

Valutazione dell'analizzatore Sysmex UF-1000i per l'esame automatizzato del sedimento urinario

Fabio Manoni¹, Mauro Ercolin¹, Ioannis Bountis¹, Valeria Temporin¹, Agostino Tinello¹, Lucia Fornasiero¹, Sara Valverde², Gianluca Gessoni²

¹Servizio di Medicina di Laboratorio A-ULSS 17 Este-Monselice, Regione Veneto

²Servizio di Medicina di Laboratorio A-ULSS 14 Chioggia, Regione Veneto

ABSTRACT

Evaluation of Sysmex UF-1000i analyser for automated urine microscopic analysis. The evaluation of corpuscles in urine is used to investigate disorders of the kidneys and urinary tract. The objective of our study was to evaluate the analytical performance of a new urinary cytometer, the Sysmex UF-1000i. The study was carried out by collecting 15 samples of native urine with concentrations of the analytes covering a wide measurement range. The imprecision was evaluated by processing all samples five times. Results were evaluated with reference to the mean of two readings with the microscope set at 400 X using the Fuchs-Rosenthal chamber count according to the European Urinalysis Guidelines. Results demonstrated a good performance for all the considered parameters, especially in the range of cut-off and decision making values.

INTRODUZIONE

L'analisi del sedimento urinario svolge un importante ruolo nello studio dei disordini del rene e delle vie urinarie, quando eseguita entro le due ore successive alla raccolta delle urine della prima minzione del mattino, per evitare fenomeni di decadimento della qualità del campione che potrebbero alterare i risultati (1, 2). Prima dell'avvento degli analizzatori automatici, la metodologia impiegata in laboratorio per l'analisi microscopica del sedimento urinario risultava difficilmente standardizzabile: raccolta delle urine in una provetta conica (approssimativamente 10 mL), esecuzione dell'esame chimico-fisico con strisce reattive, centrifugazione (per 5-10 min a circa 800g), allestimento dei preparati, utilizzando supporti idonei, e valutazione microscopica. Ognuno dei passaggi elencati introduce una variabile del procedimento che va ad aggiungersi alla inevitabile soggettività dell'esame microscopico, che tuttavia rimane il "gold standard", a dispetto di una limitata accuratezza dovuta ai numerosi passaggi preanalitici e al significativo impegno di risorse umane qualificate (3).

Difficile da standardizzare è la fase della centrifugazione, durante la quale possono essere perduti almeno il 20% degli eritrociti (RBC) e il 15% dei leucociti (WBC), per fenomeni di lisi o di adesione. L'aumento del tempo di centrifugazione o della velocità rotazionale migliora l'efficienza del recupero, ma aumenta il tasso di distruzione delle cellule e dei cilindri (4). D'altro canto, è stato segnalato che l'uso di urine non centrifugate determina il mancato riconoscimento di sedimenti organizzati, con falsi negativi tra 84% e 100% dei casi per cilindri, tra 70% e 83% per eritrociti e tra 51% e 58% per leucociti, quando confrontato con metodiche standardizzate di quantificazione degli elementi (4).

L'automazione della lettura del sedimento, iniziata circa 20 anni orsono, ha comportato grande miglioramento della precisione, possibilità di quantificazione più affidabile, affinamento degli intervalli di riferimento, aumento della produttività, ma spesso problemi di correlazione con il metodo di riferimento (la microscopia) (5).

Recentemente è stato introdotto in commercio un nuovo analizzatore automatico per la valutazione della porzione corpuscolata delle urine, denominato Sysmex UF-1000i. Scopo del presente studio è stato quello di valutare le prestazioni analitiche di questo analizzatore.

