

ЭВОЛЮЦИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ МОЧИ В СОВРЕМЕННЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ



Автор доклада зав. КДЛ О.В.Синицына,
Московская городская онкологическая больница № 62

Чебоксары, 2015

***Кем бы ты ни был - поэтом, полубогом
или идиотом, все равно - каждые
несколько часов ты должен спуститься
с неба на землю, чтобы помочиться.***

Э.М.Ремарк, «Триумфальная арка»

Рак мочевого пузыря(РМП)

- В мире: более 200 000 новых случаев ежегодно
- В РФ :
 - Заболеваемость 9,34 на 100 000 («грубый» показатель)
 - 13260 новых случаев
 - умерло 6933 больных
 - прирост за последние 10 лет-14.85 %

В структуре онкологической заболеваемости в РФ:

- ✓ -4-ое место у мужчин, 10-ое место у женщин
- ✓ -мужчины/женщины= 3/1

В.И.Чиссов с соавт.,2010,2011

РМП

Течение заболевания

- -длительное
- -непрерывно прогрессирующее
- -частое рецидивирование

Стоимость лечения одного больного
96000-187000 \$ с момента установления диагноза
до смерти (в ЕС)

Botteman et al.2008

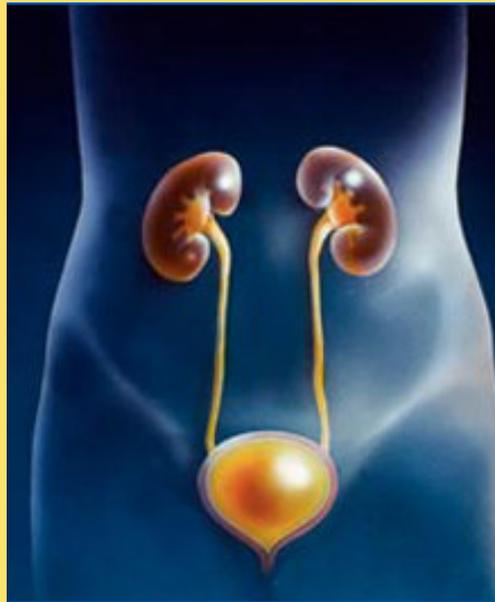
Методы диагностики рака мочевого пузыря:

- абдоминальное и трансуретральное УЗ-сканирование
- цистоскопия
- рентгеновские исследования (экскреторные урография и радиоизотопные методы)
- КТ с контрастированием

ОБЯЗАТЕЛЬНО: цитологическое исследование осадка мочи на АК

Цель исследования

Улучшить результаты ранней диагностики первичного поверхностного уротелиального рака и его рецидива.



Несмотря на тот факт, что стандарты выполнения исследований мочи существуют...



- For specimens not analyzed within **2 hours of collection**, preserve the urine specimen using refrigeration (2 °C to 8 °C), or a specifically designed chemical preservative.
- For Microbiological Exam, when specimen cannot be processed immediately, refrigerate specimen at 2 °C to 8 °C for up to 24 hours, or preserve specimen in a tube containing **bacteriostatic preservative**
- The specimen should be submitted for microbiological studies **before** urinalysis
- If refrigerated, **bring the specimen back to room temperature** before proceeding with the analysis
- Laboratories should **ensure specimen integrity** during transport (e.g., pneumatic tube systems)
- CLSI does not encourage nor endorse cutting testing strips, as patient results may not be accurate due to technical reasons.



Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology

- All specimens should be processed by the laboratory **within 2 hours of collection**, or be kept refrigerated at 4°C until delivery to the laboratory and processed no longer than 18 hours after collection
- If more than two species of bacteria are present in the urine samples..., report as “Probably contaminated; please submit a fresh, clean-catch specimen”.

Guidelines on Standard Operating Procedures for Microbiology

- If immediate processing is not possible, refrigerate the sample at 4 °C, up to a maximum of 48 hours.
- Specimen transport and storage should be done in sterile leak-proof containers.

