

Valutazione dell'analizzatore Menarini SediMAX per l'esame automatizzato del sedimento urinario

Cristina Rossi, Silvio Porzio, Michela Chiarpotto, Pasquale De Sole

Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

ABSTRACT

Evaluation of Menarini SediMAX analyzer for automated urine microscopy analysis. The aim of this study was to evaluate the analytical performance of SediMAX (Menarini Diagnostics), a new analytical tool for automatic analysis of urinary sediment. On 422 routine samples, we correlated the microscopic examination with SediMAX morphological outputs. In an early experimental phase, the manufacturer's ranges were adopted obtaining unsatisfactory results. To improve the degree of correlation, we modified the reference ranges. An overall concordance rate of 87.4% for red blood cells, 81% for leucocytes, 74.2% for bacteria, and 84.1% for squamous epithelial cells was finally obtained. The rate of false positive results ranged from 2.1% (red cells) to 17.3% (bacteria), and the rate of false negative results ranged from 3.7% (leucocytes) to 9.6% (bacteria). In conclusion, our results seem to suggest that the performance of SediMAX instrument should be improved before to recommend its use for replacement of urine microscopy examination.

INTRODUZIONE

L'esame microscopico del sedimento urinario costituisce un mezzo diagnostico indispensabile nelle malattie uro-nefrologiche. L'esame generalmente viene eseguito su urine fresche, possibilmente emesse da non più di 2 ore; è noto, infatti, che l'utilizzo di campioni di urina a distanza di diverse ore dalla raccolta, mantenute a temperatura ambiente, può portare alla presenza di artefatti a causa delle inevitabili modifiche dei caratteri fisici e chimici del campione. Specialmente nel caso di urine ipotoniche, gli elementi cellulari ed organizzati possono andare incontro ad una rapida alterazione, in aggiunta alle modifiche del pH e all'eventuale crescita batterica (1).

Il "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) ha definito che l'analisi delle urine nei laboratori clinici debba essere eseguita in maniera rapida, affidabile ed economica (2). Poiché tale analisi offre una possibilità poco costosa per testare un numero elevato di soggetti per svariate sindromi sistemiche oltre alle malattie dell'apparato urinario, essa, se modernamente condotta, è certamente al passo con le tendenze attuali verso la medicina preventiva e l'abbassamento dei costi. Il documento NCCLS, così come quello dell'European Confederation of Laboratory Medicine (ECLM) (3), descrive le procedure di laboratorio, i metodi da banco e di riferimento ed i protocolli di valutazione applicabili all'esame chimico-fisico e microscopico delle urine. Quest'ultimo, quando eseguito manualmente, è una procedura che richiede tempo e conoscenze specialistiche. Queste limitazioni possono causare riduzione dell'accuratezza dell'esame (4, 5). Sono stati quindi proposti degli strumenti di analisi automatizzata che migliorano l'accuratezza ed aumentano la velocità di "output". Uno di questi è il citofluorimetro Sysmex UF-100, che classifica ogni elemento in base alle dimensioni, alla forma, al contrasto e alla densità (6). Un altro è il microscopio a flusso Iris

iQ200, che utilizza il "software" "auto particle recognition" per l'analisi degli elementi microscopici (4, 7, 8). Ambedue i sistemi richiedono la revisione del risultato prima del referto, riducendo l'utilità del sistema, anche in termini di tempo (6, 9-11).

Nel presente lavoro abbiamo valutato il SediMAX (A. Menarini Diagnostics), un analizzatore automatico del sedimento urinario, le cui caratteristiche principali sono quelle di essere dotato di un microscopio a ingrandimento 400 X, una fotocamera digitale che esegue 10-20 foto per ogni campione; all'interno di ogni immagine tutti gli elementi riconosciuti vengono etichettati dal "software", fornendo risultati numerici sia per campo microscopico (n/HPF, HPF = "high-power field") che per μL ; visualizzazione delle immagini sul monitor con possibilità di correzione della loro classificazione e archiviazione in un database; una rete neurale, supportata da un database contenente migliaia di immagini di elementi del sedimento e che viene continuamente aggiornata; un "software" con funzioni statistiche, interfacciamento con tutti gli strumenti Menarini, atlante interattivo dei sedimenti urinari, link a www.urinalysis.net per la VEQ, e possibilità di condivisione diretta al video con altri operatori, permettendo così l'utilizzo didattico. La valutazione è stata effettuata confrontando i risultati del SediMAX con quelli ottenuti mediante esame microscopico tradizionale da parte di alcuni operatori con pluriennale esperienza di lettura del sedimento urinario. I parametri considerati nella valutazione dei due sistemi sono stati gli eritrociti (RBC), i leucociti (WBC), i batteri (BAC) e le cellule epiteliali squamose (EPI).

