

Wojskowy Instytut Medycyny Lotniczej



Magdalena Szmulik

**ZASTOSOWANIE ZMODYFIKOWANEJ METODY
CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ DO ANALIZY
WYBRANYCH ELEMENTÓW MORFOTYCZNYCH
W MOCZU**

**APPLICATION OF THE MODIFIED FLOW CYTOMETRY
METHOD TO THE ANALYSIS OF SELECTED MORPHOTIC
ELEMENTS IN URINE**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. Agnieszka Woźniak-Kosek
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, WIM-PIB

Warszawa, 2023

Streszczenie

Badanie ogólne moczu, obok analiz krwi jest jednym z najczęściej wykonywanych badań podstawowych. Pozwala na ocenę i monitorowanie homeostazy całego organizmu. Badanie to jest wykorzystywane do diagnostyki chorób nerek i układu moczowego oraz schorzeń, które manifestują się zmianami w składzie moczu. Dotychczasowe techniki analityczne opierały się na szeregu metod mikroskopowych, a tym samym na manualnym zliczaniu i różnicowaniu elementów morfotycznych występujących w moczu. Metody mikrobiologiczno-analityczne służące do wykonania tego badania rozwijały się wraz z rozwojem diagnostyki laboratoryjnej. Wraz z potrzebą zwiększenia wartości diagnostycznej tego badania, metody standaryzowano, wdrażano szereg procedur i wprowadzano automatyzację. Część dostępnych komercyjnie metod automatycznych wykorzystuje elementy klasycznego pomiaru cytometrycznego, modyfikując i dostosowując je do potrzeb i wymagań zliczania elementów upostaciowanych w moczu. W niniejszej pracy przedstawiono dwie metody automatyczne, których zasada działania opiera się na wykorzystaniu modyfikacji klasycznej metody cytometrycznej. Zastosowanie w badaniach mikrobiologiczno-analitycznych tych metod cytometrycznych otwiera również nowe możliwości w diagnostyce zakażeń układu moczowego.

Celem tej dysertacji było zbadanie potencjału laboratoryjnego jaki niesie za sobą wykorzystanie aparatury służącej rutynowo w badaniach analitycznych do oceny elementów morfotycznych, w tym WBC, RBC i bakterii w próbkach moczu pobranych od pacjentów oraz sprawdzenie zastosowania takich metod do badań mikrobiologicznych w celu skrócenia czasu oczekiwania na wynik. Analizy porównawcze dotyczyły użycia metody obrazowania cyfrowego po wcześniejszym ogniskowaniu hydrodynamicznym (element zmodyfikowanej metody cytometrii przepływowej) oraz metody fluorescencyjnej cytometrii przepływowej.

Próbki moczu użyte do badań analizowane były rutynowo w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej; w Pracowni Analityki Ogólnej, Białek i Alergenów oraz Pracowni Mikrobiologii. Materiał pochodził od pacjentów leczonych w Wojskowym Instytucie Medycznym - PIB. Pomiarom elementów upostaciowanych moczu poddano 1131 próbek moczu. Następujące po sobie oznaczenia wykonano na dwóch analizatorach A i B, których zasada metody polega w obu przypadkach na zastosowaniu zmodyfikowanych analiz cytometrycznych.

Otrzymane wyniki przedstawiono w postaci tabel wielopolowych zawierających wyliczenia liczebności w % w odniesieniu do parametrów i metod, jakimi zostały oznaczone. W badanej populacji 60,1% stanowiły kobiety (N=680), a 39,9% - mężczyźni (N=451), Średni wiek badanych osób wyniósł ponad 51 lat. Zastosowano kryteria różnicujące próbki jako pozytywne i negatywne dla każdej z metod. Pozytywne wskazania stanowiły odpowiednio w metodzie A: bakterie na poziomie $>300/\mu\text{l}$, WBC $>25/\mu\text{l}$, RBC $>23/\mu\text{l}$. W metodzie B – bakterie wykrywane powyżej pojedynczych w polu widzenia (wpw), WBC > 10 wpw, RBC >5 wpw. W metodzie paskowej każdy dodatni wynik klasyfikowano jako pozytywny. Porównania bezpośrednie przedziałów półilościowych metody B w odniesieniu do wartości liczbowych metody A, przedstawiono w postaci tabel oraz histogramów. Do najważniejszych należą porównania dotyczące obecności bakterii i leukocytów. Obecność bakterii w ilości większej niż $300/\mu\text{l}$ wykazywało 30,1% (N = 340) analizowanych próbek moczu. Obliczenia statystyczne potwierdzają, że istnieje zależność między ilością próbek, a przyjętym przedziałem. Wskazanie automatycznej preklasyfikacji bakterii dotyczyło 1080 próbek. W grupie próbek powyżej $300/\mu\text{l}$ bakterie G(+) stanowiły 13,0%, a G (-) 15,7%. Zgodności wyników ocenianych ilościowo w metodzie A oraz skalą półilościową w metodzie B, przedstawiono w tabelach, których analiza wykazała, że najwyższą zgodność obu metod, pod kątem klasyfikacji próbek jako negatywnych, uzyskano w przypadku przyjęcia punktu odcięcia w metodzie A jako $<300/\mu\text{l}$, a w metodzie B jako całkowitego braku bakterii. Zgodność tą obserwowano w przypadku 93% próbek negatywnych. Malą ona wraz z poszerzaniem grupy wyników z metody B o kolejne wskazania, takie jak pojedyncze i nieliczne; wynosiła ona odpowiednio 84,7% oraz 78,1%. Wykryte bakterie w próbkach moczu z użyciem metody A korelowały umiarkowanie dodatnio z wynikami uzyskiwanymi metodą B (ρ Spearmana= 0,57, istotność $<0,001$). Wykazano, posługując się kryteriami metody A, dla występowania leukocytów w analizowanych próbkach moczu, że 30,9% wszystkich próbek przekraczało założony próg występowania 25 leukocytów/ μl , podczas gdy według kryteriów metody B odsetek pozytywnych wyników jest mniejszy i stanowi 23,1%. Wykonane obliczenia statystyczne wskazały na istotne różnice głównie pomiędzy grupami wskazującymi na niski i bardzo wysoki poziom zmiennej zależnej. W przypadku leukocytów, grupa, która statystycznie najbardziej wyróżniała się od pozostałych została wyłoniona w wyniku porównań wielokrotnych i wynosiła 2-3 wpw. Zaobserwowano istotną statystycznie, korelację: pomiędzy metodą A i B na poziomie ρ Spearmana= 0,89, istotności $<0,001$. Porównano możliwość wystąpienia ZUM w zależności od zastosowanej metody pomiaru dla liczebności bakterii i leukocytów. Rozważono wprowadzenie trzech różnych modeli empirycznych podejrzenia