MATERIALI E METODI

Il presente studio è stato condotto analizzando 15 campioni di urine native (cioè non sottoposti ad alcun trattamento) opportunamente resi anonimi prima dell'utilizzo. I campioni sono stati raccolti con un sistema sottovuoto, che riduce al minimo la manipolazione del campione (Vacutainer, Beckton-Dickinson): per ciascun campione dal contenitore di raccolta primario sono stati riempiti 5 tubi sottovuoto, conservati ermeticamente chiusi fino al momento dell'analisi, sempre condotta entro 2 ore. I campioni sono stati selezionati in maniera tale da coprire un esteso ambito di concentrazione degli elementi corpuscolati, consentendo una valutazione della prestazione analitica a diversi livelli. Per gli RBC la concentrazione era compresa tra 3 e 1400 cellule per μL , per i WBC tra 5 e 1500 cellule per μL , per le cellule epiteliali squamose (EC) tra 3 e 121 elementi per μL , per i cilindri (CAST) tra 0 e 6,6 elementi per μL , per i miceti lieviformi (YLC) tra 10 e 1500 elementi per μL , per i batteri (BACT) tra 9 e 14.000 elementi per μL e per la conducibilità (COND) tra 11 e 20 mS/cm.

Per la valutazione dell'imprecisione dell'analizzatore

Sysmex i campioni sono stati analizzati in quintuplo. In una seconda fase, gli stessi campioni sono stati analizzati nella stessa sequenza anche con il metodo di riferimento: conta in camera di Fuchs-Rosenthal con microscopio a contrasto di fase (PhC), utilizzando un oculare a 10 X ed un obiettivo a 40 X, per un totale di 400 X; la conta è stata effettuata per ciascun campione in doppio da due osservatori indipendenti, secondo le linee guida attuali (1, 2).

La strumentazione Sysmex UF-1000i utilizza come sorgente luminosa un laser a diodi; il campione aspirato (0,8–1,2 mL) viene sottoposto ad un processo di colorazione con due fluorocromi polimetinici di nuova concezione in grado di legarsi agli acidi nucleici e, dopo un processo di focalizzazione idrodinamica, viene fatto passare attraverso due celle a flusso, una dedicata all'analisi dei microorganismi e l'altra dedicata all'analisi di tutti gli altri elementi corpuscolari. Il loro passaggio devia il fascio di luce laser e genera sia un segnale di diffusione frontale che a 45° ("scattering") della luce, che uno di fluorescenza (frontale e a 45°). I parametri misurati vengono convertiti in segnali elettrici che, analizzati, permettono l'identificazione dei diversi elementi presenti nell'urina. Per caratterizzare il campione, viene inoltre misurata la conduttività della soluzione, che è inversamente proporzionale all'impedenza e quindi al volume cellulare. La cadenza analitica è di 100 esami/ora, con esecuzione di "rerun" automatico nei campioni con un numero di elementi superiori a limiti prefissati.

Per tutti i parametri considerati sono stati valutati l'imprecisione analitica nella serie (CV) (n=5) e l'esattezza, per la quale si è confrontata la media dei valori dell'UF-1000i con il valore ottenuto con il microscopio PhC utilizzando il metodo degli scarti quadratici medi. Il profilo di imprecisione per ciascun analita è stato ottenuto tabulando in un diagramma di assi cartesiani il valore medio delle misure verso il CV.

Il "carry-over" per i campioni è stato calcolato in accordo con Broughton (6). Sono stati allestiti pool differenti di urine, uno ad alta concentrazione di elementi corpuscolari (pool A, ed i campioni derivati sono stati denominati A1, A2, A3, ecc.) ed uno a bassa concentrazione di elementi corpuscolari (pool B, ed i campioni derivati sono stati denominati B1, B2, B3, ecc.). I campioni sono stati testati in serie alternate di tre secondo lo schema A1, A2, A3 – B1, B2, B3, ecc.; il "carry over" è stato calcolato utilizzando la formula $(B1-B3)/(A3-B3)*100$.

Il protocollo analitico è stato eseguito sullo stesso analizzatore da un unico operatore, utilizzando reattivi di un unico lotto e controllo di qualità con risultati entro 1 DS per due livelli di concentrazione.

