

Usporedba metode fluorescentne protočne citometrije i svjetlosne mikroskopskopije u analizi mokraćnog sedimenta

Krivić, Doris

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:257254>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Doris Krivić

**USPOREDBA METODE
FLUORESCENTNE PROTOČNE
CITOMETRIJE I SVJETLOSNE
MIKROSKOPIJE U ANALIZI
MOKRAĆNOG SEDIMENTA**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Doris Krivić

USPOREDBA METODE
FLUORESCENTNE PROTOČNE
CITOMETRIJE I SVJETLOSNE
MIKROSKOPIJE U ANALIZI
MOKRAĆNOG SEDIMENTA

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren u Zavodu za kliničko laboratorijsku dijagnostiku u sklopu Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Vatroslav Šerić, spec. med. biochem.

Rad ima 32 lista i 7 slika.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Kvalitativna analiza mokraće.....	2
1.1.2. Kemijski pregled mokraće.....	3
1.1.3. Mikroskopski pregled sedimenta urina	3
1.2. Automatizirani analizator Sysmex UF-4000 (Siemens).....	4
2. HIPOTEZA	6
3. CILJ RADA.....	7
4. ISPITANICI I METODE	8
4.1. Ustroj studije	8
4.2. Ispitanici	8
4.3. Metode	9
4.3.1. Svjetlosna mikroskopija	9
4.3.2. Fluorescentna protočna citometrija	10
4.4. Statističke metode.....	13
5. REZULTATI	14
5.1. Usporedba mjerenja količine eritrocita.....	15
5.2. Usporedba mjerenja količine leukocita	16
5.3. Usporedba mjerenja količine pločastog epitela	17
5.4. Usporedba mjerenja količine hijalinih cilindara	18
5.5. Usporedba mjerenja količine bakterija	19
6. RASPRAVA.....	21
7. ZAKLJUČAK.....	23
8. SAŽETAK.....	24
9. SUMMARY	25
10. LITERATURA.....	26
11. ŽIVOTOPIS.....	27

1. UVOD

Mokraća je tekućina kojom izlučuju otpadni produkti metabolizma, strane i štetne tvari za organizam. Zdrava osoba izluči na dan oko 1 – 2 litre mokraće, u prosjeku oko 1,5 L. Količina izlučene mokraće može jako varirati, ovisno o vrsti bolesti. Oligurija, izlučivanje malih količina mokraće (manje od 400 ml na dan), pojavljuje se npr. kod bubrežnih i srčanih bolesti. Potpuna nemogućnost mokrenja i zadržavanje mokraće, npr. zbog opstrukcije mokraćnih puteva, naziva se anurijom. Poliurija, izlučivanje abnormalno velikih količina mokraće, nalazi se najčešće u bolesnika sa šećernom bolešću, a posebno je izražena kod dijabetesa insipidusa (1).

Tvari koje se izlučuju mokraćom možemo podijeliti u tri skupine:

1. anorganske i organske tvari koje se fiziološki izlučuju mokraćom
2. tvari koje se izlučuju mokraćom u patološkim stanjima i određenim fiziološkim stanjima (trudnoća, laktacija)
3. lijekovi, otrovi i štetne tvari (1).

Kako je mokraća produkt rada bubrega, njezine analize omogućavaju nam uvid u ispitivanje bubrežne funkcije te otkrivanje bubrežnih bolesti i praćenje tijeka same terapije. Analizu mokraće možemo podijeliti na kvantitativnu i kvalitativnu. Kvantitativnom analizom mokraće određuje se koliko se neke tvari izluči bubrezima tijekom jednog dana. Za kvantitativne pretrage sakuplja se 24-satna mokraća, izmjeri joj se volumen, a kao uzorak uzima se alikvot. Uzorak za kvalitativnu analizu mokraće prva je jutarnja mokraća jer je njezin sastav najbliži sastavu 24-satne mokraće. Kvalitativna analiza mokraće osnovna je pretraga u dijagnostici bubrežnih bolesti, a sastoji se od fizikalnog pregleda mokraće, kemijske analize test trakom i mikroskopske analize mokraćnog sedimenta (1).

1.1. Kvalitativna analiza mokraće

Prva i osnovna pretraga za dijagnostiku bubrežne bolesti je kvalitativna analiza mokraće. Sastoji se od fizikalnog, kemijskog i mikroskopskog pregleda uzorka mokraće. Uzorak izbora srednji je mlaz prve jutarnje mokraće nakon noćnog sna, toalete vanjskog spolovila, prije doručka i drugih aktivnosti, pri čemu vrijeme od posljednjeg pražnjenja mjehura treba biti najmanje četiri, a najviše osam sati. Analizu se ne preporučuje raditi kod žena neposredno prije, za vrijeme i neposredno nakon menstruacije kao ni kod žena koje imaju vidljiv vaginalni iscjedak. Uzorak mokraće treba skupljati u čistu posudu sa širokim grlom koja je za jednokratnu upotrebu. Ako se uzorak prenosi do mjesta analize uzorka, posuda mora biti zatvorena. Pregled uzorka mokraće treba učiniti unutar dva sata u odnosu na vrijeme uzorkovanja.

1.1.1. Fizikalni pregled mokraće

Fizikalni pregled mokraće daje opisnu procjenu izgleda, boje i mirisa.

Svježa mokraća zdrave osobe najčešće je bistra, ako mokraća stoji, već će nakon nekog vremena doći do stvaranja sluzi koja će lebdjeti te će podsjećati na oblačice. Ako je mokraća kisela, najčešće dolazi do taloženja kalcijeva oksalata, mokraćne kiseline i njezinih soli, urata. Ako je mokraća alkalna, mogu se pronaći fosfati i karbonati. Iz samog izgleda mokraće ne može se donijeti točna dijagnoza jer postoje slučajevi gdje je mokraća bila bistra, a osoba je bolovala od glomerulonefritisa. Mokraća zdrave osobe žute je boje zbog postojanja mokraćnog pigmenta urokroma koji nastaje iz hemoglobina. Kod raznih metaboličkih poremećaja i bolesti može doći do izlučivanja nekih tvari koje se kod normalne zdrave osobe inače ne izlučuju te tako uzrokovati promjene boje u uzorku mokraće. Npr. izlučivanje hemoglobina uzrokovat će crvenkastu boju mokraće, specifično je da će ta boja ostati i nakon centrifugiranja, za razliku od hematurije, gdje će doći do izlučivanja eritrocita u mokraći. Miris mokraće zdrave osobe je specifičan, sličan goveđoj juhi, potječe od hlapljivih kiselina (ureja koja se razgrađuje pa ima miris na amonijak). Na miris također mogu utjecati prehrana i lijekovi (2).

