

Автоматизация общего анализа мочи. Новые диагностические возможности

Русак Андрей Александрович

Рекомендации по преаналитике

European Urinalysis Guidelines SUMMARY



4.3 Preservation and Transport

- Обрабатывать пробы мочи при комнатной температуре в течение не более 1 часа
- При более продолжительном сроке хранения мочи рекомендуется использовать охлаждение (4-8 °C).
- Срок хранения пробы продлевается до 24 часов.
Но! Возможно выпадение аморфных солей в осадок
- Другой возможный путь увеличения сроков стабильности мочи без охлаждения - использование консервантов.
- После 2 ± 4 ч особенно при высоком pH, низкой относительной плотности (напр. детские пробы) лизис WBC даже при охлаждении.

8. Collection and Transportation

- Обрабатывать пробы мочи при комнатной температуре в течение не более 2 часа
- При более продолжительном сроке хранения (>2 часов) рекомендуется использовать консервант
- Охлаждение допускается, но может повлиять на результаты сухой химии(исключение URO и BIL)
- Пробы мочи для посева - хранение в холодильнике с момента забора до проведения исследования

Влияние времени хранения



Ramona C. Dolscheid-Pommerich et al. (2016):

Evaluation of the appropriate time period between sampling and analyzing for automated urinalysis

Параметр (N=321)	до 1,5 часов	2 часа	4 часа
WBC	72	64	57
RBC	39	35	27
Epithelial cells	11	11	11
Bacteria	142	170	182
CAST	1	1	1
Conductivity	14	14.1	14.8

Основная мысль:

WBC, RBC - разрушаются со временем,
↓ счета

BACT - рост бактерий ведет к ↑ счета

EC, CAST, Conductivity - не изменяются
во времени

Моча как образец для исследования

Физико-химические свойства

- » Удельный вес
- » Мутность
- » Цвет
- » pH
- » Лейкоциты (LEU)
- » Кровь (BLD)
- » Белок (PRO)
- » Глюкоза (GLU)
- » Кетоны (KET)
- » Билирубин (BIL)
- » Уробилиноген (URO)
- » Нитриты (NIT)
- » Альбумин
- » Креатинин



Осадок мочи

- » Лейкоциты
- » Эритроциты
- » Эпителий плоский
- » Эпителий переходный
- » Эпителий почечный
- » Цилиндры гиалиновые
- » Цилиндры патологические
- » Слизь
- » Бактерии
- » Кристаллы
- » Грибы
- » Сперматозоиды
- » Атипичные клетки

Рутинная практика в лаборатории

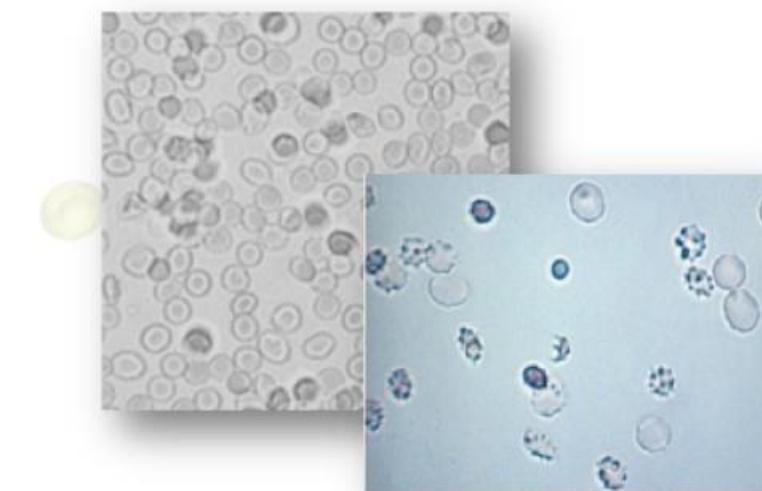
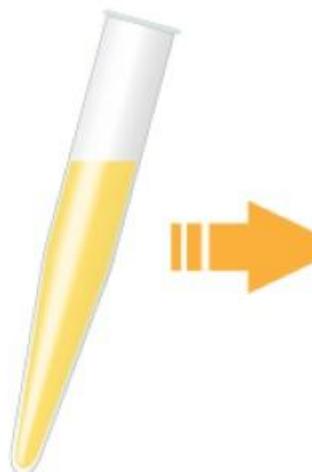
Результат тест полоски



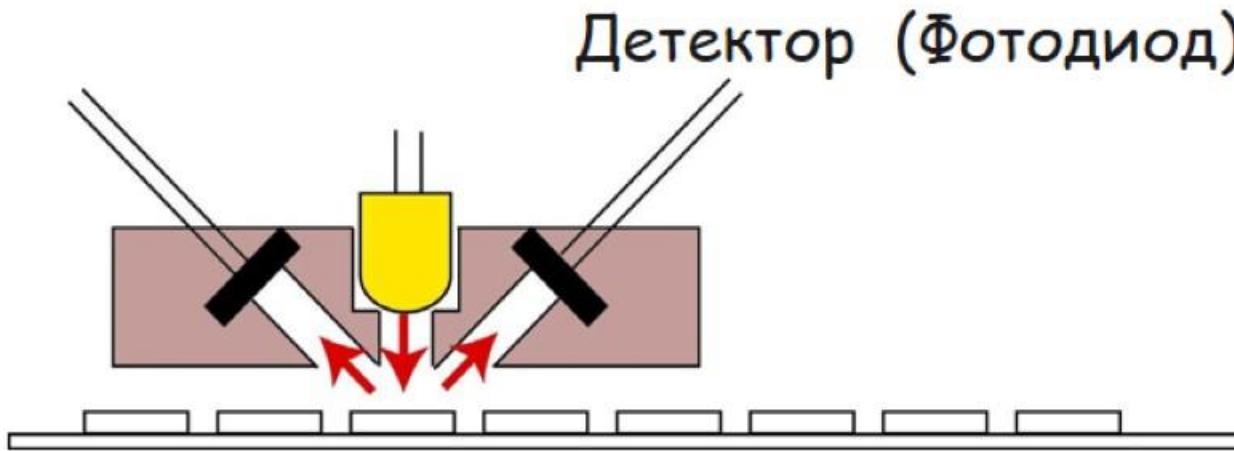
Sysmex

Кровь??

Исследование осадка под микроскопом



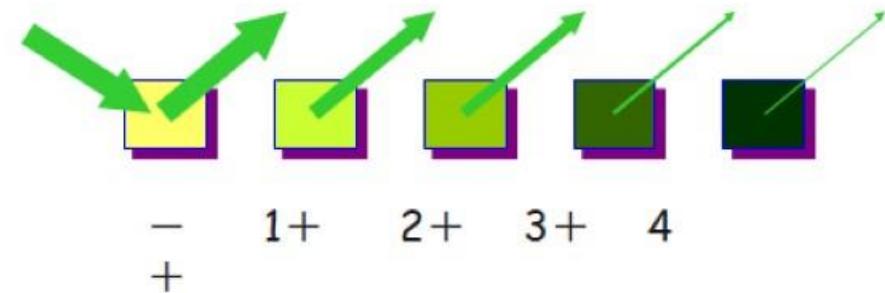
Измерение отраженного света от поверхности тест полоски



Что такое отражательная способность?

Отношение отданного и отраженного света.

Если цвет отсутствует, коэффициент составляет 100%. Светоотражение становится меньше, если цвет темнее



Перевод в количественные единицы измерения

Таблица ранжирования

Semi-quant. rank	NORMAL	±		+1		+2		+3		+4	
Conc. Value (mg/dL)		30	50	70	100	150	200	300	500	1000	OVER
Reflect. threshold value (R %)		82	75	65	57	49	43	36	28	20	16.5



R = 55%

GLU 100 mg/dL (+1)

Значению, отражательной величине каждой тестовой площадки, присваивается полукачественные значения концентрации с помощью таблицы диапазона отражения, хранящейся в анализаторе.

Результат концентрации, напечатанный в форме результата, не должен рассматриваться как точное значение концентрации и представляет собой диапазон концентраций анализа.



Почки болеют молча! Хроническая болезнь почек

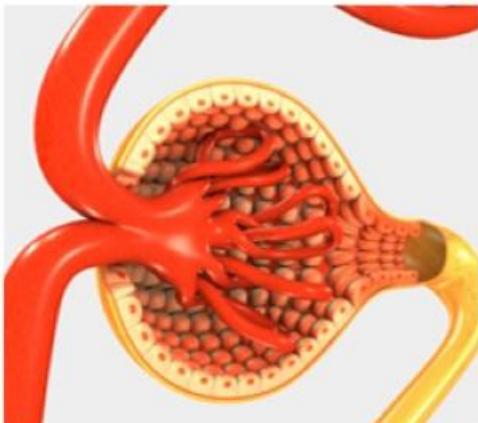
Альбуминария - принципиальный маркер ХБП

В последних рекомендациях и руководствах болезни почек
классифицируются по уровню альбуминурии

Albumin (ALB)



В качестве порогового уровня Альбуминурии, указывающего на наличие ХБП установлено значение $\geq 30\text{мг/сут}$, сохраняющееся в течении 3 и более месяцев



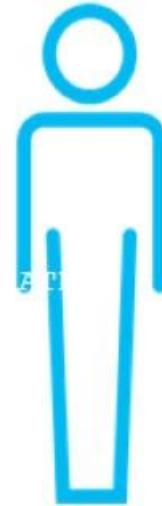
Экскреция альбумина возрастает при поражении клубочков, канальцев или нарушении фильтрации ионов по заряду

Протеинурия



PRO = 0.3 г/л

У кого из пациентов
патологическая
протеинурия?