RISULTATI

La imprecisione delle 5 misure eseguite per ciascuno dei 15 campioni relativa ai vari parametri è illustrata nella Tabella 1. Come si può rilevare nel dettaglio, per gli RBC la concentrazione media oscillava da 3,1 a 1355 elementi per μL ed il CV variava da 23,2% a 0,8%. Per i WBC la concentrazione media oscillava da 5,2 a 1384 elementi

per μL ed il CV variava da 6,2% a 1,5%. Per le EC la concentrazione media oscillava da 3,9 a 121 elementi per μL ed il CV variava da 13,6% a 1,4%. Per i CAST la concentrazione media oscillava da 0 a 5,5 elementi per μL ed il CV variava da 2,8% a 21,0%. Per i BACT la concentrazione media oscillava da 10,3 a 12.333 elementi per μL ed il CV variava da 2,0% a 11,7%. Per gli YLC la concentrazione media oscillava da 10,2 a 1526 elementi per μL ed il CV variava da 1,6% a 7,3%. La COND oscillava da 12 a 21 mS/cm ed il CV variava da 0,7% a 7,4%.

I profili di imprecisione relativi ai singoli parametri sono riportati nella Figura 1.

Per quanto attiene l'esattezza si evidenziava una buona correlazione tra i risultati ottenuti al microscopio e quelli ottenuti con lo strumento Sysmex. La Figura 2 riporta le regressioni lineari tra conta degli RBC, WBC, EC e CAST eseguite con UF-1000i e l'osservazione microscopica. Per RBC e WBC si evidenziava un'ottima correlazione ($r^2 \geq 0,999$) con coefficienti angolari della retta vicini all'unità. Anche nella correlazione relativa alla conta delle EC si evidenziava una buona correlazione ($r^2=0,984$) con un coefficiente angolare di 0,944. Meno buoni i risultati della regressione lineare tra conta dei CAST eseguita con UF-1000i ed osservazione microscopica ($r^2=0,875$ e coefficiente angolare di 0,849), anche a causa del ristretto intervallo di valori valutato.

La valutazione del "carry-over" dava i seguenti risultati: 0,01% per RBC, 0,22% per WBC, 0,23% per EC, 0,09% per BACT e 3% per COND.

DISCUSSIONE

Il presente studio si proponeva di valutare la performance analitica del citofluorimetro di 3^a generazione Sysmex UF-1000i. In una prima fase, è stata valutata l'imprecisione nella valutazione di RBC, WBC, CAST e EC, per i quali le linee guida prescrivono la determinazione quantitativa. Oltre questi parametri, si è ritenuto utile valutare anche l'imprecisione di BACT, per l'importanza che questo dato ha nello screening delle batteriurie, e di COND, un indice diretto ed affidabile dello stato di idratazione del soggetto e della capacità di concentrare le urine da parte del tubulo renale (5, 7, 8).

Per quanto attiene gli RBC abbiamo osservato una graduale e costante diminuzione della imprecisione all'aumentare del numero di elementi presenti nel campione in esame. In particolare, nei valori intorno al cut-off consigliato (15 RBC/ μL) (9-11) il CV era del 13,5%, in linea con quanto riportato in letteratura per l'analisi del sedimento in citometria automatizzata (13-17%) ed assai migliore con quanto riportato per la microscopia classica (CV attorno al 50%) (5, 12).