1.1.2. Kemijski pregled mokraće

Kemijskim pregledom mokraće ispituju se pH i relativna volumna masa (RVM) te prisutnost sastojaka kojih nema u uzorku zdravih osoba (proteini, glukoza, ketonski spojevi, bilirubin, urobilinogen, krv, nitriti, leukociti). Za sve te analize najčešće se upotrebljavaju test trakice. Analiza test trakicama brz je i jednostavan postupak pa se osim u laboratoriju, mogu koristiti i u ambulantom te uz bolesnički krevet. Izrađene su od celuloze i prozirne plastike na kojoj su na poljima impregnirani odgovarajući reagensi koji daju boju koja se uspoređuje sa skalom boja i pridružuje joj se polukvantitativan rezultat. Boja se uspoređuje sa skalom na kutiji ili automatski pomoću čitača traka refleksnom fotometrijom. Rezultat se izražava arbitrarnom jedinicom (negativno, 1/+, 2/++, 3/+++ ili 4/++++) (2). Kemijska analiza izvodi se uranjanjem test trake u epruvetu s mokraćom, potom se izvadi i na filter papiru pokupi se višak tekućine i nakon 30 sekundi uspoređuje se sa skalom, odnosno određuje automatski u čitaču trakica.

1.1.3. Mikroskopski pregled sedimenta urina

Mikroskopski pregled sedimenta mokraće vrlo je važna pretraga u kvalitativnoj analizi mokraće jer vrlo često može dati važne informacije koje iz kemijskog pregleda mokraće nisu vidljive. Takva analiza mokraćnog sedimenta najsloženiji je dio kvalitativne analize mokraće.

Za točnu identifikaciju i diferencijaciju staničnih elementa potrebno je veliko znanje, godine vježbe i iskustva te kvalitetan mikroskop (3). Iz svake mokraće stajanjem dolazi do taloženja sedimenta. Sastojci sedimenta mogu se podijeliti na 2 skupine: organizirani sediment i neorganizirani sediment. U neorganizirani dio sedimenta ubrajamo: kristale mokraćne kiseline, kalcijevog oksalata, raznih fosfata, amorfnih urata i fosfata te rjeđe kristale teško topljivih aminokiselina, prirodnih spojeva, lijekova i njihovih metabolita.

Organizirani dio sedimenta čine eritrociti, leukociti, stanice pločastog epitela, male epitelne stanice, mikroorganizmi, paraziti i njihova jajašca, spermiji i razne vrste cilindara. Ponekad su prisutne i slučajne primjese kao dlačice, vlakanca, kapljice masti, zrnca škroba i dr. (4).

U svakom uzorku mokraće s vremenom dolazi do taloženja organskih tvari i soli. Ako uzorak dulje stoji, doći će do taloženja neorganiziranog sedimenta. O sastavu sedimenta ovisi pH mokraće. U kiseloj mokraći taložiti će se kalcijev oksalat, mokraćna kiselina i soli mokraćne kiseline, dok će se u alkalnoj taložiti fosfati i karbonati.

Osim sastojaka neorganiziranog sedimenta, sediment sadrži i sastojke organiziranog sedimenta. Tu se ubrajaju pločasti epitel, male epitelne stanice, pojedini leukociti, eritrociti, hijalini cilindri, mikroorganizmi i slučajni sastojci kao što su dlaka, kapljice masti, spermatozoidi.

Nakon što se odradi kemijska analiza, potrebno je centrifugirati uzorak mokraće. Ako ima dovoljno uzorka za analizu mokraćnog sedimenta, volumen je obično 5 – 12 ml. Uzorak se centrifugira pet minuta na 1500 okretaja u minuti. Odlijevanjem supernatanta nakon centrifugiranja dobivamo sediment uzorka koji se nalazi na dnu epruvete. Takav sediment spreman je za daljnju mikroskopsku analizu. Uzorak se najprije gleda na manjem povećanju, od 100 puta i pod tim povećanjem traže se cilindri. Zatim se uzorak detaljno pregledava pod povećanjem od 400 puta kako bi se uočili te kvantificirali ostali elementi.

Uzorak može stajati na sobnoj temperaturi ako se pregleda unutar jednog sata, a na +4 °C četiri sata.

1.2. Automatizirani analizator Sysmex UF-4000 (Siemens)

U današnje vrijeme uglavnom se koriste i automatski analizatori koji prepoznaju i kvantificiraju elemente sedimenta. Oni se najčešće temelje na tehnologiji protočne citometrije. Na temelju prethodnih znanstvenih istraživanja dokazana je dobra usporedivost rezultata dobivenih na protočnom citometru te rezultata dobivenih pregledom uzorka svjetlosnim mikroskopom (5). Jedna od značajnih osobina automatskih analizatora je bolji kraće vrijeme izrade pretrage (TAT, engl. *Turn around time*), što je izrazito bitno za hitne analize.

Automatizirani uređaj Sysmex UF-4000 (Siemens) predstavlja najnoviju tehnologiju analize mokraće. Njegov rad utemeljen je na fluorescentnoj protočnoj citometriji. Analizom native mokraće bez prethodne pripreme spriječili bi se poznati izvori pogrešaka koji su svojstveni uobičajenoj analizi sedimenta mokraće. Potpuna automatizacija značila bi bržu analizu bez potrebnog nadzora te bolju produktivnost samog laboratorija. Taj analizator ima mogućnost analize više vrsta uzoraka (urin, tjelesne tekućine). Iz 2 ml urina može se odrediti 17 dijagnostičkih parametara, dok u jednom satu može obraditi 80 uzoraka. Uređaj je potpuno automatiziran te ima mogućnost digitalnog snimanja sedimenta mokraće. Kamera sadrži 2 milijuna piksela i tako omogućuje detaljan pregled čestica urina. Može se kombinirati s ostalim uređajima UF serije (6). U odnosu na analizu sedimenta svjetlosnim mikroskopom u toj analizi nije potrebno prethodno centrifugirati uzorak.

Mikroskopska procjena elemenata sedimenta dugotrajan je postupak, s visokom nepreciznosti i netočnosti; štoviše, zahtijeva stručno znanje promatrača. Posljednjih godina automatizacija mokraćnog sedimenta prevladala je navedene nedostatke pridodane svjetlosnom mikroskopu. Sada je dostupan novi analizator elemenata sedimenta mokraće iz Sysmex serije UF, UF-4000. Sysmex UF-4000 (Siemens) je potpuno automatizirani analizator elemenata mokraće. Osim urina mogu se analizirati druge tjelesne tekućine poput likvora. Princip rada instrumenta se temelji na metodi fluorescentne protočne citometrije koja ima sposobnost prepoznavanja i kvantificiranja elemenata sedimenta.

Parametri analize koje Sysmex UF 4000 može prepoznati i kvantificirati su: eritrociti (RBC), nelizirani eritrociti (NL RBC), leukociti (WBC), nakupine leukocita (WBCc), ukupne epitelne stanice (EC), ne-skvamozne epitelne stanice (Non-SEC), skvamozne epitelne stanice (SEC), prijelazne epitelne stanice (Tran. EC), bubrežne epitelne stanice (RTEC), cilindri (CAST), hijalini cilindri (Hy. CAST), patološki cilindri (Path. CAST), bakterije (BACT), kristali (XTAL), gljivice (YLC), spermatozoide (SPERM) i sluz (MUCUS). WBCc, Tran. EC, RTEC, Hy. CAST novi su parametri koji nisu bili prisutni na prethodnim uređajima Sysmex UF serije.

2. HIPOTEZA

Metoda fluorescentne protočne citometrije u analizi mokraćnog sedimenta usporediva je sa svjetlosnom mikroskopijom u analizi mokraćnog sedimenta.

