

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLAVDIJA POŠ

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLAVDIJA POŠ

**PRIMERJAVA AVTOMATIZIRANIH ANALITSKIH
METOD ZA DOLOČANJE URINSKEGA SEDIMENTA**

**COMPARISON OF AUTOMATED ANALYTICAL
METHODS FOR DETERMINATION OF URINARY
SEDIMENT**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala v Laboratoriju za analitiko urina in spremljanje koncentracije zdravil Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Milanu Skitku, spec. med. biokemije, svetniku, in somentorici mag. Mateji Šter, spec. med. biokemije za vodenje in vzpodbujanje pri nastajanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim v laboratoriju za dodatno pomoč in prijaznost.

Iskrena hvala moji družini in prijateljem, ki so me spodbujali pri delu in mi stali ob strani.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom dr. Milana Skitka in mag. Mateje Šter.

Ljubljana, 2012

Klavdija Poš

Mentor: doc.dr. Milan Skitek, spec. med. biokemije, svetnik

Somentorica: mag. Mateja Šter, spec. med. biokemije

Predsednik: dr. Darko Černe, mag. farm., spec. med. biokemije

Član: asis. dr. Nace Zidar, mag. farm

KAZALO

SEZNAM OKRAJŠAV	11
1 UVOD.....	12
1.1 NASTANEK URINA	13
1.1.1 LEDVICE IN NJHOVO DELOVANJE	13
1.1.2 SESTAVA URINA	14
1.2 ODVZEM URINA.....	15
1.2.1 PRIPRAVA NA ODVZEM	16
1.2.2 URINSKI VZOREC GLEDE NA ČAS ODVZEMA	16
1.2.2.1 PRVI JUTRANJI URIN	16
1.2.2.2 DRUGI JUTRANJI URIN	17
1.2.2.3 NAKLJUČNI VZOREC.....	17
1.2.2.4 ČASOVNI VZOREC	17
1.2.3 URINSKI VZOREC GLEDE NA NAČIN ODVZEMA	17
1.2.4 ZBIRALNIKI	18
1.2.5 TRANSPORT, SHRANJEVANJE IN STABILIZIRANJE URINA	18
1.3 OSNOVNA URINSKA ANALIZA.....	19
1.3.1 MIKROSKOPSKA ANALIZA CELIC	20
1.3.1.1 ERITROCITI.....	20
1.3.1.2 LEVKOCITI.....	22
1.3.1.3 EPITELNE CELICE	24
1.3.1.4 CILINDRI.....	25
1.3.1.5 KRISTALI.....	26
1.3.1.6 SPERMIJI, GLIVE, PARAZITI.....	27
1.3.1.7 BAKTERIJE.....	28
1.4 PRETOČNI CITOMETER UF-1000i (SYSMEX DIAGNOSTICS)	28
1.5 MIKROSKOPSKI ANALIZATOR SEDIMAX (MENARINI DIAGNOSTICS)	34
2 NAMEN NALOGE	38
3 METODE IN MATERIALI	39
3.1 VZORCI	39
3.2 OPREMA.....	39
3.2.1 SVETLOBNI FAZNO KONTRASTNI MIKROSKOP	39
3.3 MIKROSKOPSKA ANALIZA	42
3.4 ANALIZA S PRETOČNIM CITOMETROM UF-1000 i SYSMEX.....	45
3.5 ANALIZA Z MIKROSKOPSKIM ANALIZATORJEM SEDIMAX.....	46
3.6 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV	47
4 REZULTATI.....	48
4.1 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV (LEVKOCITOV, ERITROCITOV, BAKTERIJ, PATOLOŠKIH CILINDRIOV IN GLIVIC) DOBLJENIH Z MIKROSKOPOM, PRETOČNIM CITOMETROM UF-1000i SYSMEX IN AVTOMATIZIRANIM MIKROSKOPSKIM ANALIZATORJEM SEDI-MAX.....	48
5 RAZPRAVA.....	62
6 ZAKLJUČEK	67

7 LITERATURA	68
--------------------	----

KAZALO SLIK

Slika 1: Pretočni citometer UF-1000i Sysmex.....	1
Slika 2: Princip delovanja pretočnega citometra	1
Slika 3: Grafa jakosti sipanja svetlobe in fluorescence	1
Slika 4: Primer rezultata analizeUF-1000i Sysmex	1
Slika 5: Avtomatizirani mikroskopski analizator SediMax.....	1
Slika 6: Primer slike urinskega sedimenta posnete s SediMax-om	1
Slika 7: Primer izvida analizatorja SediMax.....	1
Slika 8: Mikroskop Eclipse 50i Nikon	1

KAZALO TABEL

Tabela 1: Fiziološko pomembni kristali pri različnih pH-jih.....	27
Tabela 2: Vrednosti kontrol	46
Tabela 3: Osnovni neparametrični statistični podatki za številčno koncentracijo levkocitov z uporabo mikroskopa in analizatorjev Sedimax ter UF-1000i.	48
Tabela 4: Primerjava številčne koncentracije levkocitov z uporabo mikroskopa in analizatorjev Sedimax ter UF-1000i z Wilcoxonovim testom (Z) in Spearmanovim koeficientom korelacije rangov (R)	48
Tabela 5: Osnovni neparametrični statistični podatki za številčno koncentracijo eritrocitov z uporabo mikroskopa in analizatorjev Sedimax ter UF-1000i.	49
Tabela 6: Primerjava številčne koncentracije eritrocitov z uporabo mikroskopa in analizatorjev Sedimax ter UF-1000i z Wilcoxonovim testom (Z) in Spearmanovim koeficientom korelacije rangov (R)	49

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Primerjava števila levkocitov med mikroskopom in UF-1000i ₁	
Graf 2: Primerjava števila eritrocitov med mikroskopom in UF-1000i ₁	
Graf 3: Primerjava števila levkocitov med mikroskopom in SediMax-om.....	1

Graf 4: Primerjava števila eritrocitov med mikroskopom in SediMax-om	1
Graf 5: Bland-Altman analiza števila levkocitov med UF-1000i in SediMax-om	1
Graf 6: Bland-Altman analiza števila eritrocitov med UF-1000i in SediMax-om	1
Graf 7: Primerjava števila bakterij med mikroskopom in SediMax-om	1
Graf 8: Primerjava števila bakterij med mikroskopom in UF-1000i ..	1
Graf 9: Primerjava števila patoloških cilindrov med mikroskopom in SediMax-om	1
Graf 10: Primerjava števila patoloških cilindrov med mikroskopom in UF-1000i	1
Graf 11: Primerjava odsotnosti/prisotnosti glivic med mikroskopom in SediMax-om	1
Graf 12: Primerjava odsotnosti/prisotnosti glivic med mikroskopom in UF-1000i	1

POVZETEK

Urinska analiza je osnoven in zelo pomemben postopek v diagnostiki bolezenskih stanj. Analiza urinskega sedimenta se lahko izvaja ročno s pomočjo mikroskopa ali avtomatizirano z različnimi avtomatiziranimi sistemi.

Pretočni citometer Sysmex UF-1000i olajša delo v laboratoriju, saj je avtomatiziran in opravi do 100 urinskih analiz na uro. Za analizo potrebuje 4 ml svežega urinskega vzorca. Prednost aparata je, da opozori na vzorce, ki jih je potrebno pregledati z mikroskopom. Zaradi visoke zanesljivosti in občutljivosti zazna patološke vrednosti in nas na njih opozori tudi na natisnjem izvidu.

Avtomatiziran mikroskopski urinski analizator SediMax je novost na področju urinske analitike in v laboratoriju zelo olajša delo. Za analizo potrebuje 2 ml svežega urinskega vzorca in na uro avtomatizirano opravi do 80 urinskih analiz. Za vsak vzorec kamera s pomočjo svetlobnega mikroskopa posname 15 slik. Aparat ustrezno označi vrednosti, ki so patološke in vzorce, ki vsebujejo preveč elementov. Prednost SediMax-a je, da se na slikah lahko označijo vsi delci, kar nam pomaga pri identifikaciji.

V naši raziskavi smo preverjali vzorce, ki jih je pretočni citometer označil kot tiste, ki vsebujejo povišane oziroma patološke vrednosti določenih elementov. Ti vzorci potrebujejo še podrobnejši pregled z mikroskopom. Preiskovali smo naključne vzorce urina. Za raziskavo smo tako zbrali 141 vzorcev in vse tudi statistično ovrednotili. S pomočjo različnih statističnih testov smo rezultatom določili način porazdelitve – neparametričen, mediano, mejo zaupanja ter območje prvega in tretjega kvartila.

Tako pretočni citometer kot tudi avtomatizirani mikroskopski analizator sta zelo občutljiva. Vendar pa je v določenih primerih še vedno potrebno rezultate pregledati z mikroskopom. Več takšnih primerov je pri pretočni citometriji kot pa pri analizatorju SediMax-u. Pri SediMax-u lahko najprej pregledamo mikroskopske slike vzorca na računalniku in se na podlagi le-teh odločimo za mikroskopiranje. Pri obeh aparatih je zanesljivost določanja eritrocitov in levkocitov primerljiva in zadovoljiva, kar pa ne velja za ostale elemente sedimenta, kot so patološki cilindri, glivice in bakterije.

ABSTRACT

Urinary analysis is an essential and very important procedure in the diagnosis of pathological conditions. Fixed urinary sediment analysis can be performed manually using a microscope or automated with various automated systems.

Flow cytometer Sysmex UF-1000i simplifies the work in the laboratory, it is automated and performs up to 100 urine analysis per hour. Analysis requires 4 ml of fresh urine sample. The advantage of this apparatus is that it detects the samples that need to be examined with the microscope. Due to high reliability and sensitivity it detects pathological values and draws our attention to them on the printed clearance.

Automated urine microscopic analyzer is an innovation in the field of urinary analysis and facilitates the work in the laboratory. Analysis requires 2 ml of fresh urine sample and is completed by the automated analysis of 80 urine analysis per hour. For each sample the light microscope camera captures 10 images. Apparatus marks the pathological values and samples that contain too many elements. SediMax advantage is that the images can be marked with all the particles which helps in identification.

In our study we examined samples, which have in flow cytometry been marked as those containing elevated or pathological values of certain elements. These samples require a more detailed examination with a microscope. We studied random samples of urine. For our study we collected 141 samples and evaluated them statistically. Using different statistical tests, we determined the nonparametric method of distribution, the median, the confidence limit and the area of first and third quartile.

Flow cytometer as well as an automated microscopic analyzer are very sensitive. However, in some cases, we still need to review the results with a microscope. More such cases are in flow cytometry than in SediMax. In SediMax analyzer we can firstly examine microscopic images of the sample on our computer and on the their basis we decide for the microscopy. In both of these appliances the reliability of determination of erythrocytes and leukocytes is comparable and satisfactory, but this does not apply to other elements of sediment such as pathological cylinders, yeast and bacteria.

SEZNAM OKRAJŠAV

RBC	rdeče krvne celice (eritrociti)
WBC	bele krvne celice (levkociti)
EC	epitelne celice
CAST	cilindri
Path. CAST	patološki cilindri (cilindri z vključki)
BACT	bakterije
SRC	majhne okrogle epitelne celice
YLC, YEA	glivice
X`TAL, CRY	kristali
CaOxm	kalcijev oksalat monohidrat
CaOxd	kalcijev oksalat dihidrat
TRI	triple fosfat (magnezijev, amonijev fosfat)
URI	sečna kislina
SPRM	spermiji
MUC	sluz
HPF	vidno polje mikroskopa pri večji povečavi (400x)
LPF	vidno polje mikroskopa pri nižji povečavi (100x)
COND	prevodnost

1 UVOD

Urin ali seč je biološka snov, ki se uporablja kot parameter za biokemično analizo. Osnovna analiza urina sodi med najpogostejše medicinske preiskave in ima pomembno vlogo pri odkrivanju motenj v delovanju ledvic in sečnih poti.

1.1 NASTANEK URINA

1.1.1 LEDVICE IN NJIHOVO DELOVANJE

Ledvice so parni organ fižolaste oblike. Ležita v trebušni votlini pod trebušno prepono, zadaj ob hrbtenici. Najpomembnejše naloge ledvic so, da izločajo odpadne presnove snovi in telesu tuje snovi, uravnavajo koncentracije snovi v telesnih tekočinah, vodo in elektrolite, vzdržujejo kislinsko-bazično ravnotežje in imajo endokrino funkcijo (tvorba renina, eritropoetina, vitamina D, prostaglanidov).

Nefron je funkcionalna enota ledvice. Sestavljen je iz glomerula, proksimalnega tubula, Henlejeve zanke, distalnega tubula ter zbirnega voda.

Glomerul se nahaja na začetku proksimalnega zvitega tubula in je sestavljen iz glomerulnih kapilar in Bowmanove kapsule.

Proksimalni tubul je za presnovo najdejavnejši del nefrona in prehaja v Henlejevo zanko, kjer se urin koncentrira (reabsorbirajo se Na^+ , K^+ , Cl^-).

Nato sledi distalni tubul, ki povezuje Henlejevo zanko z zbirnim vodom, kjer poteka izločanje in reabsorpcija. V distalnem delu tubula se uravnava kislinsko-bazično ravnotežje in reabsorpcija vode pod vplivom antidiuretičnega hormona.

Za nastanek urina so potrebni naslednji dejavniki:

1. Glomerulna filtracija je ultrafiltracija krvne plazme v glomerulu. Glomerulni filtrat je kemično podoben plazmi, le da je v njem zelo malo beljakovin.

2. V proksimalnem zvitem tubulu se reabsorbirajo voda, glukoza, aminokisliline in 85 % NaCl iz glomerulnega filtrata bodisi z aktivnim transportom ali pasivno difuzijo. V svetlino proksimalno zvitega tubula pa se izločajo kreatinin in druge snovi, npr. nekatera zdravila.
3. V distalnem tubulu se snovi bolj izločajo v seč in manj reabsorbirajo. Tubularna sekrecija je izločanje različnih stranskih in končnih produktov presnove in organskih spojin, ki se zaradi vezave na plazemske proteine ne morejo filtrirati v glomerulu. Tako nastane končni urin.

1.1 2 SESTAVA URINA

Urin je sestavljen iz 96 % vode in 4 % raztopljenih snovi, ki izhajajo iz zaužite hrane ali pa so odpadni produkt organizma. Sestava je različna, saj vsebuje več kot tisoč snovi, klinično pomembnih pa jih je okoli dvesto. Dnevna sestava je odvisna od zaužite hrane, metabolizma in delovanja ledvic.

Urin je raztopina soli in sečnine, ki je primarni produkt metabolizma proteinov in aminokislin. Predstavlja kar polovico količine vseh snovi v urinu.

Kreatinin in sečno kislino telo odstrani zaradi toksičnosti in sta najpomembnejši sestavini urina. Koncentracija kreatinina je odvisna od mišične mase, njegovo dnevno izločanje pa je konstantno pri določeni osebi. Merjenje koncentracije kreatinina uporabljamo za kontroliranje časovnih vzorcev urina. Zaradi izločanja pri glomerulni filtraciji se ga prav nič ne resorbira nazaj. Povečane koncentracije v krvi opozarjajo na okvarjeno glomerulno filtracijo in na ledvične disfunkcije.

V urinu se nahajajo tudi anorganski ioni. Največ je kloridnih in natrijevih ionov, lahko pa je tudi nekaj kalijevih, magnezijevih, kalcijevih in sulfatnih ionov ter amonijevega fosfata. Poleg naštetih

sestavin se v urinu nahajajo tudi organizirani elementi: manjše število eritrocitov, levkocitov, bakterij, hialinih cilindrov in kristalov.

Za vsako substanco obstajajo referenčne vrednosti (1,5).

