

Critically Appraised Topic

Automatische versus manuele microscopie van urine

Author: Dr. Helena Claerhout

Supervisor: Dr. Jaak Billen

Search/Method verified by: Dr. Jaak Billen, Apr. Steven Pauwels

Date: 11/03/2014

Clinical Bottom Line

De gouden standaard voor microscopisch onderzoek van urine is nog steeds manuele fasecontrastmicroscopie. Niettegenstaande dat deze methode een waardevolle diagnostische methode is, is manuele microscopie arbeidsintensief en tijdrovend. Daarom werden recent toestellen uitgebracht als alternatieve oplossing voor manuele microscopie.

Een complete urine analyse kan waardevol zijn bij patiënten met evidentie voor nier- en urinewegaandoeningen o.b.v. anamnestiche gegevens en/of klinische onderzoek, albuminurie, verminderde GFR,... en bij patiënten met gelijktijdig voorkomende ziekten met renale complicaties (acuut nierfalen, nefrotisch syndroom, urineweginfecties, glomerulonefritis, diabetes mellitus,...). Daarnaast kan microscopisch onderzoek bevindingen van de teststrook verduidelijken.

Manueel microscopisch onderzoek is onderhevig aan pre-analytische fouten en inter-observer variabiliteit. Door gestandaardiseerde procedures te gebruiken voor urinecollectie en urine analyse heeft men een poging gedaan om de fouten tijdens pre-analyse te vermijden o.a. stalen binnen 2 à 4 uren na collectie analyseren. Om inter-observer variabiliteit te gaan verminderen is men de oplossing gaan zoeken in automatische urinemicroscopie.

Bovendien hebben toestellen voor automatische urine analyse als voordeel hoogproductief, minder tijdrovend en arbeidsintensief te zijn en zo te zorgen voor een kortere TAT. Daarnaast bieden toestellen o.b.v. automatische urinemicroscopie ook de mogelijkheid aan om beelden te herbekijken.

Ten slotte is het mogelijk om een aantal regels, die informatie van de teststrookscreening en automatische urine analyse combineren, in te voeren om incongruente resultaten te vermijden en zo de kwaliteit van de resultaten te verzekeren.

Clinical Bottom Line

Clinical diagnostic scenario

Questions

Search terms

Relevant evidence/References

Appraisal

1. Welke indicaties zijn er voor het uitvoeren van een microscopisch onderzoek van urine?

Algemeen

Ziektebeelden

2. Hoe betrouwbaar is manueel microscopisch onderzoek?

Algemeen

Pre-analyse

Inter-observer variabiliteit

3. Is automatische urinemicroscopie een volwaardig alternatief voor manuele microscopie?

Algemeen

Flowcytometrie

Geautomatiseerde urine microscopie analyser

Methodevergelijking

Kostenbeschouwing

4. Is de combinatie van teststrookscreening en automatische urinemicroscopie nuttig?

Experiment

Discussie

To do/actions

Attachment

Clinical/Diagnostic scenario

Urine analyse omvat waardevolle diagnostische testen om de aanwezigheid, de ernst en het verloop van nier- en urinewegaandoeningen te evalueren. Bij elke patiënt die voor het eerst gezien wordt door de nefroloog of zich presenteert met klachten met vermoeden van nier- en urinewegaandoeningen zou een compleet basis urineonderzoek moeten gebeuren. In de meeste gevallen wordt enkel een teststrookscreening uitgevoerd, zonder verder microscopisch onderzoek omdat dit een snelle, eenvoudige en goedkope test is. Deze aanpak kent zijn beperkingen gezien de semi-kwantitatieve schatting van meerdere parameters zoals eiwit, heem, glucose, bilirubine,... en gekende interferenties die kunnen leiden tot vals positieve of vals negatieve resultaten.

