

Srovnání analýzy močového sedimentu pomocí dvou různých technologií: průtoková cytometrie vs. digitální snímání částic

M. Pechová

ÚVOD:

Analýza močového sedimentu má rozhodující význam v diagnostice řady rozličných onemocnění ledvin a močových cest. Je důležitá zejména pro posuzování funkce ledvin, ale i jiných orgánů (jater, pankreatu atd.). Přesná analýza močového sedimentu a správné zařazení jednotlivých elementů jsou klíčové pro diagnostiku např. hematurie, cystitidy, urolitiázy, nefrotického syndromu, proteinurie, chronické renální insuficience, nefritidy, pyelonefritidy a dalších onemocnění, ale i v průběhu monitorování pacienta po chemoterapii nebo v případě posouzení stavu dehydratace organismu.

Močová laboratoř Oddělení klinické biochemie FN Olomouc provádí chemickou analýzu spolu s analýzou močového sedimentu pomocí analyzátorů Arkray Aution Max a iQ 200 firmy Iris Diagnostics (dodavatel Medista), které jsou integrovány v jedné lince. Analyzátoři pracují v nepřetržitém provozu 24 hodin. Denně je v močové laboratoři zpracováno kolem 200 – 250 vzorků.

CÍL STUDIE:

Cílem studie bylo porovnat analýzy močového sedimentu na analyzátořech pracujících na rozdílných principech. Prvním analyzátořem, na němž byla studie provedena, je v naší laboratoři rutinně používaný analyzátor pro kompletní analýzu močového sedimentu iQ 200 firmy Iris Diagnostics, založený na principu digitálního snímání částic. Druhým srovnávaným analyzátořem byl UF-1000i zapůjčený firmou SYSMEX, založený na principu průtokové cytometrie.

Vzorky o velmi malém objemu, nehomogenní vzorky, vzorky s viditelnou hematurií či makroskopickými strukturami bakteriálních kolonií nevkládáme do přístroje, ale prohlédneme klasickou mikroskopií.

METODIKA:

Specifikace přístrojů

Analýzátor iQ 200 – společně s chemickým močovým analyzátořem **Arkray Aution MAX AX-4280** (AAM) je schopen provést kompletní močovou analýzu vzorku. Oba analyzátoři firmy Iris Diagnostics jsou vybaveny čtečkami čárových kódů. Součástí analyzátoru iQ 200 je mikroskopický modul, podavač vzorků, PC Analysis Processor a PC Results Processor a již zmiňovaný chemický močový analyzátor. Pro kompletní analýzu vzorku je třeba 4 ml vzorku moče (2 ml pro AAM, 2 ml pro iQ 200) – aspiruje 0,95 ml. Za hodinu je schopen vyšetřit až 60 vzorků. Nespornou výhodou je fakt, že vzorky moče jsou nativní, tedy bez centrifugace a barvení. Analyzátor je schopen rozlišit 12 typů částic: *Erythrocyty* (RBC), *Leukocyty* (WBC), *Epitelie* (EC) – dlaždicové, *Válce* (CAST) – hyalinní a ostatní, *Bakterie* (BACT), *Krystaly* (X TAL), *Malé kulovité částice – ostatní epitelie* (SRC), *Hlen* (MUCUS), *Spermie* (SPERM) a *Artefakty* (ART). Mikroskopický modul analyzátoru pracuje na principu digitálního snímání částic. Vzorek je po průchodu chemickým močovým analyzátořem dopraven do mikroskopického modulu iQ 200, kde je aspirován jehlou do planární průtokové květy. Tam je přidán speciální roztok *LAMINA*, který polohuje částice do ohniska CCD kamery, pomocí níž probíhá digitální snímání částic vzorku – na jeden vzorek připadne 500 snímků. APR (Auto Particle Recognition) software jednotlivé částice porovnává s uloženou databází na základě velikosti, tvaru a struktury do jedné z 12 kategorií. Výstupem analýzy jsou snímky částic v jednotlivých kategoriích a vyjádření jejich koncentrace ve vzorku (počet/ μ l nebo arbitrární jednotky). Výhoda analyzátoru spočívá v možnosti dodatečného vyhodnocení výsledků na obrazovce (odpadá nutnost manuální mikroskopie) – *reklasifikace částic*. Analyzátor pracuje se dvěma typy kontrolního materiálu (četnost: 1x za 24 hodin): *iQ positive* (roztok stabilizovaných lidských erytrocytů) a *iQ negative control*, což je roztok bez měřitelných částic. Pro zaostření a kontrolu měřicího systému používá roztok iQ Focus. Kalibrace je prováděna pomocí kalibrátoru *iQ Calibrator* jednou měsíčně.