1.2 ODVZEM URINA

Na rezultate laboratorijskih analiz vplivajo predanalitski in biološki dejavniki, kot so:

- Način prehranjevanja: post pred odvzemom urina v splošnem zniža diurezo; stradanje znižuje vrednost soli in fosfatov, zvišuje pa izločanje metabolitov, npr. ketonov in amoniaka; obrok ogljikovih hidratov pred odvzemom urina – postprandialni urin – zvišuje količino glukoze.
- Hitrost izločanja urina: odvisna od vnosa tekočine in časa zadrževanja urina v mehurju; za kemijsko analizo urina ni potrebna inkubacija, pri analizi morfologije celic in cilindrov priporočajo 1 do 2 urni inkubacijski čas, za določitev rasti bakterijskih kolonij pa 4 do 8 urni inkubacijski čas urina v mehurju.
- Telesni napor in počitek: večji telesni napor lahko pospeši izločanje sestavin urina zaradi večje glomerulne filtracije kot posledice zvišanega krvnega pritiska; z imobilizacijo bolnika se več kot dvakrat poveča izločanje kalcija.
- Zmanjšanje sposobnosti ledvic za koncentriranje urina.
- Vnos snovi z diuretičnim učinkom.

Zaradi teh dejavnikov je nujno spremljati in dokumentirati koncentracijo urina (relativna gostota, osmolalnost, kreatinin), kar nam omogoča relativni izračun določenega analita glede na

koncentriranost in klinično ovrednotenje rezultatov analize. Poleg teh dejavnikov so prisotni tudi fiziološki dejavniki, na primer nekaj levkocitov pri nosečnicah oziroma nekaj eritrocitov pri odraslih moških. Te dejavnike moramo poznati, da lahko izvid pravilno interpretiramo (2).

1.2.1 PRIPRAVA NA ODVZEM

Strokovna oseba mora dati preiskovancu ustrezna ustna in pisna navodila za način odvzema urina in pojasniti, zakaj se potrebuje urinski vzorec. Preiskovancu tako izročimo primarni zbiralnik za urin, ki je označen z imenom in priimkom na lončku, ne pa na pokrovčku, saj bi v tem primeru zbiralnik po odpiranju ostal neoznačen. Zbiralnik ima primerno veliko odprtino za uriniranje (premer vsaj 4 cm), ki se dobro zapre, da urin ne izteka. Zbiralnik naj bo označen z nalepko odporno na vlago (2).

1.2.2 URINSKI VZOREC GLEDE NA ČAS ODVZEMA

1.2.2.1 PRVI JUTRANJI URIN

Ta vzorec se odvzame takoj po prespani noči, saj je bil urin v mehurju 8 ur in je tako primeren za analizo snovi, ki se morajo koncentrirati ali inkubirati za zaznavo (nitriti, proteini). Vzorec je primeren za ortostatske proteinurije. Formirani elementi (npr. levkociti, eritrociti in cilindri) so bolj obstojni v koncentriranih, zakisanih vzorcih. Zaradi sprememb epitelnih celic niso primerni za citološke analize. Prvi jutranji urin je najpogosteje uporabljen izbor pri preiskovancih v bolnišnicah in velja za standardni vzorec izbora. Če tak vzorec v laboratorij ne prispe v roku štirih ur, ga je potrebno predhodno konzervirati.

1.2.2.2 DRUGI JUTRANJI URIN

Ta vzorec se kot izbor največkrat uporablja pri ambulantnih preiskovancih, saj je primeren za večino rutinskih analiz. Odvzame se 2 do 4 ure po prvem jutranjem urinu. Standardizirani postopek zbiranja poveča občutljivost za določanje rasti bakterijskih kultur in številčne koncentracije celic. V primeru, da preiskovanec ne upošteva navodil, ki pravijo, da lahko do odvzema popije samo kozarec vode, velja drugi jutranji urin za naključni vzorec.

1.2.2.3 NAKLJUČNI VZOREC

Najpogosteje se uporablja za rutinske, presejalne teste. Vzorec je običajno zbran čez dan in brez kakršnekoli predhodne priprave preiskovanca. Tak vzorec pa ne odraža pravega stanje organizma, če je predhodno prišlo do velike količine zaužite tekočine ali prevelikega telesnega napora.

1.2.2.4 ČASOVNI VZOREC

Uporablja se za primerjavo koncentracije analita v urinu in v krvi. Primerjava serije urinskih in krvnih koncentracij nekega analita v določenem časovnem intervalu pomaga pri določevanju ledvične mejne vrednosti in diagnozi bolezni. Poznamo tudi dvourni postprandialni urin za določanje glukozurije po kateremkoli obroku.

1.2.3 URINSKI VZOREC GLEDE NA NAČIN ODVZEMA

Rutinski odvzem urina ne zahteva predhodne priprave bolnika, saj ta potrebuje le jasna pisna in ustna navodila. Preiskovanec navadno urinira v primeren zbiralnik. Za ostale zbiralne postopke urina kot so srednji curek urina, prvi curek urina, vzorec s kateterizacijo, vzorec s suprapubično aspiracijo in pediatrični vzorec pa je potrebna pomoč.

1.2.4 ZBIRALNIKI

Primarni zbiralniki za enkratni odvzem se uporabljajo za rutinski odvzem urina. Narejeni so iz prosojnega materiala za enkratno uporabo in morajo biti kemično čisti in suhi. Njihova kapaciteta mora biti od 50 do 100 ml, odprtino pa morajo imeti vsaj 5 cm, za lažje zbiranje urina preiskovancev obeh spolov. Sterilni zbiralniki se uporabljajo za mikrobiološke preiskave oziroma pri odvzemu vzorcev za pripravo bakterijske kulture.

Primarni zbiralniki za zbrani urin se uporabljajo za zbiranje 24-urnega urina, so kemično čisti, s kapaciteto od 2 do 3 litrov, primerno široko odprtino in vodotesnim pokrovom. Zbiralniki so narejeni iz materialov, ki ščitijo urin pred svetlobo in kontaminacijo.

Sekundarni zbiralniki so prosojne epruvete za osnovno urinsko analizo. Urin se prelije iz primarnega v sekundarni zbiralnik. Zaprt odvzem urina predstavljajo vakumske epruvete, ki skupaj z ustreznimi zbiralniki izboljšajo kakovost dela in zaščito pred okužbo.

1.2.5 TRANSPORT, SHRANJEVANJE IN STABILIZIRANJE URINA

Transport: Urinski vzorci morajo biti dostavljeni v laboratorij takoj po zbiranju, vendar to vedno ni mogoče. Urinska analiza mora biti opravljena v svežem urinu najkasneje 2 uri po odvzemu v nasprotnem primeru je potrebno urin zaščititi pred svetlobnimi vplivi in spremembami sobne temperature.

Shranjevanje: V laboratoriju z avtomatiziranimi analitskimi sistemi se za shranjevanje urina uporabljajo standardizirane epruvete z prostornino od 3 do 12 ml, za mikrobiološke analize pa od 1 do 3 ml. Epruvete za kvantitativno analizo urina morajo biti od prelijanja do centrifugiranja in hlajenja oziroma zmrzovanja pokrite z ustreznim pokrovčkom.

Stabiliziranje: Spremembe (fizikalne, kemijske ali mikrobiološke) v nekonzerviranem urinu lahko bistveno vplivajo na urinsko analizo. Univerzalen način za stabiliziranje urina je hlajenje. Poznamo še kemične konzervanse, ki so odvisni od načina zbiranja, vrste analize in časa transporta do laboratorija oziroma do začetka analize (4,5).

1.3 OSNOVNA URINSKA ANALIZA

Osnovna urinska analiza ima pomembno vlogo pri odkrivanju motenj v delovanju ledvic in sečnih poti. Pomembno vlogo pa ima tudi pri nadzorovanju bolezni, pri spremljanju učinkovitosti terapije, pri prepoznavanju metaboličnih in drugih bolezni ter pri spremljanju določenih populacij zaradi kongenitalnih, asimptomatskih in dednih bolezni. Analiza je sestavljena iz sledečih preiskav oziroma analiz.

- Organoleptična in fizikalna preiskava: Pri organoleptičnem pregledu ocenimo videz in vonj, pri fizikalnem pa določimo koncentriranost urina z merjenjem relativne gostote, osmolalnosti in koncentracije kreatinina.
- Kvalitativne kemijske preiskave temeljijo na kemiji trdnih nosilcev, t.i.-testnih trakovih. To so plastični trakovi, ki vsebujejo kemijsko relativna polja. Ob stiku z urinom se reagenti raztopijo in med njimi steče kemijska reakcija, pri kateri nastane določeno obarvanje. Jakost obarvanja ocenimo s prostim očesom ali izmerimo s pomočjo refraktometrične zaznave.
- Mikroskopska kvalitativna (sediment) analiza, je analiza formiranih in s centrifugiranjem koncentriranih sestavin urina. Te sestavine so eritrociti, levkociti, cilindri, bakterije, glive, paraziti, epitelne celice, soli v kristalni ali amorfni obliki, sluzi (mukopolisaharidi) in maščobe (lipidi).

- Kvantitativna analiza urina, kjer določamo številčno koncentracijo celic. S pomočjo mikroskopa in Bürker-Türckove komore preštejemo eritrocite in levkocite v nativnem urinu. Najprej jih prepoznamo pri večji povečavi (400X), nato pa jih preštejemo pri manjši povečavi (100X) optičnega mikroskopa. Izračun: levkociti ali eritrociti ($10^6/l$) = (število celic na določeni površini/volumen) * razredčitev. Referenčne vrednosti so: RBC do $10 \times 10^6/l$ in WBC do $15 \times 10^6/l$.

1.3.1 MIKROSKOPSKA ANALIZA CELIC

Mikroskopski pregled urinskega sedimenta je še posebej koristen pri ocenjevanju prisotnosti ledvičnih bolezni in bolezni urinarnega trakta. Analiza sedimenta mora biti opravljena najkasneje v 2 urah od odvzema ali v 8 urah pri vzorcih ohlajenih na od 4 do 6°C.

Kadar pride do precipitacije uratov v kislem oziroma fosfatov in karbonatov v alkalnem, moramo analizirati nov vzorec, ki mora biti ohlajen na sobno temperaturo.

1.3.1.1 ERITROCITI

Eritrociti so majhne celice bikonkavne oblike, premera približno 7 μm . V urinu so podvrženi morfološkim spremembam.

Kadar je urin hipertoničen ali koncentriran kar dokazuje visoka specifična teža, so eritrociti zarezljeni ali skrčeni, ker so v urinu izgubili tekočino. Zarezljeni eritrociti imajo malo iglic in jih lahko zamenjamo z levkociti. Vendar pa so zarezlajni eritrociti občutno manjši od levkocitov in imajo gladek videz, ne pa zrnatega kot levkociti.

Kadar je urin hipotoničen ali razredčen (ima nizko specifično težo), se eritrociti pojavijo otečeni in zaokroženi, zaradi difuzijske tekočine v njih. V redčenem in alkalnem urinu so eritrociti pogosto videni kot senca (ghost) celice. V takšnem primeru so le-ti počili in

izpustili svoj hemoglobin, ostala je samo brezbarvna celična membrana ali senca prvotne celice. Senca eritrocitne celice se pogosto vidi v starih vzorcih urina, ampak s časoma, ko celica popolnoma razpade, izgine tudi senca.

Dismorfni eritrociti (izkrivljeni ali deformirani z izrastki-brsti ali vezikuli in različnih velikosti) so včasih prisotni tudi v urinu pri zdravih ljudeh. Povečano število kaže na prisotnost glomerulne bolezni. Najbolje jih prepoznamo s faznim ali interferenčnim kontrastnim mikroskopom. Z njim je mogoče v urinu videti tudi eritrocite z jedrom ali srpaste eritrocite (pri bolezni srpastih celic), vendar je to izjemno redko.

V urinu zdrave osebe je v vidnem polju mikroskopa pri večji povečavi (400x) prisotnih le nekaj eritrocitov, največ trije.

Stanje, v katerem najdemo povišano število eritrocitov v urinu imenujemo hematurija. Izvor hematurije je lahko predledvični, ledvični ali poledvični. Hematurija je lahko posledica krvavitve na kateri koli točki vzdolž urinarnega trakta. Vzrok zanjo je lahko ledvična bolezen, disfunkcija, infekcija, tumor oziroma lezija, tvorba kamnov ali pa motnja koagulacije zaradi uporabe antikoagulantov.

Hematurija je lahko blaga oziroma nevidna (mikrohaturija), vidna le preko mikroskopa ali pa evidentna, vidna že s prostim očesom. Obstaja majhna povezava med količino krvi in resnostjo okvare.

Krvavitve skozi glomerul pogosto spremljajo eritrocitni cilindri, ki jih lahko vidimo pri akutnem glomerulonefritisu ali bolezni glomerulov. Kadar se hematurija pojavi brez spremljevalnih beljakovin in cilindrov lahko smatramo, da je krvavitev v spodnjem delu urinarnega trakta.

Pomembno je razlikovati hematurijo od hemoglobinurije in mioglobinurije. Pri hematuriji so v sedimentu prisotni eritrociti, medtem ko jih pri hemoglobinuriji in mioglobinuriji v sedimentu ne

vidimo. Pri osebah ženskega spola pogosto prihaja do kontaminacije urina z menstruacijsko krvjo, kar se lahko napačno razume kot hematurija.

Prisotnost eritrocitov lahko vidimo kot majhen rdeč gumb na dnu centrifugirke po centrifugiranju. Rdeče celice v sedimentu so v korelaciji s pozitivnimi testnimi reagentnimi trakovi za kri. Reagentni trakovi so bolj občutljivi na hemoglobin kot na nepoškodovane eritrocite. Kadar je prisotnih nekaj nepoškodovanih rdečih krvnih celic in ni prišlo do hemolize, je test z reagentnimi trakovi negativen. V tem primeru dodamo destilirano vodo, da se celice razkrojijo in nato ponovimo testiranje.

Kadar so prisotne velike količine vitamina C je lahko test negativen ali zakasnel, čeprav v urinu vidimo eritrocite. V teh primerih se rezultati sedimenta potrjujejo z uporabnostjo reagentnih trakov za askorbinsko kislino.

Če nam rezultat preiskave pokaže vsebnost krvi v urinu, eritrociti pa v sedimentu niso prisotni, je potrebno upoštevati prisotnost hemoglobina in mioglobina.

1.3.1.2 LEVKOCITI

Izraz bele krvne celice ali levkociti v urinu se običajno nanaša na prisotnost nevtrofilnih granulocitov. Običajno imajo levkociti premer od 10 do 14 μm , kar je približno dvakrat večji kot eritrociti. V svežem urinu pri levkocitih vidimo drobne citoplazemske granulacije in pravilno lobulirano jedro.

Bele krvne celice so krhke in se v starem alkalnem vzorcu urina razgradijo; če hranimo urin pri sobni temperaturi lahko tako v 2 do 3 urah izgubimo okrog 50 % nevtrofilcev. Ko celica začne degenerirati, se jedrni detajli izgubijo, lobuli se zalijejo in dobimo eno samo okroglo celico. Zaradi izgube citoplazemske granulacije lahko tako

celico zamenjamo za limfocit ali npr. ledvično tubularnoepitelno celico.

V urinu zdrave osebe je normalno v vidnem polju mikroskopa pri večji povečavi (400x) lahko prisotnih največ pet levkocitov. Prisotnost velikega števila levkocitov v sedimentu je lahko posledica vnetja na neki točki vzdolž urinarnega trakta ali pa kakšnega drugega obolenja ledvic.

Kadar gre za infekcijo običajno vidimo skupaj bakterije in nevtrofilce, pri akutni infekciji pa so nevtrofilci povezani v skupine. Včasih je možno videti levkocite brez bakterij ali pa bakterije brez levkocitov, kot na primer pri klamidij. Redko vidimo nevtrofilce s pogoltnjenimi bakterijami, zato ker so takšne celice izjemno labilne in hitro izginejo iz urinskega vzorca.

Za prepoznavo levkocitov se uporabljajo fazni ali interferenčni kontrastni mikroskop, vitalna barvanja, očetna kislina in citocentrifugiranje. Posebej uporaben za odkrivanje in identifikacijo je fazno kontrastni mikroskop in barvanje po Sternheimer-Malbinu.