CAP Check List

- GEN.40108: Are instructions provided for **proper collection** of timed urine specimens?
- GEN.40116: Are documented instructions provided for **proper preservation and storage** of urine when specimens are collected for special tests?
- GEN.40125: For specimens sent to reference laboratories, does the referring laboratory properly follow all **requisition, collection and handling specifications** of the reference laboratory?



- CLSI GP-16 A3, Urinalysis; Approved Guideline, 3rd Edition, February 2010
- Laboratory General Check List, Laboratory Accreditation Program, College of American Pathologists, June 2009
- Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology, 2nd Edition, World Health Organization, 2003
- Guidelines on Standard Operating Procedures for Microbiology, Blood Safety and Clinical Technology, Chapter 19: Urinary Tract Infection, World Health Organization, April 2006

Централизация исследований мочи в КДЛ – одно из самых главных тенденций развития современной лабораторной медицины

Преимущества:

- Точные воспроизводимые анализы
- «Сквозное» маркирование биоматериала
- Отслеживание движения биоматериала с помощью ЛИС
- Меньшая себестоимость из-за уменьшения расхода реагентов, контрольных материалов, зарплаты персонала на местах

ЦЕНТРАЛИЗАЦИЯ требует изменения **подхода к:**

- сбору, транспортировке, обработке материала
- введению единых контейнеров
- соблюдению условий взятия материала
- соблюдению условий транспортировки
- первичной инспекции качества проб в КДЛ
- контролю качества в КДЛ
- выдаче результатов

1 этап Преаналитический этап

Получение образцов мочи – одно из самых важных исследований в клинической диагностике



Анализ мочи - самое часто назначаемое исследование:

- 1 млрд. тестов в России ежегодно
- Количество тестов растет на 10% каждый год

Анализ мочи- важное исследование при постановке диагноза ряда заболеваний, таких как:

- Сахарный диабет
- Заболевания почек и системы МПС
- Скрыто протекающих хронических заболеваний
- Является неотъемлемой частью перед любыми хирургическими вмешательствами
- Скрининговое исследование при диспансеризации
- Скрининговое исследование при диагностики беременности

1. BD internal data

2. William Check, PhD, Urinalysis Finally Catches Up. CAP TODAY, September 2002

3. Kelly J. Graham; Automation and Point-of-care testing continue to offer quality improvements.

Широкие возможности для сбора материала

- На российском рынке представлены контейнеры и пробирки фирм: **BD Vacutainer®**
- Контейнер: позволяет переносить пробу в вакуумную пробирку закрытым способом
- **Greiner** Вакуумное заполнение пробирок, но около 4.5 мл мочи остается в контейнере
- Консервант может убивать некоторые штаммы бактерий (E. Coli), и может содержать ртуть
- **Sarstedt** Полузакрытая система – риск контаминации, Консерванты могут содержать ртуть



Результаты исследования транспортных систем

В рамках эксперимента были исследованы 30 проб мочи. Стабильность образцов сравнивалась по основным критериям: количество лейкоцитов, эритроцитов, эпителия и бактерий. В 100% случаев все параметры в образцах были устойчивы в течении 72 часов.

Основные показатели	Количество проб
Все показатели без изменений (Л, Эр, бак, Эп)	10
Рост бактерий	17
Рост бактерий и лейкоцитов	1
Рост бактерий и снижение лейкоцитов	1
Изменение количества эритроцитов	1

2 этап Аналитический этап

- Подготовка образца (перемешивание, согревание до комн. температуры, центрифугирование)
- Штрих-кодирование и регистрация
- Анализ: сух. химия, микроскопия (визуализация, цитометрия...)