Door middel van microscopisch onderzoek van urine kan men beter zicht krijgen op de aanwezigheid en ernst van een aandoening van nieren en urinewegen en bovendien waardevolle informatie toevoegen aan de biochemische teststrookscreening. Het biedt de mogelijkheid om o.a. rode bloedcellen, witte bloedcellen, renale tubuluscellen, urotheelcellen, hyalijne cilinders, pathologische cilinders, kristallen, squameuze epitheelcellen en bacteriën te visualiseren.

Met het oog op een nefrotisch syndroom mogen pathologische cilinders in geen geval gemist worden en bij acute tubulaire necrose zijn renale tubuluscellen, tubulaire fragmenten en cilinders van groot belang. Daarnaast kan men bij glomerulonefritis dysmorphe rode bloedcellen en rode bloedcelcilinders aantreffen. Leukocyturie en bacteriurie zijn kentekens van urineweginfectie en massieve aanwezigheid van squameuze epitheelcellen zijn geassocieerd met een slechte afname van het staal.

Niettegenstaande dat manuele fasecontrastmicroscopie nog steeds als referentiemethode aanschouwd wordt, is het onderzoek tijdrovend en imprecies. Het onderzoek wordt sterk beïnvloed door pre-analytische collectie en bewaring, vereist een uitstekende training voor interpretatie en is operatorafhankelijk. Gezien de belangrijke variabiliteit zijn maatregelen ondernomen tot standaardisatie van het onderzoek. Enerzijds werden richtlijnen geschreven omtrent afname en bewaring van stalen ten einde de pre-analytische variabiliteit te verminderen en anderzijds werden inspanningen geleverd tot automatisatie van urinemicroscopie.

Zo werden instrumenten met flowcytometrie als meetprincipe en recenter toestellen die aan de hand van een lichtmicroscop en camera microscopische beelden kunnen produceren, op de markt gebracht. Sysmex UF-100 en opvolger UF-1000i (TOA Medical Electronics, Japan) o.a. zijn flowcytometrische toestellen. Daarnaast verschenen toestellen zoals sediMAX (A.Menarini, Italië)/UriSed(77 Electronica, Hongarije), FUS-100 (Dirui Industrial Co., China) en Iris iQ200 (Iris diagnostics, VSA) als toestellen voor automatische microscopische beeldvorming.

Questions

1. Welke indicaties zijn er voor het uitvoeren van een microscopisch onderzoek van urine?
2. Hoe betrouwbaar is manueel microscopisch onderzoek?
3. Is automatische urinemicroscopie een volwaardig alternatief voor manuele microscopie?
4. Is de combinatie van teststrookscreening en automatische urinemicroscopie nuttig?

Search Terms

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: "urine", "microscopy"
- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters: "urine", "microscopy", "urinary sediment", "urine sediment", "urinalysis", "urised", "sedimax", "uf-100", "uf-1000", "Iris iQ-200", "automatic microscopy", "guidelines urinalysis", "diagnostic performance", "diagnostic value", "analytical performance", "evidence", "flowcytometry", "dipstick", "indication", "inter observer", "variability", "variation", "autionmax", "urinary tract infection", "acute kidney injury", "nephritic syndrome", "nephrotic syndrome", "minimal change disease", "membranous nephropathy", "glomerulonephritis", "IgA nephropathy", "proliferative glomerulonephritis", "post-streptococcal glomerulonephritis", "lupus nephritis", "henoch schonlein purpura", "diabetic nephropathy"
- 3) Guidelines: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS; <http://www.nccls.org/>), European Urinalysis Guidelines, National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) guidelines
- 4) UpToDate Online version 21.8 (2013)

Relevant evidence/References

1) Guidelines and Recommendations

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Urinalysis; Approved guideline- third edition. CLSI document GP16-A3. Wayne, PA, USA: CLSI; 2009.
2. Kouri T, Gant V, Fogazzi G, Hofmann W, Hollander H, Guder W. Towards European urinalysis guidelines introduction of a project under European confederation of laboratory medicine. Clin Chim Acta 2000;297:305-11.