Analýzátor UF-1000i od firmy Sysmex je plně automatizovaný močový analyzátor, jenž pracuje na principu průtokové cytometrie. Kapacita analyzátoru je 100 vzorků/hodinu a analýza vzorku trvá přibližně 1 minutu. Je schopen pracovat ve dvou módech, a sice automatickém a manuálním. Pro režim automatický je třeba 4 ml vzorku, zatímco v režimu manuálním postačí 1 ml vzorku. Při analýze sedimentu je vzorek (150 μ l) ředěn 4 x, při analýze bakterií je vzorek (62,5 μ l) ředěn 8 x.

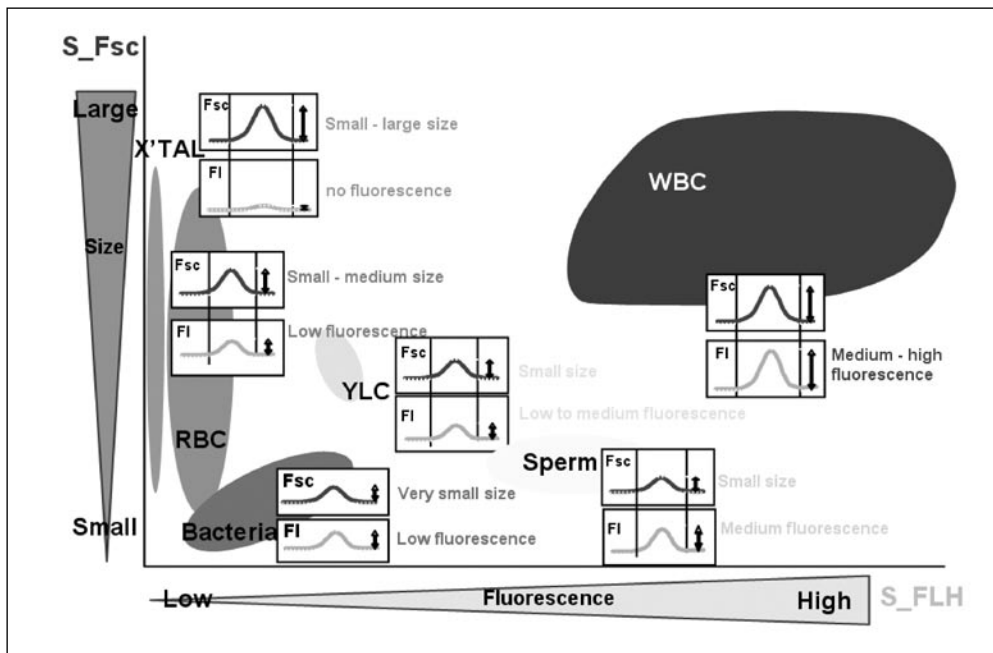
Princip průtokové cytometrie: Zředěný a obarvený vzorek moče (2 různá barviva: UF II SEARCH-SED – pro sediment, UF II SEARCH-BAC – pro bakterie) je hydrodynamicky zaostřen a prochází průtokovou celou SFC („sheath flow cell“) obklopenou SF („sheath fluid“). Částice se seřadí a prochází za sebou ve středu proudu kapaliny. Zde je každá ozářena paprskem laseru (635 nm). Na vstupu do průtokové cely je měřena vodivost, která je průchodem každé částice snížena. Sleduje se **fluorescence a rozptyl světla** (boční a přímý) generovaný každou částicí (každá částice má jiné optické vlastnosti a tedy i jiný rozptyl). Výstupem jsou tedy tyto typy signálů **Forward scattered light signal, laterally scattered light signal a laterally fluorescent light signal**. Intenzita rozptýleného a fluorescenčního světla je převáděna na elektrický signál a jednotlivé typy signálů jsou pak zobrazeny ve formě tzv. scattergramů. Množství rozptýleného světla odpovídá **velikosti** buněk (Fsc signál – pro přímý rozptyl). Boční rozptyl (Ssc signál) nás informuje o povrchu částice. Fluorescence (Fl signál) emitovaná obarvenou buňkou odráží **kvantitativní vlastnosti buněk**, neboli **vnitřní strukturu** částice. Přičemž platí, že výška pulzu

nás informuje o velikosti (průměru) – Fsc, a šířka o délce částice – Fscw.