3. CILJ RADA

Cilj je rada usporediti nalaze mokraćnog sedimenta dobivene metodom fluorescentne protočne citometrije s nalazima dobivenim svjetlosnom mikroskopijom.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije

Provedeno istraživanje ustrojeno je po načelu presječne (*cross-sectional*) studije koja daje informacije o populaciji unutar koje se provode znanstvena istraživanja. Presječna je studija opisna studija koja se najčešće koristi za procjene sprječavanja akutnih ili kroničnih stanja te za odgovore na pitanjima o uzrocima bolesti. Analizira podatke prikupljene iz populacije i u određenom vremenu te pruža podatke o cijeloj populaciji. Može se upotrijebiti za opisivanje neke značajke populacije, kao što su prevalencija bolesti ili može potkrijepiti zaključke uzroka i posljedica (7).

4.2. Ispitanici

U provedenom istraživanju analizirani su nasumični uzorci mokraće pacijenata zaprimljenih u Zavod za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek. Ukupno je obrađeno 150 uzoraka.

4.3. Metode

Za analizu mokraćnog sedimenta korištena je laboratorijska metoda svjetlosne mikroskopije te metoda fluorescentne protočne citometrije.

4.3.1. Svjetlosna mikroskopija

Analiziranje sedimenta mokraće rutinski se provodi pod svjetlosnim mikroskopom. Uzorak urina se mora pripremiti postupkom centrifugiranja na 1500 okretaja/min 5 minuta, u konusnoj epruveti, nakon čega se uzima alikvot sedimenta koji se analizira. Uzorak se prvo promatra pod malim povećanjem (10 x) kako bi se uočila raspodjela različitih elemenata u sedimentu, a samo diferenciranje i brojanje stanica izvodi se pod velikim povećanjem (40 x). Tijekom procesa brojanja zabilježava se prosječan broj stanica i elemenata na barem 10 različitih vidnih polja. Iako je „zlatni standard“ u laboratorijskoj analizi sedimenta mokraće, mikroskopska analiza mokraće ne koristi se učinkovito u kliničkim laboratorijima zbog nedostatka standardizacije, što najčešće dovodi do netočnih rezultata.

Standardizirani kit za mikroskopski pregled sedimenta urina

Urised je standardizirani kit koji se koristi za mikroskopski pregled sedimenta mokraće. Urised je građen od polistirena i sastoji se od 10 komorica. Dužina i širina komorice su 9,5 mm. Površina jedne komorice je $90,25 \text{ mm}^2$, a volumen $9,025 \text{ mm}^3$. Volumen uzorka koji se unosi u komoricu nakon centrifugiranja iznosi $0,011 \mu\text{l}$ (8).

Princip metode:

Mikroskop je optički uređaj pomoću kojega vidimo uvećanu sliku malih predmeta. Optički mikroskop koristi snop svjetlosti za prikazivanje uvećane slike predmeta (9).

Snop svjetlosti osvjetljava predmet koji promatramo te prolazi kroz optički sustav mikroskopa koji stvara njegovu povećanu sliku. Svjetlost kojom osvjetljavamo predmet prolazi kroz kondenzor koji sabire zrake svjetlosti na uzorak kako bi on bio što bolje osvjetljen. Svjetlost zatim prolazi kroz uzorak i ulazi u objektiv koji stvara prvu povećanu realnu sliku. Ta slika služi kao predmet za okular koji daje još više povećanu virtualnu sliku od koje oko na mrežnici stvara realnu sliku (10).

4.3.2. Fluorescentna protočna citometrija

Analiza uzoraka mokraće metodom fluorescentne protočne citometrije (FFC, engl. fluorescence flow cytometry) napravljena je na uređaju Sysmex UF-4000 (Siemens). Tom metodom moguće je analizirati fiziološka i kemijska svojstva stanica. Kao dio najnovije tehnologije sudjeluje i u analizi mokraćnog sedimenta. Takvom vrstom analize dobivamo uvid i informacije o veličini i strukturi stanica te samoj unutrašnjosti stanice. U analizama mokraće tehnologija fluorescencije koristi se i za brojanje bakterija, crvenih krvnih zrnaca, bijelih krvnih zrnaca i drugih elemenata.

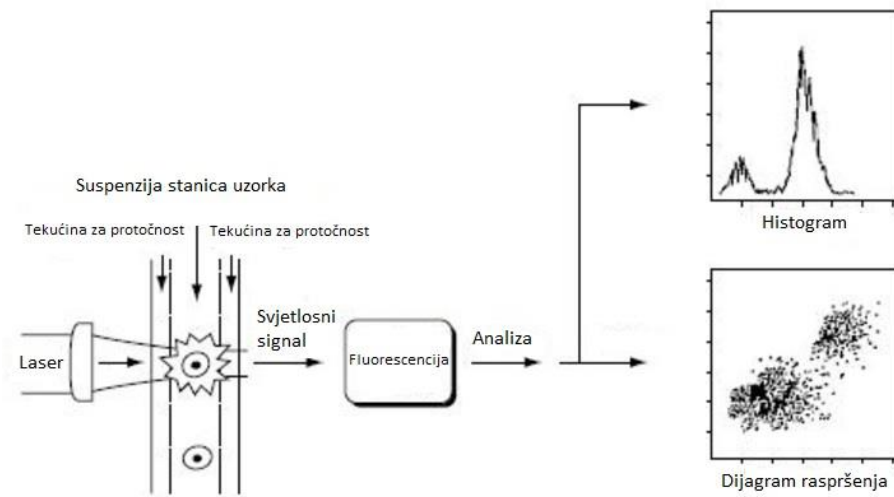
Princip metode:

Fokusirana zraka svjetlosti (laser) usmjerena je na stanice, što rezultira raspršenom svjetlošću i fluorescencijom. Pomoću tih svjetlosnih signala kao parametara generira se jednodimenzionalni histogram koji se temelji na intenzitetu svjetlosti i dvodimenzionalnom dijagramu raspršenja (engl. *scattergam*) utemeljenom na intenzitetu fluorescencije i intenzitetu raspršenog svjetla kako bi se omogućila detaljna analiza stanica (11).

Fluorescencija emitirana iz stanice mokraće odražava kvantitativnu površinu stanica i intracitoplazmatska svojstva te svojstva jezgre zbog svojstava fluorescentno obilježenih antitijela i fluorescentnog pigmenta.

Intenzitet raspršenja prema naprijed ukazuje na volumen stanice. Bočno rasipanje svjetlosti daje informacije o unutarnjoj staničnoj strukturi i njenom sadržaju, kao što su jezgra i granule. Također, fluorescencija označava količinu nukleinskih kiselina prisutnih u stanici.

Budući da je Sysmex UF-4000 (Siemens) baziran na principu protočne citometrije te je potpuno automatizirani analizator čestica urina, frakcionirat će čestice u mokraći i izraziti ih kvantitativno.



Slika 1. Prikaz principa metode fluorescentne protočne citometrije, izvor:

[https://microbiologiemedicale.fr/automate-cytologie-urinaire-sysmex-sedimax-iris/\(12\)](https://microbiologiemedicale.fr/automate-cytologie-urinaire-sysmex-sedimax-iris/(12)).