2) Systematic Reviews and Meta-analyses

3. Kanbay M, Kasapoglu B, Perazella M. Acute tubular necrosis and pre-renal acute kidney injury: utility of urine microscopy in their evaluation- a systematic review. Int Urol Nephrol 2010;42:425-33.
4. Narchi H. Risk of long term renal impairment and duration of follow-up recommended for Henoch-Schönlein purpura with normal or minimal urinary findings: a systematic review. Arch Dis Child 2005;90:916-20.

3) Reviews

5. Fogazzi GB, Verdesca S, Garigali G. Urinalysis: Core curriculum 2008. Am J Kidney Dis 2008;51(6):1052-67.
6. Chadban S, Atkins R. Glomerulonephritis. Lancet 2005;365:1797-806.

4) *Original Articles*

7. Perazella MA, Coca SG, Kanbay M, Brewster UC, Parikh CR. Diagnostic value of urine microscopy for differential diagnosis of acute kidney injury in hospitalized patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:1615-19.
8. Ravigneaux MH, Pellet H, Colon S, Buenerd A, Lacavalerie B, Abdullah E. Significance of cytolipiduria during a nephrotic syndrome. *Nephrologie* 1991;12(1):12-6.
9. Martinez MH, Bottini PV, Levy CE, Garlipp CR. UriSed as a screening tool for presumptive diagnosis of urinary tract infection. *Clin Chim Acta* 2013;425:77-9.
10. Wilson ML, Gaido L. Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *CID* 2004;38:1150-8.
11. Lunn A, Holden S, Boswell T, Watson A. Automated microscopy, dipsticks and the diagnosis of urinary tract infection. *Arch Dis Child* 2009;95:193-7.
12. Nakayama K, Ohsawa I, Maeda-Ohtani A, Murakoshi M, Horikoshi S, Tomino Y. Prediction of diagnosis of immunoglobulin A nephropathy prior to renal biopsy and correlation with urinary sediment findings and prognostic grading. *J Clin Lab Anal* 2008;22:114-8.
13. Vikse B, Bostad L, Aasarød K, Lysebo D, Iversen B. Prognostic factors in mesangioproliferative glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:1603-13.
14. Robson WL, Leung AK. Post-streptococcal glomerulonephritis with minimal abnormalities in the urinary sediment. *J Singapore Paediatr Soc* 1992;34:232-4.
15. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7.
16. Feletar M, Ibañez D, Urowitz MB, Gladman DD. The impact of the 1997 update of the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus: what has been changed? 2003;48:2067-73.
17. Tumlin JA. Lupus Nephritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2008;66:188-94.
18. Heine GH, Sester U, Girndt M, Kohler H. Acanthocytes in the urine: Useful tool to differentiate diabetic nephropathy from glomerulonephritis? *Diabetes Care* 2004;27(1):190-4.
19. Claire-Del Granado R, Macedo E, Mehta RL. Urine microscopy in acute kidney injury: Time for a change. *Am J Kidney Dis* 2011;57(5):657-60.
20. Block DR, Lieske JC. Automated urinalysis in the clinical lab. *MLO* 2012;10:8-12.
21. Fogazzi GB, Garigali G. The clinical art and science of urine microscopy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008;12:625-32.
22. Kouri T, Vuotari L, Pohjavaara S et al. Preservation of urine flow cytometric and visual microscopic testing. *Clin Chem* 2002;48:900-5.
23. Winkel P, Statland BE, Jorgensen K. Urine microscopy, an ill-defined method, examined by a multifactorial technique. *Clin Chem* 1974;20:436-9.