Vendar pa je precipitacija barvila v močno alkalnem urinu skupaj z infekcijo urinarnega trakta lahko moteča. Pri obarvanih levkocitih vidimo rdeče-vijolično jedro in vijolično ali modro citoplazmo. Lahko pa ima enak vzorec urina različna obarvanja, sveže celice so lahko manj obarvane.

Z dodano očetno kislino dosežemo hemolizo eritrocitov, hkrati pa tudi obarvanje jeder levkocitov. Če barvamo po Papanicolu je identifikacija levkocitov podobna kot v razmazu periferne krvi, razen če le-ti niso preveč poškodovani.

Levkocite, še posebej limfocite, je težko razlikovati od eritrocitov in ledvičnih epitelnih celic. Limfociti so le nekoliko večji od eritrocitov, z enim okroglim jedrom in omejeno citoplazmo. Ledvične epitelne celice so le nekoliko večje od limfocitov, imajo manjše in

temnejše jedro ter obilnejšo citoplazmo. Prisotnost limfocitov je velika prvih nekaj tednov po zavrnitvi transplantacije ledvic in je zgodnji pokazatelj zavrnitvenega procesa. Če obstaja sum na njihovo prisotnost, jih najlažje identificiramo z barvanjem z Wright-ovim barvilom.

Svetleče oz. glitter celice so večji, otekli nevtrofilni levkociti, ki se pojavijo v hipotoničnem urinu, s specifično gostoto 1,010 ali manj. Svetlikanje celic povzročijo granule, ki se stalno gibljejo. Obarvane svetleče celice imajo svetlomodro ali skoraj prozorno citoplazmo. Vidne so v razredčenih urinskih vzorcih pri bolnikih z infekcijami spodnjega urinarnega trakta in pri kroničnem pielonefritisu.

Eozinofilci so večji od nevtrofilcev in so ovalni ali podolgovati. Običajno citoplazemskih zrnec ne vidimo, pomaga nam prisotnost 2 ali 3 različnih jedrnih lobulov. Eozinofilce težko prepoznamo s svetlobnim ali fazno kontrastnim mikroskopom. Za lažje prepoznavanje uporabljamo posebno eozinofilno barvilo, kot je npr. Hansel-ovo barvilo (v metanolu metilensko modro in eozin-Y).

Povečano število eozinofilcev je povezano z zdravili, ki povzročajo intersticijski nefritis torej pri zdravljenju s penicilinom. Prepoznavanje je pomembno zato, da spremenimo morebitno neustrezno terapijo.

Monocite, histocite in makrofage je v preparatu težko prepoznati, večinoma so večjih od nevtrofilcev. Njihova citoplazma je skoraj vedno obilna, vakuolizirana in granulirana. Identifikacijo najlažje potrdimo z citocentrifugiranjem in barvanjem po Wright-u ter Papanicol-u.

1.3.1.3 EPITELNE CELICE

Epitelne celice vidimo v večini urinskih vzorcev. Poznamo ploščate, prehodne (urotelijske) in ledvične epitelne celice, vendar izvora in videza ne navajamo. Opisujemo jih le kot številne ali zelo številne.

Ploščate epitelne celice so zelo velike, ploščate celice, ki so sestavljene iz tankih plasti citoplazme in enega jedra. Velikost jedra je približno enake velikosti eritrocita ali limfocita, sama celica pa je približno 5 do 7 krat večja od eritrocita, njen premer meri okrog 30 do 50 μm . Veliko ploščatih epitelnih celic v urinu najdemo kot posledico kontaminacije presredka ali vagine pri ženskah ali kontaminacije kože pri moških. Kadar je urin kontaminiran z vaginalnimi izločki, lahko ploščate epitelne celice spremljajo paličaste bakterije ali glivice lahko pa tudi oboje. Pri obarvanih celicah vidimo vijolična jedra in bogato roza ali vijolično citoplazmo. Enostavno jih je prepoznati, vsaj dokler ne začnejo degenerirati, kar se lahko eventualno pojavi kot amorfna snov.

Prehodni ali urotelni epitelij pokriva ledvični meh in predel od dna sečnega mehurja pri ženskah in do proksimalnega dela sečnice pri moških. Celice iz nižjih plasti epitelija je težko razlikovati od epitelija ledvičnih tubulov in levkocitov. Njihova velikost in oblika se zelo spreminja, kar je odvisno od medija v katerem se nahajajo, če je ta medij voda, jo požrejo in postanejo lahko okrogle ter napihnjene. Lahko imajo podaljške citoplazme in jih imenujemo »replate« celice. Povečano število celic najdemo ob infekcijah. Posebno velike in več jederne, vakuolizirane oblike celic vidimo tudi po terapiji z obsevanjem. Če jih barvamo, vidimo temnomodro jedro in različne svetlo modre citoplazme.

Ledvične epitelne celice pokrivajo nefron, proksimalni in distalni del tubula. Pri povečanem številu pomislimo na aktivno ledvično obolenje ali poškodbo nefronov.

1.3.1.4 CILINDRI

Vsi cilindri imajo matrico Tamm-Horsfall-ove beljakovine. Osnova je hialini cilindri, vanj pa se lahko vključi katerakoli prisotna komponenta, kemijski ali formirani del.

Tvorba cilindrov je odvisna od prisotnosti proteinov, kislega pH-ja in zadostne koncentracije topljencev. Zato cilindrov ne najdemo v razredčenem, alkalnem urinu. Zaradi nepravilnega shranjevanja urin postane alkalen in to privede do razgradnje cilindrov. Najpogostejši so v majhnem številu prisotni hialini cilindri, ki jih najdemo po naporu ali dehidraciji. Kadar so v času nastajanja cilindrov prisotni v lumnu nefrona različni elementi, lahko nastanejo različni cilindri. Ločimo: eritrocitne, levkocitne, granulirane, pigmentirane, maščobne in voščene cilindre.

Poznati moramo izgled vseh vrst cilindrov, ter tudi cilindroide, saj je njihova prisotnost znak hudih poškodb.

V urinskem sedimentu sta normalno lahko prisotna dva hialina cilindra, večje število ali prisotnost drugih vrst cilindrov pa dokazuje patološko stanje.

Za pravilno prepoznavanje cilindrov uporabljamo svetlobni, fazni ali interferenčni kontrastni mikroskop. Pri prepoznavi si lahko pomagamo tudi z barvanjem, npr. s Sternheimer-Malbin-ovim barvilom.

1.3.1.5 KRISTALI

Kristali, ki se pojavijo v urinskem vzorcu so ponavadi klasificirani kot normalni ali patološki. Pri zdravih ljudeh nimajo diagnostičnega pomena. Opisujemo tiste, ki so lahko sestavine sečnih kamnov (sečna kislina, fosfati, kalcijev oksalat, magnezijev amonijev fosfat, kalcijev karbonat, cistin, kalcijev sulfat), tiste, ki se pojavijo endogeno, kot posledica bolezni (cistin, tirozin, leucin, holesterol, bilirubin, hemosiderin) ali pa tiste, ki se pojavijo iatrogeno, kot posledica zdravil in zdravljenja (sulfonamidi, ampicilin, rentgenska kontrastna sredstva, aciklovir).

Opišemo tudi prisotnost amorfnih soli (urati, fosfati).

Tabela 1: Fiziološko pomembni kristali pri različnih pH-jih

Kisel pH	Nevtralni pH	Alkalen pH
Kalcijev oksalat	Amonijev biurati	Tripl fosfat
Sečna kislina	Kalcijev karbonat	Amonijev biurati
Amorfni urati	Kalcijev oksalat	Kalcijev karbonat
	Tripl fosfat	Kalcijev fosfat
		Amorfni fosfati

1.3.1.6 SPERMIJI, GLIVE, PARAZITI

Spermiji

Lahko so prisotni v moškem in ženskem urinu. Imajo ovalno telo (glava), ki je velika približno od 4 do 6 μm in tanek rep, ki je dolg približno od 40 do 60 μm . Za prepoznavo spermijev je zelo uporaben fazno kontrastni mikroskop.

Glive

So brezbarvne celice jajčaste oblike. Pogosto so prisotne z značilnimi oblikami brstenja ali psevdohifami. Najdemo jih predvsem v urinskem vzorcu žensk in sladkornih bolnikov. Pogosto so prisotne kot posledica kontaminacije urina iz vaginalne glivične okužbe, zraka ali kože, možna je tudi primarna infekcija urinarnega trakta. Najpogostejša gliva v urinu je *Candida albicans*. Največkrat je prisotna pri sladkornih bolnikih, saj je glukoza vir energije.

Enostavno jih prepoznamo s svetlobnim in fazno kontrastnim mikroskopom. Pri barvanju pa Gram-u so močno pozitivne, pri vitalnem barvanju pa ne dajejo jasnih rezultatov, saj se glive vedno ne obarvajo.

Paraziti

Trichomonas vaginalis je najpogostejši parazit, ki ga lahko najdemo v urinskem sedimentu. Je ovalne ali okrogle oblike, velik do 30 μm (običajno večji od levkocita), ima eno jedro in štiri bičke ter dodaten

biček zadaj. V mokrih preparatih ga hitro prepoznamo po njegovem gibanju.

Primarno je odgovoren za vaginalne okužbe, lahko pa tudi za okužbe sečil, periuretralne žleze, mehurja in prostate.

1.3.1.7 BAKTERIJE

So majhne, le nekaj mikrometrov dolge. Lahko so paličaste ali okrogle. Prisotne so lahko posamično, v parih ali v verigah, odvisno od vrste bakterij. Najpogostejše so gram-negativne palčke. Urin zdravih ljudi je sterilen, zato je prisotnost bakterij posledica infekcij urinarnega trakta, vaginalne ali uretralne kontaminacije.

Kadar gre za infekcijo urinarnega trakta, najdemo bakterije običajno skupaj z levkociti, nitriti in proteini. Bakterijsko okužbo moramo potrditi z kvantitativno urinokulturo.

Za prepoznavo bakterij v urinskem sedimentu uporabljamo 400 - kratno povečavo. Če urin stoji pri sobni temperaturi, se bakterije hitro razmnožijo. Pri težavnih vzorcih si pomagamo z barvanjem po Gram-u. Citocentrifugiran preparat barvan po Wright-u bo vse bakterije obarval temno modro-vijolično (bazofilično).

1.4 PRETOČNI CITOMETER UF-1000i (Sysmex Diagnostics)

Sysmex UF-1000i je popolnoma avtomatiziran najnovejši fluorescenčni pretočni citometer urina. Temelji na tehnologiji laserskih diod skupaj s hidrodinamičnim konduktometričnim fokusiranjem. Analizira lahko do 100 vzorcev na uro. Med analiziranimi vzorci opozori na tiste, ki jih je potrebno dodatno mikroskopirati, označi in opozori tudi na patološke vrednosti v urinskih vzorcih. Je zelo občutljiv in natančen, zato lahko odkrije elemente, ki bi jih težje prepoznali in določili pri običajnem ročnem mikroskopiranju s svetlobnim mikroskopom.



UF1000i

Slika 1: Pretočni citometer UF-1000i Sysmex (13)

Postopek analiziranja vzorca:

Analizator za avtomatizirano analizo potrebuje 4 ml vzorca, ki ga laboratorijski delavec predhodno nalije v epruveto za analiziranje. Za ročni način analiziranja pa potrebujemo 1 ml vzorca.

- Stojalo na katerem so epruvete z vzorci se pred analizo vstavi v aparat.
- Aspiracija vzorca.
- Razdelitev vzorca za analizo sedimenta in bakterij.

Postopek analize sedimenta:

- Redčenje z ustreznim reagentom (diluent).
- Barvanje s polimetinskim fluorescentnim barvilom(UF-II SEARCH SED).
- Mešanje.
- Segrevanje, pri čemer se raztopijo amorfne soli, ki sicer motijo analizo.
- Meritev prevodnosti vzorca.

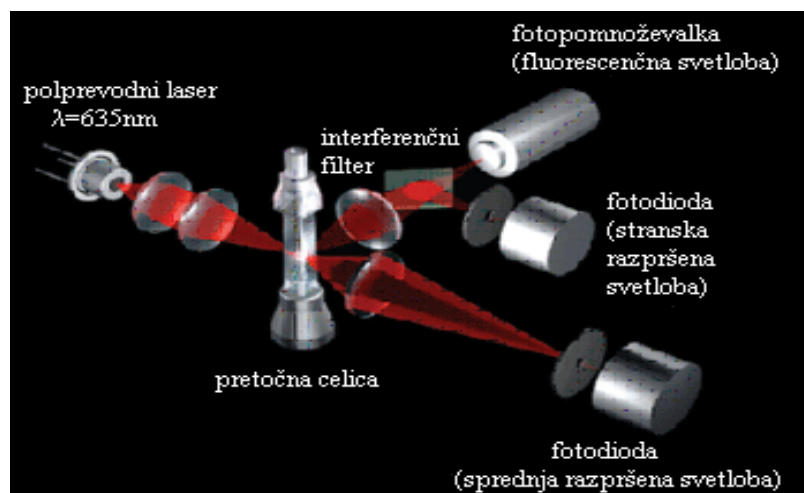
Postopek analize bakterij:

- Redčenje z ustreznim reagentom (diluent).
- Barvanje s polimetilenskim fluorescentnim barvilom (UF-II SEARCH BAC).
- Mešanje.
- Segrevanje, pri čemer se raztopijo amorfne soli, ki sicer motijo analizo.

Princip delovanja

Z dvema ločenima analitičnima kanaloma lahko naredimo selektivno analizo bodisi za bakterije ali celoten obseg parametrov.

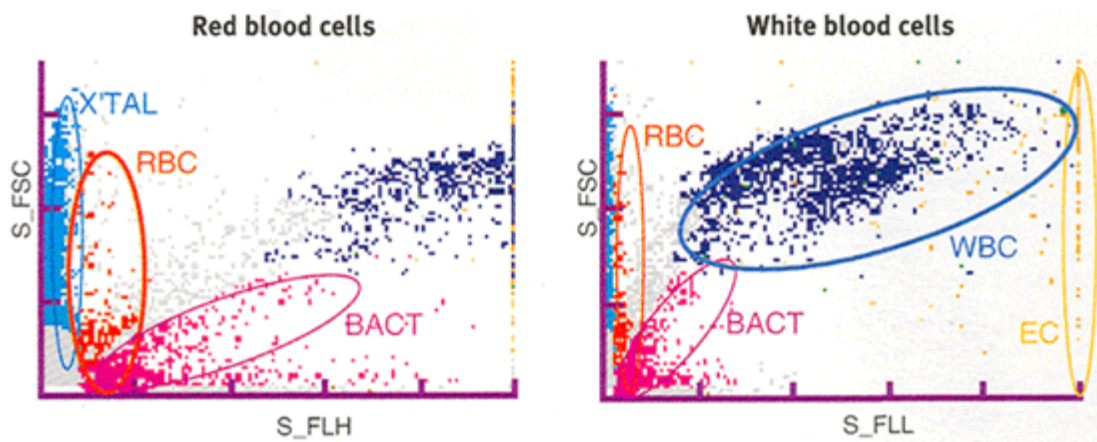
Delci v urinu so obarvani z dvema fluorescentnima barviloma, ki se specifično vežeta z nukleinskimi kislinami in celičnimi membranami. Vzorec potuje v toku izotonične raztopine skozi pretočno celico z uporabo hidrodinamičnega konduktometričnega fokusiranja, da zagotovi vsakemu delcu prehod polprevodniškega laserskega žarka, pri čemer prisotni delci in celice sipajo svetlobo in oddajo fluorescenčni signal.



Slika 2: Princip delovanja pretočnega citometra (prevedeno iz vira št.13)

Razpršena svetloba vsakega delca je detektirana s fotodiode na dveh različnih položajih (spredaj in od strani), skupaj z intenziteto fluorescence se pretvori v električni signal. Sprednja razpršenost zagotavlja informacijo o velikosti, stranska o površini, medtem ko intenziteta fluorescence zagotavlja informacije o nukleinskih kislinah vsakega delca. Združene informacije omogočajo razvrstitev celičnih elementov.