PRO = 0.3 г/л

Протеинурия



У кого из пациентов
патологическая
протеинурия?

PRO = 0.3 г/л

ALB = 30 мг/дл

CRE = 10 мг/дл

P/C = 0.15

A/C = 30



PRO = 0.3 г/л

ALB = 30 мг/дл

CRE = 200 мг/дл

P/C = норма

A/C = норма

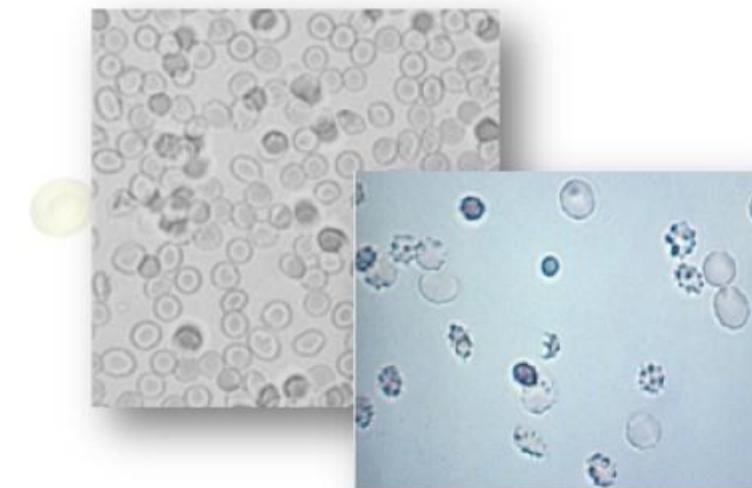
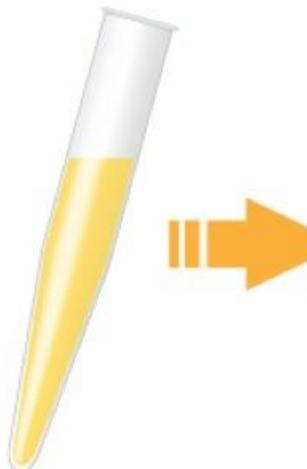
Рутинная практика в лаборатории

Результат тест полоски



Кровь??

Исследование осадка под микроскопом



Ручная микроскопия



Потери WBC при центрифугировании

Среднее количество лейкоцитов разрушенных при центрифугировании и оставшихся в супернатанте

	Лейкоциты, разрушенные при центрифугировании, %, min-max	Лейкоциты, оставшиеся в супернатанте, %, min-max
Всего	7,50% (0,12–14,50)	0,29% (0–0,78)
Норма	15,25% (1,85–19,09)	0,3 (0–1,48)
Микролейкоцитурия	6,84%	0,32%
20-100 клеток в 1 мкл	(0,41–10,65)	(0,03–0,82)
Макролейкоцитурия	3,62%	0,25%
Более 100 в 1 мкл	(0,64–7,83)	(0,11–0,45)

Потери RBC при центрифугировании

Среднее количество эритроцитов разрушенных при центрифугировании и оставшихся в супернатанте

	Эритроциты, разрушенные при центрифугировании, %, min-max	Эритроциты, оставшиеся в супернатанте, %, min-max
Всего	14,64% (6,36–23,52)	6,74% (1,65–25,77)
Норма	16,56% (15,00–29,79)	7,87% (5,08–23,41)
Микрогематурия	18,89%	11,11%
20–100 клеток в 1 мкл	(9,57–20,59)	(2,42–25,85)
Макрогематурия	6,55%	0,88%
Более 100 клеток в 1 мкл	(3,25–18,91)	(0,51–4,89)

European Urinalysis Guidelines

SUMMARY

These European Urinalysis Guidelines are given under the auspices of the European Confederation of Laboratory Medicine (ECLM).

Classification of examinations

Examinations have been re-classified into four hierarchical levels based on accuracy of mea-

6.2.3. ROUTINE IDENTIFICATION METHODS FOR URINE PARTICLES (LEVEL 2).

«...**STANDARDIZED URINE SEDIMENT UNDER A COVERSHEET.**
STANDARDIZED CENTRIFUGED URINE SEDIMENT
SHOULD BE INVESTIGATED UNDER A DEFINED SIZE
COVERSLIP WITH A KNOWN VOLUME OF SPECIMEN IN
THE VIEW FIELD (APPENDIX, ANNEX 12.1.2).»

«...IT IS UNDERSTOOD THAT CENTRIFUGATION
METHODS ARE NEVER QUANTITATIVE IN
COUNTING RBC AND WBC THAT ARE VARIABLY
LOST DURING CENTRIFUGATION. THE PROCEDURE IS
THEN PRONE TO HIGH UNCERTAINTY OF CERTAIN
PARTICLE COUNTS DESPITE STANDARDIZATION.»

Понятно, что **методы, включающие центрифугирование, никогда не являются количественными для эритроцитов и лейкоцитов**, поскольку последние могут утрачиваться при центрифугировании. Процедура является неточной в отношении подсчета некоторых частиц, несмотря на стандартизацию

Традиционная оценка форменных элементов мочи



Показатель	Ориентировочный метод (ОАМ)	Подсчет по Нечипоренко
Объем мочи	Около 10 мл	10 мл
Объем осадка	Не измеряется	1 мл
Степень концентрирования	Не известна	10
Толщина препарата	Не известна	0,1 мм

В методе Нечипоренко стандартизованы степень концентрирования, толщина препарата и объем мочи при микроскопии

В ОАМ эти параметры не стандартизованы!

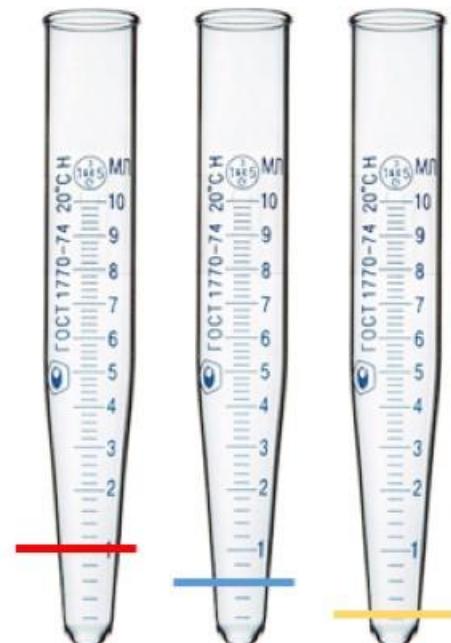
Зависимость количества клеток в поле зрения микроскопа от степени концентрирования мочи

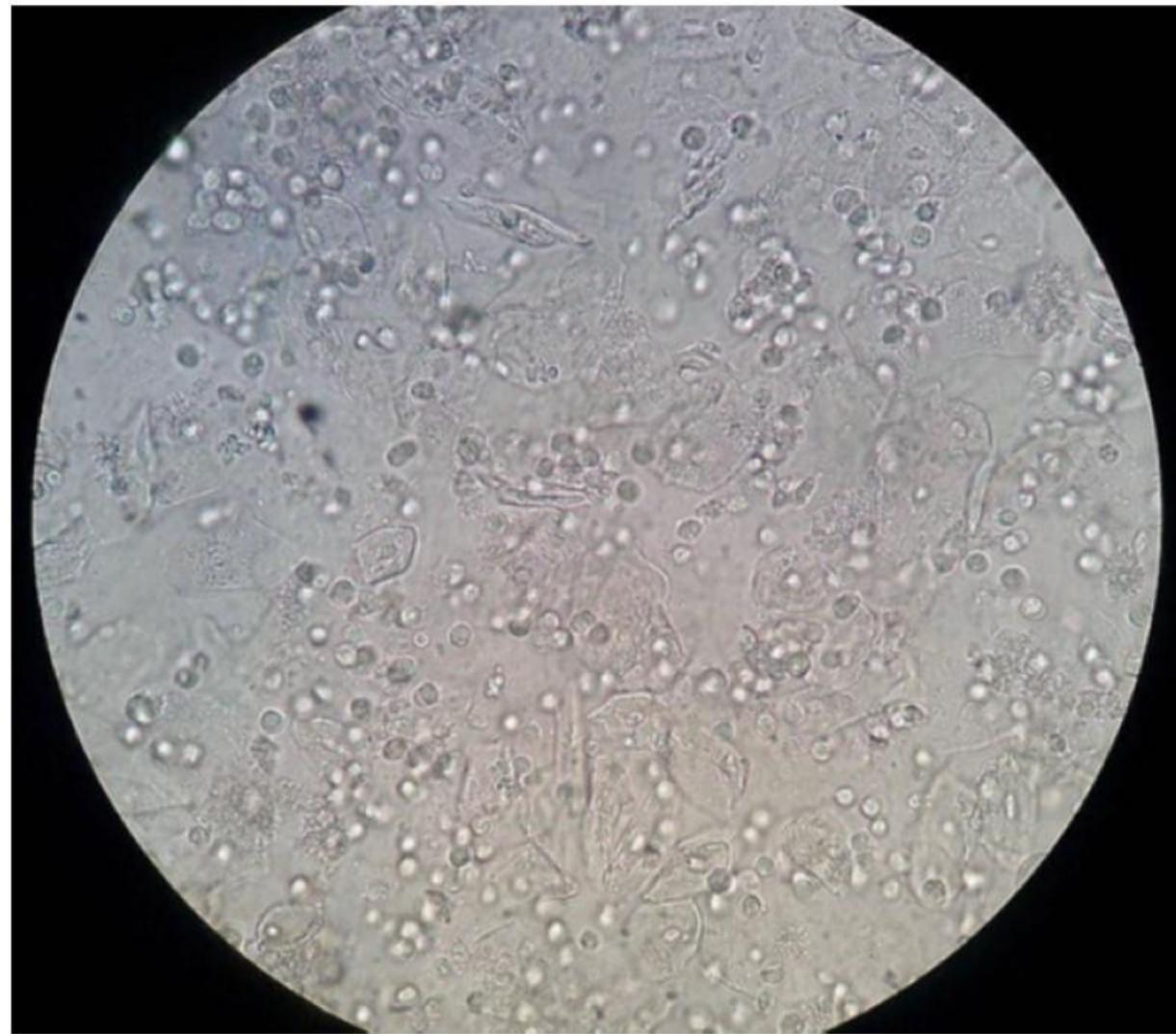


Исходный объем мочи мл	10	10	10
Объем осадка мл	1	0,5	0,25
Концентрирование (во сколько раз)	10	20	40
Количество условных клеток в поле зрения	3	6	12

При разной степени концентрирования мочи количество форменных элементов будет меняться даже при микроскопии в одних и тех же условиях.