24. Zaman Z, Fogazzi GB, Garigali G, Croci MD, Bayer G, Kranicz T. Urine sediment analysis: analytical and diagnostic performance of sediMAX – A new automated microscopy image-based urine sediment analyser. *Clinica Chimica Acta* 2010;411:147-54.
25. Huysal K, Budak YU, Karaca AU, Aydos M, Kahvecioglu S, Bulut M et al. Diagnostic accuracy of UriSed automated urine microscopic sediment analyzer and dipstick parameters in predicting urine culture test results. *Biochemia Medica* 2013;23(2):211-7.
26. Akin OK, Serdar MA, Cizmeci Z, Genc O, Aydin S. Comparison of LabUMat-with-UriSed and iQ200 fully automatic urine sediment analysers with manual urine analysis. *Biotechnol Appl Biochem* 2009;53:139-44.
27. Roggeman S, Zaman Z. Safely reducing manual urine microscopy analyses by combining urine flow cytometer and strip results. *Am J Clin Pathol* 2001;116:872-8.
28. Yüksel H, Kiliç E, Ekinci A, Evliyaoglu O. Comparison of fully automated urine sediment analyzers H800-FUS100 and Labumat-UriSed with manual microscopy. *J Clin Lab Anal* 2013;27:312-6.
29. Mayo S, Acevedo D, Quiñones-Torrelo C, Canós I, Sancho M. 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.
30. Langlois M, Delanghe J, Steyaert S, Everaert K, De Buyzere M. Automated flow cytometry compared with an automated dipstick reader for urinalysis. *Clin Chem* 1999;45:118-22.
31. Zhao F, Jin Y, Chen X, Xie X. Clinical application of UF-1000i in combination with AX-4280 for the screening test ability of urinary formed elements. *J Clin Pathol* 2013;66:229-31.

5) Reference Works, Handbooks and Databases

32. Wald R. Urinalysis in the diagnosis of kidney disease. Uptodate online version 21.8 (2013).
33. Oxford handbook of clinical medicine 8th edition 2010. Oxford University Press.
34. Fogazzi GB. The urinary sediment, an integrated review 3th edition 2009. Elsevier.
35. Harrison Internal Medicine 18th edition 2011. McGraw Hill Medical.
36. Fogazzi BG, Garigali G. The urinary sediment by sediMAX 2012. Elsevier.

6) “grey literature”

37. Bjijsluiter: HYCOR KOVA® Liqua-Trol with Microscopics Urinalysis Controls, HYCOR Biomedicals Inc., Garden Grove USA

I. Welke indicaties zijn er voor het uitvoeren van een microscopisch onderzoek van urine?

Algemeen

Een complete urine analyse omvat een ruwe (macroscopische) evaluatie, teststrookscreening en een microscopisch onderzoek van het urinesediment.³² Microscopisch onderzoek maakt integraal deel uit van een basis urine analyse en voegt onvervangbare informatie toe aan fysicochemisch onderzoek.⁵ In volgende gevallen zou een complete urine analyse moeten gebeuren: bij patiënten met evidentie voor een nieraandoening, meer bepaald iemand met albuminurie of een acute of chronisch verminderde GFR, bij patiënten met een vermoedelijke nieraandoening op basis van klinische gegevens (bv. oedeem) of omwille van gelijktijdig voorkomende ziekte die vaak gepaard gaat met nieraandoeningen (bv. actieve SLE, secundaire aHT), bij patiënten met gekend of vermoeden van niersteenlijden, of het kan nodig zijn om de significantie van bevindingen door teststrookscreening te verduidelijken.³²

Ziektebeelden

Acuut nierfalen

De diagnose van een acuut nierfalen is voornamelijk gebaseerd op een bepaling van serum creatinine, ureum en urinaire output. Aanvullend bij deze parameters verschaft urinaire biochemie en microscopie essentiële informatie in de differentiële diagnose van acuut nierfalen in verschillende categorieën van prerenale azotemie en acute tubulusnecrose. *Perazella et al.* voerden een cross-sectionele studie uit (n=267) waarbij consulterende nefrologen gevraagd werden de mogelijke oorzaak van acuut nierfalen (toename van 50% van serum creatinine) te beoordelen op twee tijdstippen: ten eerste na klinische beoordeling van de patiënt maar voor urinemicroscopie (pre-microscopie diagnose) en ten tweede na ontslag van de patiënt, renale biopsie of dood (finale diagnose). Bovendien werd een urinair scoresysteem gehanteerd o.b.v. cilinders en renale tubulaire epitheelcellen (RTEC) voor differentiatie van acute tubulusnecrose van prerenaal nierfalen. Deze studie toont aan dat urinemicroscopie uitgevoerd op de dag van consultatie een waardevolle diagnostische test is om de probabiteit van diagnose van acute tubulusnecrose te staven. Hierbij wordt gesuggereerd dat acute tubulusnecrose betrouwbaar kan worden onderscheiden van prerenaal nierfalen.^{3,7}