Per quanto riguarda i WBC, il CV forniva un valore assai soddisfacente ed assolutamente allineato con i migliori dati riportati in letteratura (5,6-6,8%), ancora una volta migliorativo rispetto al CV riportato per l'osservazione microscopica, che si attesta attorno al 50% (5, 13). Il profilo di imprecisione per i WBC mostrava un andamento diverso con valori attorno al 6% per le basse concen-

Tabella 1
Valori medi ed imprecisione di 5 misure eseguite sull'analizzatore Sysmex UF-1000i nei 15 campioni selezionati

Eritrociti/ μL		Leucociti/ μL		Cellule epiteliali/ μL		Cilindri/ μL		Batteri/ μL		Miceti/ μL		Conducibilità, mS/cm	
Media \pm DS	CV	Media \pm DS	CV	Media \pm DS	CV	Media \pm DS	CV	Media \pm DS	CV	Media \pm DS	CV	Media \pm DS	CV
3,1 \pm 0,7	23,2%	5,2 \pm 0,3	6,2%	3,9 \pm 0,5	13,6%	-	-	10,3 \pm 0,7	6,5%	10,2 \pm 0,7	6,6%	11,8 \pm 0,4	3,6%
3,7 \pm 0,5	14,4%	5,6 \pm 0,3	5,4%	5,5 \pm 0,3	5,4%	0,3 \pm 0,04	11,9%	23,1 \pm 2,5	10,9%	21,3 \pm 1,5	7,3%	11,9 \pm 0,9	7,4%
6,3 \pm 1,1	18,0%	12,2 \pm 0,7	5,6%	5,5 \pm 0,4	8,1%	0,4 \pm 0,08	18,8%	25,9 \pm 2,9	11,5%	38,6 \pm 2,1	5,2%	12,2 \pm 0,5	4,0%
8,7 \pm 1,6	18,4%	17,2 \pm 0,9	5,0%	8,6 \pm 0,4	4,7%	0,5 \pm 0,09	21,0%	30,4 \pm 1,3	4,2%	40,5 \pm 1,4	3,4%	12,5 \pm 0,1	0,9%
14,6 \pm 2,0	13,5%	38,7 \pm 1,8	4,6%	11,1 \pm 1,3	11,6%	1,4 \pm 0,08	5,8%	60,1 \pm 4,4	7,3%	53,6 \pm 3,2	6,1%	12,6 \pm 0,4	3,2%
70,7 \pm 3,4	4,8%	47,1 \pm 1,9	4,0%	11,7 \pm 0,4	3,8%	1,6 \pm 0,23	14,8%	79,8 \pm 7,3	9,2%	80,5 \pm 1,3	1,6%	12,7 \pm 0,1	0,7%
147,9 \pm 11,1	7,5%	70,0 \pm 3,0	4,4%	19,7 \pm 1,4	7,3%	1,6 \pm 0,23	14,6%	221,9 \pm 6,8	3,1%	93,7 \pm 3,4	3,7%	13,5 \pm 0,7	4,9%
303,0 \pm 9,7	3,2%	95,4 \pm 2,7	2,8%	22,9 \pm 1,1	4,7%	2,1 \pm 0,11	5,2%	309,5 \pm 10,1	3,3%	105,1 \pm 6,1	5,7%	14,6 \pm 0,4	2,9%
314,6 \pm 6,3	2,0%	120,4 \pm 1,9	1,6%	24,8 \pm 0,7	2,8%	2,7 \pm 0,15	5,5%	961,6 \pm 45,4	4,7%	162,2 \pm 3,9	2,4%	15,6 \pm 1,2	7,4%
469,9 \pm 8,8	1,9%	219,9 \pm 10,5	4,8%	26,9 \pm 1,3	4,9%	2,7 \pm 0,42	15,4%	5329,0 \pm 136,2	2,6%	380,3 \pm 10,1	2,7%	15,7 \pm 0,9	5,8%
574,4 \pm 7,0	1,2%	235,5 \pm 5,5	2,4%	28,3 \pm 1,4	5,1%	3,0 \pm 0,32	10,6%	5503,2 \pm 112,2	2,0%	388,6 \pm 9,1	2,4%	15,9 \pm 0,8	5,3%
609,8 \pm 6,1	1,0%	366,1 \pm 5,6	1,5%	56,9 \pm 2,3	4,1%	3,6 \pm 0,10	2,8%	7720,3 \pm 255,3	3,3%	406,2 \pm 25,5	6,3%	16,0 \pm 1,1	6,9%
779,4 \pm 12,1	1,6%	920,3 \pm 16,0	1,7%	57,0 \pm 2,3	4,1%	4,4 \pm 0,36	8,2%	8993,4 \pm 179,9	2,0%	723,6 \pm 12,9	1,8%	17,1 \pm 0,5	2,9%
1330,5 \pm 14,0	1,1%	1081,0 \pm 39,8	3,7%	101,5 \pm 2,0	2,0%	5,1 \pm 0,21	4,2%	9364,6 \pm 727,2	7,8%	1188,9 \pm 22,5	1,9%	18,6 \pm 0,7	3,6%
1354,6 \pm 10,7	0,8%	1383,9 \pm 78,0	5,6%	121,4 \pm 1,7	1,4%	5,5 \pm 0,80	14,6%	12333,3 \pm 1437,2	11,7%	1526,1 \pm 44,6	2,9%	21,0 \pm 0,9	4,4%