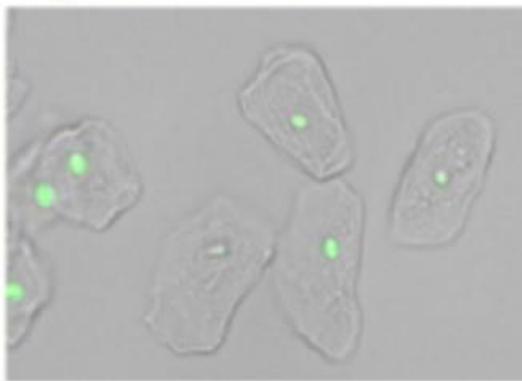
Результаты разных операторов и в разных лабораториях могут отличаться в разы



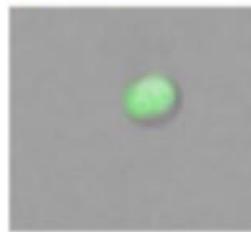


Принцип измерения

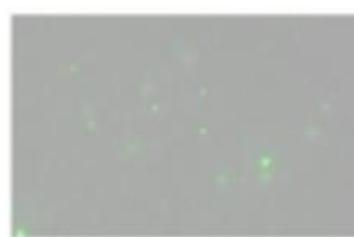
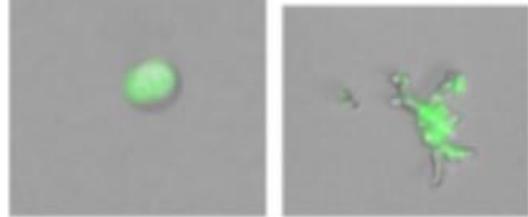
Epithelial Cell



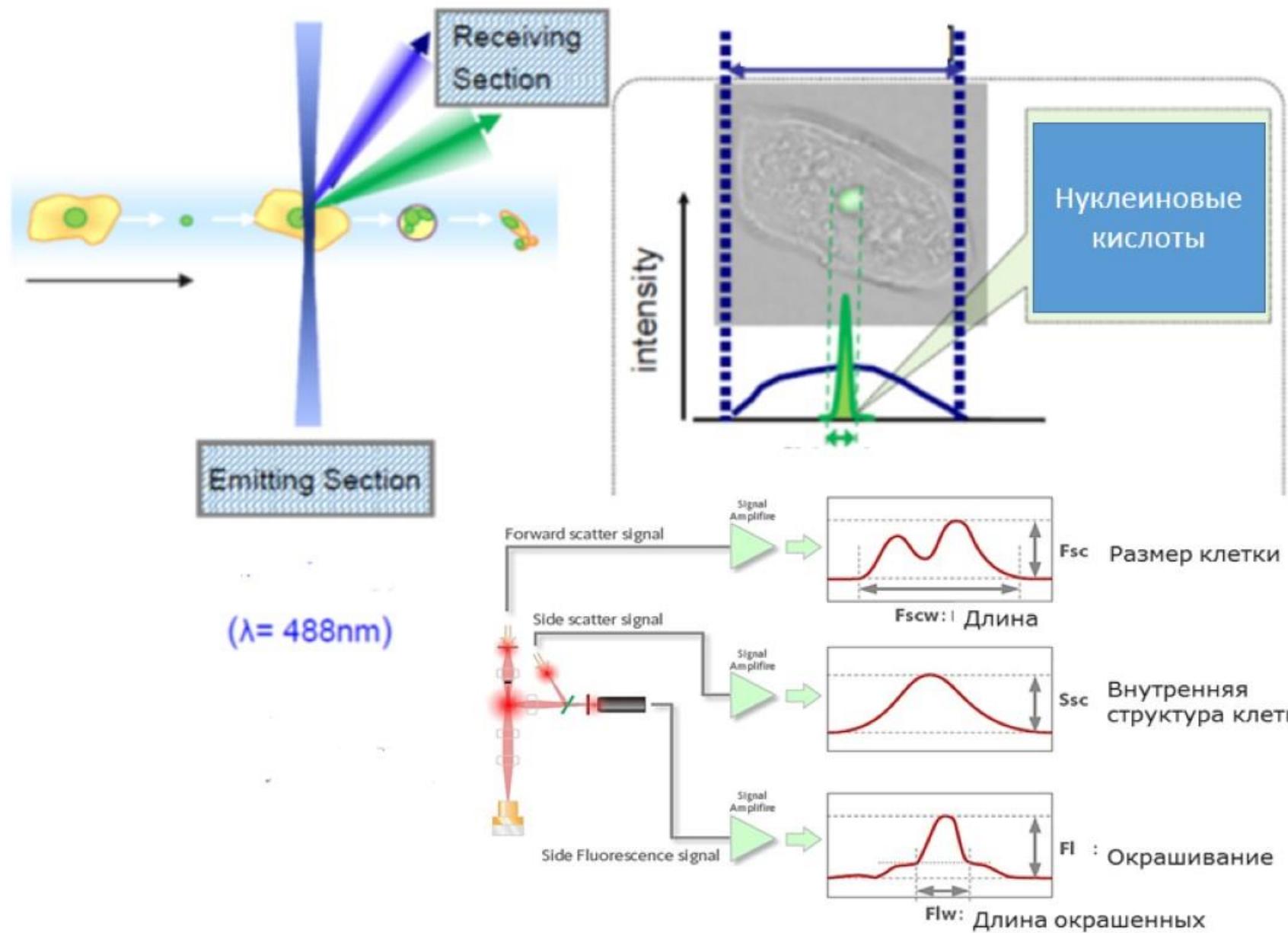
WBC



YLC



BACT



Основные клинические задачи

□ Диагностика гематурии:

- Дифференциальная диагностика типа гематурии.

□ Диагностика инфекций мочевыводящей системы:

- Дифференциальная диагностика инфекции от контаминации.
- Принятие решения о необходимости бактериологического анализа мочи.



Основные клинические задачи

□ Диагностика гематурии:

- Дифференциальная диагностика типа гематурии.

□ Диагностика инфекций мочевыводящей системы:

- Дифференциальная диагностика инфекции от контаминации.
- Принятие решения о необходимости бактериологического анализа мочи.

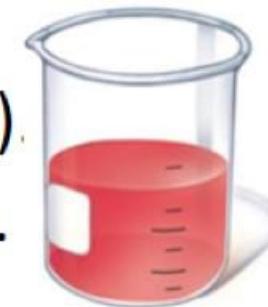


Гематурия (RBC)

□ Варианты:

- Микрогематурия.
- Макрогематурия (> 100 в п/з или > 1500 мкл).
- Гемоглобин/миоглобинурия (преренальная).

Макрогематурия



Микрогематурия



□ Точки интереса клинициста:

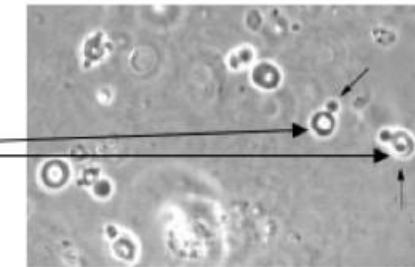
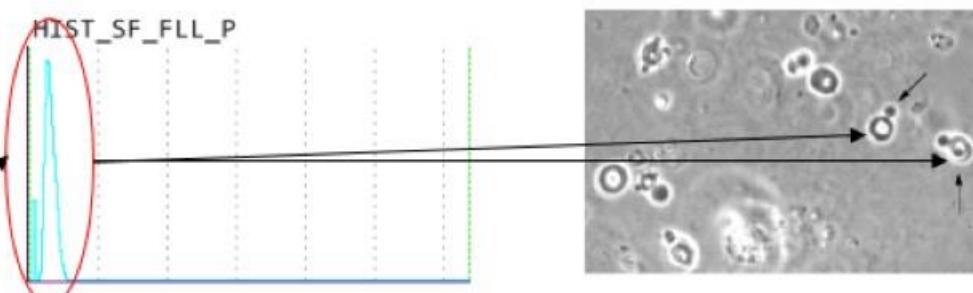
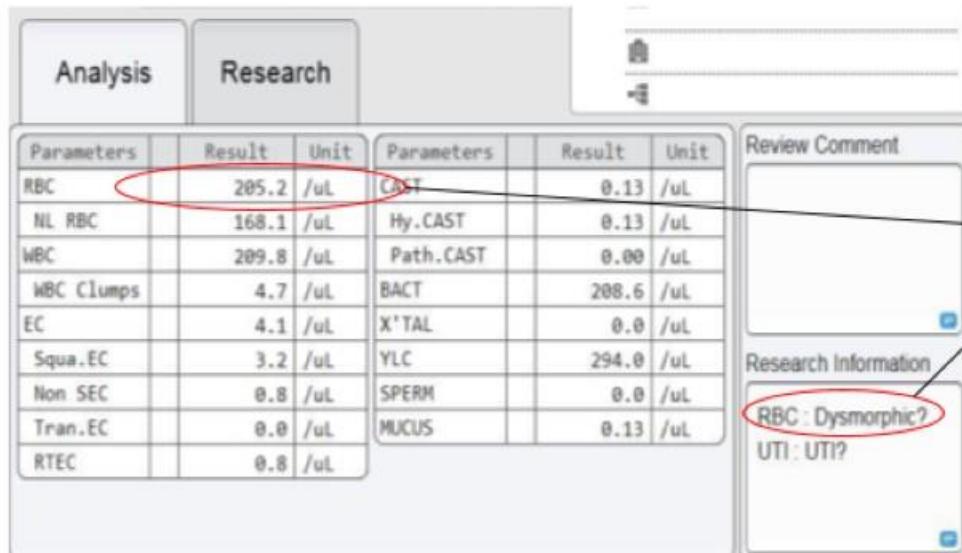
- Гематурия любой выраженности имеет клиническое значение
- Необходимо понять природу гематурии – преренальная, ренальная или постренальная.
- Необходимо выяснить причину гематурии.