Postupak analize uzorka:

1. Injektiranje 450 μl uzorka. 125 μl uzorka odlijeva se za SFch i 125 μl uzorka za CRch reakcijsku jedinicu.
2. Ispuštanje 362,5 μl diluenta i 12,5 μl boje za SFch i CRch jedinicu (razrijeđenje mokraće 4 puta).
3. Uzorak se miješa devet sekundi na temperaturi od 39 °C.
4. Razrijeđen i obojen uzorak se unosi u protočnu ćeliju.
5. Zraka lasera obasja uzorak, uočavanje raspršene svjetlosti i fluorescencije.
6. Analiza raspršene svjetlosti i izračunavanje numeričke vrijednosti za svaki parametar.
7. Prikaz rezultata analize.

Reagensi:

UF-CELLSHEATH, UF-CELLPACK SF, UF-CELLPACK CR, UF-Fluorocell SF, UF-Fluorocell CR, UF-CONTROL, UF-CALIBRATOR, Cellclean U.



Slika 2. Uređaj Sysmex UF-4000 (Siemens), autor slike: Doris Krivić

4.4. Statističke metode

Svi prikupljeni kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim frekvencijama i omjerima, dok su numerički podatci opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom te po potrebi medijanom, interkvartilnim rasponom te ukupnim rasponom. Raspodjela podataka ispitana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Rezultati su prikazani tablično i grafički.

Za usporedbu pojedinih mjerenja različitim metodama korištena je Passing-Bablokova regresijska analiza, a za kontrolno testiranje povezanosti dviju numeričkih varijabli korišten je Spearmanov test korelacije.

Statistička analiza učinjena je programskim sustavom MedCalc (inačica 18.11.6, MedCalc Software bvba), uz odabranu razinu značajnosti od $P < 0,05$.

5. REZULTATI

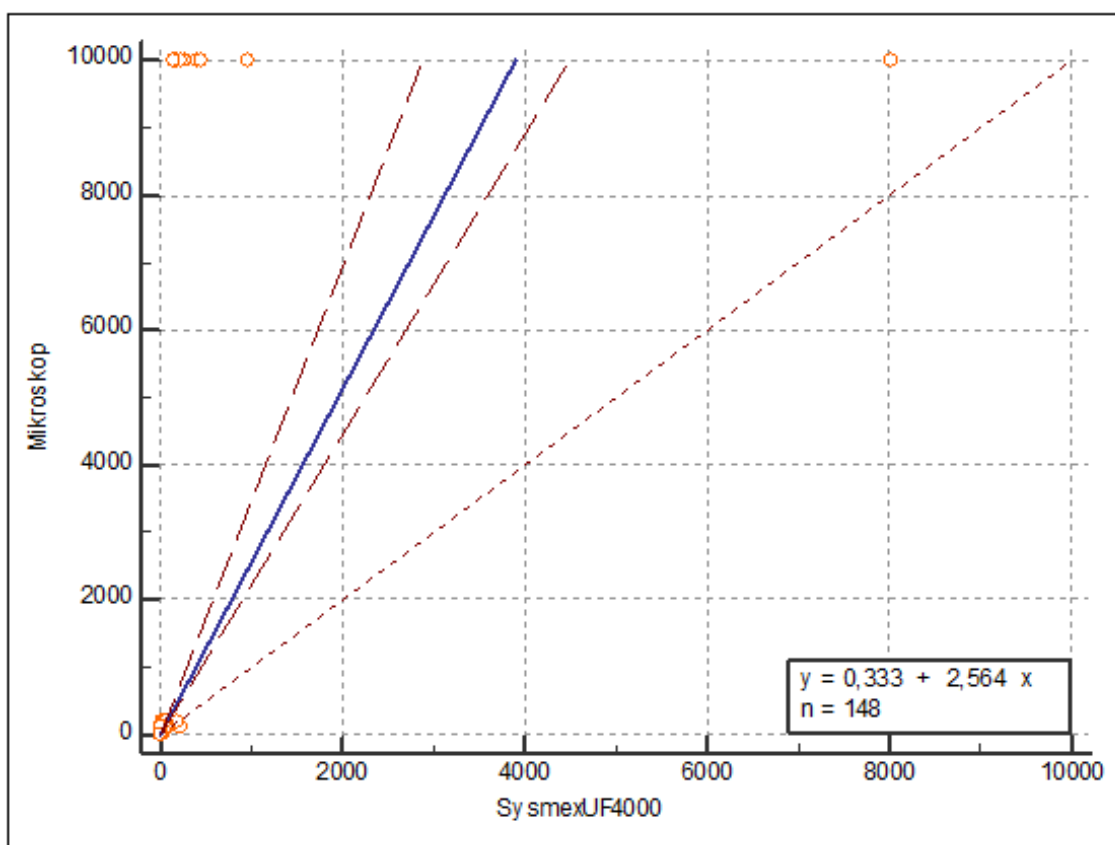
U istraživanju je korišteno 150 uzoraka urina na kojima su se na dva načina vršila mjerenja eritrocita, leukocita, pločastog epitela, hijalinih cilindara i bakterija po vidnom polju.

Prvo mjerenje napravljeno je procjenom nakon promatranja mikroskopom te drugo mjerenje na istom uzorku mjernim uređajem Sysmex UF-4000 (Siemens). Spol, dob te ostala demografska obilježja ispitanika nisu promatrana jer ne utječu na rezultat ovoga istraživanja.

5.1. Usporedba mjerenja količine eritrocita

Rezultati Passing-Bablokove regresije pokazali su da nema značajnog odstupanja od linearnosti (Cusum test linearnosti, $P = 0,19$) te je analiza dobivenog pravca pokazala sljedeće: koeficijent pravca dva i pol puta veći je od idealnog koeficijenta ($B = 2,56$ [95 % CI: 2,22 do 3,47]), no odsječak na osi ordinate zanemariv je ($A = 0,33$ [95 % CI: -0,65 do 1,11]). To znači da su vrijednosti očitane mikroskopom u prosjeku 2,5 puta veće od vrijednosti očitanih mjernim uređajem Sysmex UF-4000 (Siemens), odnosno te dvije vrste mjerenja nisu usklađene (Slika 3.).

Rezultati analize povezanosti između očitavanja količine eritrocita dobivenih mikroskopom i očitavanja dobivenih mjernim uređajem Sysmex UF-4000 (Siemens) pokazali su vrlo visoku i statistički značajnu korelaciju između tih dviju varijabli (Spearmanov test korelacije, $Rho = 0,85$ [95 % CI: 0,80 do 0,89]; $P < 0,001$).

