

Новое поколение анализаторов осадка мочи: преимущества для лаборатории и клиники

Князева Е.С.

Sysmex Europe GmbH (Москва)

Автоматизация анализа мочи до сих пор находится в стадии развития по сравнению с другими областями лабораторной диагностики, такими как гематология или клиническая химия, хотя анализ мочи является одним из самых распространенных лабораторных методов исследования и используется при диагностике фактически любых заболеваний, а для нефрологии и урологии имеет определяющее значение, т.к. либо подтверждает, либо исключает соответствующую патологию. Так называемый «Общий анализ мочи», назначаемый практически при любом первичном посещении врача, фактически состоит из нескольких: визуального описания образца мочи, результатов его исследования тест-полоской и результатов микроскопической оценки осадка. Если сегодня в России анализаторы мочи на тест-полосках уже достаточно широко распространены, то автоматизация анализа осадка до сих пор находится в зачаточной стадии.

Традиционно анализ осадка мочи в России выполняется ручным методом со всеми присущими таким методам недостатками, такими как плохая воспроизводимость, субъективность оценки, длительность и трудоёмкость выполнения и др. Из-за отсутствия контрольных материалов анализ осадка мочи фактически остается вне сферы как внутрилабораторного, так и внешнего контроля качества. При рутинном ручном исследовании коэффициент вариации при подсчете, например, таких клинически значимых элементов осадка мочи, как лейкоциты, превышает 130%, что делает метод пригодным для клинического использования только в случаях выраженного отклонения от «нормальных» значений [1].

Кроме того, сама технология выполнения ручного микроскопического исследования осадка мочи имеет серьезные подводные камни, зачастую ведущие к спорной достоверности полученного результата. Скорость седиментации различных частиц мочи при центрифугировании описывается сложной формулой и зависит от относительной плотности и вязкости мочи, а также от относительной плотности и радиуса соответствующих частиц. Разнообразие как частиц, так и химического состава мочи приводит к тому, что процент клеток, остающихся

в супернатанте сильно отличается в разных образцах [2]. Центрифугирование может также приводить к разрушению таких диагностически важных элементов, как цилиндры [4].

Еще один широко используемый вид исследований, микробиологическое исследование мочи для определения бактериурии, является еще более длительным (до двух суток), причем в зависимости от типа бактерий в некоторых случаях условия культивирования могут препятствовать полноценному росту.

Все эти сложности учитывались при разработке первого в мире автоматического анализатора частиц осадка мочи UF-100, выпущенного на мировой рынок компанией Sysmex в 1995 году. За прошедшие годы использованная технология значительно эволюционировала, и в 2006 г. Sysmex предложил лабораториям второе поколение анализаторов мочи – приборы UF-1000i и UF-500i.

Также как и их предшественники, системы UF-1000i и UF-500i являются проточными цитофлуориметрами, основанными на передовой технологии полупроводникового лазера. Без какой-либо предварительной подготовки пробирки с нативной мочой помещаются на борт анализатора UF. После автоматического перемешивания образца для анализа аспирируется 1,2 мл мочи. В приборе аликвота мочи перемешивается в фиксированном соотношении со специальными реагентами – дилуентами и флуоресцентными красителями. Задача дилуентов – растворение аморфных кристаллов за счет поддержания определенного уровня pH, предобработка клеточных мембран для облегчения дальнейшего окрашивания, а также предотвращение неспецифического окрашивания. Флуорохромы представляют собой полиметиновые красители, которые добавляются как в камеру для подсчета бактерий, так и в камеру для подсчета элементов осадка.

Полиметин, как флуорохром, имеет множество аналитических преимуществ. Он синтезируется искусственно, от количества метиновых групп, длины и структуры цепи зависит диапазон световой адсорбции, который в случае UF точно соответствует длине волны лазера, равной 635 нм. Полиметин может обнаруживаться

в крайне низких концентрациях, что особенно важно для анализа образца с очень малым содержанием клеточных элементов. Но основным свойством полиметиновых флуорохромов является их тропность к нуклеиновым кислотам, содержащимся в клетках – РНК и ДНК, причем интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна концентрации РНК/ДНК в соответствующей частице. Окрашенные клетки проходят строго по одной через проточную камеру, где под действием возбуждающего лазера флуоресцируют; длина волны испускаемого флуоресцентного сигнала составляет 660 нм. Помимо интенсивности флуоресцентного сигнала каждой частицы, регистрируется длительность его пульса, а также интенсивность фронтального и бокового светорассеяния. Совокупность регистрируемых параметров подробно описывает размер частицы, ее форму и внутреннюю структуру, а также количество содержащихся нуклеиновых кислот.