3 этап Постаналитический этап

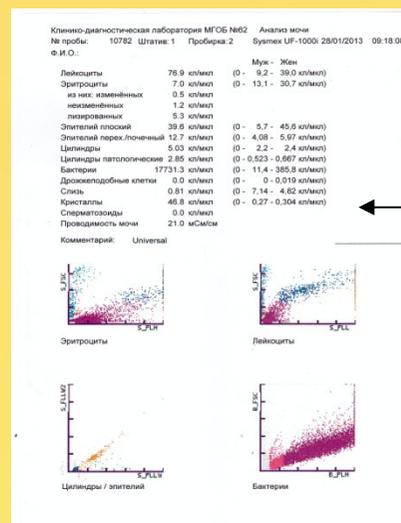
Интерпретация результатов с ВОЗМОЖНОСТЬЮ дообследования!

- Определение достоверности, сопоставление результата с референсными интервалами и с предыдущими результатами пациента
- Дальнейшее исследование (иммуноцитохимия, иммунохемилюминисценция, расширенный биохимический анализ и т.д.)
- Консервирование и хранение образца (банк клеток, с возможностью хранения до 3 месяцев)



Опыт МГОБ №62

- Стерильные банки с возможностью отбора образца без вскрытия
- Одноразовые пробирки с вакуумом
- Штрих-кодирование
- Высоко технологичные автоматические анализаторы
- ЛИС



Автоматический анализатор Sysmex UF 1000i



Определяемые параметры:

12 аналитических параметров,
9 исследовательских параметров

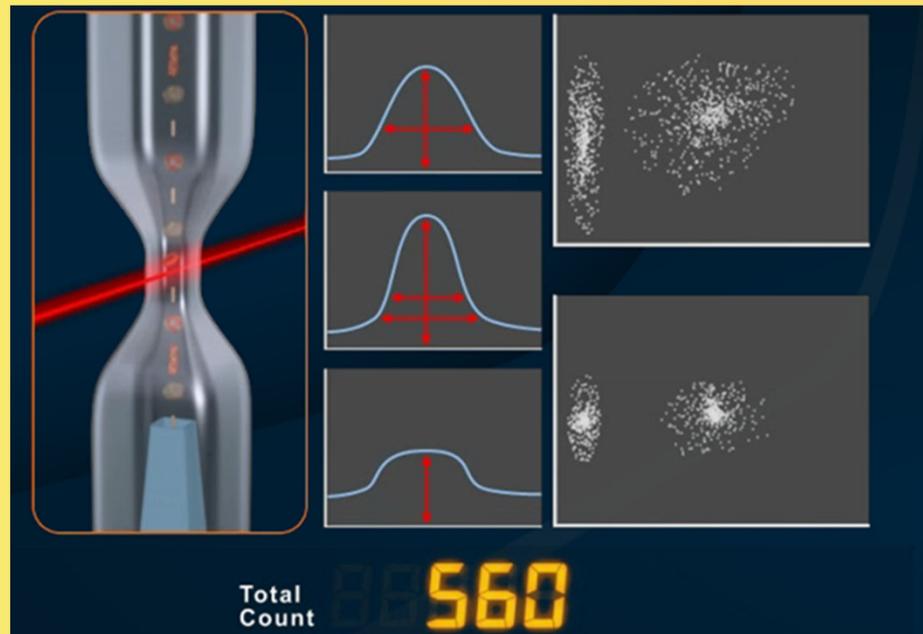
В результате анализа подсчитываются и
идентифицируются следующие клетки:

- эритроциты (RBC),
- лейкоциты (WBC),
- эпителий (EC),
- цилиндры (CAST)
- бактерии (BACT).

В дополнение к этим главным параметрам,
анализатор **UF-1000i** определяет объем
других присутствующих элементов:

- цилиндры патологические (Path. Cast)
- кристаллов (X'TAL),
- малых круглых клеток (SRC),
- сперматозоидов (SPERM)
- дрожжеподобных клеток (YLC),
- слизь (MUCUS).