Nefrotisch syndroom

Nefrotisch syndroom is gekarakteriseerd door een triade van proteïnurie (>3g/24u) geassocieerd met hypoalbuminemie (albumine <25g/L) en oedeem. Tevens sterke hyperlipidemie (totaal cholesterol >10 mmol/L) is vaak aanwezig.³³ De meest voorkomende oorzaken van een nefrotisch syndroom zijn: minimal change disease, focale segmentale glomerulosclerose, idiopathische membraneuze nefropathie, diabetische nefropathie, membraneuze lupus nefritis, amyloïdose en lichte keten depositie. De kenmerken van een nefrotisch sediment zijn lipidurie en opmerkelijke cilindurie, met hoofdzakelijk vetcilinders en RTEC cilinders. Microscopische hematurie is variabel, afhankelijk van het type glomerulopathie.³⁴ In een studie van *Ravigneaux et al.* vond men d.m.v.

fasecontrastmicroscopie van urine van patiënten met een nefrotisch syndroom een cytolipidurie in 62.8% van de gevallen. Dit werd meestal geobserveerd in patiënten tussen de leeftijd van 20 en 80 jaar, geassocieerd met cytologische bevindingen van glomerulaire en/of tubulaire schade.⁸

Minimal change disease en focale segmentale glomerulosclerose

De urinaire bevindingen in MCD en FSGS zijn voornamelijk deze van een nefrotisch syndroom, namelijk opmerkelijke proteïnurie geassocieerd met verschillende aantallen van RTEC, opvallende cilindrurie en lipidurie.³⁴

Membraneuze nefropathie

Membraneuze nefropathie gaat voornamelijk gepaard met urinaire bevindingen zoals proteïnurie in de nefrotische range geassocieerd met microscopische hematurie, zware cilindrurie en lipidurie.³⁴

Urineweginfecties

Urineweginfecties worden gedefinieerd als infecties van urinewegstructuren: nieren, ureters, blaas of urethra, voornamelijk voorkomend in aanwezigheid van bacteriën in de urine.⁹ Deze aandoeningen behoren tot de meest voorkomende bacteriële infecties. Urineweginfecties vormen een uitdaging, niet enkel omdat ze talrijk voorkomen, maar ook omdat de diagnose niet altijd eenvoudig is.¹⁰ Voornamelijk bij kinderen blijft het een moeilijk punt omdat de verschillende collectiemethodes verschillende contaminatiegraden hebben en er verschillende methodes zijn om urine te verwerken.¹¹ De definitieve diagnose wordt gesteld aan de hand van de aanwezigheid van $\geq 10^5$ bacteriën/mL in *midstream* urine, niettegenstaande dat een derde van de patiënten met een cystitis lagere kolonie aantallen kunnen hebben.³⁴ Naast het uitvoeren van urineculturen voor diagnose van urineweginfecties, kan teststrookscreening en urinemicroscopie uitgevoerd worden. Bacteriurie en pyurie kunnen gedetecteerd en gekwantificeerd worden d.m.v. urinemicroscopie. Een voordeel van urinemicroscopie is dat WBC, WBC cilinders en andere cellulaire elementen direct geobserveerd worden. Daarentegen is het een nadeel dat WBC snel deterioreren in urine die niet vers is of niet adequaat bewaard werd.¹⁰