MATERIALI E METODI

Campioni

Abbiamo esaminato, in un arco di tempo di due mesi,

422 campioni di urina pervenuti sia dai reparti di degenza che dagli ambulatori. A tutti i campioni, resi opportunamente anonimi, sono stati effettuati, entro due ore dalla minzione, sia l'esame al SediMAX che l'esame chimico-fisico e microscopico in campo chiaro ad un ingrandimento 100 X per i cilindri e per le cellule epiteliali e 400 X per tutti gli altri parametri.

Esame microscopico

E' stata analizzata l'urina qualitativamente con un apparecchio semiautomatico (AutionMAX, Menarini Diagnostics) e successivamente centrifugata a 1500 rpm per 6 min. Dal "pellet" risospeso in 0,5 mL, un volume di circa 50 μ L è stato trasferito su di un vetrino standard con coprioggetto di 24x24 mm. Per ogni vetrino sono stati esaminati almeno 10 campi microscopici utilizzando un microscopio in campo chiaro a ingrandimenti 100 X e 400 X. Per la lettura di urine con emazie dismorfiche ed acantociti si utilizzava un microscopio a contrasto di fase 400 X.

La Tabella 1 riporta i criteri utilizzati per la categorizzazione dei risultati.

Analisi automatizzata

L'analisi con il SediMAX richiede un volume minimo di campione di 2 mL. Una aliquota di 200 μ L viene iniettata all'interno di una particolare cuvetta che permette la formazione di un sottile film liquido su cui avviene la lettura con il microscopio. Mediante illuminazione del campione tramite led verde ad elevata potenza, la camera digitale raccoglie le immagini microscopiche, confrontabili con quelle ordinariamente valutate a 400 X nel nostro sistema di lettura routinaria. Per ogni campione sono analizzati 10 campi microscopici a 400 X, visualizzati attraverso 15 fotografie. Una speciale rete neurale, supportata da un database contenente migliaia di immagini del sedimento, individua gli elementi in base alle loro caratteristiche.

In una prima fase, i risultati ottenuti con il SediMAX sono stati confrontati con quelli ottenuti con l'esame microscopico standardizzato in uso nel nostro laboratorio utilizzando la categorizzazione dei risultati proposta dalla ditta. Successivamente, tale categorizzazione è stata modificata (Tabella 1) in modo da ottenere la massima concordanza tra i risultati del SediMAX e quelli ottenuti con l'esame microscopico standardizzato.

RISULTATI

I risultati ottenuti nella prima fase mostravano che il SediMAX sovrastimava tutti i parametri cellulari presi in considerazione, in particolar modo le RBC (risultati non riportati), dando così una scarsa concordanza tra i due metodi. Alla luce di queste differenze, erano apportate modifiche alla categorizzazione del SediMAX (Tabella 1) in modo da ottenere una migliore concordanza tra le distribuzioni di frequenza per classe dei risultati dei diversi elementi microscopici (Tabelle 2-5).

La Tabella 6 riporta la percentuale di concordanza dei dati letti al SediMAX con quelli ottenuti all'esame microscopico. Come risulta nella Tabella, il grado di correlazione per i diversi elementi considerati non è molto elevato, anche se la quota di risultati falsi negativi e falsi positivi per WBC e RBC non era eccessivamente elevata.

Per quanto riguarda il risultato relativo ai BAC, si deve tuttavia tener conto che in questa valutazione nella lettura al microscopio non si eseguiva una conta, ma solo una valutazione qualitativa, mentre il SediMAX effettua una vera e propria conta cellulare.

DISCUSSIONE

L'esame delle urine come screening per infezioni o altre malattie renali e del tratto urinario è di grande importanza nel Laboratorio di Analisi Cliniche. Secondo le linee guida europee la procedura tradizionale raccomandata comprende due fasi: nella prima, si esegue un'analisi semiquantitativa chimico-fisica al fine di identificare, fra tutti i campioni di urina, quelli negativi per emoglobina, esterasi leucocitaria, nitriti e proteine. Nella seconda fase sono analizzati al microscopio solo i campioni che sono risultati positivi per questi parametri (3). La prima fase potrebbe però generare risultati falsi negativi e pertanto uno screening basato solo sull'analisi chimico-fisica può condurre al mancato rilevamento di infezioni e altre malattie del tratto urinario (12-15). Un esame che combini l'analisi chimico-fisica con quella automatizzata del sedimento potrebbe ridurre il problema (16, 17).

L'analisi microscopica convenzionale del sedimento urinario, sebbene sia considerata il metodo di riferimento, richiede numerosi passaggi manuali, quali la centrifugazione, la concentrazione e la risospensione delle urine, che comportano la perdita e la distruzione del materiale cellulare. Pertanto, l'utilizzo di sistemi automatizzati potrebbe aiutare a risolvere questi problemi e a migliorare così l'accuratezza dell'analisi del sedimento urinario. Infatti, componenti cellulari particolarmente sensibili alle condizioni chimico-fisiche delle urine, quali le RBC, possono essere alterati con la centrifugazione.