ZUM na podstawie wyników elementów upostaciowanych moczu. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że kobiety miały istotnie częściej podejrzenie ZUM w porównaniu do mężczyzn. Analizując uzyskane dane statystyczne, stwierdzono, że spośród badanych parametrów sugerujących zakażenie, najdokładniej podejrzenie ZUM różnicuje metoda A przy kryterium 300/μl. Porównując posiewy mikrobiologiczne z wynikami metody A, zaproponowano dwa algorytmy skriningu mikrobiologicznego próbek moczu. Pierwszy model zakładał wskazywanie próbek dodatnich, przy jednoczesnym przekroczeniu wartości cut-off dla dwóch parametrów (bakterie $\geq 300/\mu\text{l}$, WBC $> 25/\mu\text{l}$ lub $40/\mu\text{l}$). Drugi algorytm wymagał przekroczenia wartości cut-off choćby dla jednego parametru. Oceniono wydajności tych algorytmów, gdzie pierwszy algorytm skutkował brakiem wyników fałszywie ujemnych. Czulość wynosiła 99,9% a swoistość od 81,3 – do 83,7% w zależności od wartości WBC (odpowiednio WBC $> 25/\mu\text{l}$ i $40/\mu\text{l}$). Założenia drugiego modelu skriningu pozwalają na uzyskanie wyższego współczynnika redukcji posiewów (50-51,9% vs 37,7-38,7%), przy jednoczesnej utracie czulości skriningu do 79,2% i 70,8% dla WBC odpowiednio $> 25/\mu\text{l}$ i $40/\mu\text{l}$.

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

1. Podwyższone parametry wskazujące na zakażenie układu moczowego częściej dotyczyły kobiet niż mężczyzn.
2. Dla bakterii wyznaczono empirycznie wartości cut-off, tak aby był on podstawą do klasyfikowania wyników jako „ujemnych” (w zakresie mikrobiologicznych wartości referencyjnych) lub „dodatnich”, gdy tę wartość przekraczały. W badanych próbkach moczu przyjęto wartości cut-off na poziomie 300/μl.
3. Wyznaczono dla leukocytów wartości cut-off na poziomie $>25/\mu\text{l}$ i $\geq 40/\mu\text{l}$. Zastosowanie algorytmu uwzględniającego leukocyty i bakterie, pozwoliło z dużym prawdopodobieństwem potwierdzić u pacjentów zakażenie układu moczowego. W dalszym etapie należy w takich przypadkach przeprowadzić diagnostykę mikrobiologiczną dotyczącą identyfikacji gatunkowej patogenu i jego oporności na antybiotyki. Ten dalszy proces nie był tematem tej pracy.
4. Zastosowanie metod fluorescencyjnej cytometrii przepływowej do oznaczenia ilościowego wybranych elementów morfotycznych tj. erytrocytów, leukocytów i bakterii zawartych w moczu pozwala na skrócenie czasu analizy i szybsze wydanie wyniku mikrobiologicznego w przypadkach podejrzenia zakażeń układu moczowego.

5. Określenie parametrów morfotycznych w badaniu ogólnym moczu przy użyciu zmodyfikowanych metod cytometrycznych jest ważnym wskaźnikiem prognostycznym świadczącym m.in. o prawdopodobieństwie wystąpienia zwiększonych ilości mikroorganizmów powodujących bakteriurię.

6. Potwierdzono wysoką korelację pomiędzy wynikami uzyskanymi dla próbek moczu w badaniach mikrobiologicznych, z wynikami wyznaczonymi metodami typowo analitycznymi. Ocena wskaźników zakażenia dróg moczowych w badaniu elementów upostaciowanych ma potencjał diagnostyczny do wykluczania ZUM, wspomagając interpretację wyników próbek pobranych od pacjentów. Wpływać także będzie na szybkość wydania wyniku mikrobiologicznego.

7. Oprogramowanie aparatu A (bazujące na fluorescencyjnej cytometrii przepływowej oraz interpretacji skatergramów) pozwala nie tylko na ilościowe zliczanie bakterii, ale także ich wstępną preklasyfikację na G(+) i G(-) co jest niedostępne w przypadku stosowania innych metod analitycznych. Wstępna ocena na tym poziomie jest niezwykle ważna dla klinicystów, którzy muszą podjąć szybką decyzję o empirycznym włączeniu bądź nie antybiotykudo leczenia pacjenta.