Возможности анализатора UF (Sysmex, Япония) в диагностике гематурии

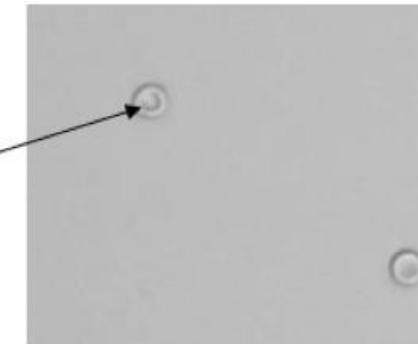
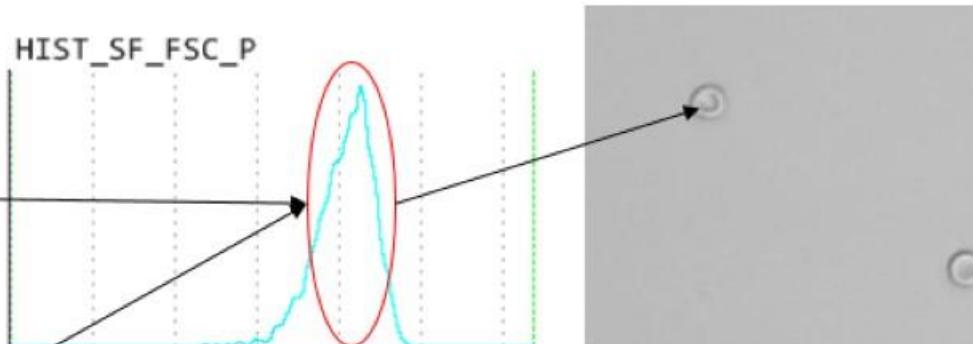
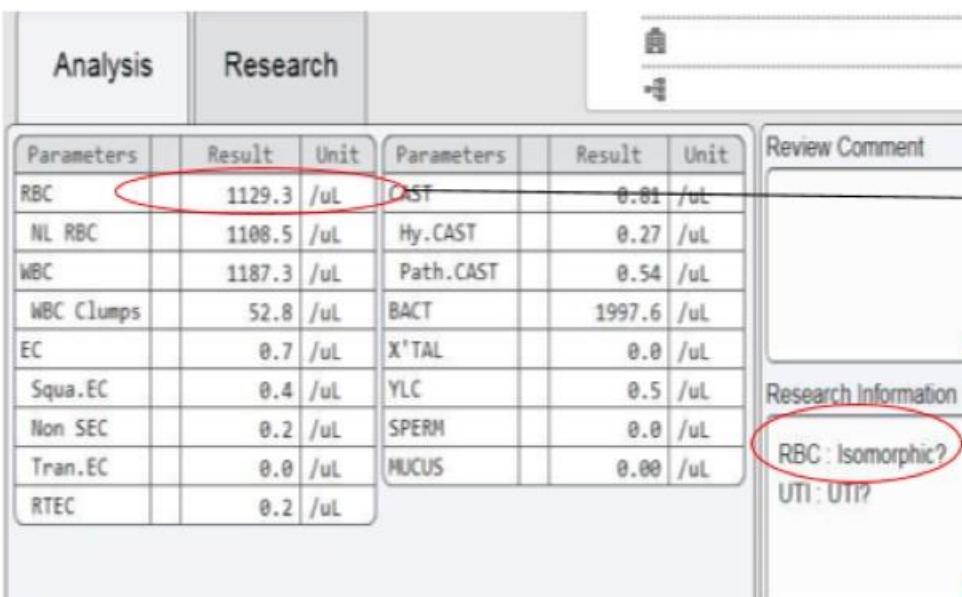
1. Точный колличественный подсчет числа эритроцитов с аналитической чувствительностью 1 эритроцит в микролитре мочи, что соответствует 1 эритроцита в 10 полях зрения.
2. Диагностическая чувствительность определения гематурии – 98,5%, а диагностическая значимость отрицательного результата – 96,5%.
3. Идентифицирует неизированные “Изоморфичные” эритроциты
4. Идентифицирует Лизированные эритроциты
5. Идентифицирует и сообщает о наличии Дисморфичных эритроцитов с диагностической чувствительностью близкой к 100%.



UF 4000/5000: дифференцировка гематурии.



Гломерулярная гематурия сопровождается выделением дисморфичных эритроцитов



Постренальная гематурия сопровождается выделением неизмененных эритроцитов нормального размера

Эритроциты

BLD



- » Определяется свободный гемоглобин (BLD-H) или интактные эритроциты (BLD-R)
- » Не улавливает единичные эритроциты
- » Полуколичественные категории: 0,03 – 0,06 – 0,15 – 0,75 мг/л
- » Ложноотрицательный результат: повышенная кислотность мочи, выраженная протеинурия, высокий удельный вес, аскорбиновая кислота, нитриты

RBC

- » Количественный результат в 1 мкл
- » В случае длительного хранения, RBC становятся диморфными и разрушаются

Любые
несовпадения
должны быть
оценены врачом!

Основные клинические задачи

□ Диагностика гематурии:

- Выявление микрогематурии.
- Дифференциальная диагностика типа гематурии.

□ Диагностика инфекций мочевыводящей системы:

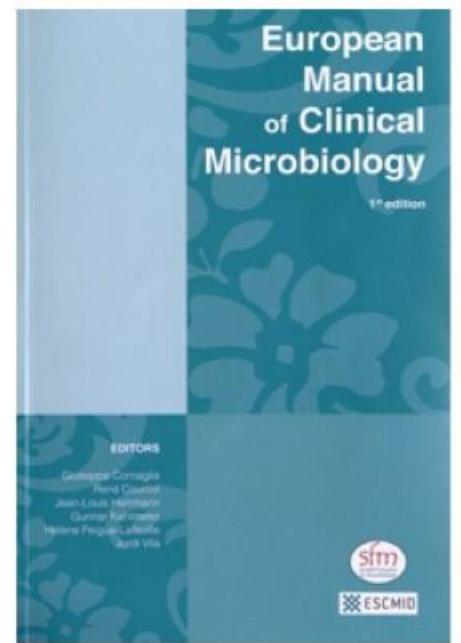
- Дифференциальная диагностика инфекции от контаминации.
- Принятие решения о необходимости бактериологического анализа мочи.

ИМП - среди лидеров внебольничных инфекций (после респираторных)

ИМП - лидер внутрибольничных инфекций. (До 40% ВБИ)

Лейкоциты в моче - не рассматриваются как главное доказательство ИМП

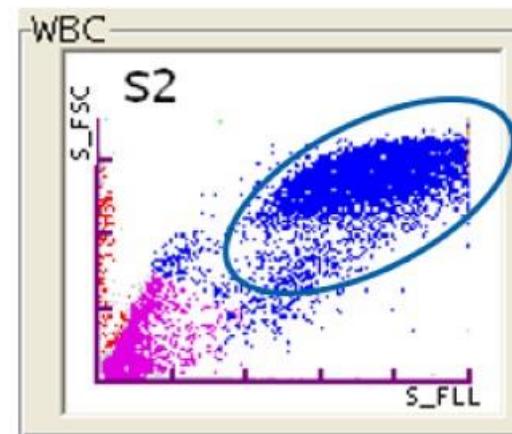
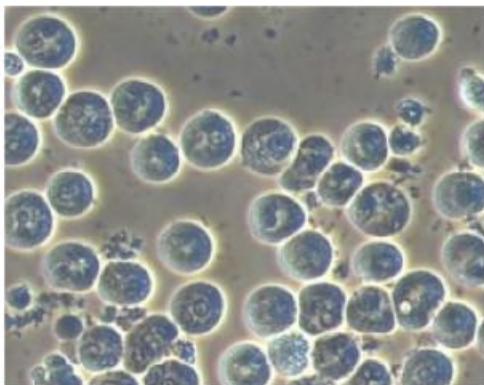
Полуколичественный метод оценки Лейкоцитурии методом центрифугирования и микроскопии - не должен применяться



Европейское руководство по клинической микробиологии

WBC

- Обычно нейтрофилы
- При $S.G. = 1,002-1,008$ г/мл и $pH = 8,0-9,0$, при длительном нахождении в моче нейтрофилы увеличиваются в размерах, разбухают, разрушаются



Определение лейкоцитов по тест-полоске

LEU	-	1+	2+	3+	c/ μ L *
		25	75	500	

Тест определяет только нейтрофилы (эстеразная активность)!