I risultati ottenuti con la nostra sperimentazione sul SediMAX ci permettono di affermare che lo strumento ha una buona capacità di lettura di elementi quali RBC e WBC. Per quanto riguarda altri elementi, quali miceti, cellule epiteliali non squamose, cristalli di ossalato di calcio e di acido urico, cilindri jalini e patologici, a causa della ridotta incidenza di campioni positivi, non è stato possibile ottenere risultati significativi.

La mancanza di concordanza messa da noi in evidenza nella fase preliminare è stata formalmente ridotta mediante opportune modifiche alla categorizzazione del SediMAX, permettendo così un passaggio dall'uno all'altro dei due sistemi interpretativi senza eccessivi problemi. L'operazione da noi suggerita permette di riportare i risultati ottenuti con i due sistemi all'interno della stessa classe. Pertanto il clinico che riceve il risultato dell'esame morfologico effettuato con il SediMAX non noterà differenze nella categorizzazione rispetto alla lettura microscopica tradizionale.

Tabella 1

Categorizzazione dei risultati utilizzata nel nostro laboratorio e quelle impiegate per il SediMAX prima e dopo le modifiche apportate durante lo studio

	Classe	Esame microscopico	SediMAX Fase 1	SediMAX Fase 2
Globuli rossi*	1	0-2		0-4,4
	2	3-5	0-2	4,5-25
	3	6-10	2,1-9,6	26-81
	4	11-25	9,6-36	82-281
	5	26-50	36-60	282-400
	6	>50	>60	>400
Leucociti*	1	0	0-5	0-2,4
	2	1-10	5-12	2,5-16
	3	11-25	12-48	17-45
	4	26-50	48-96	46-100
	5	>50	>96	>100
Cellule epiteliali squamose*	1	Assenti	0-3	0-0,5
	2	Alcune	3-6	0,6- 2,1
	3	Numerose	6-18	2,2-14
	4	Tappeto	18-28,8 >28,8	>14
Batteri*	1	Assenti	0-18	0-13
	2	Alcuni	18-48	14-35
	3	Numerosi	48-150	36-150
	4	Tappeto	>150	>150

*I valori sono espressi in cellule/campo.

Tabella 2

Concordanza tra risultati al SediMAX e valutazione microscopica dei globuli rossi. I valori sono espressi in cellule/campo

Classe al microscopio	Classe SediMAX						Totale
	1	2	3	4	5	6	
1	319	5	2	-	-	-	326
2	15	21	4	1	-	-	41
3	6	5	10	2	-	-	23
4	1	2	5	13	-	-	21
5	-	1	2	-	4	-	7
6	-	-	-	2	-	2	4
Totale	341	34	23	18	4	2	422

Uno degli aspetti da considerare nell'impiego del SediMAX è l'acquisizione continua di nuovi dati da parte della rete neurale, che permette un ulteriore miglioramento nel riconoscimento degli elementi figurati. Inoltre, evitando i passaggi manuali, tutta la procedura di analisi delle urine risulterà notevolmente velocizzata (18).

In conclusione, in base alla nostra esperienza, l'analizzatore automatico SediMAX è uno strumento utilizza-

bile come sistema di base per l'analisi quotidiana dei sedimenti urinari in laboratori che effettuano un numero elevato di esami al giorno. Infatti, il SediMAX, quando collegato all'AutionMAX in un unico sistema, può eseguire l'esame chimico-fisico e microscopico con la possibilità di "software" personalizzati, che prevedono l'uso di algoritmi capaci di evidenziare incongruenze (per es. presenza di emoglobina all'esame chimico e assenza di

Tabella 3

Concordanza tra risultati al SediMAX e valutazione microscopica dei leucociti. I valori sono espressi in cellule/campo

Classe al microscopio	Classe SediMAX					Totale
	1	2	3	4	5	
1	235	11	3	-	-	249
2	7	85	10	4	1	107
3	2	9	15	7	2	35
4	-	7	8	4	2	21
5	-	1	6	-	3	10
Totale	244	113	42	15	8	422

Tabella 4

Concordanza tra risultati al SediMAX e valutazione microscopica delle cellule epiteliali squamose. I valori sono espressi in cellule/campo

Classe al microscopio	Classe SediMAX				Totale
	1	2	3	4	
1	305	18	4	2	329
2	22	29	9	-	60
3	3	9	20	-	32
4	-	-	-	1	1
Totale	330	56	33	3	422