Принцип измерения Технологии проточной цитофлуориметрии

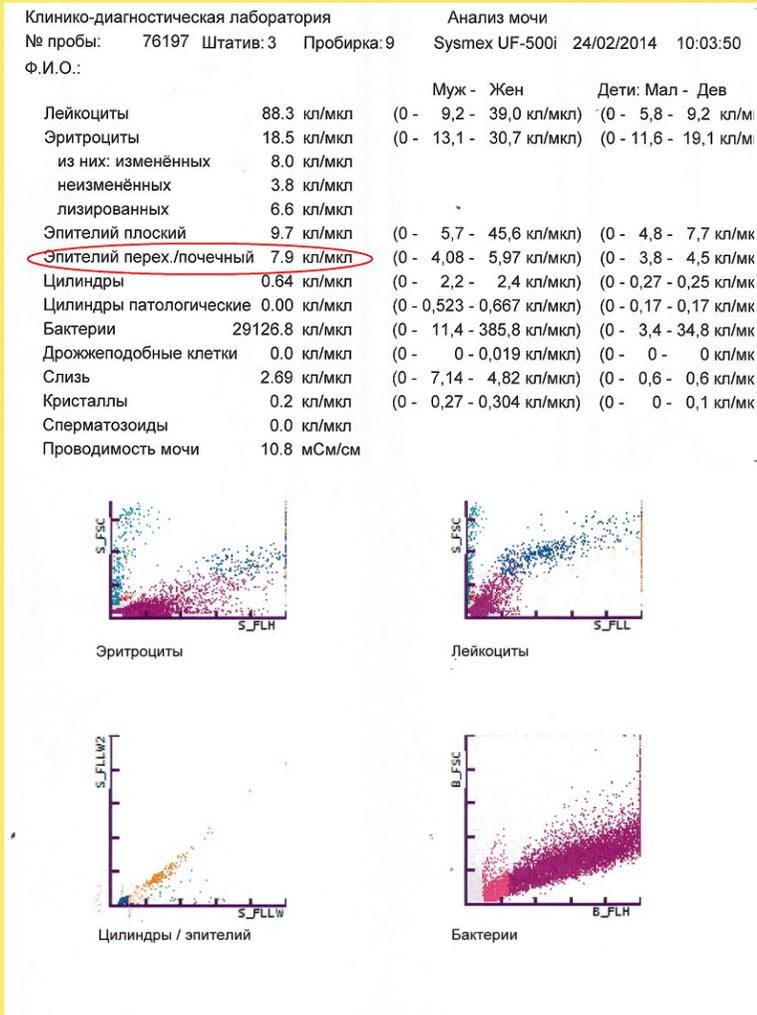


С **каждой** частицы прибор «считывает» информацию:

- о размере
- о внешнем строении частиц
- о внутреннем строении частиц

Анализ бокового рассеяния и флуоресценции обеспечивает высокую специфичность и точность диагностики

Оценка результатов



- ❖ Бланк на русском языке с различием норм у женщин и мужчин.
- ❖ Комментарий под бланком поможет в обнаружение и контроле инфекций мочевых путей (UTI) и анализе морфологии эритроцитов(RBC)
- ❖ Числовые результаты передаются в систему ЛИС и выдаются на бланке.
- ❖ Графические результаты (4 графика) разноцветные или одноцветные могут быть распечатаны на принтере. Они также показываются в цвете на мониторе компьютера **UF-1000i** для повышения достоверности данных.

Скрининг рака мочевого пузыря(РМП)

Материалы и методы исследования

Материал: моча

Оборудование :

- -Анализатор осадка мочи UF-1000i, Sysmex
- -SurePath, BD
- -AutostainerLink 48, Dako

Методы исследования:

- -проточная цитометрия,
- -цитологический, иммуноцитохимический

Среди обследованных 84 пациентов ,
мужчин- 52, женщин-32,
возраст пациентов от 38 лет до 85 лет.