Glomerulonefritis

Glomerulonefritis is een frequente oorzaak van eindstadium van renaal falen bij volwassenen. Het is een groep van aandoeningen waarbij de primaire pathologie zich in de glomerulus afspeelt. De schade aan het glomerulair filterend apparaat zorgt voor lekkage van eiwitten en/of bloed in de urine, afhankelijk van de aandoening.^{6,33}

IgA nefropathie

De ziekte van Berger of IgA nefritis is het meest voorkomende type van glomerulonefritis in de ontwikkelde landen en de langetermijnprognose is slecht. Het wordt klinisch gekarakteriseerd door milde tot ernstige hematurie en/of proteïnurie. Hoewel de diagnose niet gesteld kan worden zonder nierbiopt zijn er 4 belangrijke klinische merkers in de diagnose van patiënten met IgA nefropathie of in de differentiële diagnose met andere types nefritis en nefropathie: meer dan 5 RBC in een urinesediment, persisterende proteïnurie, serum IgA >315 mg/dL en serum IgA/C3 ratio >3.01 .^{12,34} Nakayama et al. evalueerden het nut van deze parameters en men vond dat deze parameters nuttig zijn in de differentieel diagnose van andere typen nefritis en nefropathie. Bovendien is het totaal aantal van de verschillende types cilinders nuttig voor de voorspelling van de prognose. Het gelijktijdig optreden van korrel-, vetcilinders en ovale vetlichaampjes in het urinesediment is een belangrijk teken van slechte prognose.¹²

Membranoproliferatieve glomerulonefritis

Membranoproliferatieve glomerulonefritis kan idiopathisch (primair) of secundair zijn geassocieerd met virale infecties (HBV of HCV), bacteriële endocarditis, viscerale abscessen en geïnfecteerde arterioveneuze shunts. De aandoening wordt gekarakteriseerd door een grote variatie aan klinisch verloop en tekens. De klinische tekens zijn hematurie (geïsoleerde dysmorphe microscopische hematurie, microscopische hematurie of eventueel macroscopische hematurie), proteïnurie en eventueel nefrotisch syndroom.^{33,34} Vikse *et al.* zochten in een retrospectieve studie naar prognostische factoren bij membranoproliferatieve glomerulonefritis. Men vond dat toegenomen proteïnurie een risicofactor was voor progressie naar eindstadium van renaal falen en dat er een omgekeerde correlatie was tussen het urinair eiwit en serum albumine, wat een significante risicofactor is. Bovendien werd aangetoond dat de aanwezigheid van urinaire korrelcilinders een risicofactor voor progressie naar eindstadium nierfalen is t.o.v. patiënten zonder urinaire korrelcilinders.¹³

Acute post-streptokokken glomerulonefritis

Deze vorm van glomerulonefritis ontstaat na een recente infectie met bèta-hemolytische streptokokken. De klassieke presentatie omvat hypertensie, oedeem, macroscopische hematurie, acuut nierfalen, proteïnurie en een urinesediment met RBC en RBC cilinders, maar occasioneel kan het gepaard gaan met weinig urinaire bevindingen.¹⁴

Extracapillaire glomerulonefritis

Bij extracapillaire glomerulonefritis is er een snelle deterioratie van de nierfunctie over enkele dagen/weken als gevolg van crescentvorming (proliferatie van cellen in de ruimte van Bowman) in de meerderheid van glomeruli. Deze aandoening kan geassocieerd zijn met Goodpasture's syndroom, immuuncomplex aandoeningen en pauci-immune systeem vasculitis. In de actieve fase is er progressief nierfalen, milde tot ernstige proteïnurie en massieve hematurie. Volgens de ervaringen van Fogazzi *et al.* is hematurie altijd aanwezig in een zeer ernstige vorm met in 89% van de gevallen opmerkelijke RBC cilinders. Milde tot matige leukocyturie en aanwezigheid van tubuluscellen is ook frequent (84.2%), evenals renale tubuluscelcilinders (68.4%), vetcilinders (42.1%) en WBC cilinders (>31%).³⁴