□ Тест полуколичественный, качественный



Ограничения метода

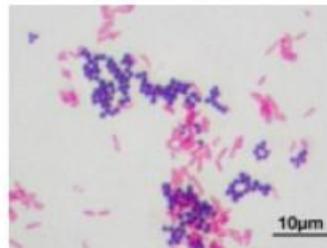
Ложноотрицательный результат

- глюкозурия, кетонурия, протеинурия
- повышенная кислотность мочи
- высокий удельный вес
- некоторые ЛС (окислители): цефалексин, тетрациклин, гентамицин

Ложноположительный результат

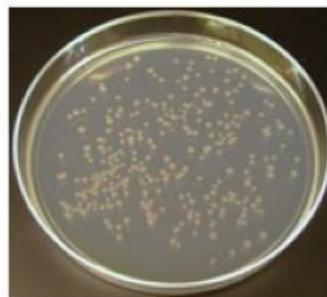
- контаминация

Традиционный метод бактерии



- Нитрат-редуктазный тест

Окрашивание по Граму



Идентификация



Анализ на чувствительность к антибиотикам

- https://en.wikipedia.org/wiki/Gram_stain; https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ecoli_colonies.png;
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bacterial_lawn_01.jpg

Классический метод лабораторной диагностики ИМП (инфекции мочевых путей)



Интерференции. Нитриты

Ложноотрицательный результат

- бактерии, не метаболизирующие нитраты (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*)
- недостаточное поступление нитратов с пищей
- короткое время нахождения мочи в мочевом пузыре
- антибиотикотерапия
- высокая концентрация аскорбиновой кислоты
- сильное разведение (усиленный диурез)

Ложноположительный результат

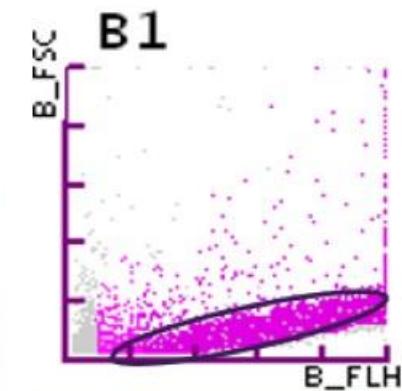
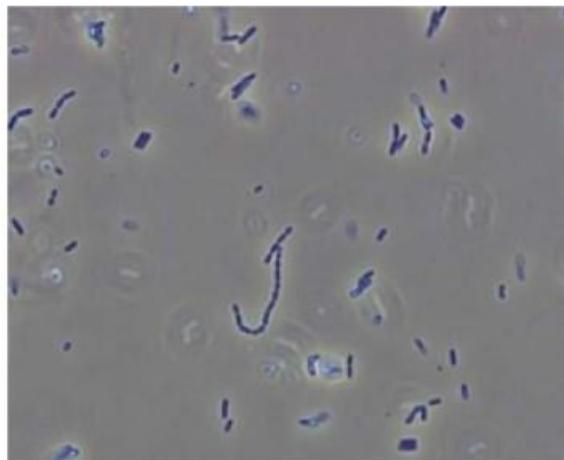
- лекарственные препараты (феназопиридин)
- длительное нахождение тест-полоски на воздухе

Не всегда отрицательный результат по NIT свидетельствует об отсутствии бактерий в образце

Systech UF предпосевной анализатор

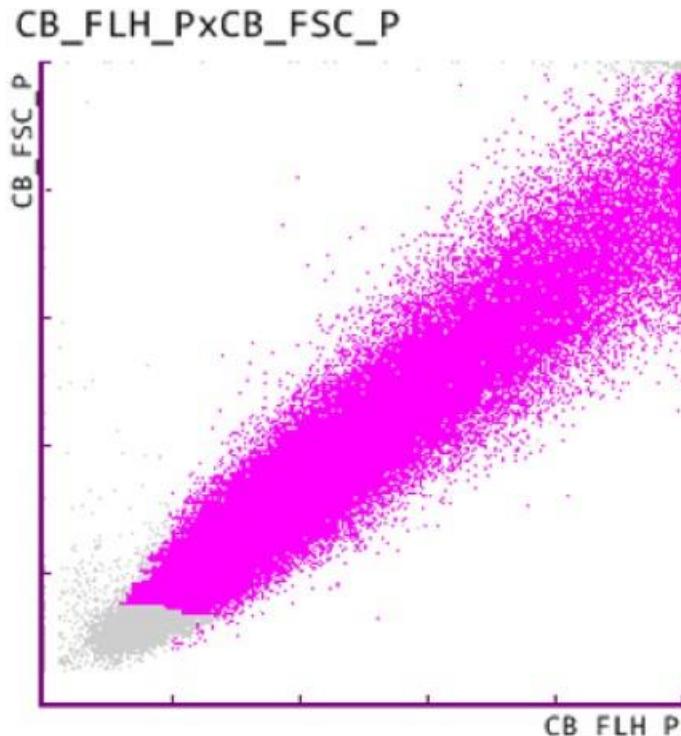
ВАСТ

- Подсчитываются в отдельном канале (специальные реагенты - дилюент и флюорохром)
- Исключается влияние на результат - высокоточная детекция
- Бактерии встречаются у здоровых людей в минимальном количестве ($<1 \times 10^4$ в 1мл)

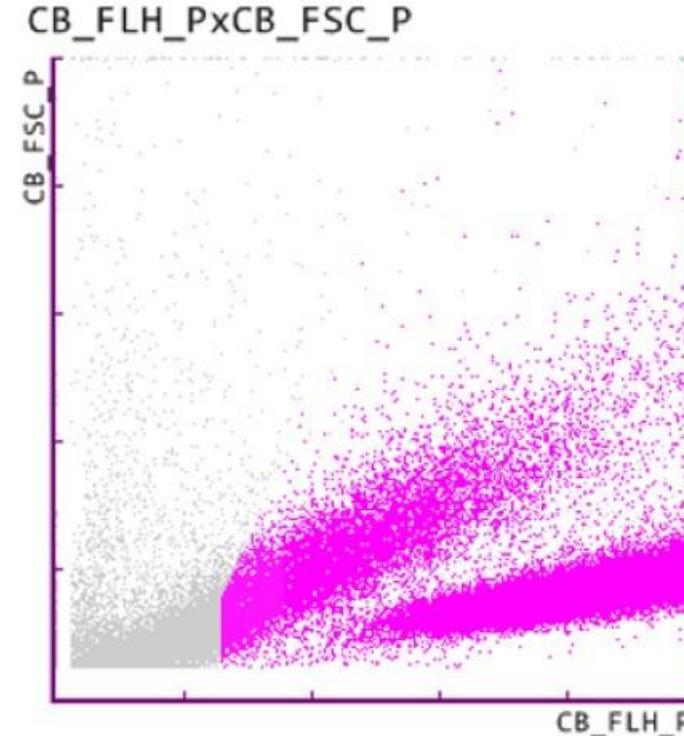


Морфология бактерий

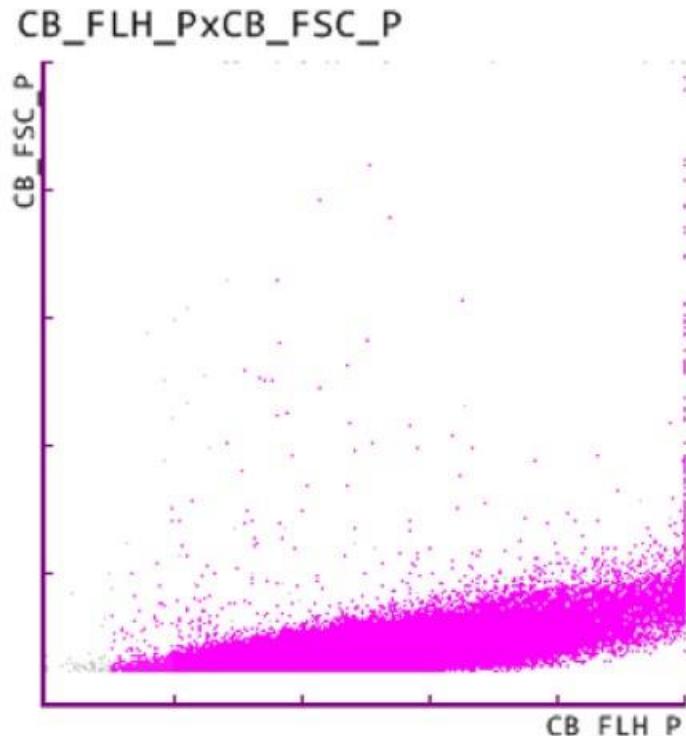
Грамм положительные?



Грамм положит./отриц.?



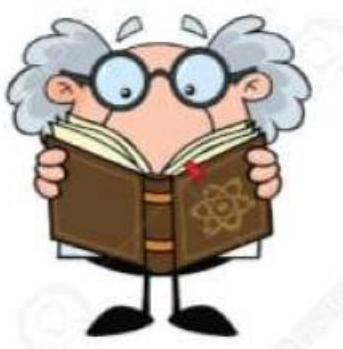
Грамм отрицательные?