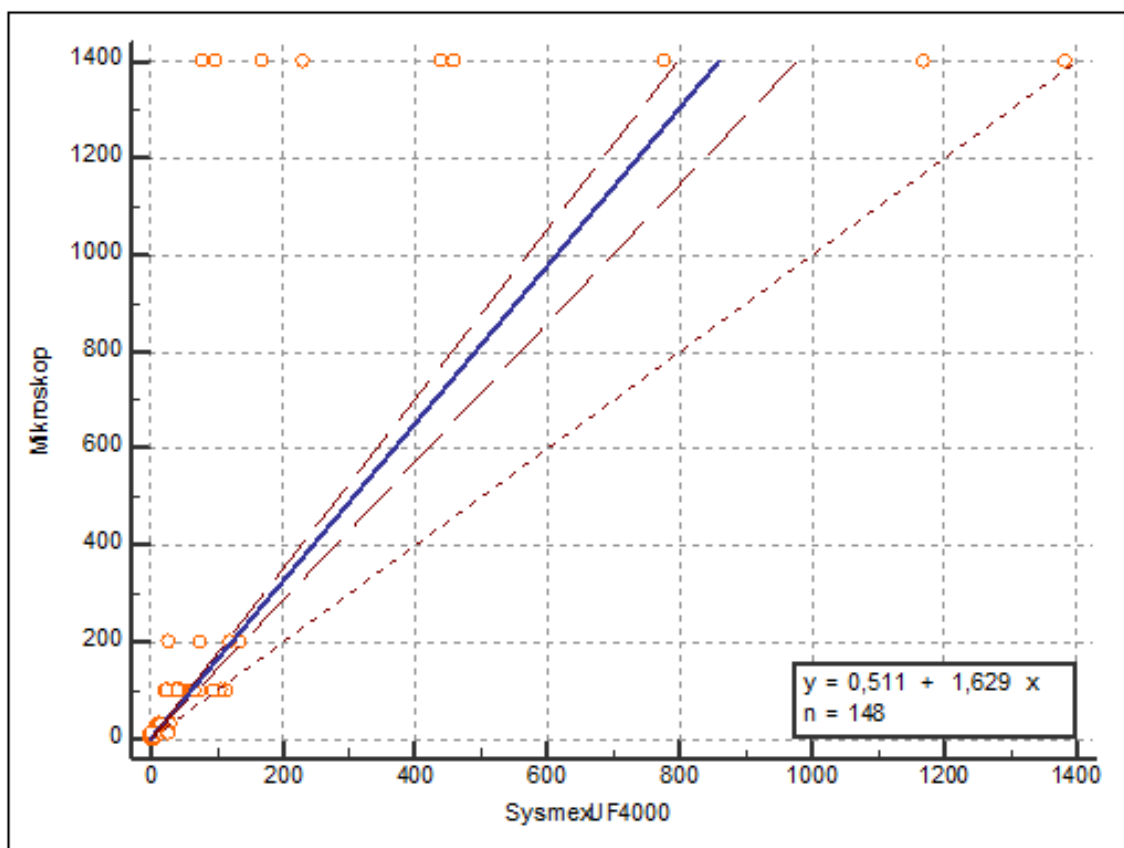


Slika 3. Passing-Bablokova regresija između očitavanja količine eritrocita dobivenih mikroskopom i očitavanja dobivenih mjernim uređajem Sysmex UF-4000 (Siemens)

5.2. Usporedba mjerenja količine leukocita

Rezultati Passing-Bablokove regresije pokazali su značajno odstupanje od linearnosti (Cusum test linearnosti, $P = 0,03$), odnosno nije zadovoljen uvjet primjene te metode, međutim rezultati dobivenog pravca pokazuju sljedeće: koeficijent pravca nešto je veći od idealnog koeficijenta, odnosno jedinice ($B = 1,63$ [95 % CI: 1,43 do 1,75]), dok je odsječak na osi ordinate također mali ($A = 0,51$ [95 % CI: 0,16 do 0,71]). To znači da te dvije vrste mjerenja nisu usklađene niti za očitavanje količine leukocita (Slika 4.).

Rezultati analize povezanosti između očitavanja količine leukocita dobivenih mikroskopom i očitavanja dobivenih mjernim uređajem Sysmex UF-4000 (Siemens) pokazali su očekivano vrlo visoku i statistički značajnu korelaciju između tih dviju varijabli (Spearmanov test korelacije, $Rho = 0,95$ [95 % CI: 0,93 do 0,96]; $P < 0,001$).

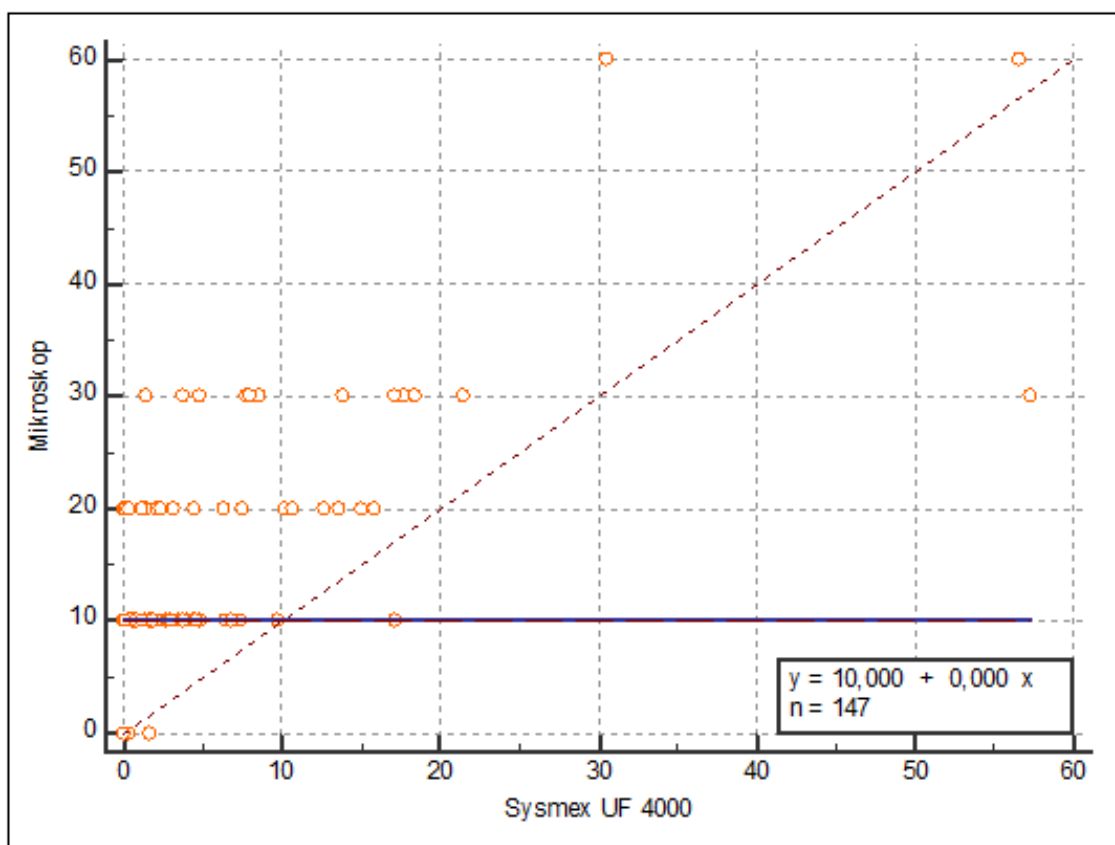


Slika 4. Passing-Bablokova regresija između očitavanja broja leukocita dobivenih mikroskopom i očitavanja dobivenih mjernim uređajem Sysmex UF-4000 (Siemens)

5.3. Usporedba mjerenja količine pločastog epitela

Rezultati Passing-Bablokove regresije pokazali su statistički značajno odstupanje od linearnosti (Cusum test linearnosti, $P < 0,01$), odnosno nije zadovoljen uvjet primjene Passing-Bablokove metode, što znači da je veliko odstupanje u rezultatima očitavanja količine pločastog epitela tim dvjema metodama. Velika neusklađenost iščitava se i iz regresijskog grafa (Slika 5.).

