako ilość na μ l,” „wyniki elementów upostaciowanych np. bakterii jako ilość komórek w mikrolitrze,...”). Określenia typu np. „...ocena bakterii...”,

- „...wartości krwinek...”, „wyniki elementów morfotycznych...”, odnoszą się do oceny liczby (nie „ilości”) komórek bakterii czy liczby (nie „wartości” lub „wyników”) krwinek.
- Bardzo często w pracy używane jest określenie „drożdże” w odniesieniu do grzybów drożdżopodobnych (drożdżaków), takich jak np. *Candida* spp. Termin „drożdże” przynależny jest grzybom o znaczeniu gospodarczym i przemysłowym, do których należą tzw. drożdże szlachetne, czyli odmiany i szczepy hodowlane z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* (drożdże piwowskie, winiarskie, gorzelnicze i piekarniane), oraz niektóre gatunki grzybów niedoskonałych.
 - W pracy nie ujednolicono terminologii i sposobu pisania nazw czy symboli, co bardzo utrudnia zrozumienie i analizę wielu fragmentów tekstu. Co innego oznaczają słowa technika i metoda badawcza i nie można ich stosować zamiennie ani jako synonimy. Mylące jest opisywanie analizatorów i metod tymi samymi symbolami, np. literą „A” (lub nie wiadomo z jakich powodów małą literą „a”) albo B. Ponadto, używanie, zwłaszcza w tytułach i podtytułach, podobnie jak w spisie treści, wyrażen „analizator A” i „...B” (lub urządzenie A, B) jest nieprecyzyjne, ponieważ nie określa, jakiego urządzenia dany symbol dotyczy, i zmusza czytelnika do poszukiwania bardziej precyzyjnych informacji w treści pracy.
 - Zastanowienie budzą wyrażenia typu „przedstawiające wyniki elementów...”, czy „zestawiając je na szczegółowej liście wyniku” (jeden wynik nie może stanowić podstawy do skonstruowania listy). Nie jest jednoznacznym określenie „rozkład liczbowych wyników RBC”, „ocena WBC i BACT”, „lepszą dokładność” i podobne.
 - Bardzo różnie, nawet na tej samej stronie, opisywano np. bakterie Gram-dodatnie - m.in. jako G(+), G (+), gram dodatnie, Gram dodatnie, Gram (+), lub G+, gram +, itd. Podobnie opisywano bakterie Gram-ujemne.
 - W niektórych przypadkach sugeruję połączenie danych z kilku tabel w jednej (np. tabela 18 i 19, tabela 27 i 28, tabela 55 i 56, itd.). Zastrzeżenia budzi obserwowany pod niektórymi tabelami brak wyjaśnień, co oznaczały użyte symbole lub skróty, albo użycie języka angielskiego, podczas gdy podstawowym językiem pracy jest język polski (np. tabela 76 – symbol * i język angielski).
 - Niektóre informacje, jak np. treść komunikatów zaprogramowanych celem wykonania badania, powinny być umieszczone w podrozdziale „Metody”.
 - Osie wykresów nie zostały zaopatrzone w tytuły ani opisane, co utrudnia interpretację przedstawianych na nich danych. Nie jest możliwe, aby, po wydzieleniu z tekstu, zarówno ryciny jak i wykresy czy tabele mogły być analizowane ze zrozumieniem jako odrębne części.
 - W „Materiałach i metodach”, obok nazw odczynników powinien być podany producent, nawet jeśli są one przypisane do określonego analizatora. Podobnie w odniesieniu do fragmentu (s. 23) „, operator ma dostęp do tzw. „Research Info”..” – powinno być podane źródło, skąd pochodzi ta baza (np. strona internetowa).

- Praca doktorska nie zawiera dyskusji jako odrębnego rozdziału, natomiast część „Omówienie wyników i dyskusja” została oparta w dużej mierze na podsumowaniu otrzymanych wyników, podczas gdy rzeczywista dyskusja jest bardzo krótka i nie wyczerpuje .

- Duże zastrzeżenia budzi sposób cytowania publikacji i opracowań oraz ich spis w części „Piśmiennictwo”. Wielokrotnie pozycje literaturowe, na które powołuje się Autorka, nie zostały oznaczone w tekście numerem, pod którym są umieszczone w „Piśmiennictwo”, co utrudnia szybkie ich odnalezienie oraz konfrontację z tym, co już istnieje, a co recenzowana praca wnosi nowego i istotnego na konkretny temat (np. s. 11 – doniesienie Moldavana, s. 136 – Oyaert i wsp., s. 137 Haugun K i wsp., s. 138 – Duyeal Song, itp.).

- Dopracowania wymaga część „Piśmiennictwo”, w której nie zachowano jednolitych zasad cytowania pozycji literaturowych (m.in. na początku cytowania znajduje się albo nazwisko, albo skrót imienia pierwszego autora, różny jest sposób pisania tytułów czasopism, stron i roku wydania, dowolnie zostały zastosowane znaki interpunkcyjne, itd.).

- Uważam, że cennym materiałem dodatkowym, który można było umieścić na końcu dysertacji, byłyby instrukcje (pełne lub skrócone) producentów analizatorów użytych do badań, ponadto certyfikaty czy protokoły lub świadectwa walidacji.

Ogólny wniosek

Uwagi, które zostały przedstawione w treści recenzji rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Szmulik, nie pomniejszają merytorycznej oceny dysertacji ani praktycznego znaczenia przedstawionych wyników i szacunku dla pracy, jaka została włożona w ich uzyskanie. Opiniowana dysertacja stanowi ważne zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia opracowanie zagadnienia naukowego i praktycznego jego wykorzystywania w diagnostyce moczu. Ze względu na konieczność standaryzacji nowych metod diagnostycznych oraz ich przydatność kliniczną i potencjalne zastosowanie w opracowaniu procedur diagnostycznych opartych na aktualnej wiedzy i możliwościach technicznych, badania te zasługują na uwagę i powinny być kontynuowane.

Podsumowanie

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Magdaleny Szmulik, odpowiada warunkom określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 15 września 2017 r., poz. 1789 z późn. zm.). **Wobec powyższego zwracam się do Rady Naukowej Wojskowego Instytutu Medycyny Lotniczej w Warszawie o dopuszczenie pani mgr anal. med. Magdaleny Szmulik do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.**