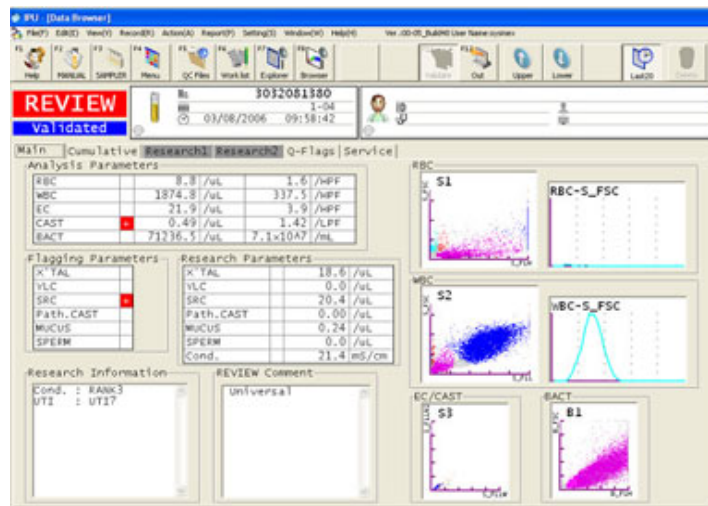
Analizator prikaže barvne kodirane točkovne diagrame in jasne številčne vrednosti za vse delce.



Slika 3: Grafa jakosti sipanja svetlobe in fluorescence (13)

Parametri, ki jih določi analizator UF-1000i so: rdeče krvne celice (RBC), bele krvne celice (WBC), epitelne celice (EC), cilindri (CAST), bakterije (BACT), majhne okrogle epitelne celice (SRC), glive (YLC), spermiji (SPERM), kristali (X`TAL), cilindri z vključki (Path. CAST), sluzi (MUCUS), prevodnost, eritrocitne morfološke informacije (RBC info) in informacije o infekciji sečil (UTI info).

Številski in grafični rezultati se medsebojno dopolnjujejo in zagotavljajo maksimalno zanesljivost.



Slika 4: Primer rezultata analize UF-1000i Sysmex (13)

ERITROCITI

Rdeče krvne celice so porazdeljene v območju označenim z RBC. Eritrociti v urinu nimajo jedra in imajo premer velikosti približno 7µm. Imajo nizko fluorescenco na grafu, zato ker je celična membrana pobarvana z barvilom UF-II SEARCH SED (Fenantidrin obarva nukleinske kisline, slabo pa barva membrane in membranske strukture. Karbocianid obarva negativno nabite membranske strukture in mitohondrije) in je fluorescenčna svetloba šibka. Eritrociti so različne velikosti. Na podlagi izmerjenega signala naprej sipane svetlobe se izriše histogram – frekvenčna porazdelitev.

LEVKOCITI

Bele krvne celice so porazdeljene v območju označenim z WBC. Levkociti v urinu imajo jedro in premer velikosti približno od 10 do 14µm. Jedro levkocita se zelo dobro obarva z barvilom UF-II SEARCH SED in na grafu je zelo visoka intenziteta fluorescence. Tudi levkociti imajo različne oblike, zato sta sipanje in fluorescenca porazdeljena na širšem območju točkovnega diagrama.

EPITELNE CELICE

So porazdeljene v območju označenim z EC. Na tem območju so porazdeljene velike celice kot npr. ploščate in prehodne epitelne celice. Te celice imajo močno sipanje svetlobe in močno fluorescenco.

CILINDRI

So porazdeljeni v območju označenim s CAST ali Path. CAST. Signal električne impedance se uporablja za razvrstitev in ločevanje cilindrov od sluzi. Intenziteta impedance nam pove volumen celice in s tem razlikuje cilinder od sluzi, saj ima sluz manjši volumen od volumna cilindrov. Cilindri vključujejo nekaj mikrosomov, zato je njihova fluorescenca šibka. Patološki cilindri pa vključujejo levkocite, epitelne celice in mikrosome ter imajo zato močno fluorescenco. Tako cilindri kot patološki cilindri se razvrščajo na podlagi fluorescence.

Povezava z laboratorijskim informacijskim sistemom (LIS) zagotavlja preprost pretok podatkov. Shranjene podatke lahko prikažemo, natisnemo ali pošljemo na LIS kadarkoli.

Pretočni citometer UF-1000i vsebuje večjo bazo podatkov s 10000 prostimi mesti za zbirke z vsemi grafičnimi podatki.

1.5 MIKROSKOPSKI ANALIZATOR SEDIMAX (Menarini Diagnostics)

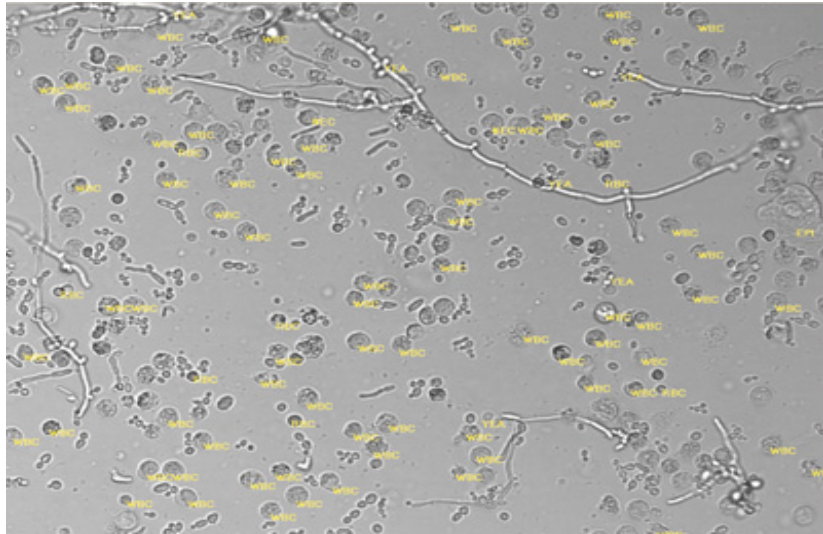
SediMax je avtomatiziran mikroskopski urinski analizator. Temelji na zajemanju in prepoznavanju slik enoplastnega urinskega sedimenta v kiveti z digitalno kamero mikroskopa.



Slika 5: Avtomatizirani mikroskopski analizator SediMax (12)

Analizator potrebuje za analizo 2 ml urina. 200 μ l tega urina odpipetira v kiveto in centrifugira pri 2000 rmp 10 sekund. Zaradi centrifugalne sile so urinski delci v eni plasti na dnu kivete. Vgrajena CMOS (komplementarna polprevodna oksidna kovina) kamera s pomočjo svetlobnega mikroskopa posname 15 (ali 10) digitalnih slik iz različnih lokacij kivete. SediMax sliko poveča za približno 400-krat, kar je enakovredno povečavi 10x40 pri visoki zmogljivi vizualni mikroskopiji. Analiza 15-ih digitalnih slik predstavlja pregled 2,4 μ l nativnega urina. Po vsakem pipetiranju se vzorčna sonda spere z destilirano vodo, tako se namreč prepreči kontaminacija naslednjega vzorca.

Celoten proces je pod nadzorom računalnika, ki je prav tako odgovoren za prepoznavo delcev. Delce je mogoče videti na zaslonu s pomočjo črno-bele slike pridobljene z svetlobnim mikroskopom.

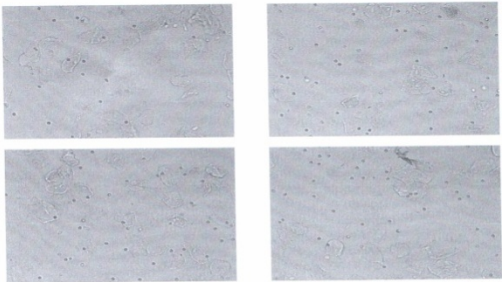


Slika 6: Primer slike urinskega sedimenta posnete s SediMax-om (12)

Proces prepoznavanja slike poteka vzporedno z analizo vzorcev. Vse slike se vrednotijo z zelo kvalitetno programsko opremo za obdelavo slik, ki je sposobna zaznati in razvrstiti urinske delce, kot so: rdeče krvne celice (RBC), bele krvne celice (WBC), ploščate epitelne celice (EPI), neploščate epitelne celice (NEC), cilindri-hialini cilindri (HYA), patološki cilindri (Path. CAST), kristali (CRY) – kalcijev oksalat monohidrat (CaOxm), kalcijev oksalat dihidrat (CaOxd), triple fosfat (TRI), sečna kislina (URI), bakterije (BACT), glivice (YEA), spermiji (SPRM) in sluz (MUC).

Rezultate lahko izrazimo kot številčno koncentracijo z enotami ($\text{nx}10^6/\text{l}$) in kot polkvantitatnimi rezultati. Z analizo 15-ih digitalnih slik SediMax obdela 62 vzorcev na uro, če pa analizira z 10-imi slikami pa dvigne obdelavo na 80 vzorcev na uro.

Vzorci z zelo visokim številom delcev so označeni »crowded« in jih je priporočljivo, pregledati z mikroskopom.

URINE ANALYSIS REPORT					
Laboratory :		004109834993		General sediment result :	+
Sample ID :		-		N° of + particle types :	5
Patient name :		6/28/2011 11:46:03 AM		N° of evaluated images :	15
SEDIMENT RESULT					
		pHPF	N°	±/	Ref. (pHPF)
RBC	Red Blood Cells	38.80	28.87	+++	0 .. 1.14
WBC	White Blood Cells	13.70	9.13	++	0 .. 2.05
CRY	Crystals	0.00	0.00	-	0 .. 1.36
CRY	Crystals	0.00	0.00	-	0 .. 1.36
CaOx	CRY - Calcium-oxalate	0.00	0.00	-	0 .. 1.36
CaOxm	CRY - Calcium-oxalate monohydrate	0.00	0.00	-	0 .. 1.36
CaOxd	CRY - Calcium-oxalate dihydrate	0.00	0.00	-	0 .. 1.36
HYA	Casts - Hyalin	0.00	0.00	-	0 .. 0.45
PAT	Casts - Pathological	0.80	0.83	++	0 .. 0.34
NEC	Non Squamous Epithelial Cells	2.80	1.87	++++	0 .. 0.45
EPI	Squamous Epithelial Cells	20.00	13.33	+++	0 .. 1.14
YEA	Yeast	0.00	0.00	-	0 .. 0.68
BAC	Bacteria	14.90	9.93	-	0 .. 17.05
MUC	Mucus	19.90	13.27	-	0 .. 60
SPRM	Spermatozoa	0.00	0.00	-	0 .. 2.73
Comment :					
Dilution factor : 1.0					
					

Slika 7: Primer izvida analizatorja SediMax

ERITROCITI IN LEVKOCITI

Prepoznavna eritrocitov je zanesljiva, razen če so prisotne spore gliv ali brstenje gliv kvasovk. V teh primerih lahko analizator SediMax napačno identificira posamezne celice gliv in brstenje gliv kvasovk kot eritrocite.

S pogledom na zaslon (takoj z navzkrižnim preverjanjem rezultatov SediMax-a za RBC proti hemoglobinu in WBC proti levkocitni esterazi zaznamo z odčitavo urinskega traka) v shranjenih slikah bi ta problem rešili.

S funkcijo zoom-a je mogoče razlikovati izomorfne in dismorfne eritrocite.

Občasno so cevaste epitelne celice zelo podobne levkocitom in jih lahko aparat napačno identificira.

CILINDRI

Kadar so epitelne celice v skupkih ali v fragmentih jih aparat lahko zamenja za patološke cilindre, vendar napako odpravimo s ponovnim pregledom shranjenih slik.

Zaradi vgrajenega svetlobnega mikroskopa slike ne omogočajo diferenciacije hemoglobinskih, mioglobinskih in/ali bilirubinskih cilindrov.

KRISTALI

Oprelitev kalcijevega oksalata, tipičnih uratov in triple fosfatnih kristalov je dokaj dobra.

GLIVE

SediMax opredeljuje micide/hife zelo dobro, vendar pa zamenjuje konidio in brstenje gliv celic z eritrociti.

BAKTERIJE

Detekcija paličastih bakterij je praktično vedno pravilno prepoznana, pri okroglih pa predstavlja težave prevelika prisotnost razbitih celic ali amorfni oborin.

2 NAMEN NALOGE

Namen našega dela je bilo proučevanje nove avtomatizirane mikroskopske metode v primerjavi s pretočno citometrijo in s standardno mikroskopsko metodo. Posebno pozornost smo namenili določanju eritrocitov, levkocitov, bakterij, patoloških cilindrov in gliv.

Dobljene vrednosti urinskih analiz SediMax-a smo preverili s pretočnim citometrom UF-1000i in še dodatno s svetlobnim mikroskopom.

Skušali smo ugotoviti, ali je možna popolna primerjava rezultatov pridobljenih z vsemi tremi metodami.

Dobljene rezultate smo statistično ovrednotili.

3 METODE IN MATERIALI

3.1 VZORCI

Urinske analize smo opravili v Laboratoriju za analitiko urina in spremljanje koncentracije zdravil Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo na Polikliniki v Ljubljani. Preiskovali smo vzorce urina, ki so imeli povišane oziroma patološke vrednosti na izvidu pretočne citometrije. Preiskovanci so bili v laboratorij napoteni iz različnih oddelkov in ambulant Kliničnega centra Ljubljana. Izbrali smo 141 vzorcev za osnovno urinsko analizo ter vse rezultate tudi statistično ovrednotili.

3.2 OPREMA

Pri delu smo uporabljali nasledno opremo:

- Svetlobni, fazno kontrastni mikroskop Eclipse 50iNikon.
- Pretočni citometer UF-1000i Sysmex.
- Avtomatizirani aparat SediMax Menarini.
- Centrifuga Centric 322 A TEHTNICA.

3.2.1 SVETLOBNI FAZNO KONTRASTNI MIKROSKOP

V Laboratoriju za analitiko urina in spremljanje koncentracije zdravil uporabljajo svetlobni, fazno kontrastni mikroskop. Fazni kontrast smo uporabljali za pregled cilindrov in eritrocitov. Mikroskop je sestavljen iz mehaničnih in optičnih delov. K optičnim delom prištevamo sistem lečja, ki ga sestavljajo objektiv, okular,

kondenzator ter slepica. Mehanski deli so tubus, revolver, stativ, mikroskopska mizica, zaslonka, noga ter makro- in mikrometerski vijak.

OPTIČNI DELI

Objektiv je sistem leč za povečanje opazovalnih predmetov, ki dajo realno sliko. Sestavljen je iz sprednje frontalne in zadnje korekcijske leče.

Okular je del mikroskopa skozi katerega opazujemo naš preparat. Sestavljen je iz dvojnega sistema leč (zbiralne in očesne), ki povečuje osnovno sliko iz objektiva.

Kondenzator je sistem leč, ki zbere svetlobne žarke in jih usmeri skozi preparat. Pri majhni povečavi s posebnim vijakom kondenzator spuščamo, pri velikih povečavah pa dvigujemo.

Slepica je zaslonka, ki odmerja količino vpadne svetlobe tako, da dosežemo najboljši kontrast.



Slika 8: Mikroskop Eclipse 50iNikon (11)

MEHANSKI DELI

Stativ je masivna osnovna plošča, na katero so pritrjeni ali vgrajeni ostali deli mikroskopa. Navzgor se nadaljuje v nosilni steber.

Tubus je v navpični smeri premakljiva cev, ki ima v zgornjem delu nosilec za prosto vstavljen okularja in v spodnjem delu revolver s privitimi objektivi.

Revolver je vrtljiva plošča za menjavo in pritrjevanje objektivov. V njem so istočasno priviti objektivi različnih povečav.

Mikroskopska mizica je z ročajem prirejena za premikanje vzorca v smeri x ali y.

Makrometerski vijak, z njim poiščemo grobo sliko preparata, tako da premikamo mikroskopsko mizico.

Mikrometerski vijak, z njim natančno izostrimo vidno polje.