Rezultati analize povezanosti između očitavanja količine pločastog epitela dobivenog mikroskopom i očitavanja dobivenog mjernim uređajem Sysmex UF-4000 (Siemens) očekivano su pokazali i nešto slabiju korelaciju. Korelacija je srednje visoka te statistički značajna između tih dviju varijabli (Spearmanov test korelacije, $Rho = 0,52$ [95 % CI: 0,39 do 0,63]; $P < 0,001$).

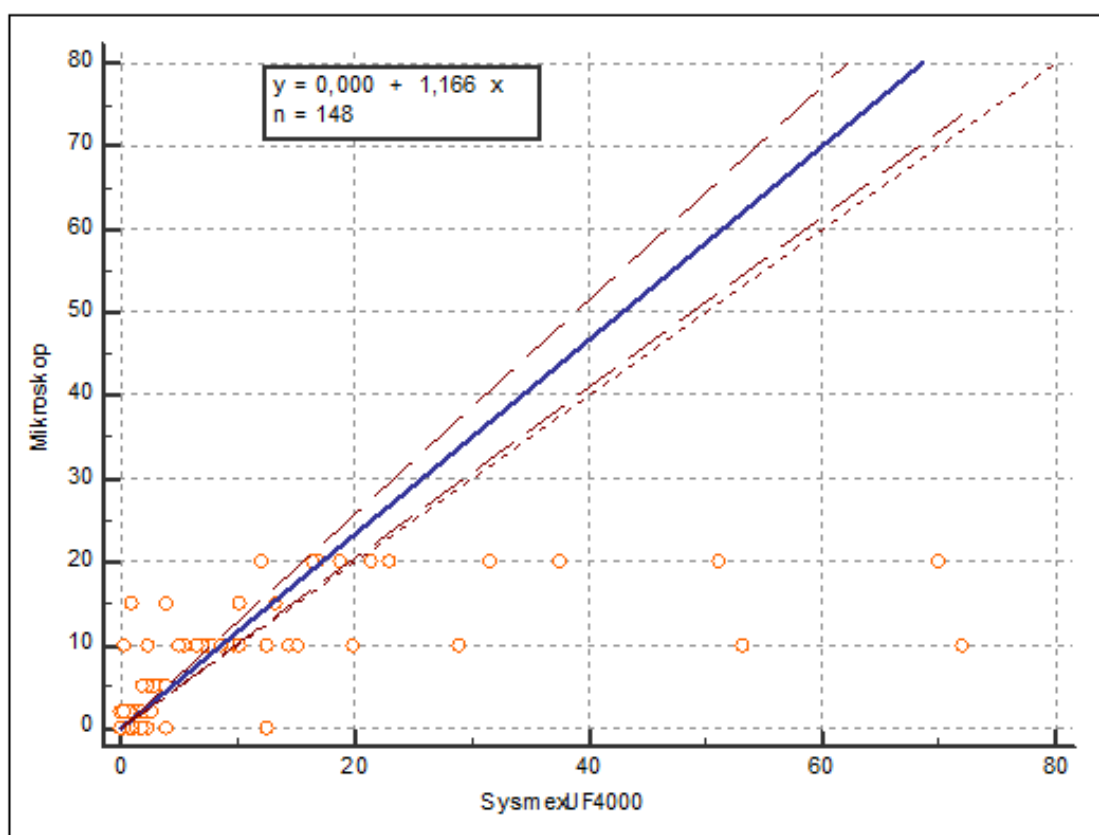


Slika 5. Passing-Bablokova regresija između očitavanja broja pločastog epitela dobivenog mikroskopom i očitavanja dobivenih mjernim uređajem Sysmex UF-4000 (Siemens)

5.4. Usporedba mjerenja količine hijalinih cilindara

I rezultati Passing-Bablokove regresije za usporedbu dviju proučavanih metoda na mjerenju količine hijalidnih cilindara pokazali su statistički značajno odstupanje od linearnosti (Cusum test linearnosti, $P < 0,01$), odnosno nezadovoljavanje uvjeta primjene Passing-Bablokove metode. To opet znači da je veliko odstupanje u rezultatima očitavanja količine pločastog epitela tim dvjema metodama. Velika neusklađenost iščitava se i iz regresijskog grafa (Slika 6.).

Rezultati analize povezanosti između očitavanja količine hijalinih cilindara dobivenih mikroskopom i očitavanja dobivenih mjernim uređajem Sysmex UF-4000 (Siemens) očekivano su pokazali i nešto slabiju korelaciju. Korelacija jest visoka te statistički značajna između tih dviju varijabli (Spearmanov test korelacije, $Rho = 0,79$ [95 % CI: 0,72 do 0,84]; $P < 0,001$), no iz korelacijskog grafa vidi se neusklađenost između mjerenja (Slika 6.).