UF-1000i používá jako kontrolní materiál *UF II Control* (low, high), což jsou standardizované latexové částice.

V lidské moči se vyskytují různé formy elementů, jenž jsou velmi variabilní co do velikosti, tvaru, vnitřní struktury. Na základě toho jsou pak umístěny ve scattergramech. Analyzátor rozlišuje 5 typů scattergramů pro sediment (S1 až S5) a 3 pro bakterie (B1 až B3). Scattergram S1 (Obrázek 1): vyjadřuje závislost fluorescence na přímém rozptylu. Leukocyty jakožto jaderné částice s bohatou vnitřní strukturou mají vyšší fluorescenci (umístění vpravo) oproti např. erytrocytům s chudou vnitřní strukturou (umístění vlevo). Vzhledem ke své velikosti se WBC pohybují na ose y (signál Fsc = velikost částic) v její horní části, na rozdíl od ERY, které mají širokou variabilitu velikosti částic (poloha – podél celé osy y). Obdobně by se dala vysvětlit poloha i všech ostatních elementů přítomných v jednotlivých typech scattergramů.

Obrázek 1: Scattergram S1



VÝSLEDKY:

Praktická část studie – Vyšetřovali jsme 375 nativních patientských vzorků moči paralelně na obou analyzátoch. Pomocí Bland-Altmanových grafů jsme srovnávali erytrocyty, leukocyty, epitelie a vál-

ce. Výsledky srovnání stanovení bakterií, jenž byly měřeny na obou analyzátoch semikvantitativně v arbitrárních jednotkách, jsme shrnuli do tabulky (Tabulka 1).

Bland-Altmanovy grafy pro RBC vykazují relativně příznivou korelaci, data jsou rozložena kolem středové osy (Obrázek 2). Pro WBC se objevuje mírný trend zvyšující se zejména ve vyšších koncentracích elementů (Obrázek 3). Pro EC a CAST je trend analogický, navíc jsme na UF-1000i zachytili poměrně častou pozitivitu vzorků zařazených iQ 200 jako

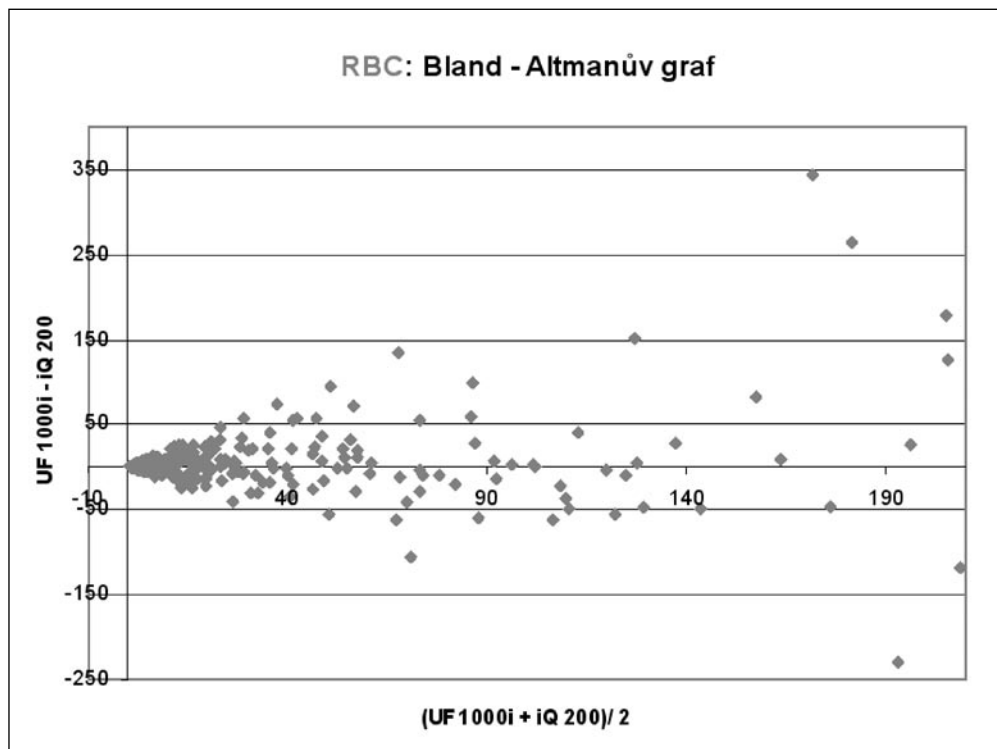
negativní, u obou zmiňovaných elementů - častěji u válců (Obrázek 4 a 5).