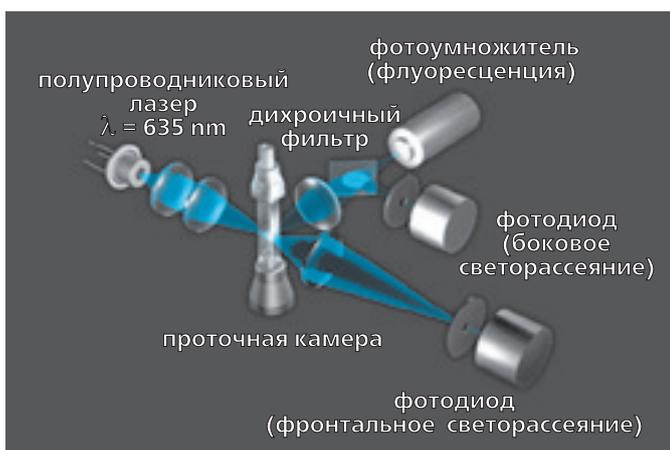


Рисунок 1.

Оптический модуль анализатора UF

Для каждого образца анализируется до 65000 частиц и на основе суммы полученной оптической информации через 40–60 секунд оператор получает данные о количественном содержании в моче эритроцитов, лейкоцитов, эпителиальных клеток (с подразделением на клетки плоскоклеточного, почечного и переходного эпителия), бактерий, грибов, кристаллов, цилиндров как гиалиновых, так и патологических, и сперматозоидов.

В анализаторе решена значимая для клинических лабораторий проблема контроля качества – существуют контрольные материалы в умеренно и высоко-патологическом уровне значений, а сам прибор поддерживает функцию автоматического контроля качества с возможностью параллельного ведения до 24 контрольных файлов.

Основной задачей лабораторного анализа осадка мочи является выявление патологических образцов, а среди диагностических находок наибольший интерес представляет обнаружение в образце эритроцитов (гематурия) и лейкоцитов (лейкоцитурия). Проведенные исследования по сопоставлению результатов, полученных референсным методом (фазоконтрастная микроскопия, подсчет в камере Фукса–Розенталя) и с помощью анализатора UF-1000i, установили наличие их высокозначимой корреляции. Коэффициент регрессии при выявлении эритроцитов составил 0,95, лейкоцитов – 0,99, а для эпителиальных клеток – 0,92 [3]. При этом авторы подчеркивают трудности микроскопического подсчета и идентификации эритроцитов при их малых концентрациях и в случае выраженной грибковой контаминации образца.

Анализаторы серии UF способны с высокой чувствительностью выявлять нормальные образцы мочи. Такая чувствительность обеспечивается классификацией огромного количества частиц, анализом нативной мочи для исключения известных источников ошибок традиционного микроскопического анализа и окрашиванием при оптимальных условиях специально разработанными реагентами. В результате «отрицательные» образцы, а их, как правило, большинство, могут быть немедленно автоматически подтверждены, результат передан в ЛИС и сразу выдан клиницисту. Реализация в лаборатории подхода совместного применения для анализа мочи ридера тест-полосок и проточного цитометра UF ведет к очень заметному сокращению количества образцов, требующих дальнейшей микроскопии. По данным разных авторов при использовании такого подхода процент микроскопических исследований может быть снижен до 10–15% [5,6].