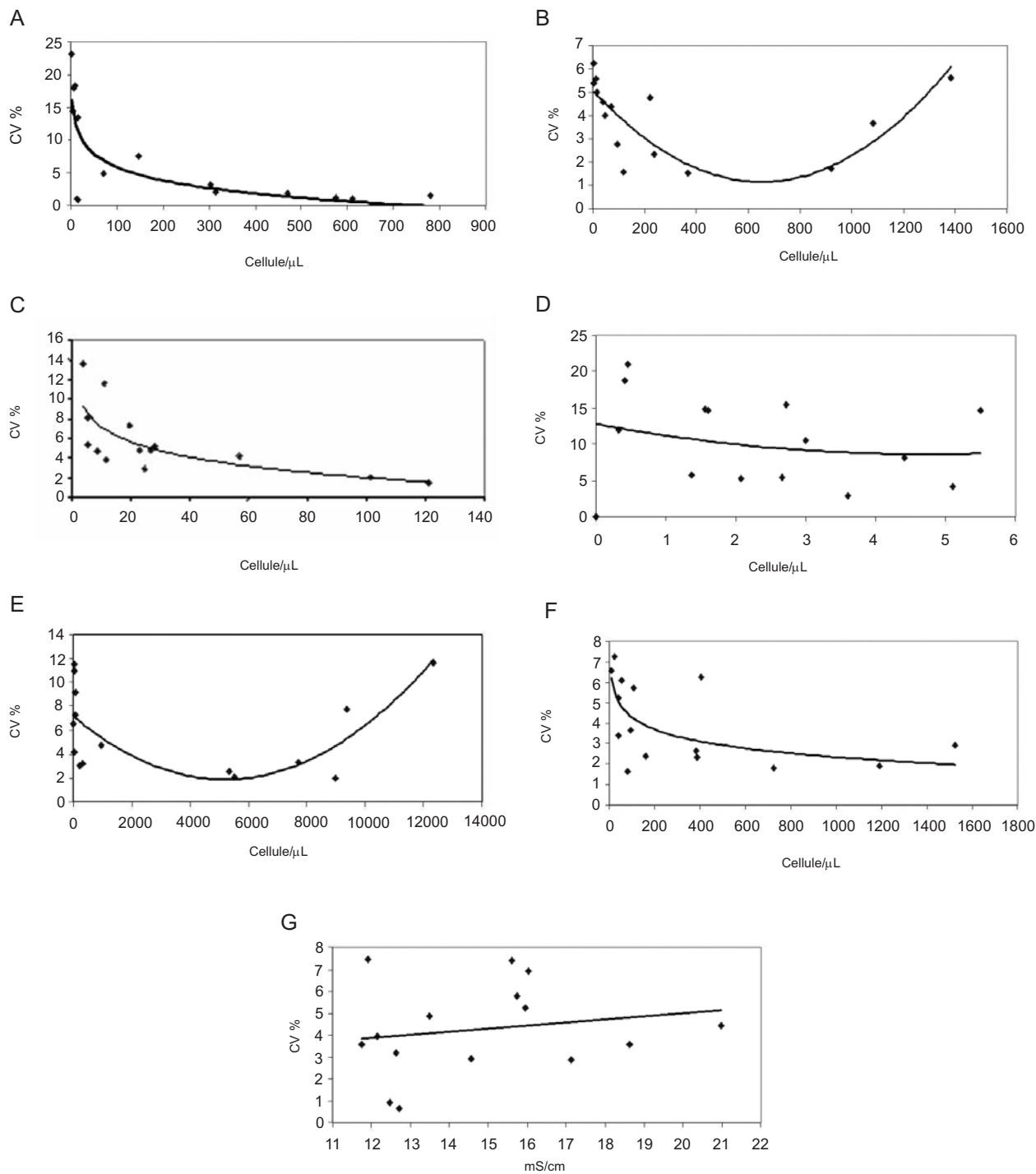