U srovnání stanovení bakterií bylo 75 % vzorků zařazeno oběma analyzátory mezi negativní, asi 8,5 % vzorků zařadil iQ 200 mezi negativní a analyzátor UF-1000i mezi 3+, 5,3 % bakterií zařadil UF-1000i mezi 3+ a analyzátor iQ 200 mezi 1+ (Tabulka 1).

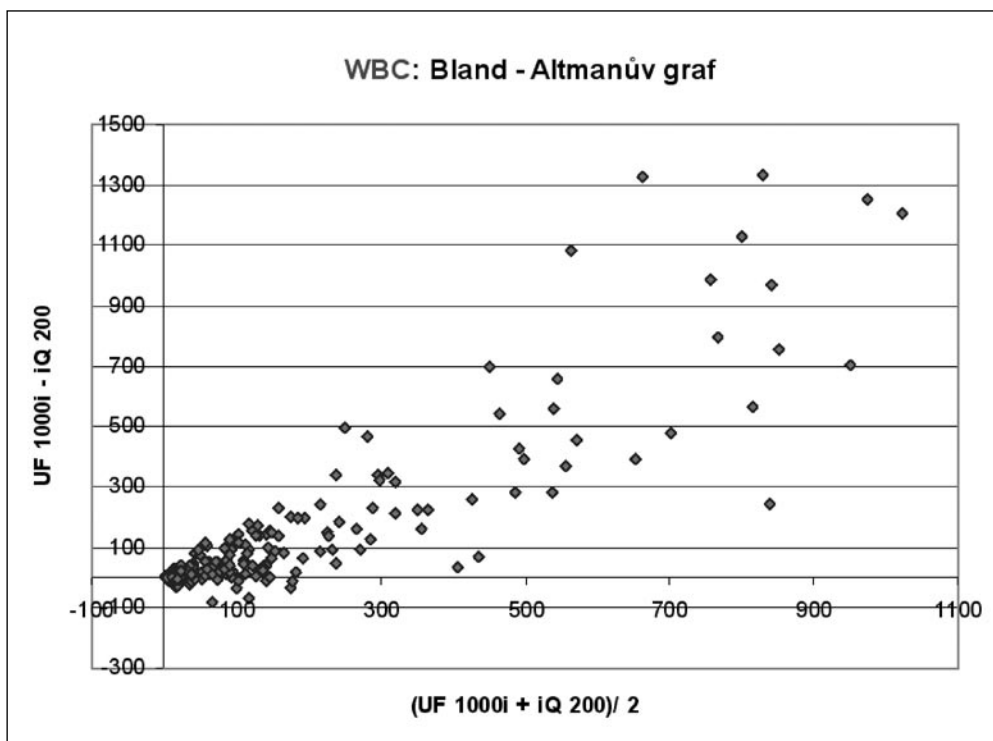
Tabulka 1: Srovnání stanovení bakterií

iQ 200	Sysmex UF-1000i					celkem
	-	1+	2+	3+	4+	
-	275	3	9	32		319
1+	27		4	20		53
2+				2		2
3+						
4+	1					1