Бактериальный посев - золотой стандарт диагностики

**Метод микроскопии не подходит для мониторинга терапии
бактериурии**

**Метод проточной цитофлуориметрии - точный количественный
подсчет, удобно для мониторинга терапии**



UF-4000/5000: диагностика инфекций мочевых путей:

- При выборе порогового уровня бактериурии ≥ 58 бактериальных клеток в мкл и/или ≥ 150 грибковых клеток в мкл мочи **чувствительность анализа выполненного на UF-5000 для обнаружения инфекции мочевого тракта составила 99,4% с уровнем предсказательной ценности отрицательно результата 99,7%.**
- Внедрение этого прибора в качестве предскрининга перед посевом мочи на среды позволило уменьшить число посевов мочи **на 55,5%!**

Clinica Chimica Acta 484 (2018) 171–178



Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cca



Brief reports

Evaluation of the new Sysmex UF-5000 fluorescence flow cytometry analyser for ruling out bacterial urinary tract infection and for prediction of Gram negative bacteria in urine cultures



Rita De Rosa*, Shamanta Grosso, Giada Lorenzi, Graziano Bruschetta, Alessandro Camporese

Microbiology and Virology Department, Pordenone Hub Hospital, AAS 5 "Friuli Occidentale", Via Montereale 24, 33170 Pordenone, Italy

UF-4000/5000: диагностика инфекций мочевых путей

Идентификация анализатором UF-4000/5000 грамотрицательных бактерий подтверждалась референсными методами (окраска по Граму или культуральная идентификация) в **99,8%**!

Результат классической идентификации по Граму	Флаг «Грам негатив» UF-5000
Грамотрицательные	411
Грамотрицательные + грамположительные	63
Грамположительные	1
Культура негативна (не дала роста или <10 ⁵ КОЕ/мл)	18
Всего	493
	83,4% 12,7% 0,2% 3,7% 100%

Clinica Chimica Acta 484 (2018) 171–178



Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cca



Brief reports

Evaluation of the new Sysmex UF-5000 fluorescence flow cytometry analyser for ruling out bacterial urinary tract infection and for prediction of Gram negative bacteria in urine cultures



Rita De Rosa*, Shamanta Grosso, Giada Lorenzi, Graziano Bruschetta, Alessandro Camporese

Microbiology and Virology Department, Pordenone Hub Hospital, AAS 5 "Prati Occidentale", Via Montebre 24, 33170 Pordenone, Italy

Оптимизация лабораторной диагностики инфекции мочевых путей при помощи UF



- Отрицательный результат и предварительный положительный результат (с Грам идентификацией) врач получает в день сдачи образца (доступен в течение 2-х часов после сдачи).
- **Удается избегать посева мочи более чем в половине случаев.**

Диагностические параметры (моча)



RBC

Нелизированные RBC

WBC

Сгустки WBC

Эпителиальные клетки(EC)

Плоский эпителий (Squa.EC)

Неплоский эпителий (Non.SEC)

Переходный эпителий(Tran.EC)

Почечный эпителий (RTEC)

Цилиндры

Гиалиновые цилиндры(Hy.CAST)

Патологические цилиндры (Path.CAST)

Бактерии (BACT)

Кристаллы (X'TAL)

Дрожжеподобные клетки

Сперматозоиды

Слизь

Параметры (Биологические жидкости)



RBC

WBC

Мононуклеарные клетки (MN#, MN%)
Полиморфноядерные клетки (PMN#, PMN%)

Эпителиальные клетки (EC)

Ядроодержащие клетки (TNC)

Бактерии

Всегда на борту!

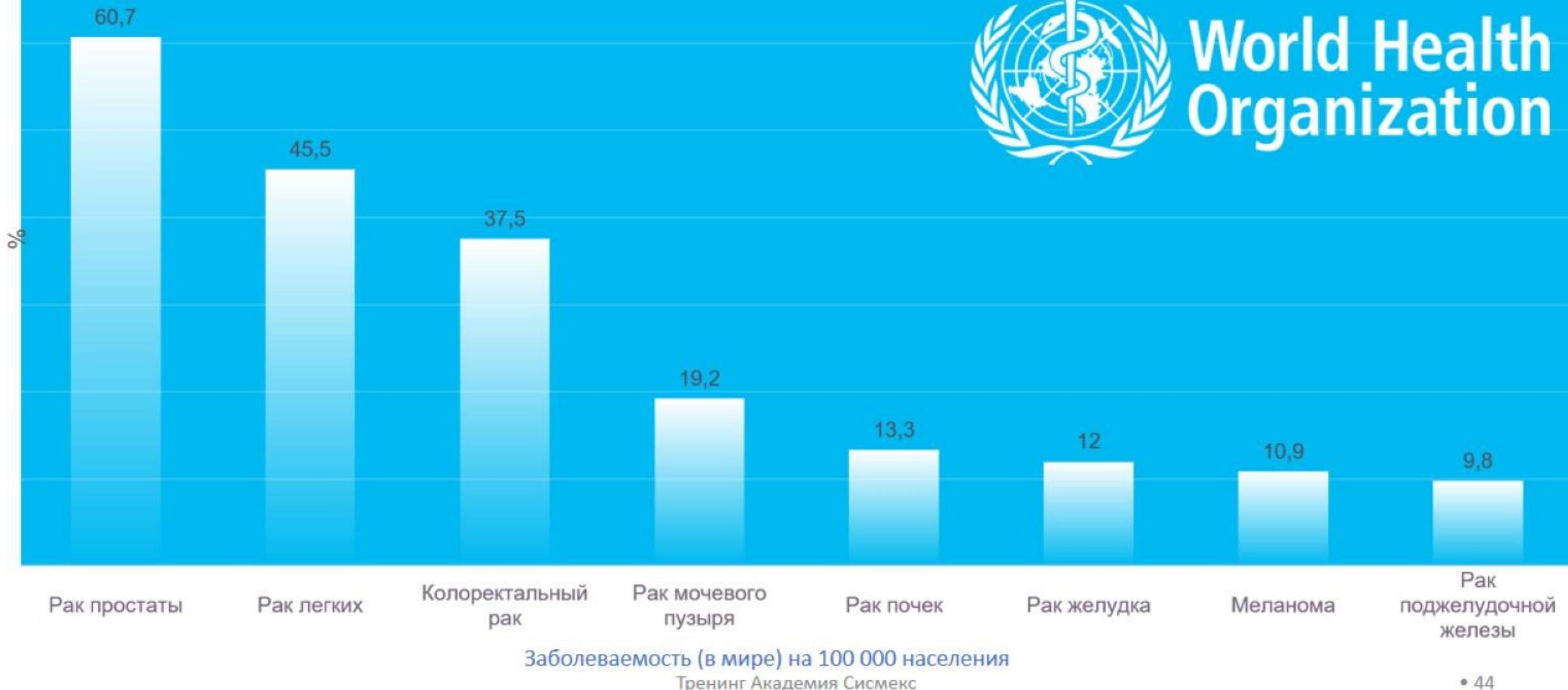
24/7

-
- Синдром клеточной атипии
-

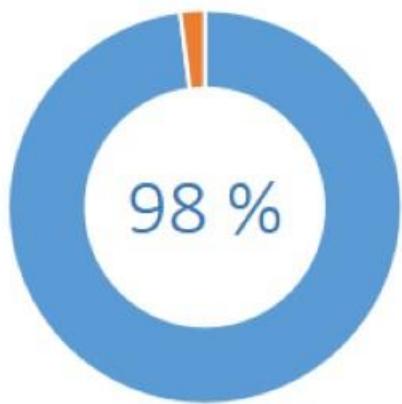
Эпидемиология онкологических заболеваний