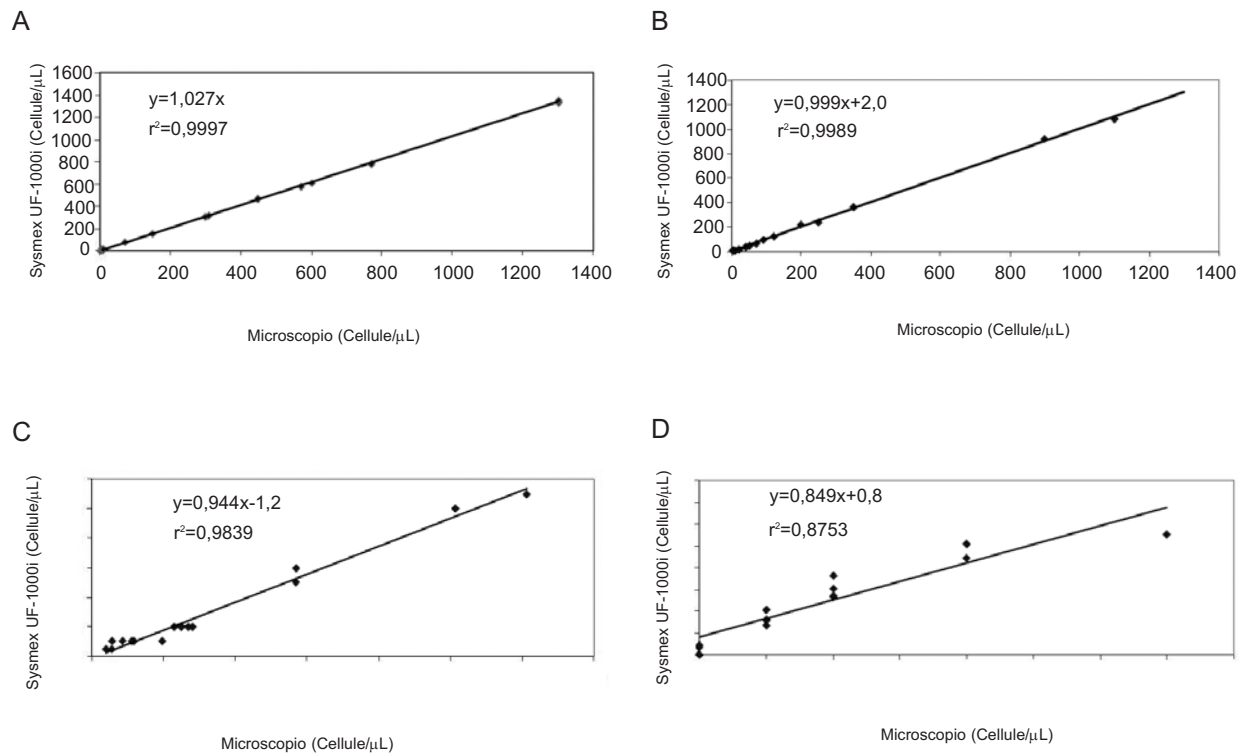