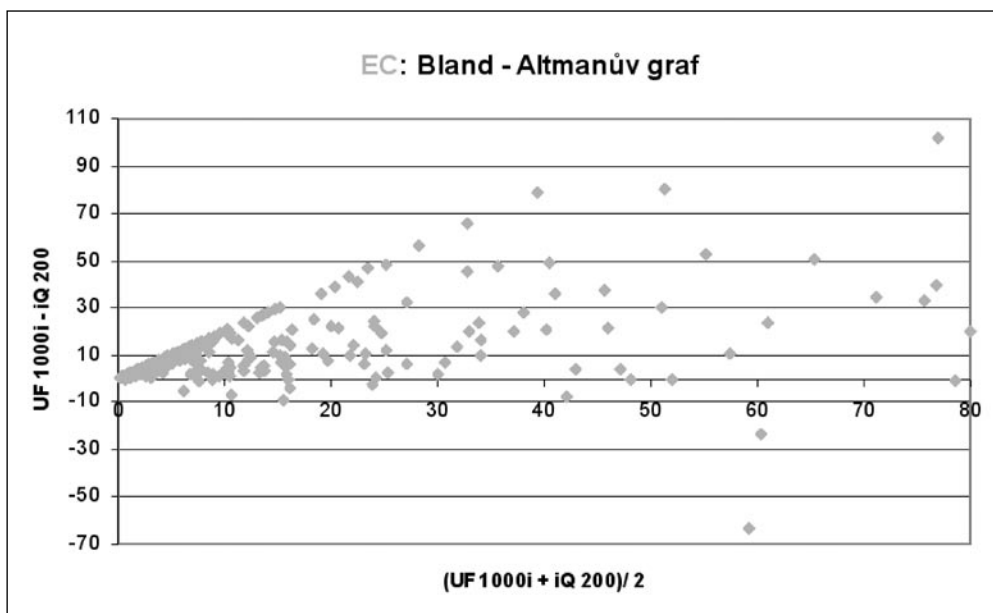
Obrázek 2: Srovnání stanovení erytrocytů



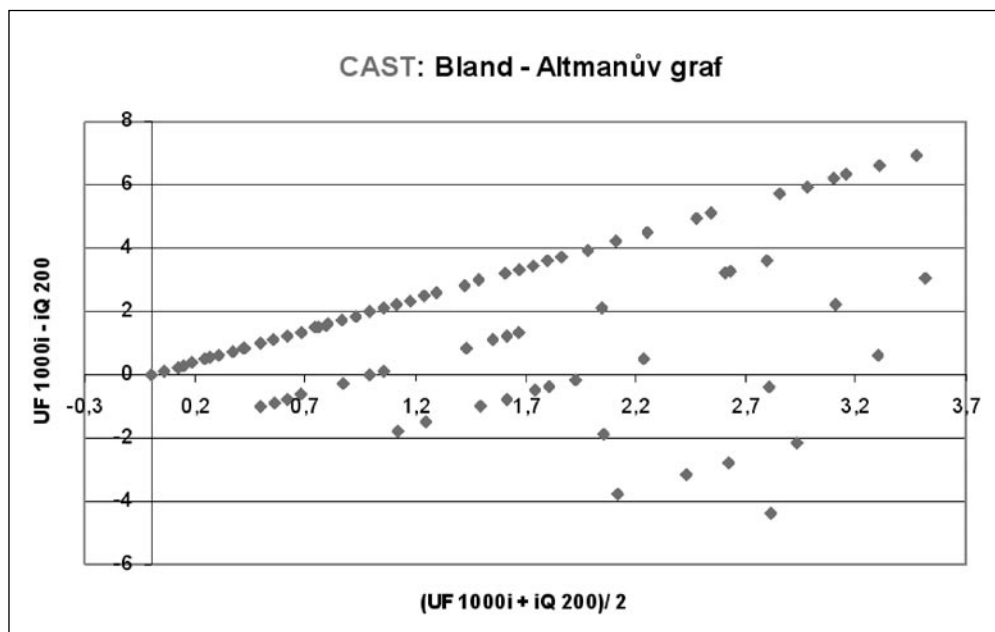
Obrázek 3: Srovnání stanovení leukocytů



Obrázek 4: Srovnání stanovení epitelíí



Obrázek 5: Srovnání stanovení válců



Opakovatelnost – byla měřena na dvou směsných vzorcích moče o nízké a vysoké koncentraci elementů. Oba vzorky byly změřeny 15 krát a z dat byly vypočteny variační koeficienty (CV). Opakovatelnost těchto vzorků změřena na analyzátoru iQ 200 se v nižších koncentracích pohybuje kolem 40 % (Tabulka 2). Tento vysoký variační koeficient je možno přisuzovat značnému vlivu toho, že se pohybujeme blízko meze detekce (výrobce uvádí měřicí rozsah 1 – 1000 částic/μl) a navíc je to způsobeno faktem, že analyzátor počítá elementy na celá čísla (rozdíl od UF-1000i). Pro vysokou hla-

dinu směsného vzorku je opakovatelnost relativně vyhovující, kdy CV pro erytrocyty 13,5 % a leukocyty 10,8 %. Pro analyzátor UF-1000i (Tabulka 3) jsme zvláště pro nízké koncentrace vzorku dosáhli lepších výsledků, z důvodu že naměřené hodnoty jsou přesnější (analyzátozem zaokrouhlené na 1 desetinné místo) a pro všechny uvedené elementy je patrné, že naměřené hodnoty nízkých koncentrací vzorku se pohybují dále od meze detekce. Pro nízké hladiny elementů (RBC, WBC, EC) se CV pohybuje od 10,4 – 15,0 %, pro vysoké hladiny 9,1 – 10,1 %.