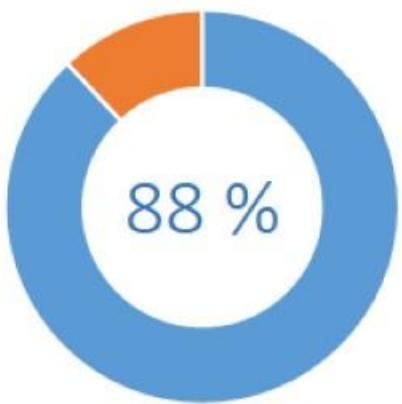
World Health Organization



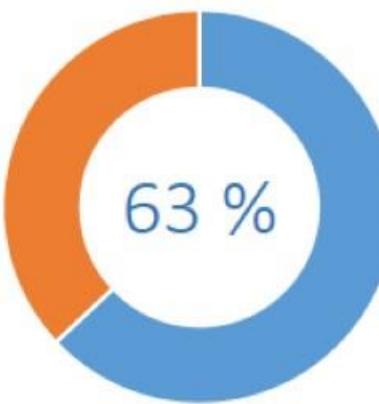
Пятилетняя выживаемость



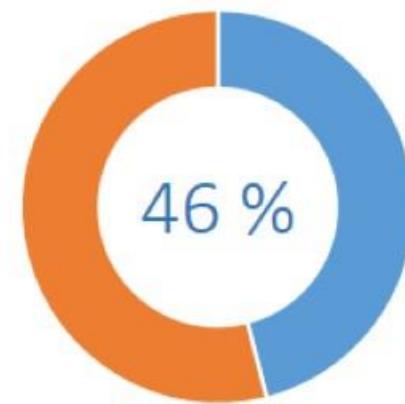
Стадия 0



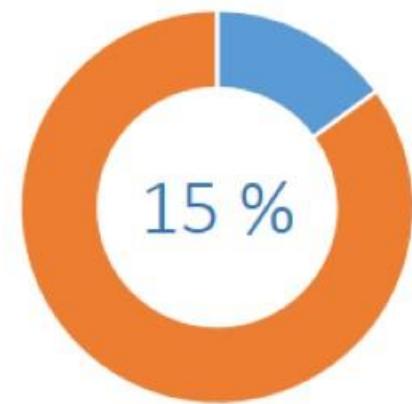
Стадия 1



Стадия 2



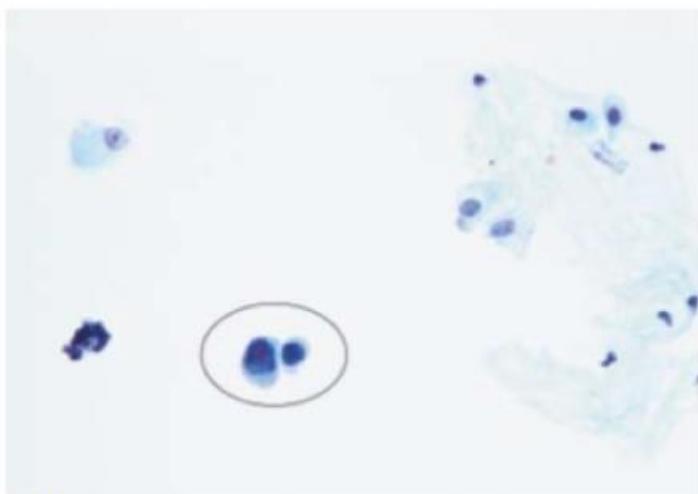
Стадия 3



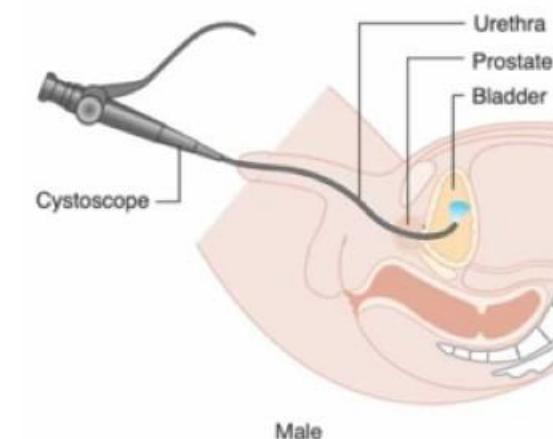
Стадия 4

Скрининг рака мочевого пузыря – пациент с симптомами

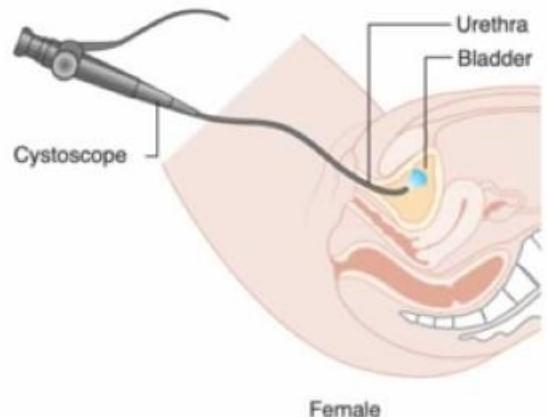
- Рак мочевого пузыря диагностируется у пациентов с гематурией
- Клиническими симптомами, связанными с поздними стадиями болезни
 - Золотой стандарт диагностики у пациентов с симптомами:
 - Скрининг на рак мочевого пузыря не является рутинной медицинской рекомендацией во всех странах.



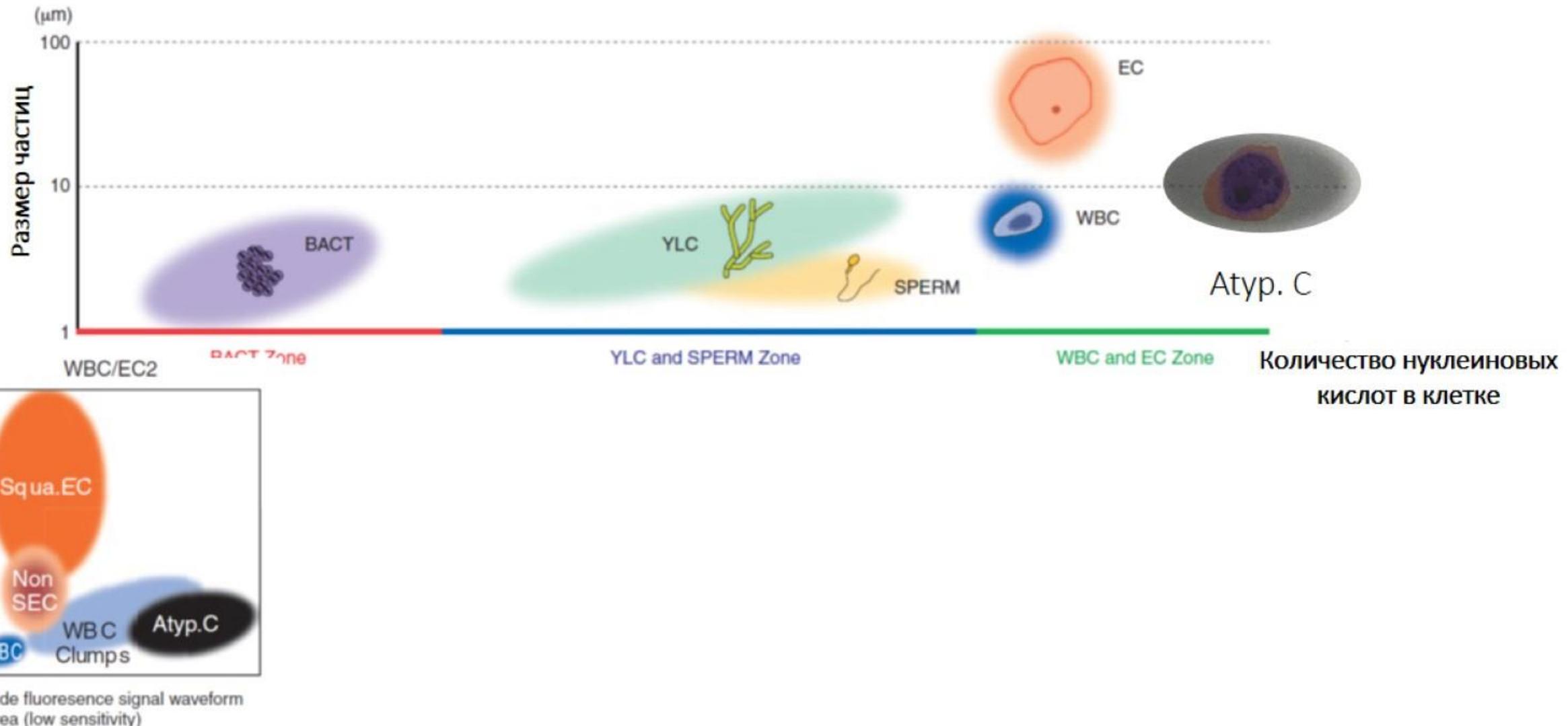
Цитологическое исследование
мочи



Цистоскопия с биопсией



Атипичные клетки: возможности анализатора UF-4000/5000



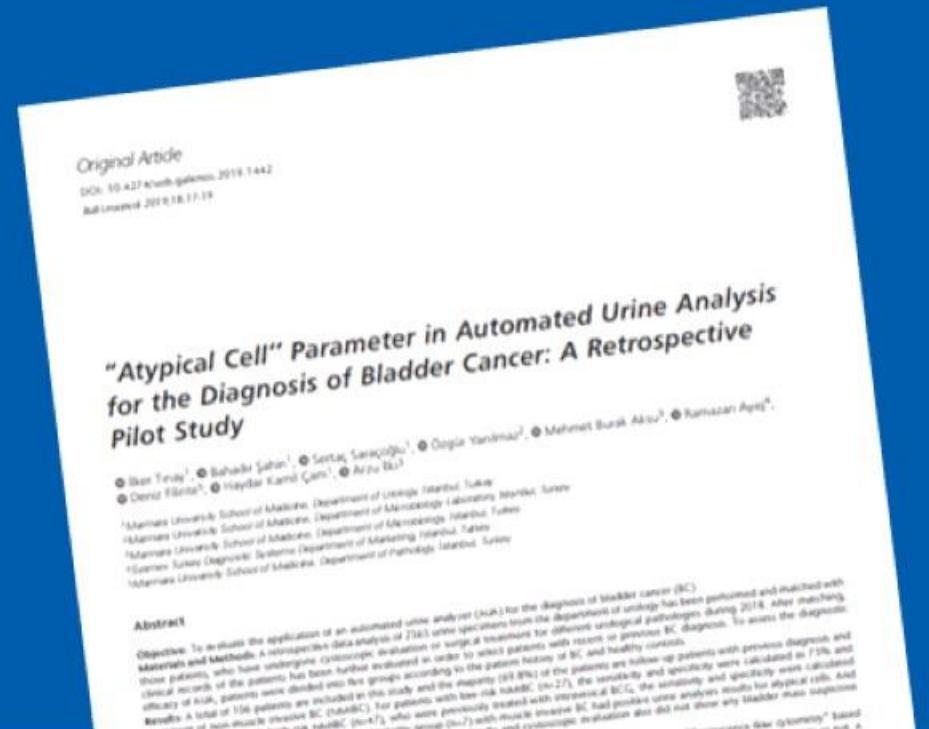
Биомаркеры для диагностики рака мочевого пузыря

- В настоящее время существует шесть тест-систем для обнаружения биомаркеров рака мочевого пузыря, одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA): NMP22® BC test, NMP22® BladderChek®, BTA stat®, BTA TRAK®, ImmunoCyt™, UroVysion™
- Чувствительность специфичность данных наборов для диагностики рака мочевого пузыря колеблется от 57-82% до 74-88%, она увеличивается с увеличением стадии и степени

Tan WS, Tan WP, Tan MY, et al. Novel urinary biomarkers for the detection of bladder cancer: A systematic review. *Cancer Treat Rev* 2018;69:39-52.].