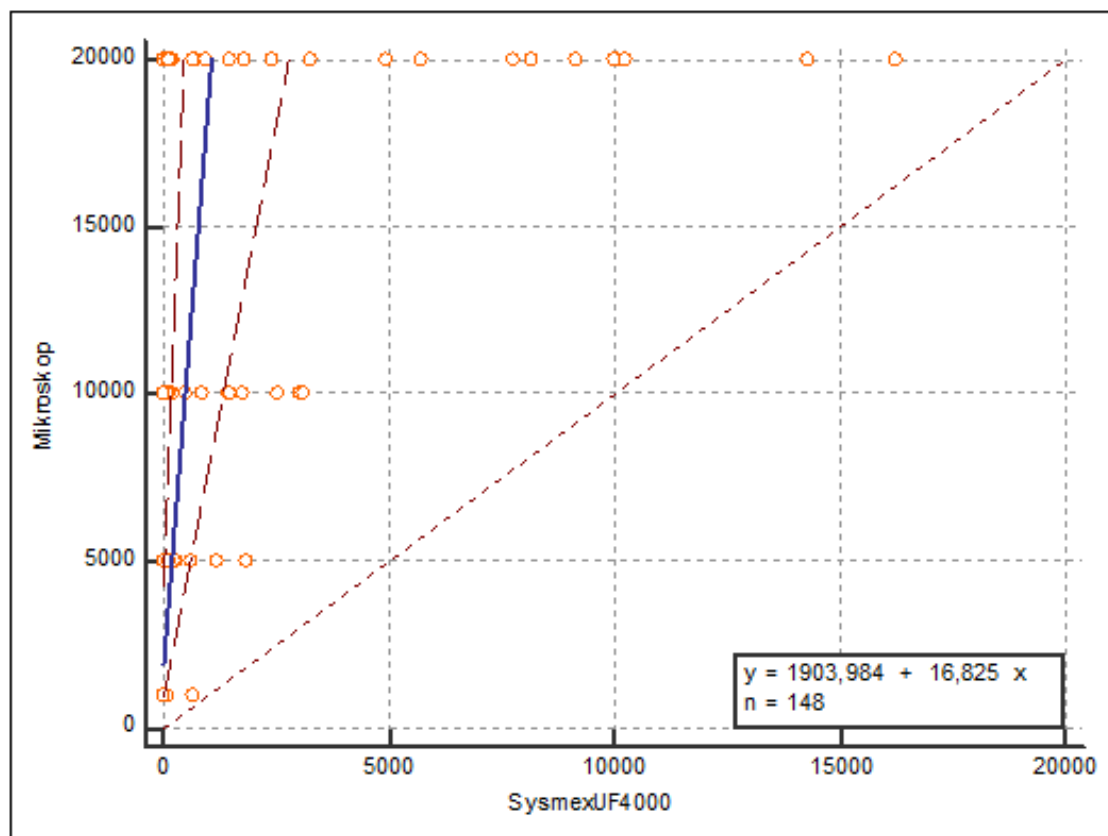


Slika 6. Passing-Bablokova regresija između očitavanja broja hijalinih cilindara dobivenih mikroskopom i očitavanja dobivenih mjernim uređajem Sysmex UF-4000 (Siemens)

5.5. Usporedba mjerenja količine bakterija

Rezultati Passing-Bablokove regresije između dviju promatranih metoda kod mjerenja količine prisutnih bakterija u uzorku također su pokazali statistički značajno odstupanje od linearnosti (Cusum test linearnosti, $P < 0,01$). Ponovno nije zadovoljen uvjet primjene Passing-Bablokove metode, što znači da je veliko odstupanje u rezultatima pojedinih očitavanja. Velika neusklađenost iščitava se i iz regresijskog grafa, odnosno korelacijskog dijagrama (Slika 7.).

Rezultati analize povezanosti između očitavanja količine prisutnih bakterija mikroskopom i očitavanja mjernim uređajem Sysmex UF-4000 (Siemens) očekivano su pokazali slabiju korelaciju. Korelacija je srednje visoka te statistički značajna između tih dviju varijabli (Spearmanov test korelacije, $Rho = 0,64$ [95 % CI: 0,54 do 0,73]; $P < 0,001$).



Slika 7. Passing-Bablokova regresija između očitavanja broja bakterija dobivenih mikroskopom i očitavanja dobivenih mjernim uređajem Sysmex UF-4000 (Siemens)

Rezultati usporedbe promatranih dviju metoda mjerenja (fluorescentna protočna citometrija i svjetlosna mikroskopija) pokazali su za sve mjerene varijable (eritrociti, leukociti, hijalini cilindri, pločasti epitel bakterije) visok stupanj neuskladnosti očitanih vrijednosti.

6. RASPRAVA

Provedbom ovog istraživanja na temelju pet parametara (eritrociti, leukociti, pločasti epitel, hijalini cilindri, bakterije) uspješno je provedena usporedba nove metode fluorescentne protočne citometrije i svjetlosne mikroskopije. Metode su međusobno uspoređene koeficijentom korelacije metoda i Passing-Bablokovom regresijskom analizom.

Na temelju rezultata jasno je vidljivo kako između fluorescentne protočne citometrije i svjetlosne mikroskopije postoji nesukladnost. Prilikom obrade podataka o količini eritrocita dobivenih dvjema metodama uočeno je kako nema odstupanja od linearnosti ($P = 0,19$) te kako su vrijednosti na svjetlosnom mikroskopu dva i pol puta veće nego vrijednosti dobivene na uređaju Sysmex UF-4000 (Siemens). Iznosom koeficijenta korelacije od 0,850 može se zaključiti kako postoji visoka i značajna korelacija među dvjema metodama ($P < 0,001$).

Prilikom usporedbe dobivenih rezultata za leukocite utvrđeno je značajno odstupanje od linearnosti ($P = 0,03$), vrlo visoka i statistički značajna korelacija između tih dviju varijabli (0,95) te izrazita korelacija među metodama ($P < 0,001$).

Analizom količine pločastog epitela fluorescentnom protočnom citometrijom i svjetlosnom mikroskopijom korištenjem Passing-Bablokove regresije uočeno je značajno odstupanje od linearnosti ($< 0,01$) te je veliko odstupanje u rezultatima s nešto slabijom korelacijom. Korelacija je srednje visoka (0,52) te statistički značajna između tih dviju varijabli ($P < 0,001$).

Prilikom usporedbe rezultata između dvaju mjerenja količine hijalinih cilindara ponovno je uočeno odstupanje u linearnosti ($P < 0,01$), dok je korelacija također nešto slabija (0,79), ali s visokom statističkom značajnošću ($P < 0,001$).

Bakterije su posljednji elementi koji su uspoređivani između fluorescentne protočne citometrije i svjetlosne mikroskopije. Nakon statističke obrade ponovo je značajno odstupanje od linearnosti ($P < 0,01$), također slabije korelacije (0,64) i statistički značajne korelacije između tih dviju metoda ($P < 0,001$).

Puno se znanstvenih radova bavilo analizom automatskih analizatora mokraćnog sedimenta, ali je samo nekoliko slučajeva u kojima se kao referentna metoda koristila svjetlosna mikroskopija.

U odnosu na rezultate dobivene u ovom istraživanju, istraživanje Previtali G. i sur. dokazalo je sukladnost rezultata dobivenih metodom fluorescentne protočne citometrije i svjetlosne mikroskopije u analizi mokraćnog sedimenta (11). Razlika između ova dva istraživanja bila je u vrsti uzorka. Naime, ovo istraživanje je zahtijevalo centrifugiranu mokraću prilikom mikroskopske analize, koja se koristi u rutinskom laboratorijskom radu, dok je za istraživanje Previtali G. i sur. bila potrebna svježa necentrifugirana mokraćca.

S obzirom na dobivene rezultate vrlo je jasno kako rezultati analize sedimenta mokraćce mjereni fluorescentnom protočnom citometrijom i svjetlosnim mikroskopom nisu usporedivi. Budući da uređaj Sysmex UF-4000 (Siemens) (fluorescentna protočna citometrija) daje kvantitativne rezultate, a nalaz dobiven svjetlosnim mikroskopom ima semikvantitativnu vrijednost (intervali), teško je usporediti te rezultate. Kako bismo statistički obradili rezultate dobivene na temelju tih dviju usporednih metoda, semikvantitativne vrijednosti dobivene na mikroskopu potrebno je pretvoriti u kvantitativne i od svakog intervala uzeti najvišu vrijednost, te ju usporediti s rezultatima dobivenim na uređaju Sysmex UF-4000 (Siemens). Korištenje najviše vrijednosti iz svakog intervala u usporedbi s egzaktnom brojčanom vrijednosti, može biti razlogom neusklađenosti rezultata dobivenih tim dvjema metodama.