NAPRAVA ZA OSVETLITEV

Mikroskop ima vgrajeno 6V/30W halogensko nastavljivo žarnico, ki osvetli svetlo polje sistema.

VZDRŽEVANJE MIKROSKOPA

Z mikroskopom ravnamo zelo pazljivo, še posebej z občutljivimi optičnimi deli. Te čistimo z mehko krpico ali posebnim papirjem. Za trdovratne madeže uporabljamo raztopino detergenta ali alkohola. Mehanske dele čistimo z mehko krpico, ki je lahko suha ali navlažena z vodo.

3.3 MIKROSKOPSKA ANALIZA

Mikroskopski pregled urinskega sedimenta

Mikroskopska analiza sedimenta je kvantitativna analiza formiranih delcev, ki jih najprej koncentriramo s centrifugiranjem. Ti delci so eritrociti, levkociti, cilindri, bakterije, glive, paraziti, epitelne celice...

Priprava urinskega sedimenta za mikroskopiranje

Za mikroskopsko sliko urinskega sedimenta potrebujemo:

- Graduirno epruveto za centrifugiranje.
- Pasteurjevo pipeto s kapilarno konico ali nastavek na ustrezni pipeti za enostaven prenos urinskega sedimenta.
- Plastično mikroskopsko ploščico z določeno količino sedimenta.

Postopek:

1. V koničasto centrifugirko odlijemo 12 ml urina. Vsako spremembo količine urina moramo označiti v izvidu, zaradi točnega števila vsebovanih sestavin. Pri pediatričnih vzorcih je ponavadi volumen manjši.
2. Vzorec centrifugiramo 5 minut z relativno centrifugalno močjo 1500-2000 obr./min.
3. Supernatant odlijemo in pri tem pazimo, da ne suspendiramo sedimenta.
4. Usedlino dobro premešamo, s tem preprečimo neenakomerno porazdelitev delcev v mikroskopskem preparatu.
5. S Pasteurjevo pipeto oz. nastavkom na ustrezni pipeti prenesemo vzorec na polkrožno odprtino komorice na ploščici.
6. Porazdelitev delcev v preparatu in vsebnost redkih elementov pregledamo z mikroskopom. Najprej jih pogledamo pod manjšo (100x), nato pa podrobnejše pod večjo (400x) povečavo.

VREDNOTENJE

Eritrociti in levkociti

Pri 400-kratni povečavi preštejemo celice v 10-ih vidnih poljih, kot rezultat pa navedemo spodnjo in zgornjo mejo ali kot povprečno število. Kadar je v vidnem polju več kot 50 celic, to označimo kot številni, če pa je celic več kot 100, jih označimo kot zelo številni eritrociti ali levkociti. Če vidimo celice v skupinah, to navedemo kot število skupin na vidno polje. Pri eritrocitih opišemo njihov videz (sveži, izluženi, zmanjšani), pri levkocitih pa morebitno razpadlost ali vsebnost z maščobo.

Cilindri

Sestavljeni so iz beljakovinske ali hialine osnove, ki jo izločajo uroepitelne celice. Poznamo več vrst cilindrov, le-ti so lahko hialini,

granulirani in eritrocitni. Vsaka vrsta je diagnostično značilna za določeno ledvično obolenje. Pri 100-kratni povečavi pregledamo cel preparat ter preštejemo in opišemo vsebovane cilindre. Če smo jih našteali manj kot 10, rezultat podamo kot število opisanih cilindrov v preparatu, npr. 6 granuliranih cilindrov. Če pa jih najdemo več kot 10, pa to izrazimo z naslednjimi besedami: več kot 10 granuliranih cilindrov v preparatu.

Bakterije, glive, paraziti

Pri 400-kratni povečavi prepoznamo in opišemo obliko bakterij (paličaste, okrogle). Diagnostično pomembna je najdba več kot 20-ih kolonij bakterij v vidnem polju. Vsebnost bakterij označimo z malo, številne ali zelo številne. Pri parazitih navedemo ime parazita, najpogostejši je *Trichomonas*. Enako velja za glive, najpogosteje najdemo *Candido albicans*.

Kristali

Opisujemo samo kristale snovi, ki so lahko sestavina sečnih kamnov ali kristalne snovi, ki nastanejo endogeno (cistin, tirozin, levcin, holesterol, bilirubin). Opišemo tudi prisotnost amorfnih soli.

Epitelne celice

Če jih je v sedimentu veliko, jih opisujemo kot številne ali zelo številne. Videza in izvora ne opisujemo.

3.4 ANALIZA S PRETOČNIM CITOMETROM UF-1000i SYSMEX

Za ta analizator ni potrebna predpriprava vzorca, ker se uporablja nativni urin, ki se prelije v epruvete za analizo direktno iz posodice za vzorce. Stojalo z epruvetami se vstavi v analizator in vse kar je potrebno za nadaljnjo analizo, opravi analizator sam. Rezultati analiz se natisnejo v grafični obliki in številčnih vrednostih po posameznih parametrih. Če analizator zazna kakšno patološko vrednost jo označi (rdeči +) in takšen sediment je potrebno pregledati z mikroskopom in nato se rezultati primerjajo in zabeležijo.

Reagenti in kontrole

Analizator za svoje delovanje potrebuje dva reagenta:

- UF II SEARCH SED (za sediment) in
- UF II SEARCH BAC (za bakterije)

Kontroli se izvajata enkrat dnevno in sicer pred pričetkom dela. Vrednost kontrol, ki so že v naprej določene, so deklarirane kot visoke in nizke. Vrednosti visoke kontrole so za RBC: 38,7; WBC: 155,7; EC: 36,4; CAST: 9,33; BACT: 186,6 in za Cond (ms/cm): 3,7. Vrednosti nizke kontrole pa za RBC: 19; WBC: 18,7; EC: 5,5; CAST: 3,69; BACT: 59 in Cond (ms/cm): 1,9.

- UF II CONTROL – H (high)
- UF II CONTROL – L (low)

Čiščenje aparata poteka vsak dan po končanem delu. Izvedemo ga ročno in sicer z blagim detergentom.

Vrednotenje rezultatov Sysmex UF-1000i

Aparat poda vse analize kot število celic na mikroliter (μl) urina in jih preračuna na vidno polje mikroskopa s 400-kratno (HPF) oziroma s 100-kratno (LPF) povečavo.

3.5 ANALIZA Z MIKROSKOPSKIM ANALIZATORJEM SEDIMAX

Za analizo na SediMax-u ni potrebna predhodna priprava vzorca, saj se uporablja nativen urin, ki se prelije v epruvete za analizo direktno iz posodice za vzorce. Stojalo z epruvetami se vstavi v analizator in vse kar je potrebno za nadaljnjo analizo opravi analizator sam. Rezultati analiz se natisnejo v obliki številčnih vrednosti po posameznih parametrih. Vsi delci se lahko samodejno označijo na zaslonu, kar omogoča vizualno identifikacijo in potrditev s strani tehnika. Posamezni delci so lahko vidni skupaj z povečano sliko, kar pomaga pri prepoznavanju dvomljivih ali nenavadnih delcev. Instrument avtomatično označi vzorce z zvišano koncentracijo celic z oznako »crowded«. Ti vzorci potrebujejo ročni pregled z mikroskopom.

SediMax uporablja edinstveno enkratno komoro za štetje in ne zahteva reagentov za analizo urina ampak le prenos vzorca, ki ga sonda za vzorčenje odmeri.

Kontrole

Kontroli se izvajata enkrat dnevno, in sicer pred pričetkom dela. Imenujeta se Kova Liqua-Trol raven 1 in raven 2. Obe ravni vsebujeta eritrocite in levkocite.

Tabela 2: Vrednosti kontrol

Kontrola	ERITROCITI	LEVKOCITI
Visoka (HIGH)	2,27 - 47,73	4,5 - 29,55
Nizka (LOW)	0 - 1,14	0 - 4,55

Čiščenje aparata poteka vsak dan po končanem delu. V epruveto nalijemo 6 ml 2 % hipoklorita, ter epruveto vstavimo v stojalo, stojalo pa v aparat. Čiščenje aparata je avtomatizirano.

3.6 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

Vse rezultate smo statistično obdelali s programom MedCalc® for Windows. Primerjave rezultatov smo podali grafično s kvantili in 95 % mejo zaupanja. Naredili smo primerjavo z Wilcoxonovim testom in Spearmanovim koeficientom korelacije rangov. Grafično bomo podali tudi Bland-Altmanovo analizo za eritrocite in levkocite.

4 REZULTATI

4.1 Statistična obdelava rezultatov (levkocitov, eritrocitov, bakterij, patoloških cilindriov in glivic) dobljenih z mikroskopom, pretočnim citometrom UF-1000i Sysmex in avtomatiziranim mikroskopskim analizatorjem SediMax.

Tabela 3: Osnovni neparametrični statistični podatki za številčno koncentracijo levkocitov (Lkci, vidno polje 400X) z uporabo mikroskopa in analizatorjev Sedimax ter UF-1000i.

Lkci	*Mikroskop	Sedimax	UF-1000i
mediana	15.00	8.30	14.50
**95% CI	10.00 – 30.00	5.94 – 12.57	10.44 – 23.47
***1Q – 3Q	5.00 – 45.00	2.58 – 23.53	4.88 – 54.23

*Številni: ≥ 50 ; zelo številni: ≥ 100 .

** Meja zaupanja.

*** Območje 1. in 3. Kvartila.

Tabela 4: Primerjava številčne koncentracije levkocitov (Lkci, vidno polje 400X) z uporabo mikroskopa in analizatorjev Sedimax ter UF-1000i z Wilcoxonovim testom (Z) in Spearmanov koeficient korelacije rangov (R).

Lkci	Z (p)	R (p)
Mikroskop vs. Sedimax	- 6.689 (<0.0001)	0.862 (0.813 – 0.900)
Mikroskop vs. UF-1000i	2.234 (0.0255)	0.896 (0.858 – 0.925)

Sedimax vs. UF-1000i	- 8.933 (<0.0001)	0.924 (0.895 – 0.945)
----------------------	-------------------	-----------------------

Tabela 5: Osnovni neparametrični statistični podatki za številčno koncentracijo eritrocitov (Erci, vidno polje 400X) z uporabo mikroskopa in analizatorjev Sedimax ter UF-1000i.

Erci	*Mikroskop	Sedimax	UF-1000i
mediana	4.00	0.50	3.60
**95% CI	3.00 – 6.00	0.34 – 0.76	2.94 – 4.26
***1Q – 3Q	2.00 – 13.25	0.10 – 2.65	1.88 – 7.93

*Številni: ≥ 50 ; zelo številni: ≥ 100

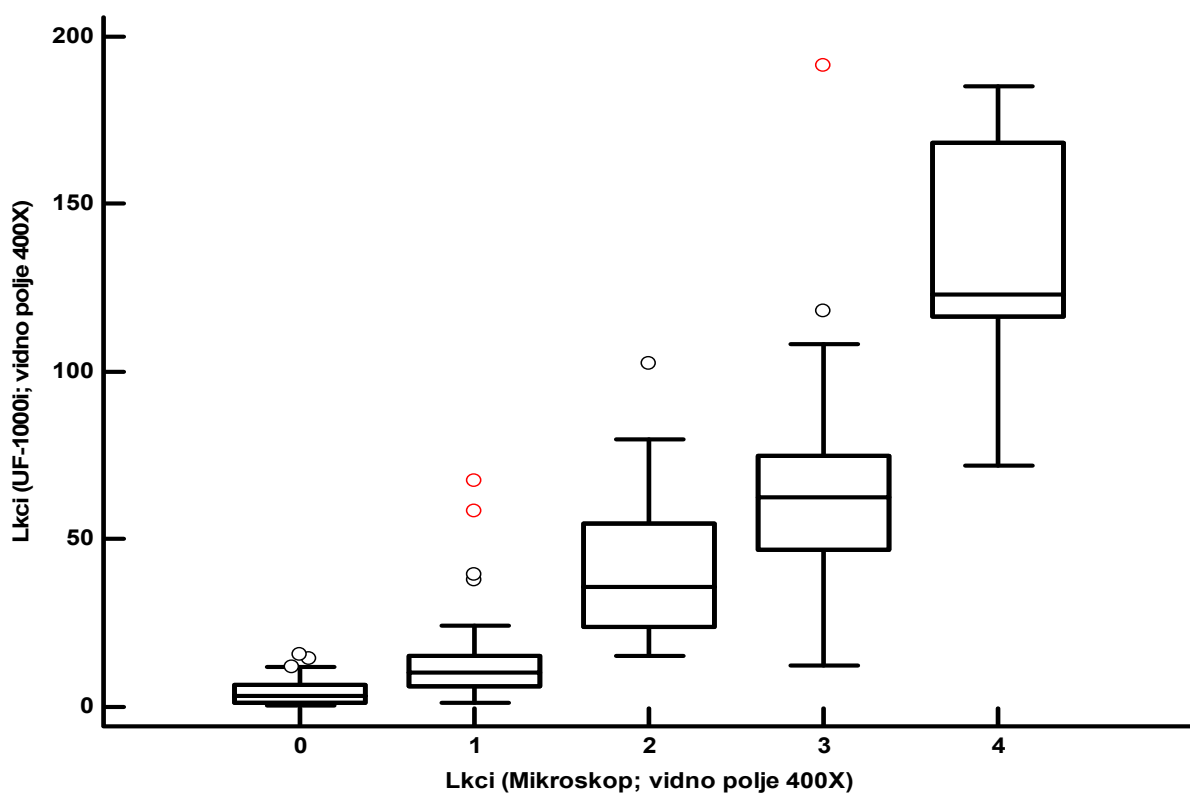
** Meja zaupanja

*** Območje 1. in 3. kvartila

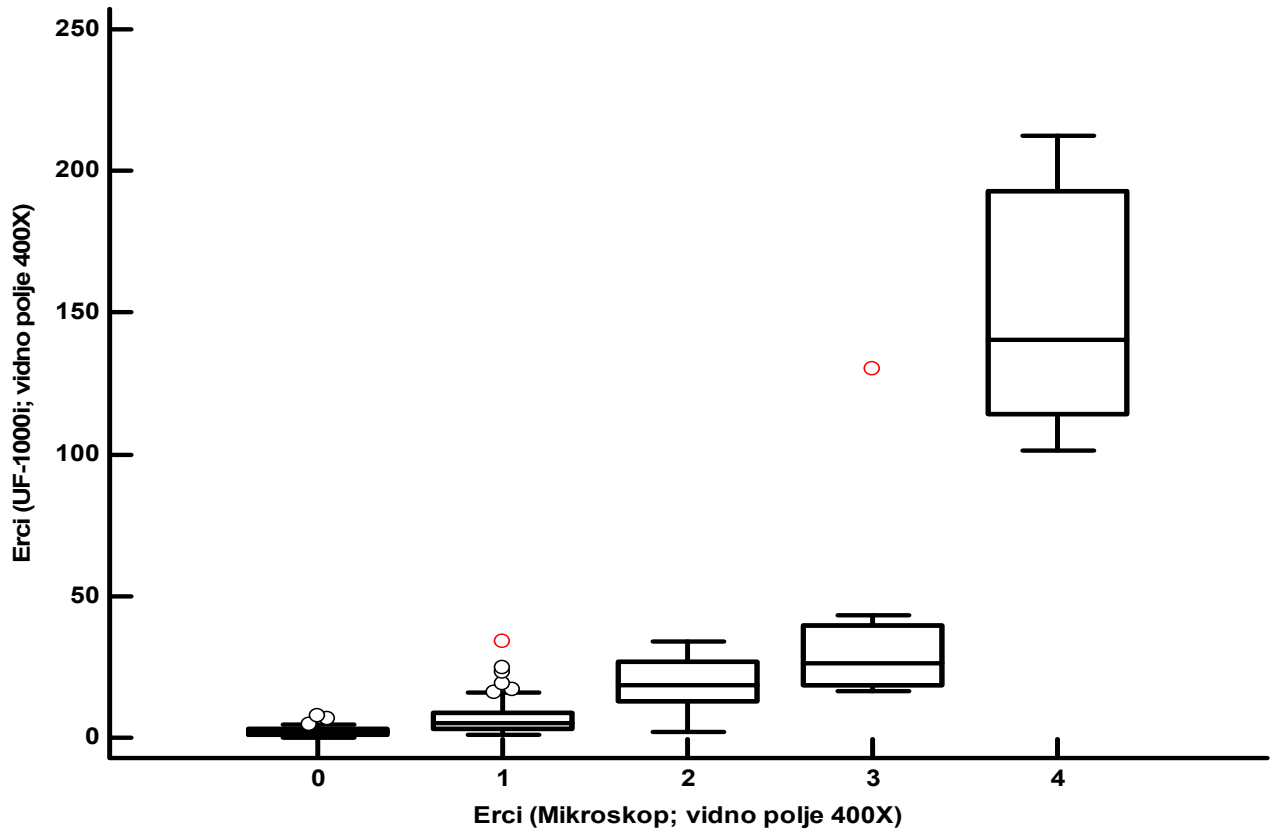
Tabela 6: Primerjava številčne koncentracije eritrocitov (Erci, vidno polje 400X) z uporabo mikroskopa in analizatorjev Sedimax ter UF-1000i z Wilcoxonovim testom (Z) in Spearmanov koeficient korelacije rangov (R)