- 1. Исследование проводилось при подозрении на наличие первичной опухоли, на основании жалоб больных, анамнестических данных, результатов лучевых методов исследования, анализа осадков мочи с наличием малых круглых клеток(SRC).
- 2. В плановом порядке через 4-6 недель после ТУР мочевого пузыря по поводу рака.
- 3.С наличием рецидива или подозрением на рецидив РМП.
- **Диспансерное наблюдение** после ТУР согласно стандартам лечения и обследования онкологических больных.

Алгоритм приготовления образца



Клинико-диагностическая лаборатория Анализ мочи
 № пробы: 78197 Штатив: 3 Пробирка: 9 Sysmex UF-500i 24/02/2014 10:03:50
 Ф.И.О.:

		Муж -	Жен	Дети: Мал -	Дев
Лейкоциты	88.3 кл/мкл	(0 - 9,2 - 39,0 кл/мкл)		(0 - 5,8 - 9,2 кл/мкл)	
Эритроциты	18.5 кл/мкл	(0 - 13,1 - 30,7 кл/мкл)		(0 - 11,6 - 19,1 кл/мкл)	
из них: изменённых	8,0 кл/мкл				
неизменённых	3,8 кл/мкл				
лизированных	6,6 кл/мкл				
Эпителий плоский	9,7 кл/мкл	(0 - 5,7 - 45,6 кл/мкл)		(0 - 4,8 - 7,7 кл/мкл)	
Эпителий перех.почечный	7,9 кл/мкл	(0 - 4,08 - 5,97 кл/мкл)		(0 - 3,8 - 4,5 кл/мкл)	
Цилиндры	0,64 кл/мкл	(0 - 2,2 - 2,4 кл/мкл)		(0 - 0,27 - 0,25 кл/мкл)	
Цилиндры патологические	0,00 кл/мкл	(0 - 0,523 - 0,667 кл/мкл)		(0 - 0,17 - 0,17 кл/мкл)	
Бактерии	29126,8 кл/мкл	(0 - 11,4 - 385,8 кл/мкл)		(0 - 3,4 - 34,8 кл/мкл)	
Дрожжеподобные клетки	0,0 кл/мкл	(0 - 0 - 0,019 кл/мкл)		(0 - 0 - 0 кл/мкл)	
Слизь	2,69 кл/мкл	(0 - 7,14 - 4,82 кл/мкл)		(0 - 0,6 - 0,6 кл/мкл)	
Кристаллы	0,2 кл/мкл	(0 - 0,27 - 0,304 кл/мкл)		(0 - 0 - 0,1 кл/мкл)	
Сперматозоиды	0,0 кл/мкл				
Проводимость мочи	10,8 мС/мсм				



Cobas 6000, Roche

В работе проанализированы результаты обследования **84** пациентов, которые были госпитализированы в плановом порядке и по неотложным показаниям в МГОБ №62 в урологическое отделение с ноября 2013 по февраль 2015 года

	P16ink4a+	P16ink4a -
Первичные	24	4
Пациенты после ТУР 4-6 недель	2	2
Рецидивы	30	8
Ремиссия более 6 мес.	0	14
	56(66,7%)	28(33,3%)

Пациенты с положительным p16ink4a

	Кол-во человек	High/Low	%
Первичные	24	16	66,7
		8	33,3
Пациенты после ТУР 4-6 недель	2	2	100
Рецидивы	30	22	73,4
		8	26,7
Ремиссия	0	0	0
	76		

Сравнение наших результатов с опытом зарубежных коллег

- 26,7% -66,7% (11-100%) уротелиальные карциномы высокой и низкой степени злокачественности вместе
- 73.4% (80%) уротелиальные карциномы высокой степени злокачественности
- В 100% карциномы in situ (CIS) (100%)

Yin et al. p16ink4a immunoreactivity is f reliable marker for urothelial carcinoma in situ. Hum Pathol 2008;39:527-535