Tabulka 2: iQ 200 - opakovatelnost

	RBC		WBC	
	L	H	L	H
mean [c/μl]	1,6	109,7	3,2	37,9
SD [c/μl]	0,63	14,83	1,42	4,09
CV [%]	39,5	13,5	44,5	10,8

Tabulka 3: UF-1000i - opakovatelnost

	RBC		WBC		EC	
	L	H	L	H	L	H
mean [c/μl]	4,2	181,8	5,6	49,7	5,6	11,1
SD [c/μl]	0,49	16,47	0,84	4,58	0,58	1,12
CV [%]	11,5	9,1	15,0	9,2	10,4	10,1

Reprodukovatelnost – byla testována na kontrolních materiálech obou výrobců. Vzorby byly analyzovány po dobu 20 dní a z dat byly opět vypočteny variační koeficienty. Reprodukovatelnost naměřených dat na obou analyzátoch mezi sebou nelze srovnávat, neboť se jedná o dva různé typy kontrolních materiálů. Zatímco pozitivní kontrolní materiál pro iQ 200 je roztokem stabilizovaných lidských erytrocytů (negativní kontrolní materiál je roztok bez měřitelných částic), kontrolní materiály pro UF-1000i („low“ a „high“) jsou na bázi stabilizovaných latexových částic.

iQ 200 – pro negativní kontrolní materiál s cílovou hodnotou blízko nule nemělo smysl reprodukovatelnost měřit. CV pozitivního kontrolního materiálu o dvou různých šaržích s velmi podobnou cílovou hodnotou se pohybuje kolem 5 %.

Tabulka 4: UF-1000i - reprodukovatelnost

n = 20, c -low

	RBC	WBC	EC	CAST	BACT	Cond.
CV [%]	6,5	5,6	19,5	24,3	7,1	20,8
TV [counts/μl]	38,3	39,9	9,6	5,90	200,9	10,3

n = 20, c - high

	RBC	WBC	EC	CAST	BACT	Cond.
CV [%]	3,1	2,0	12,0	12,7	3,4	3,1
TV [counts/μl]	190,8	792,6	77,7	19,51	825,2	38,1

ZÁVĚR:

Oba analyzátoři jsou vhodné pro rutinní analýzu vzorků močí. Nespornou výhodou analyzátoru iQ 200 je možnost reklasifikace částic obsluhou a částice tak „mikroskopicky ověřit“. UF-1000i umožňuje odlišit a kvantifikovat izomorfní a dysmorfní erytrocyty, což má v diagnostice onemocnění značný význam. Nevýhodou UF-1000i je pak nemožnost ověřit mikroskopicky zařazené částice analyzátořem v jednotlivých kategoriích. U analyzátoru UF-1000i

UF-1000i – z tabulky 4 lze vidět, že pro všechny sledované parametry je variační koeficient „low“ hladiny kontrolního materiálu horší než je tomu u „high“ hladiny kontrolního materiálu. U nízkých hladin blízko meze detekce jsou všechny výsledky horší než u vyšších hladin. Nejlepší CV byl dosažen u leukocytů (u obou hladin kontrolního materiálu), nejhorší u válců (u obou hladin kontrolního materiálu), neboť válce jsou velice heterogenní typy částic.

U patologických nálezů jsme přítomnost elementů ověřovali klasickou mikroskopií. Výsledky elementů byly ve značné míře blízké hodnotám naměřeným na analyzátoru iQ 200. Jedním z důvodů může být právě možnost reklasifikace částic obsluhou.

jsme zaznamenali častější pozitivitu bakterií, kdy kontrola klasickou mikroskopií potvrdila nesprávné zařazení. Pro ověření a následně správnou interpretaci je nutná dobrá znalost jednotlivých typů elementů.

Automatizace analýzy eliminuje manuální přípravu vzorku, zrychluje analýzu a do jisté míry minimalizuje kontakt zdravotnického personálu s potenciálně infekčním materiálem, jakým je pacientský vzorek moče.