Erci	Z (p)	R (95% CI)
Mikroskop vs. Sedimax	- 8.764 (<0.0001)	0.676 (0.575 – 0.757)
Mikroskop vs. UF-1000i	- 3.45 (0.0006)	0.744 (0.660 – 0.810)
Sedimax vs. UF-1000i	- 7.477 (<0.0001)	0.607 (0.490 – 0.702)

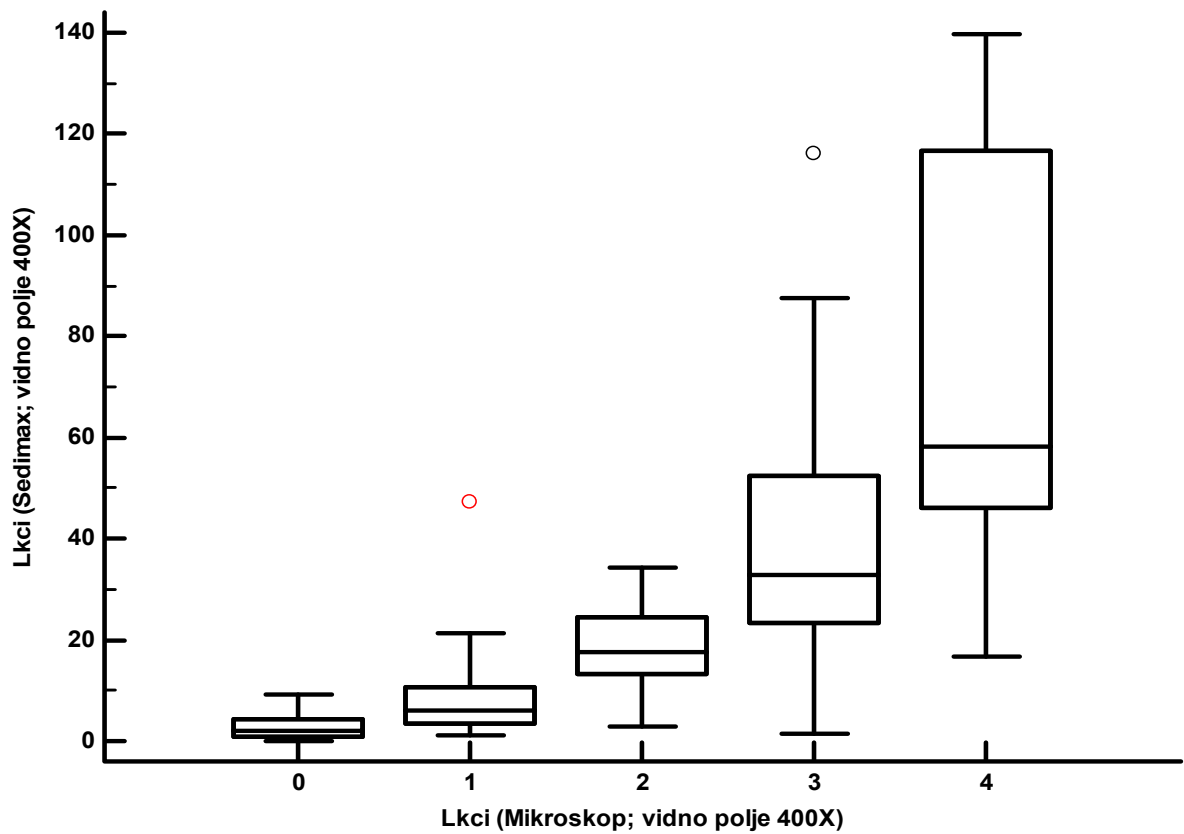
Graf 1: Primerjava števila levkocitov (Lkci) med mikroskopom (0–5=0, 6–25=1, 26–50=2, 51–100=3, >100=4) in UF-1000i.



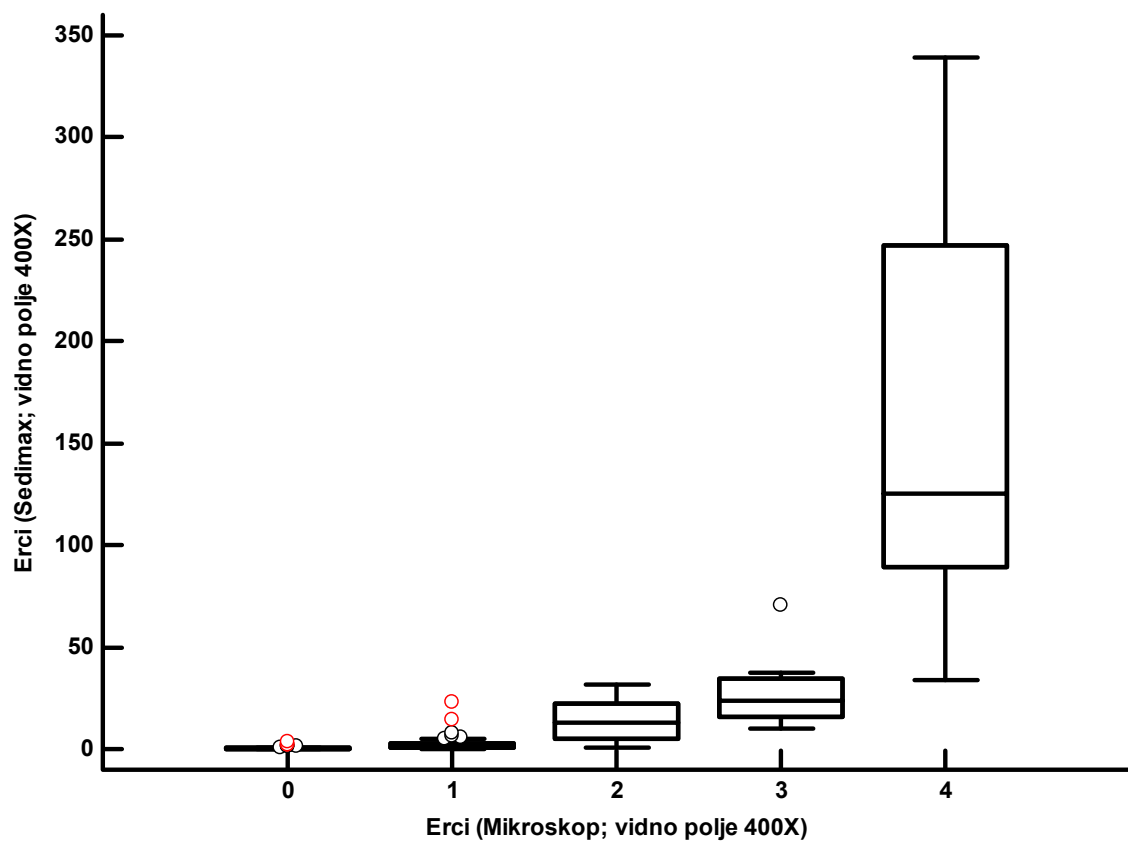
Graf 2: Primerjava števila eritrocitov (Erci) med mikroskopom (0–3=0, 4–25=1, 26–50=2, 51–100=3, >100=4) in UF-1000i.



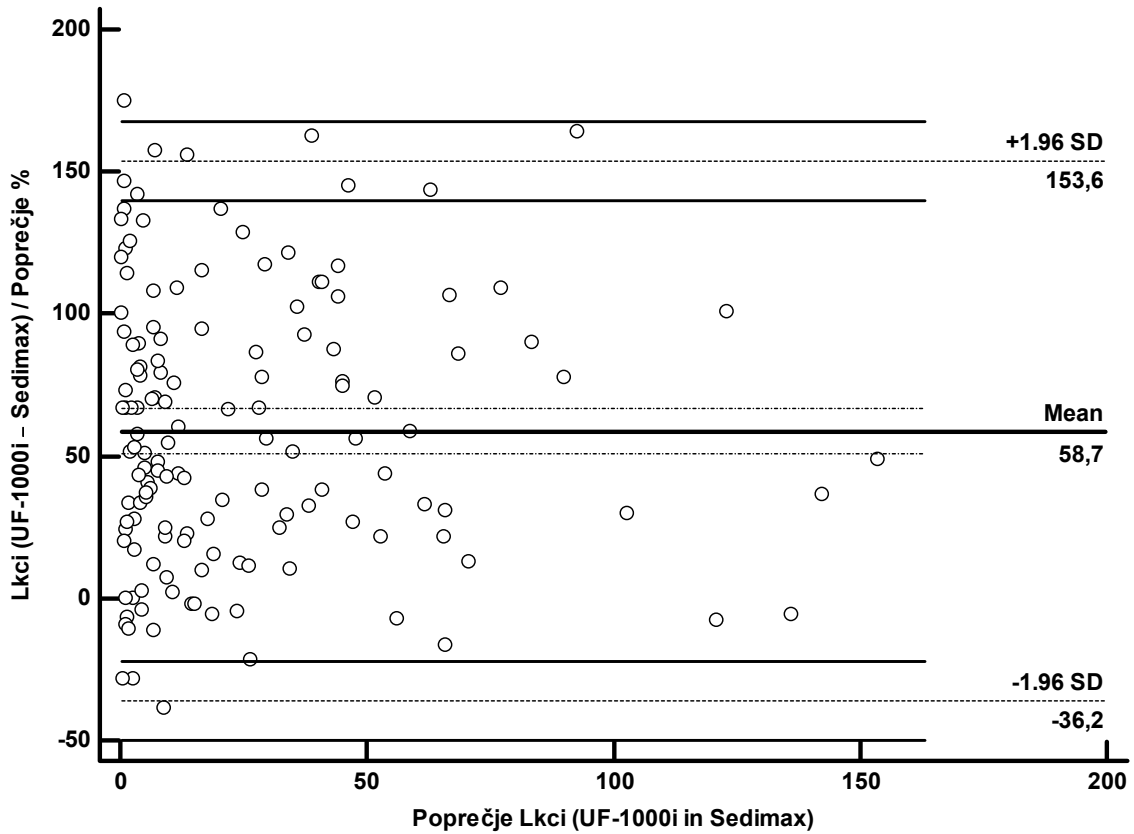
Graf 3: Primerjava števila levkocitov (Lkci) med mikroskopom (0–5=0, 6–25=1, 26–50=2, 51–100=3, >100=4) in SediMax-om



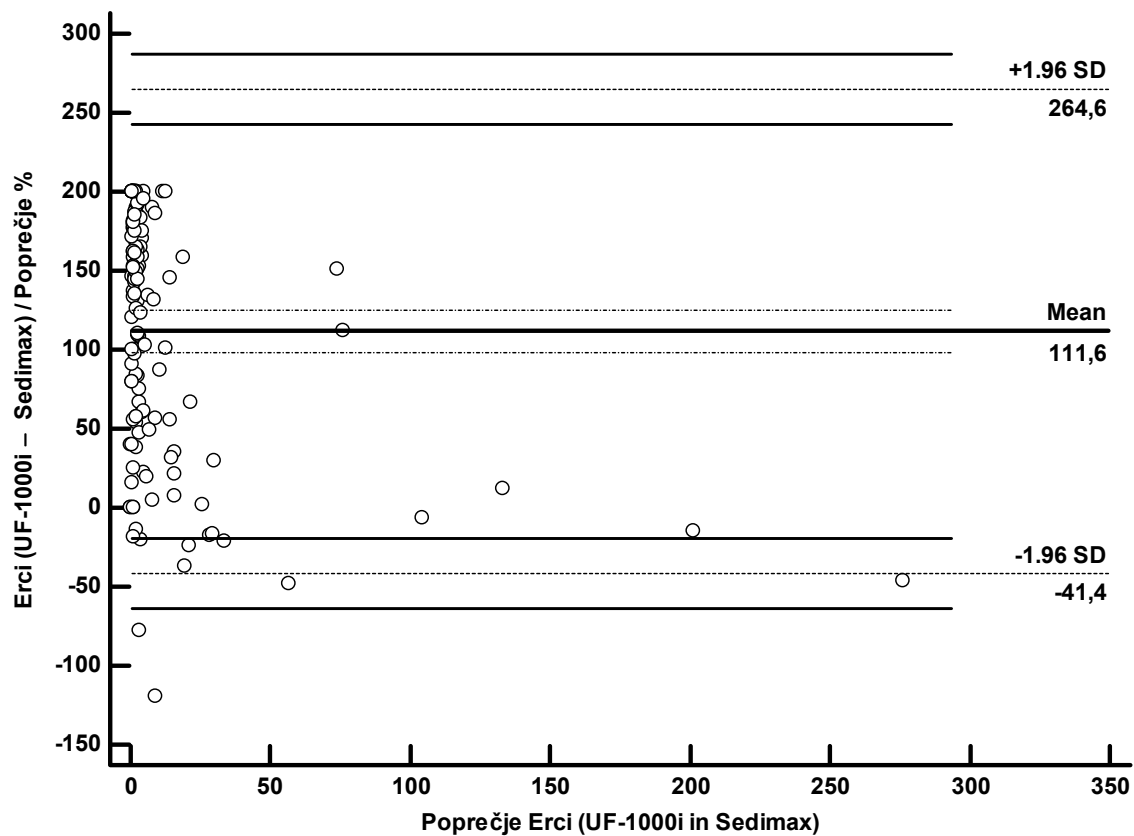
Graf 4: Primerjava števila eritrocitov (Erci) med mikroskopom (0–3=0, 4–25=1, 26–50=2, 51–100=3, >100=4) in SediMax-om



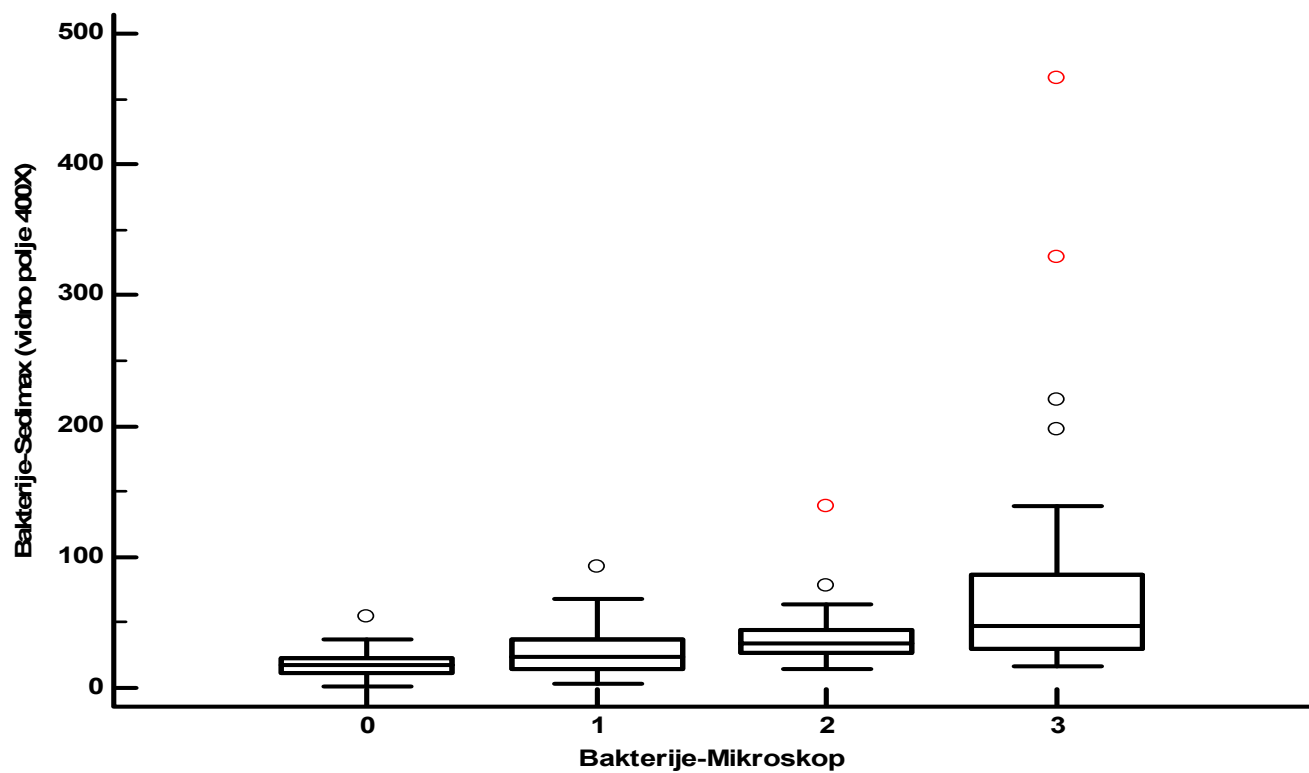
Graf 5: Bland-Altman analiza števila levkocitov (Lkci) med UF-1000i in SediMax-om (oboje na vidno polje 400X).