Oeyen E, et al. Bladder Cancer Diagnosis and Follow-Up: The Current Status and Possible Role of Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci.* 2019;20(4):821.

Параметр «Атипичные клетки» в автоматическом анализе мочи для диагностики рака мочевого пузыря: ретроспективное пилотное исследование



Суть данной публикации:

Приемлемая чувствительность и высокая специфичность автоматизированного анализа мочи на основе флуоресцентной проточной цитометрии продемонстрировали потенциальную ценность для диагностических решений при последующей цистоскопии для пациентов с раком мочевого пузыря с низким риском, чтобы избежать инвазивных процедур и сэкономить средства.

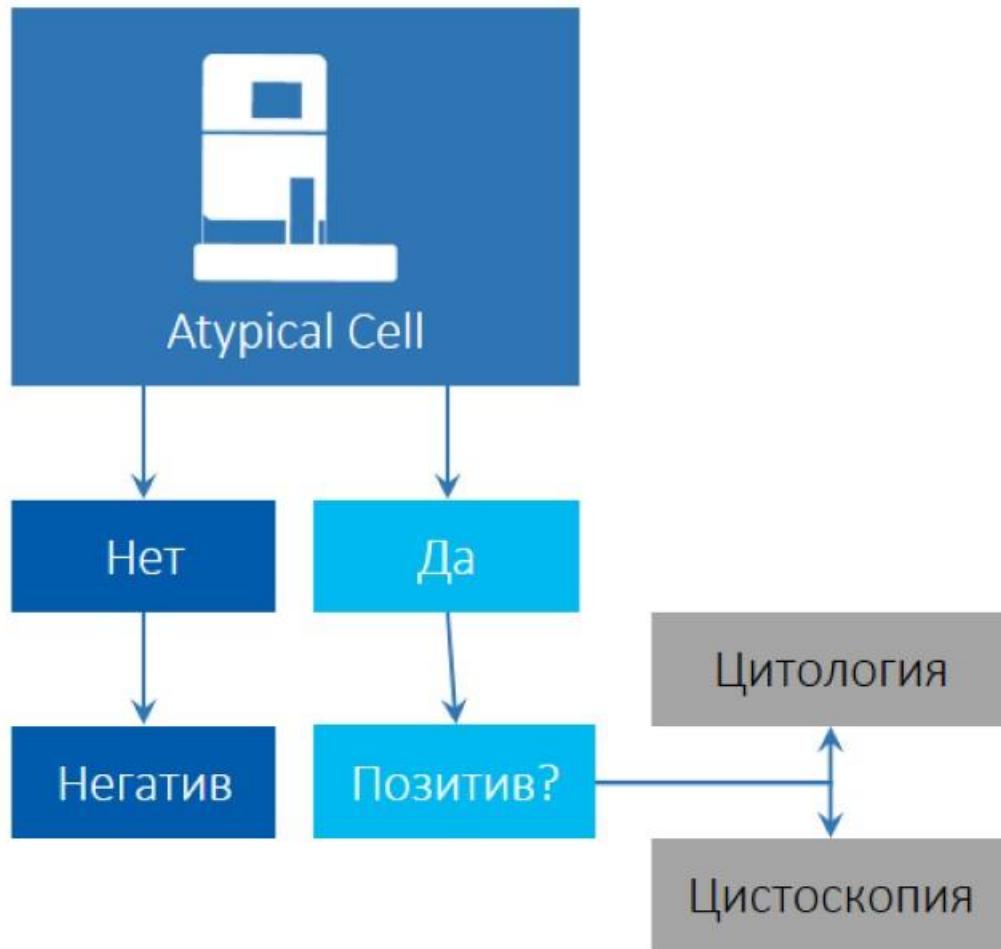
- Пациенты с низким риском неинвазирующий мышечный слой рак мочевого пузыря NMIBC (n=27)
 - Чувствительность 75 %
 - Специфичность 100 %

Table 1. Low risk NMIBC-control cystoscopy

SYSMEX result	Cystoscopy result			
	Negative	LMPUN	pTaLG	Total
Negative	23	0	1	24
Positive	0	2	1	3
Total	23	2	2	27

NMIBC: Non-muscle invasive bladder cancer, LMPUN: Papillary urothelial neoplasia with low malignant potential

Возможный алгоритм применения параметра 'Atypical Cell'



Обоснования подхода:

Tinay et al., Bull Urooncol 2019;18:17-19

Aydin et al., 2020

Ren et al. Diagnostic Pathology (2020) 15:77

Клинический случай

R	Параметр	Результат	Ед.	LH	M
	URO		mg/dL		
	BLD_H	0.06	mg/dL	*	
	BLD_R				
	BIL		mg/dL		
	KET		mg/dL		
	GLU		mg/dL		
	PRO	30	mg/dL	*	
	pH	5.0			
	NIT	-			
	LEU		c/ μ L		
	S.G	1.014			
	COLOR	STRAW	02		
	CLOUD	-			
	Error Code	0000			



Мужчина 69 лет.

В феврале 2021 года был выявлен рак мочевого пузыря.

Была выполнена трансуретральная резекция мочевого пузыря.

Клинический случай

R	Параметр	Результат	Ед.	LH	M
	RBC	11.1	/µl		
	WBC	68.9	/µl		
	WBC Clumps	0.5	/µl		
	Squa.EC	3.5	/µl		
	Tran.EC	2.1	/µl		
	RTEC	23.6	/µl		
	Hy.CAST	0.13	/µl		
	Path.CAST	0.00	/µl		
	BACT	2079.8	/µl		
	X'TAL	0.0	/µl		
	YLC	3.2	/µl		
	SPERM	0.0	/µl		
	MUCUS	0.00	/µl		

Atyp.C	3.0	/µl		
Osmo.	509	mOsm...		



В анализе осадка были обнаружены атипичные клетки в большом количестве.

Рецидив рака мочевого пузыря.

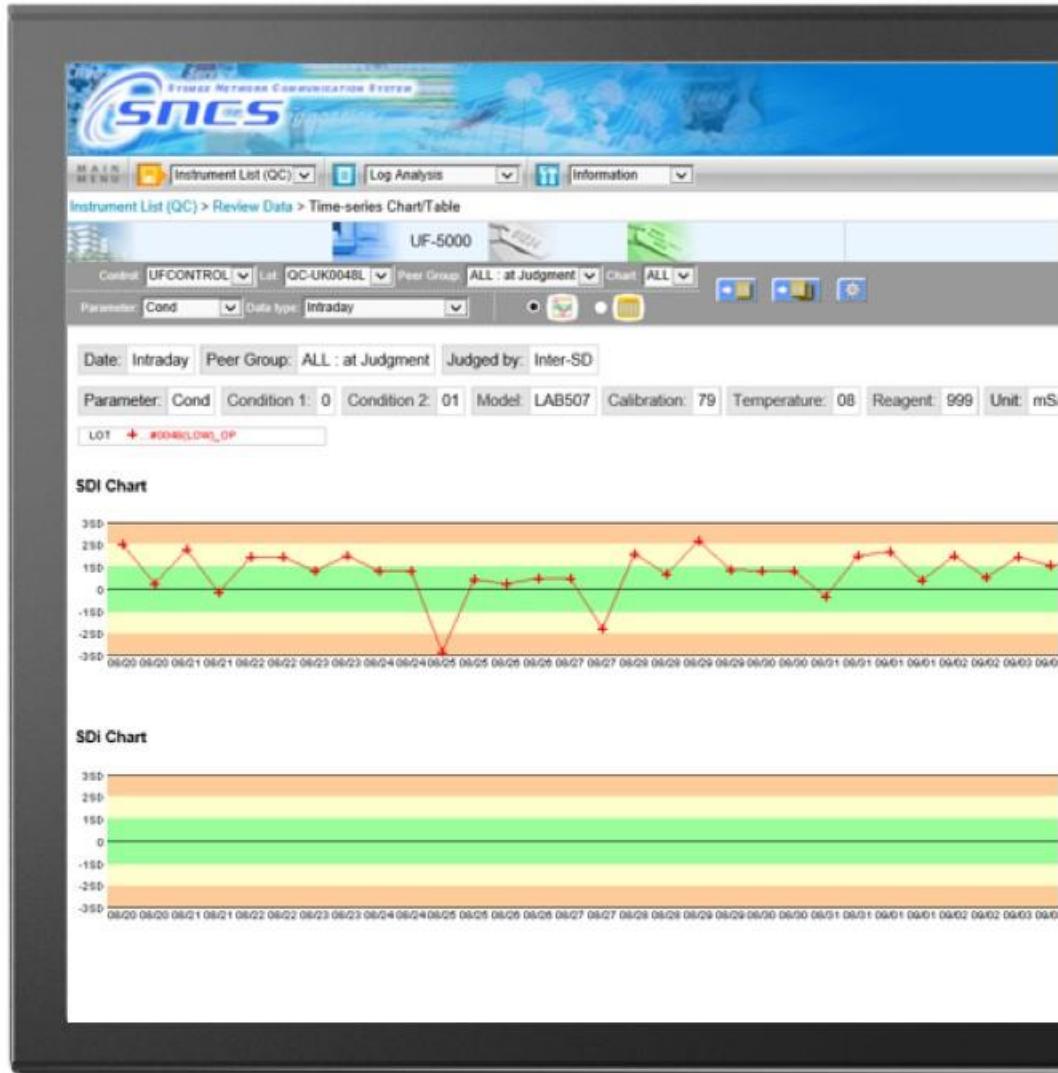
Контроль качества



Контроль качества



SNCS IQAS Online



Sysmex UN