Nakazawa et al. p16ink4a expression analysis as an ancillary tool for cytologic diagnosis of urothelial carcinoma. Am J Clin Pathol/ 2009;132:776-784

Клинический случай пациентка М., 75 лет

- 2012г-гематурия, на УЗИ обнаружена экзофитная опухоль, проведена операция ТУР, гистология- Уротелиальная карцинома с плоскоклеточной метаплазией.
- в **январе** 2013г.-папиллярная опухоль- рецидив?, гистология-воспаление, p16ink4a обнаружен умеренно выраженный позитивный сигнал в опухолевых клетках.
- в **октябре** 2013г.- клинически рецидив, **CYFRA** 21-1= 20.1 нг/мл.(норма 0-4)
- в **ноябре** 2013г. –папиллярное стеелящиеся образование –ТУР и 6 курсов химиотерапии. Гистология – уротелиальная карцинома с низким потенциалом злокачественности.

Клинический случай пациентка М., 75 лет

- **Июнь** 2014 Контроль:

СУFRA в моче=5,2 нг/мл(N=0-4),

в крови=1,1 нг/мл(N=0-1),

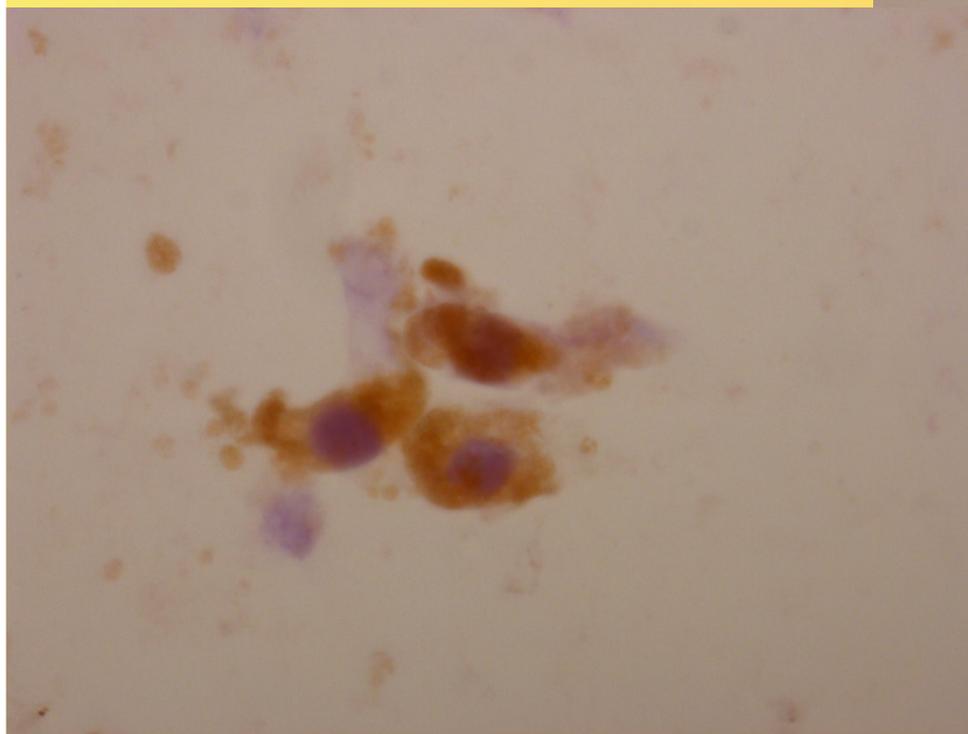
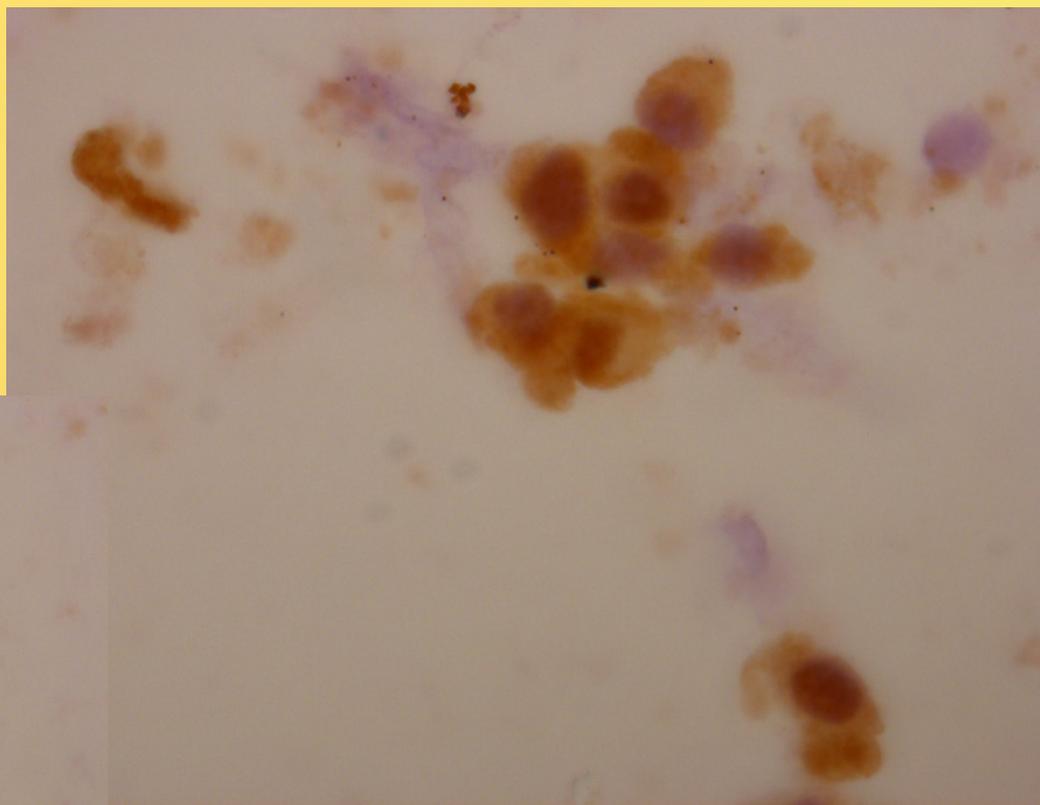
p16ink4a обнаружен позитивный сигнал в
опухолевых клетках,