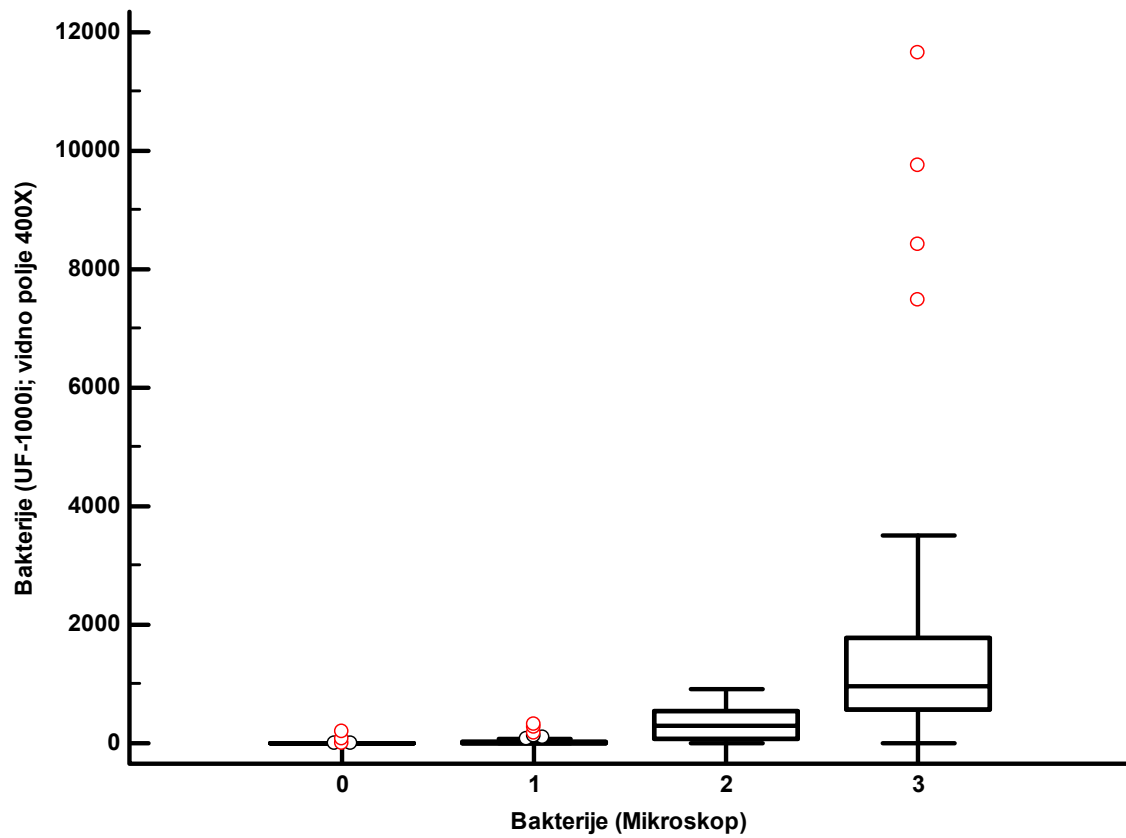
Graf 6: Bland - Altman analiza števila eritrocitov (Erci) med UF-1000i in SediMax-om (oboje na vidno polje 400X).



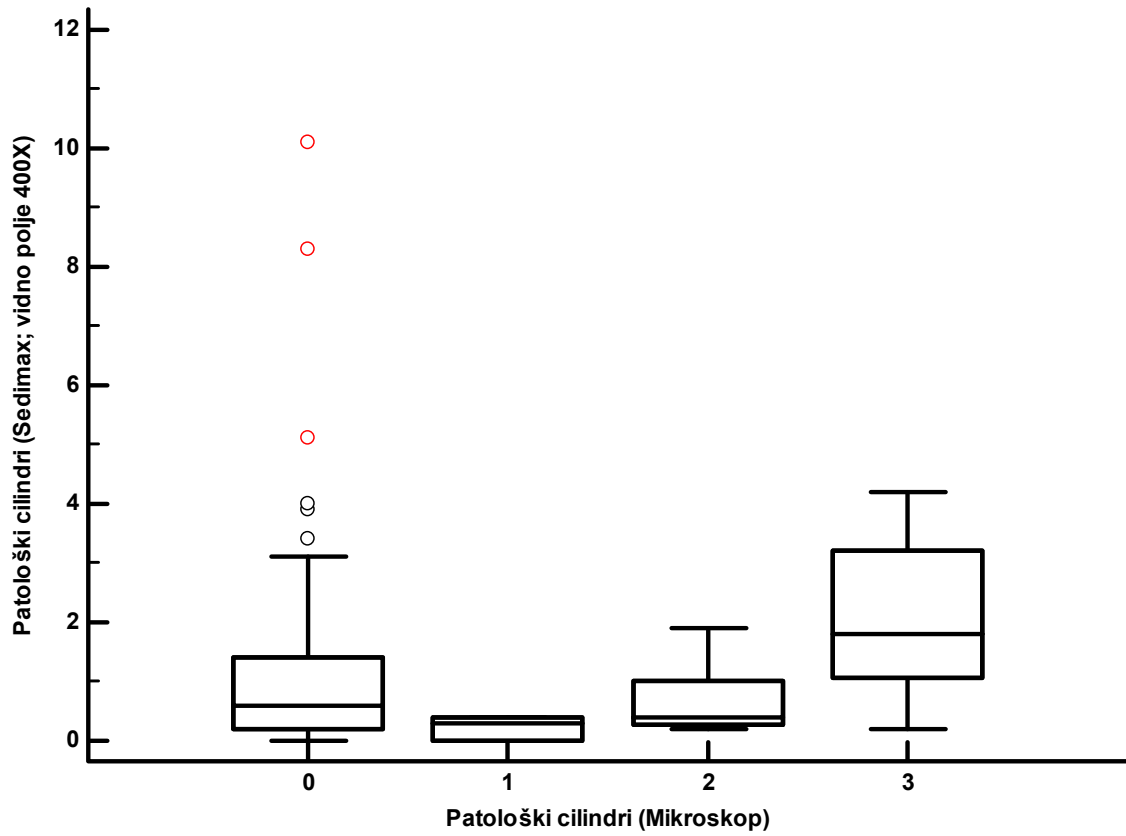
Graf 7: Primerjava števila bakterij med mikroskopom (O=O, malo=1, številne=2, zelo številne=3) in SediMax-om.



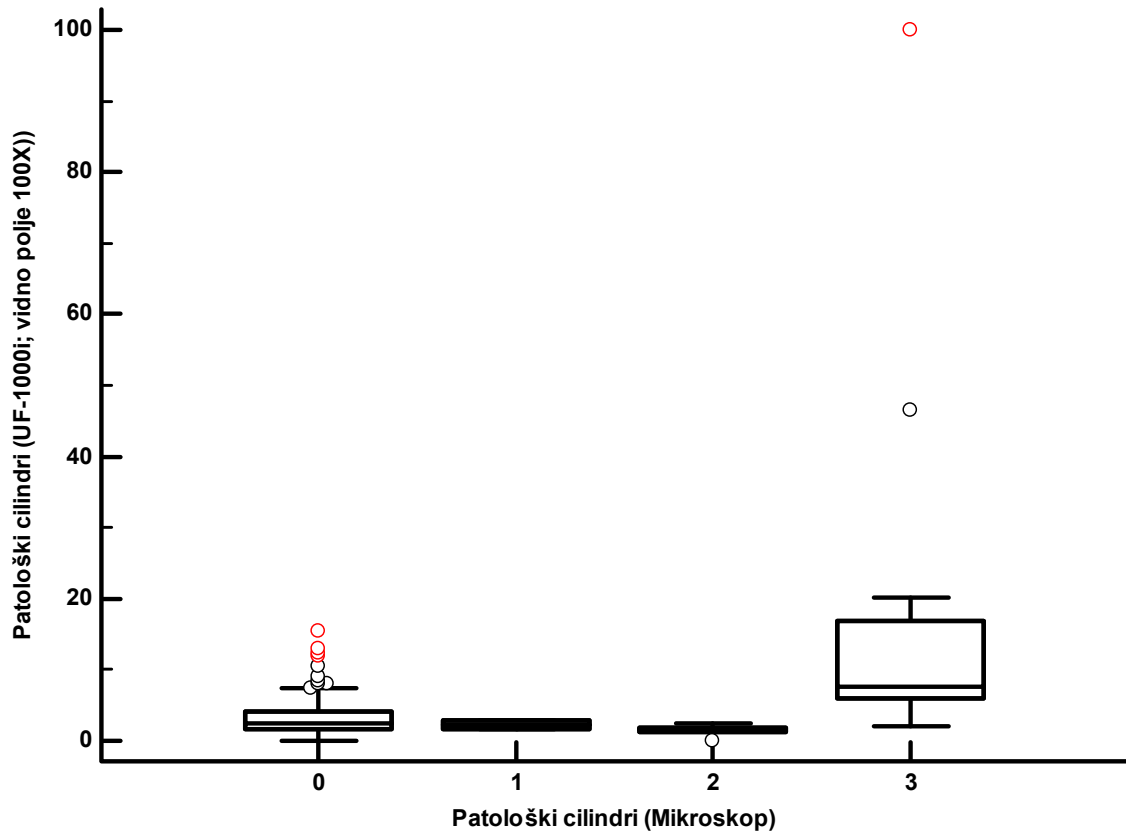
Graf 8: Primerjava števila bakterij med mikroskopom (O=O, malo=1, številne=2, zelo številne=3) in UF-1000i.



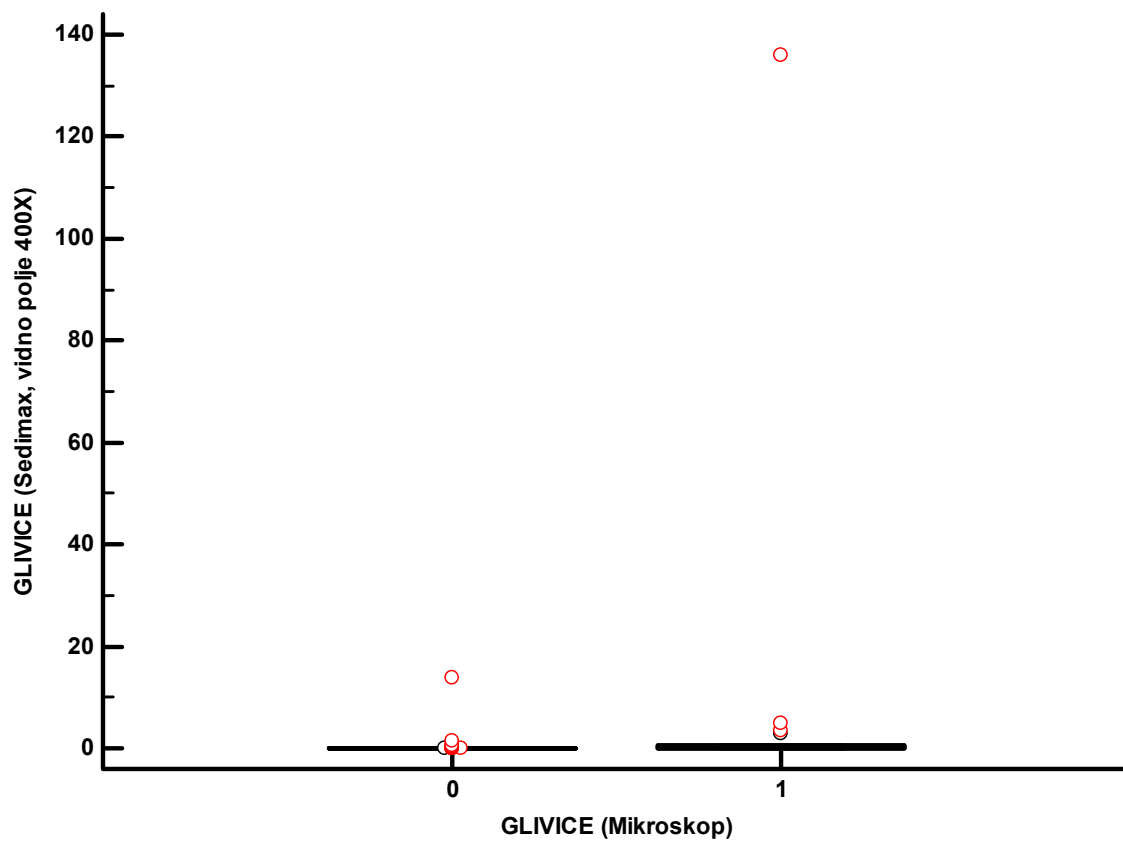
Graf 9: Primerjava števila patoloških cilindrov med mikroskopom (O=0, 1-2=1, 2-5=2, >5=3) in SediMax-om.