Figura 1
Profili di imprecisione ottenuti su 5 misure effettuate con l'analizzatore Sysmex UF-1000i in 15 differenti campioni di urine.
 A) Eritrociti; B) Leucociti; C) Cellule epiteliali; D) Cilindri; E) Batteri; F) Miceti; G) Conducibilità.

trazioni con progressivo decremento all'aumentare della concentrazione, CV intorno al cut-off di circa il 5% e tendenza poi ad aumentare a concentrazioni elevate (oltre 1000 WBC/ μL), probabilmente per fenomeni di concomitanza di conta.

Anche per quanto attiene le EC abbiamo osservato

un costante e progressivo calo della imprecisione all'aumentare della quantità di elementi presenti nel campione. Al momento non esiste un cut-off condiviso per quanto riguarda le EC, soprattutto perchè non è ancora accertato un loro eventuale significato clinico; tuttavia, Regeniter et al. (10) hanno suggerito come limite supe-

**Figura 2**

Correlazioni ottenute tra microscopia quantitativa e Sysmex UF-1000i.

A) Eritrociti; B) Leucociti; C) Cellule epiteliali; D) Cilindri.

riore di riferimento 9 elementi/μL; a questo livello il profilo di imprecisione forniva valori di CV attorno al 7%.

Per i CAST il profilo di imprecisione migliorava solo di poco con l'aumentare della concentrazione degli elementi nel campione. La quantificazione della cilindriuria, del resto, è assai critica per la presenza di numerosi fenomeni concomitanti: possibile lisi dei cilindri o loro frammentazione, eventuale interferenza da parte di altri elementi, quali "cluster" di cellule epiteliali. I valori di imprecisione ottenuti nel nostro studio sono in buon accordo con quanto riportato in letteratura (13). Regeniter et al. (10) considerano fisiologici sino a 2 CAST/μL; in questo ambito di valori, il CV da noi osservato era mediamente attorno al 10%.

Per quanto riguarda i microorganismi, siano essi BACT o YLC, i CV ottenuti erano assai soddisfacenti; per YLC il profilo di imprecisione ben mostra la correlazione inversa tra CV e concentrazione di YLC. Per i BACT il profilo di imprecisione mostrava come il CV diminuisca con l'aumentare del numero dei BACT presenti per poi aumentare nuovamente per conte elevate, verosimilmente per la presenza di BACT in vario stato di aggregazione (14, 15).

Per quanto infine attiene la conducibilità, il profilo di imprecisione suggeriva una sostanziale indifferenza del metodo rispetto alla concentrazione di soluti nelle urine.

Per quanto attiene la correlazione tra l'analizzatore UF-1000i e la conta microscopica in camera, essa è

sempre risultata assai soddisfacente. Per gli RBC abbiamo ottenuto sperimentalmente un $r^2 > 0,999$, valore sensibilmente superiore a quanto riportato in letteratura per l'analizzatore Sysmex UF-100 da vari autori: 0,89 (10), 0,97 (12, 14, 17) e 0,94 (16). Per i WBC abbiamo ottenuto un r^2 di 0,999, sensibilmente superiore a quanto riportato in letteratura per l'analizzatore UF-100: 0,94 (10, 12, 17), 0,91 (14) e 0,68 (16). Anche per le EC abbiamo ottenuto un r^2 di 0,984, molto migliore di quanto riportato in letteratura per UF-100: 0,74 (10), 0,90 (12, 17) e 0,89 (16). Infine, per i CAST abbiamo ottenuto un r^2 di 0,875, dato molto soddisfacente se paragonato con i risultati riportati in letteratura con UF-100: 0,32 e 0,44 (10, 14).