цистоскопия-опухоль 5 мм, рецидив, ТУР.

Гистологически уротелиальный рак.

Пациентка М., 75 лет p16ink4a позитивный сигнал

CINtec, Roche Corp., x40



Выводы

1. Стандартизация метода исследования мочи позволяет добиться снижения числа ошибок на преаналитическом этапе (13-28%) по сравнению с 57,3% процентов всех возможных ошибок (Gruder et al, 2001)
2. Апробированная на базе нашего лечебного учреждения система для сбора, хранения и транспортировки образцов мочи производства BD Vacutainer обеспечивает сохранность образцов, что позволяет доставлять материал из регионов для углубленного исследования патологических анализов без потери качества образца.
3. Использование анализатора Sysmex UF 1000i существенно повышает воспроизводимость и правильность исследования (специфичность 94%) за счет метода проточной цитометрии и может использоваться в скрининговых программах по ранней диагностике поверхностного рака мочевого пузыря.
4. Методика иммуноцитохимического определения p16ink4a может быть использована как для ранней диагностики РМП так и для контроля излеченности, выявления рецидивов.

ВАЖНО ПОМНИТЬ:

**ответственность
клиницистов**
(интерпретация
результатов, инструк-
таж пациентов по
поводу подготовки к
исследованию)



**ответственности
сотрудника КДЛ**
(обработка
материала,
выполнение
исследования,
выдача результата)

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ



Поселок Моче, Департамент Ла-Либертад, Перу