Osim načina u izdavanju nalaza, u svakoj od metoda koristi se drugačiji uzorak. Naime, za uređaj Sysmex UF-4000 (Siemens) nije potrebna prethodna priprema uzorka, uzorak je spreman za analiziranje odmah pri primitku u laboratorij, dok je za analizu pod svjetlosnim mikroskopom potrebno prethodno centrifugirati urin, što bi mogao biti još jedan razlog i objašnjenje za neusklađenost između mjerenja tih dviju metoda.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se izvesti sljedeći zaključak:

Usporedbom fluorescentne protočne citometrije na uređaju Sysmex UF-4000 (Siemens) i svjetlosne mikroskopije potvrđeno je kako postoje značajna odstupanja u rezultatima dobivenih analizom eritrocita, leukocita, pločastog epitela, hijalinih cilindara i bakterija.

8. SAŽETAK

Uvod: Usporedba fluorescentne protočne citometrije i svjetlosne mikroskopije u analizi sedimenta mokraće vrlo je bitna jer će omogućiti uvođenje najsuvremenije metode u svakodnevnu kliničku praksu, što rezultira bržom i točnijom analizom sedimenta mokraće.

Cilj istraživanja: Cilj je rada usporediti nalaze mokraćnog sedimenta dobivene metodom fluorescentne protočne citometrije s nalazima dobivenim svjetlosnom mikroskopijom.

Nacrt istraživanja: Presječno istraživanje

Ispitanci i metode: U provedenom istraživanju analizirani su nasumični uzorci mokraće pacijenata KBC-a Osijek. Ukupno je obrađeno 150 uzoraka. U uzorcima mokraće od 150 pacijenata provedena je analiza sedimenta mokraće metodom fluorescentne protočne citometrije na uređaju Sysmex UF-4000 (Siemens) te standardnom metodom svjetlosne mikroskopije.

Rezultati: Analizom sedimenta mokraće svjetlosnim mikroskopom i fluorescentnom protočnom citometrijom te njihovom međusobnom usporedbom, vidljivo je značajno odstupanje od međusobnih rezultata. Dokazana je korelacija ($P < 0,001$) s koeficijentom korelacije ($r = 0,64$; $r = 0,79$; $r = 0,52$; $r = 0,95$; $r = 0,85$) i linearnost ($P = 0,19$; $P = 0,03$; $P = 0,01$; $P \leq 0,01$; $P \leq 0,01$) između metode fluorescentne protočne citometrije i svjetlosne mikroskopije.

Zaključak: Provedbom kliničke usporedbe uređaja Sysmex UF-4000 i svjetlosnog mikroskopa potvrđeno je kako postoje značajna odstupanja u rezultatima analize eritrocita, leukocita, pločastog epitela, hijalinih cilindara i bakterija u sedimentu mokraće.

Ključne riječi: automatizirana analiza, protočna citometrija, sediment mokraće, svjetlosni mikroskop

9. SUMMARY

Comparison of fluorescent flow cytometry and light microscopy in urine sediment analysis

Introduction: Comparison of fluorescent flow cytometry and light microscopy in urine sediment analysis is very important, as it will allow the introduction of a state-of-the-art method into daily clinical practice, resulting in faster and more accurate analysis of urine sediment.

Objectives: The aim of the study is to compare the findings of urinary sediment obtained by fluorescent flow cytometry method with the findings obtained by light microscopy.

Research Design: Cross-sectional study

Subjects and methods: Randomized urine specimens of KBC Osijek patients were analyzed in this study. A total of 150 samples were processed. Urine sediment analysis by fluorescence flow cytometry on the device Sysmex UF 4000 (Siemens) and standard light microscopy were performed on 150 urine samples from the same number of patients.

Results: The comparison of the analysis of urine sediment by light microscope and fluorescent flow cytometry method shows a significant deviation from the mutual results. Correlation ($P < 0.001$) with correlation coefficient ($r = 0.64$; $r = 0.79$; $r = 0.52$; $r = 0.95$; $r = 0.85$) and linearity ($P = 0.19$; $P = 0.03$; $P = 0.01$; $P \leq 0.01$; $P \leq 0.01$) are proven between the fluorescence flow cytometry and light microscopy.

Conclusion: Clinical comparison of Sysmex UF-4000 (Siemens) and light microscope confirmed there are significant discrepancies in the results of urine sediment analysis.

Keywords: automated urinalysis; flow cytometry; manual microscopy; urine sediment;

10.LITERATURA

1. Daudon M, Frochot V. Crystalluria. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2015;53:1479–1487.
2. Flegar-Meštrić Z, ured. Kvalitativna analiza mokraće. Priručnik. Tečaj trajnog usavršavanja medicinskih biokemičara. HKMB, 2013, str 29-61.
3. Sysmex Europe GmbH. Fluorescence flow cytometry. Dostupno na adresi: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/measurement-technologies/fluorescence-flow-cytometry.html>. Datum pristupa 01.07.2019.
4. Krins. Quick-Read 10 Chamber Slide. Dostupno na adresi: <https://www.krinslifescienceslab.ca/product/quick-read-10-chamber-slide/>. Datum pristupa: 10.07.2019.
5. Sysmex. UF-4000 Fully automated urine flow cytometer. Dostupno na adresi: https://www.sysmex-europe.com/fileadmin/media/f100/Brochure/Sysmex_UF-4000_2016.pdf. Datum pristupa: 10.07.2019.
6. Sysmex. Automated-Urinalysis-System. Dostupno na adresi: <https://www.sysmex.com/US/en/Products/Urinalysis/Pages/Sysmex-Urinalysis-Solution.aspx>. Datum pristupa 02.08.2019.
7. Kendra Cherry. Cross- Sectional Research Method: How Does It Work?. Dostupno na adresi: <https://www.verywellmind.com/what-is-a-cross-sectional-study-2794978>. Datum pristupa: 02.08.2019.
8. Previtali G, Ravasio R, Seghezzi M, Buoro S, Alessio MG. Performance evaluation of the new fully automated urine particle analyser UF-5000 compared to the reference method of the Fuchs-Rosenthal chamber. *Clin Chim Acta*. 2017;472:123-130
9. Central Microscopy Research Facility . Light Microscopy. Dostupno na adresi: <https://cmrf.research.uiowa.edu/light-microscopy>. Datum pristupa: 03.08.2019.
10. Stephen M Wolniak. Principles of Light Microscopy. Dostupno na adresi: <https://science.umd.edu/CBMG/faculty/wolniak/wolniakmicro.html>. Datum pristupa: 03.08.2019.
11. Michael Brown, Carl Wittwer. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry*.2000;46:1221-29.
12. Fraperie P, Maye-Lasserre M. Formation des techniciens de laboratoire de microbiologie medicale. Dostupno na adresi: <https://microbiologiemedicale.fr/automate-cytologie-urinaire-sysmex-sedimax-iris/> Datum pristupa: 01.07.2019.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Ime i Prezime: Doris Krivić

Datum i mjesto rođenja: 13. svibnja 1996. u Osijeku

Adresa: Tiha 1 Briješće, 31000 Osijek

Telefon: 095/832-00-84

E-mail: doriskrivic.os@gmail.com

Obrazovanje:

- 2014. godine završila srednju Medicinsku školu u Osijeku; smjer: zdravstveno laboratorijski tehničar

- 2014. – 2017. godine završila Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku, zvanje: univ. bacc. med. lab. diagn.

-2017.- 2019. godine završila Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku, zvanje: mag. med. lab.diagn.

Interesi:

- od 2006. godine do danas aktivna sportašica, Ženski odbojkaški klub Osijek