Среди «положительных» образцов одной из наиболее частых находок – лабораторные проявления инфекции мочевыводящих путей. Используемая в канале бактерий анализатора UF система реагентов окрашивает исключительно бактерии, при этом наличие в образце клеточного дебриса не оказывает влияния на результат. Такая технология позволяет количественно подсчитывать бактерии даже в диапазоне 10^3 – 10^4 /мл. В комбинации с одновременным подсчетом в моче лейкоцитов и грибов такой анализ дает клиницисту быструю информацию о наличии или отсутствии инфекции мочевыводящих путей, позволяя при отрицательном результате значительно сократить назначение антибиотикотерапии, а лаборатории – уменьшить количество посевов мочи. По данным многочисленных исследований в зависимости от примененного cut-off для бактериурии анализатор UF демонстрирует чувствительность и специфичность до 0,97 и 0,93 соответственно,

а отрицательную и положительную прогностическая значимость – до 0,995 и 0,83 [7–10]. При использовании для выявления инфекции мочевыводящих путей предварительного скрининга на анализаторе UF количество посевов удалось сократить на 75% [11,12]. Кроме этого, оценка рисунка скатерограммы бактерий позволяет лаборатории сделать предварительный вывод о типе патогена.

Помимо выявления признаков инфекции мочевыводящих путей клинически значимым является обнаружение гематурии. Автоматическая детекция гематурии также требует высокой чувствительности, так как в дальнейшем должен быть выявлен возможный источник кровотечения. По возможности, для оценки морфологии эритроцитов следует использовать фазово-контрастную микроскопию, что позволяет наилучшим способом выявить аномальную морфологию клеток – эритроциты после прохождения через мембрану клубочков характеризуются типичными морфологическими изменениями. Помимо круговых форм с гладкой или неровной структурой, акантоциты (известные также как клетки Микки-Мауса) являются особым видом дисморфных эритроцитов с проекцией специфической формы. Морфологическая оценка эритроцитов требует значительного практического опыта и хорошего знания микроскопии осадка мочи:

- Эритроциты гломерулярного генеза как правило меньше эритроцитов из не гломерулярного источника
- Эритроциты гломерулярного генеза варьируют по форме и размеру, в то время как при негломерулярном источнике кровотечения они одинаковы
- Эритроциты гломерулярного генеза часто бывают «пустыми», т.е. в них почти отсутствует гемоглобин
- Иногда при гломерулярной геморрагии микроскопически могут выявляться также эритрофагоциты. Эритрофагоциты представляют собой эпителиальные клетки, уже адсорбировавшие эритроциты.

Напротив, при внепочечном кровотечении эритроциты сохраняют свою форму (описываются как эуморфные, изоморфные или не гломерулярные эритроциты). Помимо фазо-контрастной микроскопии в лабораториях используется также световая микроскопия предварительно окрашенного по Райту образца и световая микроскопия нативного образца. Минимальную чувствительность (66%) демонстрирует наиболее распространенный метод световой микроскопии нативного образца [13]. Таким образом клинически значимая чувствительность показана только для метода, доступного далеко не во всех лабораториях, а достоверность информации о клеточной морфологии, полученной рутинным методом сомнительна. В 80-е годы прошлого века были предприняты достаточно

многообещающие попытки использовать для определения источника кровотечения показатель распределения эритроцитов мочи по размеру, полученный на гематологическом анализаторе. Однако, этот метод показал серьезные ограничения, т.к. частицы, схожие по размеру с эритроцитами мочи, например, бактерии или кристаллы, ошибочно регистрируются анализатором как эритроциты. В отличие от гематологических анализаторов приборы серии UF лишены таких недостатков: на основании четкого выделения эритроцитов в образце, анализа их размера и распределения по размеру прибор в состоянии оценить морфологию эритроцитов и сообщить о своих находках оператору. В случае, если эритроциты нормальны по размеру и одинаковы по форме, генерируется сообщение «RBC isomorphic?», а если эритроциты дисморфны или имеются значительные вариации по размеру – сообщение «RBC dysmorphic?» или «RBC mixed?». Использование данной классификации в клинической практике показало для выявления гломерулярного кровотечения ее чувствительность составляет 100%, специфичность 92% для диагностики негломерулярных кровотечений 83% и 94%, соответственно [14,15].