La valutazione automatizzata del sedimento urinario, iniziata quasi 20 anni fa con la proposta di sistemi di riconoscimento di immagine, quali Yellow IRIS, UA1000 e Seditron, si è probabilmente affermata solo con la citofluorimetria a flusso (UF-100 Sysmex) nella seconda metà degli anni '90. Sono note ormai le possibilità e i vantaggi di questo approccio: grande miglioramento della precisione delle misure, affinamento degli intervalli di riferimento, aumento della produttività. Rispetto all'UF-100, abbiamo potuto osservare che l'UF-1000i fornisce una maggiore definizione e differenziazione delle diverse specie di elementi corpuscolati, con un'esattezza migliore rispetto a quella finora riscontrata per questo tipo di sistemi analitici, premesse per una riduzione della

percentuale di revisioni microscopiche dei campioni, facilitazione del flusso operativo, riduzione del tempo di risposta e del rischio di errori.

BIBLIOGRAFIA

1. CLSI document GP16-A3. Urinalysis; Approved guideline – 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
2. European Urinalysis Guidelines. European Confederation of Laboratory Medicine. *Scand J Clin Lab Invest* 2000;60:1-96.
3. Cappelletti P. Gli esami su urine. E' tempo di cambiare? *Riv Med Lab* 2002;3:93-104.
4. Armstrong L, Soto J, Hacker F Jr, et al. Urinary indices during dehydration, exercise, and rehydration. *Int J Sport Nutr* 1998;8:345-55.
5. Hannemann-Pohl K, Kampf SC. Automation of urine sediment examination: a comparison of the Sysmex UF-100 automated flow cytometer with routine manual diagnosis (microscopy, test strips, and bacterial culture). *Clin Chem Lab Med* 1999;37:753-64.
6. Broughton P. Carry over in automatic analysers. *J Autom Chem* 1984;6:94-5.
7. Györy A. Urine microscopy analysis. *Lab Med Int* 1999;16:23-5.
8. Györy A, Hawkins T, Ross M, et al. Clinical value of urine microscopy by manual and automated methods. *Lab Hemat* 1998;4:211-6.
9. Delanghe JR, Kouri TT, Huber AR, et al. The role of automated particle flow cytometry in clinical practice. *Clin Chim Acta* 2000;301:1-18.
10. Regeniter A, Haenni V, Risch L, et al. Urine analysis performed by flow cytometry: reference range determination and comparison to morphological findings, dipstick chemistry and bacterial culture results. A multicentric study. *Clin Nephrol* 2001;55:384-92.
11. Steinmetz J, Henny J, Gueguen R. Reference limits for urine sediments performed on Sysmex UF-50. *Ann Biol Clin (Paris)* 2004;62:671-80.
12. Ottinger C, Regeniter A, Kochli H, et al. Standardized counting of particles in the urine: a comparison between flow cytometry, cell chamber and traditional sediment analysis. *Schweiz Rundsch Med Prax* 2004;93:15-21.
13. Kouri TT, Kahkonen U, Malmiemi K, et al. Evaluation of Sysmex UF-100 urine flow cytometer vs chamber counting of supravital stained specimens and conventional bacterial cultures. *Am J Clin Pathol* 1999;112:25-35.
14. Sutheesophon K, Wiwanitkit V, Boonchalermvichian C, et al. Evaluation of the Sysmex UF-100 automated urinalysis analyzer and comparative study with NCCLS method. *J Med Assoc Thai* 2002;85:S246-52.
15. Manoni F, Valverde S, Antico F, et al. Measurement of urine leukocytes by a second generation flow cytometer; application in the diagnosis of acute urinary tract infections in adult patients. *Riv Med Lab – JLM* 2001;2:1-9.
16. Chien T, Kao J, Lin P, et al. Urine sediment examination: a comparison of automated urinalysis systems and manual microscopy. *Clin Chim Acta* 2007;384:28-34.
17. Ottinger C, Huber A. Quantitative urine particles analysis: integrative approach for the optimal combination of automation with UF-100 and microscopic review with the cell chamber. *Clin Chem* 2003;49:1559-60.