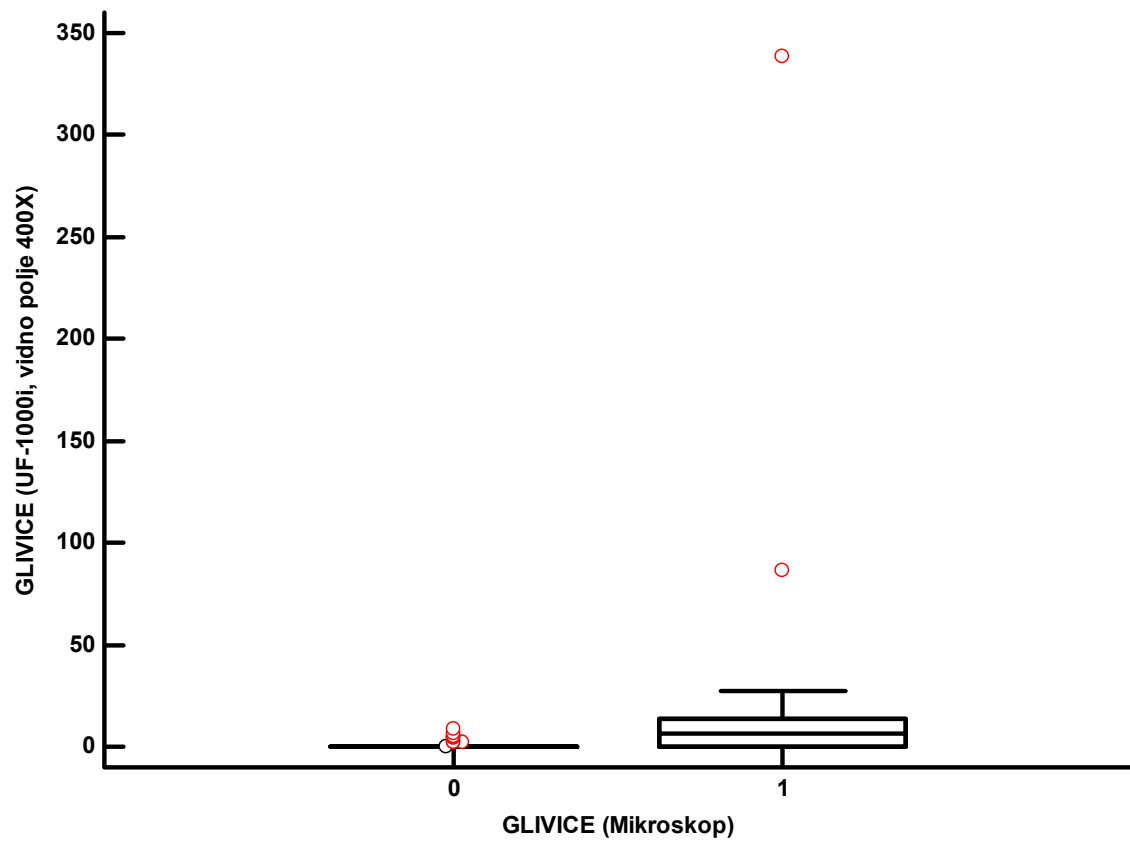
Graf 10: Primerjava števila patoloških cilindrov med mikroskopom (O=0, 1-2=1, 2-5=2, >5=3) in UF-1000i.



Graf 11: Primerjava odsotnosti/prisotnosti glivic med mikroskopom (odsotnost=0, prisotnost=1) in SediMax-om.



Graf 12: Primerjava odsotnosti/prisotnosti glivic med mikroskopom (odsotnost=0, prisotnost=1) in UF-1000i.



5 RAZPRAVA

Urinske preiskave se opravljajo v osnovni, kakor tudi v specialistični zdravstveni dejavnosti ter so poleg hematoloških in biokemičnih analiz temelj diagnostike bolezni. V Laboratoriju za analitiko urina in spremljanje koncentracije zdravil Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo na Njogoševi ulici v Ljubljani letno opravijo okrog 35000 analiz urinskega sedimenta.

Analizirali smo 141 vzorcev in prav tako vse statistično ovrednotili. Preiskovanci so bili k nam napoteni iz različnih oddelkov in ambulant Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

V vseh primerih smo najprej opravili analizo urinskega sedimenta na pretočnem citometru UF-1000i Sysmex, nato pa še s svetlobnim, fazno kontrastnim mikroskopom ter na avtomatiziranem mikroskopskem analizatorju SediMax. Oba avtomatizirana analizatorja urina zajemata analizo naslednjih celic: rdeče krvne celice (RBC), bele krvne celice (WBC), epitelne celice (EP oz. EPI), cilindre (CAST oz. HYA), bakterije (BACT), okrogle epitelne celice (SRC oz. NEC), glive (YLC oz. YEA), spermije (SPERM oz. SPRM), kristale (X`TAL oz. CRY), cilindre z vključki (Path. CAST) in sluzi (MUCUS). Pretočni citometer nam poda še informacije o prevodnost, eritrocitne morfološke informacije (RBC info) in informacije o infekciji sečil (UTI info). Mikroskopski analizator pa dodatno razvršča sledeče kristale: kalcijev oksalat monohidrat (CaOxm), kalcijev oksalat dihidrat (CaOxd), triple fosfat (TRI) in sečna kislina (URI). Osredotočili smo se na eritrocite, levkocite, bakterije, patološke cilindre in glive.

Z mikroskopom smo preverili prisotnost oziroma vrednost celic, ki jih je pretočni citometer označil kot patološke, vendar ne vseh. Tiste vzorce, ki so vsebovali veliko število eritrocitov, levkocitov ali amorfnih soli je analizator SediMax označil kot pregoste oziroma »crowded«. Takšnih vzorcev naša raziskava ni zajela.

Glede na rezultate v diplomski nalogi in tudi na podlagi literature ugotavljamo, da imajo vse tri tehnike tako dobre kot tudi slabe lastnosti.

Mikroskop: Mikroskopska analiza urina je bistvenega pomena za diagnosticiranje in spremljanje bolnikov, pri katerih obstaja sum za ledvične bolezni in okužbo sečil. Dobra lastnost je, da mikroskop ni pretirano draga investicija in ne potrebuje dodatnih reagentov, samo centrifugirke in mikroskopska stekelca. Vizualna mikroskopija je delovno intenzivna, vendar moramo upoštevati tudi človeški faktor, saj le izkušen laboratorijski delavec v preparatu vidi celične elemente, ki jih aparat spregleda (npr. parazite ali kristale) in jih lahko identificira. Ampak tudi človeški faktor lahko predstavlja slabo lastnost. Individualna ocena preparata se lahko razlikuje med dvema laboratorijskima delavcema. Čas mikroskopiranja je odvisen, glede na čas analize na aparatu, ki pa zajema: mešanje vzorca, odlivanje v centrifugirke, centrifugiranje, odlivanje, mikroskopiranje - vsaj petih vidnih polj in določitev povprečne ocene. Slaba lastnost je tudi ročno vnašanje ocene sedimenta v računalnik ali na izvid (obstaja namreč možnost napak pri prepisovanju rezultatov). Za ročno mikroskopiranje potrebujemo 12 ml svežega urina.

Pretočni citometer UF-1000i Sysmex: Dobra lastnost aparata je, da lahko analiziramo do 100 vzorcev na uro in pri tem ne potrebujemo človeške asistencije, potrebno je le vstaviti epruvete z vzorci. Ponovljivost analize je boljša kot pri mikroskopiranju, prenos rezultatov pa je neposredno na računalnik in na izvid. Za analizo analizator potrebuje 4 ml svežega urina. Slaba lastnost je visoka cena aparata in reagentov, ki so potrebni za analizo. Odstopanja pri

določenih analizah, glede na mikroskopsko analizo, so v nekaterih primerih velika. Tako ne zazna parazitov, prav tako kristalov, zamenjuje eritrocite z glivicami in obratno, ter ne zazna cilindrov in jih tudi ne opredeli.

Aparat prav gotovo ne more v celoti nadomestiti laboratorijskega delavca, ki pregleduje preparat sedimenta, kar je razvidno tudi iz diplomske naloge. Če primerjamo mikroskopsko analizo z analizo pretočne citometrije so bila največja odstopanja pri določanju patoloških cilindrov, zmerna pa pri določanju bakterij in gliv. Pri določanju levkocitov in eritrocitov sta analizi najbolj ustrezni. Tudi če primerjamo pretočno citometrijo z mikroskopskim analizatorjem sta analizi eritrocitov in levkocitov med seboj ustrezni.

Mikroskopski analizator SediMax: Dobra lastnost aparata je, da lahko analizira do 80 vzorcev na uro in za analizo potrebuje le 2 ml svežega urina. Aparat za analizo ne potrebuje nobenih reagentov, le destilirano vodo za spiranje sonde, da ne pride do kontaminacije vzorcev. Natančnost analize je boljša kot pri mikroskopiranju in sam prenos rezultatov analize je neposredno na računalnik in na izvid. Dobra lastnost je tudi, da si shranjene slike lahko ogleda izkušeni laboratorijski delavec in tako oceni morfologijo eritrocitov ter ostale podrobnosti. Slaba lastnost analizatorja je pregost vzorec. Če vzorec vsebuje veliko število eritrocitov, levkocitov ali pa amorfnih soli, ga aparat označi kot »crowded« in ne more prešteti ostalih celičnih elementov.

Aparat lahko le delno nadomesti mikroskop, saj laboratorijski delavec najprej pregleda slike sedimenta na računalniku in šele nato mikroskopira, če je seveda to tudi potrebno.

Levkociti: Primerjava števila levkocitov je bila boljša pri aparatu SediMax, kot pa pri UF-1000i. To vidimo, če primerjamo grafa 1 in 3. Pri grafu 3 opazimo manjša odstopanja kot pa pri grafu 1. Po

mojem mnenju bi lahko napačno identificiranje predpisali različnim oblikam levkocitnih celic.

Eritrociti: Primerjava števila eritrocitov je bila boljša pri SediMax-u, razen kadar je bilo število eritrocitov zelo veliko, takrat je bil boljši UF-1000i. Pri nižjih vrednostih so bila pri obeh aparatih opazna rahla odstopanja. Odstopanja bi lahko nastala zaradi prisotnosti gliv, saj jih lahko oba aparata narobe identificirata. UF-1000i lahko prav tako narobe identificira eritrocite zaradi različnih oblik celic.

Bakterije: Primerjava števila bakterije je bila za oba aparata dobra. Zmerna odstopanja vidimo na obeh grafih (7 in 8). Glede na to, da ima analizator UF-1000i posebej kanal za prepoznavanje oziroma štetje bakterij, smo pričakovali boljše rezultate. Tudi pri SediMax-u smo pričakovali boljše rezultate, glede na rezultate primerjalnih analiz drugod po svetu. Odstopanja pri SediMax-u so lahko posledica razbitih celic ali pa majhne prisotnosti amorfnih oborin.

Patološki cilindri: Primerjava števila patoloških cilindrov pri obeh aparatih vsebuje največ odstopanja. Pogosto sta oba aparata zaznala patološke cilindre, vendar jih pod mikroskopom nismo videli. Zmotno identificiranje pri SediMax-u bi lahko bila posledica epitelnih celic v skupkih ali fragmentih, pri UF-1000i pa posledica prisotnosti sluzi ali pa zaradi različnih oblik levkocitnih in epitelnih celic.

Glivice: Primerjava prisotnosti/odsotnosti glivic je pri UF-1000i malo boljša kot pa pri SediMax-u, vendar pa sta oba aparata pri določanju dobra. Aparata bi lahko napačno identificirala nekaj eritrocitnih celic, zato je prišlo do majhnega odstopanja.

Povzetek študije primerjalne metode za SediMax

Ocenili so analitične in diagnostične učinkovitosti SediMaxa, nove avtomatske mikroskopske slike, ki temelji na osnovi urinskega analizatorja sedimenta v primerjavi z optično fazno kontrastnim

mikroskopom. Diagnostično zmogljivost v zvezi z optično fazno kontrastnim mikroskopom so primerjali z rezultati iz dveh centrov (n1=910, n2=1233). V centru 1 so bili v vizualni mikroskopiji uporabljeni necentrifugirani vzorci urina, medtem, ko so v centru 2 uporabili urinski sediment.

SediMax je bil sposoben zaznati in natančno opredeliti najpogostejše delce – eritrocite, levkocite in epitelne celice – z občutljivostjo in specifičnostjo >80 % v obeh študijah. Za patološke cilindre je bila specifičnost 76,5 %, občutljivost pa 66,7 %. Občutljivost za glivice pa je bila 68,5 %. V obeh študijskih območjih je bilo pod krivuljo ROC (karakteristika delovanja sprejemnika) 80-90 % za eritrocite, levkocite, epitelne celice, glivice in kristale kalcijevega oksalata. Za neploščate epitelne celice in patološke ter hialine cilindre je bilo pod krivuljo 73-74 %.

SediMax je dober za računanje in identifikacijo eritrocitov, levkocitov, epitelnih celic, glivic, bakterij in kristalov kalcijevega oksalata. Identifikacija patoloških cilindrov in neploščatih epitelnih celic je ustrezna, vendar pa bi ga bilo potrebno izboljšati. (4)

Ugotovitve: SediMax tako v navedeni študiji kot tudi v naših primerjavah dobro opredeli eritrocite in levkocite. V študiji je dokaj dobro opredelil patološke cilindre, kar pa za našo primerjavo ne velja, saj so le-ti imeli največ odstopanj.

Če želimo resnično ugotoviti dobre in slabe lastnosti aparata niso dovolj le študije, ampak je potrebna tudi vsakodnevna uporaba aparata na različnih urinskih vzorcih.

6 ZAKLJUČEK

Pri diplomski nalogi smo primerjali rezultate analiz svetlobnega fazno kontrastnega mikroskopa, pretočne citometrije in avtomatiziranega mikroskopskega analizatorja. Ugotovili smo, da rezultati niso vedno primerljivi. Pri nekaterih vzorcih je bolje uporabljati pretočno citometrijo, pri drugih pa mikroskopski analizator. Vse tri tehnike imajo tako dobre kot tudi slabe lastnosti.

Avtomatizacija v laboratorijih omogoča hitrejše analize, višjo občutljivost in specifičnost ter tako razbremeni zaposlene. Mikroskop še vedno predstavlja zlati standard urinske analitike, saj se uporablja že vrsto let in je tudi cenovno ugoden. Vendar za mikroskopiranje potrebujemo izurjeno oko in laboratorijskega delavca z dolgoletnimi izkušnjami.

Avtomatizacija v laboratorijih je zelo priporočljiva in dobrodošla, saj se iz dneva v dan naredi več analiz. Ker pa so aparati zmotljivi, jih je nujno preverjati z mikroskopiranjem vzorcev s svetlobno fazno kontrastnim mikroskopom.

Prihodnost je v avtomatizaciji analiz. Z uvajanjem novega avtomatskega mikroskopskega analizatorja bi prihranili čas za pripravo sedimenta za mikroskop, saj bi si mikroskopske slike lahko ogledali na računalniku in tako ocenili vsebnost celičnih elementov. Kljub temu da ima SediMax veliko dobrih lastnosti, pa bi ga bilo potrebno še izboljšati oziroma združiti z avtomatskim bralcem urinskega traku.

7 LITERATURA

1. Skitek M.: Osnovna urinska analiza; Zbornik predavanj; seminar za tehnike laboratorijske medicine, SZKK, Jesenice, Maribor, Ljubljana, Murska Sobota; 2003
2. Milan Skitek, mag. farm., spec in Alenka Trampuš Bakija, univ. dipl. biol.: Priporočeni postopek za odvzem, zbiranje, hranjenje, stabiliziranje in transport urina, SZKK, Ljubljana, 2001
3. Plazar Nadja, Pahor Vanja, Berce Klementina: Priporočeni postopek za osnovno analizo urina, SZKK, Ljubljana, 2004
4. Zaman Z., Fogazzi G.B., Garigali G, Croci M.D., Bayer G., Kráncz T.: Urine sediment analysis: Analytical and diagnostic performance of SediMAX® - A new automated microscopy image-based urine sediment analyser, Clinica Chimica Acta; 2010; 411, p.p.147-154
5. Vesna Poljašević Plavša: Proučevanje pretočne citometrije v osnovni urinski analizi, Diplomsko delo, FFA, Ljubljana, 2007
6. Fogazzi G.B. in Pirovano B.: The urinary sediment. An integrated view, Masson, Milano, 2009, poglavje 7
7. Turgeon Mary Louise: Linnè&Ringsrud`s clinical laboratory science: The basic and routine techniques, Maryland Heights (MO), 2011, pp.396-426
8. Fully Automated Urine Sediment Analyzer SediMax, User manual for version 1.5
9. Clinical Case Study: Sysmex, 2007
10. Ringsrud K.A. in Linnè J.J.: Urinalysis and Bodyfluids. A color text and atlas, 1995

INTERNETNI VIRI

11. <http://www.mvi-inc.com/mvipro/page.php3?id=183&mode=smash>
12. http://www.mediconire.com/diag/index.php?option=com_k2&view=item&id=118:sedimax&Itemid=205
13. http://sysmex.co.kr/product/product_5_a.htm
14. <http://www.mediconire.com/diag/docs/lab/sedimax.pdf>