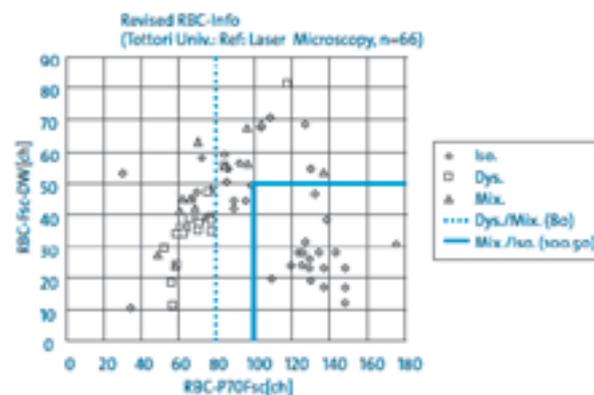


Рисунок 2.

Сравнение данных о составе эритроцитов (метод лазерной микроскопии) и содержании изоморфных эритроцитов, полученных на анализаторе Sysmex серии UF (правый нижний квадрант)

Обнаружение в образце преимущественно дисморфных эритроцитов позволяет предположить почечный источник кровотечения (гломерулярная гематурия). Семейный анамнез и другие клинические признаки, совместно с лабораторными данными, играют важную роль при принятии решения о дальнейших диагностических манипуляциях, особенно у детей, т.к. крайне желательно избегать инвазивных методов исследования.

При повторном обнаружении дисморфной гематурии, как изолированной, так и в сочетании с протеинурией и патологическими цилиндрами, необходимо выяснить возможную семейный анамнез гематурии, также необходимо исключить системные заболевания с вовлечением почек в патологический процесс; это может потребовать выполнения серологических и прочих клинических исследований.

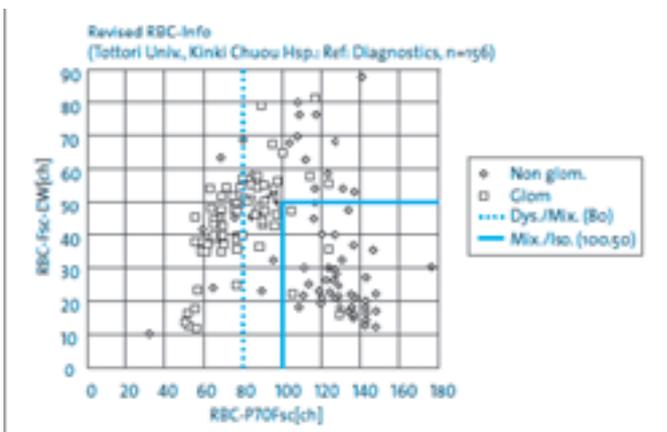


Рисунок 3.

Данные об эритроцитах, полученные на анализаторе Sysmex серии UF, сопоставление с источником кровотечения

В случае обнаружения гематурии без признаков дисморфии эритроцитов, что таким образом исключает вовлечение почечных клубочков в патологический процесс, такое состояние может быть вызвано воспалительными изменениями мочевыводящих путей. Для таких образцов

при обнаружении в них лейкоцитов, бактерий или грибов, необходимо в дальнейшем выполнить посев мочи для идентификации патогена. В случае же отсутствия признаков инфекции мочевыводящих путей должны быть рассмотрены другие возможные причины гематурии, такие как мочекаменная болезнь, при которой за счет механического повреждения возможно попадание эритроцитов в мочу.

Анализ мочи, одна из древнейших медицинских технологий, получил в 21 веке новые возможности, которые предоставляют новейшие автоматизированные анализаторы осадка мочи UF-1000i/UF-500i (Sysmex Corporation, Japan). Использование этих приборов позволяет значительно сократить время анализа, сделать его результат достоверным, дает дополнительные возможности для мониторинга терапии, сократить исследования микроскопии осадка мочи, позволив квалифицированному персоналу лабораторий сосредоточиться только на образцах, требующих внимания, а также предоставляет урологам и нефрологам дополнительную информацию об источнике кровотечения, что исключительно важно для дифференциальной диагностики заболеваний и значительно снижает количество последующих инвазивных методов.

Использование UF-1000i/UF-500i как скринингового инструмента перед посевом мочи помогает исключить слепое назначение антибиотиков, что ведет как к уменьшению расходов лечебного учреждения, так и к снижению риска развития резистентной флоры. Для лаборатории предварительный скрининг биологических образцов позволяет значительно уменьшить последующие посевы, что также дает значительный экономический эффект.*

* Список литературы находится в редакции