Tabella 5

Concordanza tra risultati al SediMAX e valutazione microscopica dei batteri. I valori sono espressi in cellule/campo

Classe al microscopio	Classe SediMAX				Totale
	1	2	3	4	
1	235	34	15	-	284
2	21	33	9	-	63
3	4	10	40	11	65
4	-	-	5	5	10
Totale	260	77	69	16	422

Tabella 6

Risultati dell'analisi di confronto tra SediMAX ed esame microscopico del sedimento urinario

	Concordanza	Risultati falsi negativi	Risultati falsi positivi
Globuli rossi	87,4%	6,5%	2,1%
Leucociti	81,0%	3,7%	5,6%
Cellule epiteliali squamose	84,1%	7,6%	6,7%
Batteri	74,2%	9,6%	17,3%

RBC al microscopico). In questo modo, grazie all'allarme di incongruenza, si potrebbero recuperare i campioni non concordanti che abbiamo evidenziato nel nostro lavoro. Infine, la stazione di lavoro unica permette all'operatore di gestire *in toto* la sequenza di analisi del campione, dal momento in cui arriva in laboratorio fino al referto finale, e di ridurre la possibilità di errore nella valutazione del sedimento, rendendo l'esame complessi-

vamente più standardizzato, grazie anche all'esclusione di passaggi manuali, quali la centrifugazione e la preparazione del vetrino per l'analisi microscopica.

BIBLIOGRAFIA

1. Gai M, Lanfranco G, Rotunno G. L'esperienza torinese nell'esame delle urine e sedimento: passato, presente e futu-

- ro. *Giorn Tec Nefrol Dial* 2005;2:34-9.
2. CLSI document GP16-A. Urinalysis and collection, transportation and preservation of urine specimens. Approved guideline. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1995.
 3. European Urinalysis Guidelines. European Confederation of Laboratory Medicine. *Scand J Clin Lab Invest* 2000;231 (suppl):1-86.
 4. Shayanfar N, Tobler U, von Eckardstein A, et al. Automated urinalysis: first experience and a comparison between the Iris IQ200 urine microscopy system, the Sysmex UF-100 flow cytometer and manual microscopic particle counting. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1251-6.
 5. Ramos T. L'esame morfologico dell'urina. *Riv Med Lab - JLM* 2002;3:32-7.
 6. Ben-Ezra J, Bork L, McPherson R. Evaluation of the Sysmex UF-100 automated urinalysis analyzer. *Clin Chem* 1998;44:92-5.
 7. Linko S, Kouri TT, Toivonen E, et al. Analytical performance of the Iris iQ200 automated urine microscopic analyzer. *Clin Chim Acta* 2006;372:54-64.
 8. Mayo S, Acevedo D, Quiñones-Torrel C, et al. Clinical laboratory automated urinalysis: comparison among automated microscopy, flow cytometry, two test strips analyzers, and manual microscopic examination of the urine sediments. *J Clin Lab Anal* 2008;22:262-70.
 9. Lamchiaghase P, Preechaborisutkul K, Lomsomboon P, et al. Urine sediment examination: a comparison between the manual method and the iQ200 automated urine microscopy analyzer. *Clin Chim Acta* 2005;358:167-74.
 10. Akin OK, Serdar MA, Cizmeci Z, et al. Comparison of UriSed and IQ200 full automatic urine sediment analyzer with manual urine analysis. *Biotechnol Appl Biochem* 2009;53:139-44.
 11. Chien TI, Kao JT, Liu HL, et al. Urine sediment examination: a comparison of automated urinalysis systems and manual microscopy. *Clin Chim Acta* 2007;384:28-34.
 12. Shaw ST Jr, Poon SY, Wong ET. "Routine urinalysis". Is the dipstick enough? *J Am Med Assoc* 1985;253:1596-600.
 13. Laine P, Toivonen E, Eklund K, et al. Rapid dipstick urinalysis in the internal medicine clinic: what is missed? *J Intern Med* 1997;242:271-3.
 14. Deville WL, Yzermans JC, van Duijn NP, et al. The urine dipstick test useful to rule out infections. A meta-analysis of the accuracy. *BMC Urol* 2004;4:4.
 15. Gangaram R, Ojwang PJ, Moodley J, et al. The accuracy of urine dipsticks as a screening test for proteinuria in hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 2005;24:117-23.
 16. Lun A, Ziebig R, Priem F, et al. Routine work-flow for use of urine strips and urine flow cytometer UF-100 in the hospital laboratory. *Clin Chem* 1999;45:1305-7.
 17. 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 result - a multicenter study. *Clin Nephrol* 2001;55:384-92.
 18. Miyake R, Yamazaki I, Kojima Y, et al. High-throughput pre-treatment system in automated urinary sediment analyzer. *Cytometry* 2000;39:67-71.