Lupus nefritis

Volgens de criteria voor SLE van het *American College of Rheumatology* (1982 en gereviseerde versie in 1997) is de aanwezigheid van persisterende proteïnurie >0.5 g/dag (of >3+) of cellulaire cilinders (RBC-, hemoglobine-, korrel-, tubulaire- of gemengde cilinders) een criterium voor renale aandoening in SLE.^{15,16} Patiënten met microscopische of macroscopische hematurie werden vaak beschouwd als patiënten met een ernstigere vorm van lupus nefritis en zouden bijgevolg dus eerder een nierbiopsie krijgen. Meerdere studies verspreiden nochtans twijfel over de mogelijkheid van het voorspellen van onderliggende renale aandoeningen d.m.v. urinaire bevindingen. Hoewel er een algemene trend is dat patiënten met meer proliferatieve vormen van lupus nefritis hogere waarden van proteïnurie en gestegen serum creatinine hadden, was de correlatie met het urinesediment minder uitgesproken.¹⁷

Henoch-Schönlein purpura nefritis

Bij Henoch-Schönlein purpura is bij 5% van de patiënten de primaire langetermijncomplicatie een renale aandoening. De renale aandoening kan zich manifesteren door hematurie, met of zonder proteïnurie, occasioneel nefrotisch syndroom, of soms nierfalen met snelle progressieve glomerulonefritis. Kinderen met een normale urine analyse hebben geen nieraandoeningen op lange termijn. Het risico op een nieraandoening op lange termijn is 12 keer hoger als de initiële presentatie

gecompliceerd is met een nefrotisch syndroom dan bij patiënten met enkel een abnormale urine analyse. Bovendien is het risico 2.5 keer hoger bij vrouwen dan bij mannen.⁴

Diabetische nefropathie

Ongeveer 40% van de patiënten met type 1 of 2 diabetes mellitus ontwikkelen nefropathie, maar door een hogere prevalentie van type 2 DM (90%) tov type 1 (10%), heeft de meerderheid van de patiënten met diabetische nefropathie DM type 2. In patiënten met types 1 en 2 DM, microalbuminurie ontstaat 5 à 10 jaar na het ontstaan van diabetes. Huidige richtlijnen bevelen aan om patiënten met type 1 DM 5 jaar na diagnose te testen voor microalbuminurie en nadien jaarlijks. Omdat het tijdstip van ontstaan bij type 2 vaak niet gekend is, beveelt men aan om hierbij de patiënten te testen bij ontdekking van de aandoening en nadien jaarlijks. Patiënten met kleine toenames in albuminurie bereiken typisch positieve teststrookscreening van proteïnurie (>300mg albuminurie) na 5 à 10 jaar na het ontstaan van vroegtijdige albuminurie. Diagnose van diabetische nefropathie wordt meestal gesteld zonder renale biopsie. Hoewel de aanwezigheid van microalbuminurie in type 1 DM een belangrijke risicofactor is voor progressie naar macroalbuminurie, ontwikkelt slechts 50% van de patiënten macroalbuminurie over de volgende 10 jaar. Eenmaal macroalbuminurie aanwezig is, is er een gelijkmatige vermindering in GFR, en ongeveer 50% van de patiënten bereikt eindstadium renaal falen na 7 à 10 jaar.³⁵

Hoewel het urinair sediment meestal als onopmerkelijk gedefinieerd wordt, naast occasioneel erythrocyten, in diabetische nefropathie, werd er in de studie van *Heine et al.* frequent hematurie gevonden in patiënten met diabetische nefropathie. Microscopische hematurie (≥ 8 erythrocyten/ μL) werd bij 62% van de patiënten met diabetische nefropathie gevonden o.b.v. een enkel urinestaal. Bij onderzoek van drie consecutieve urinestalen was de prevalentie 82% in geval van diabetische nefropathie en 95% bij glomerulonefritis. Daarentegen werd zeldzaam acanthocyturie aangetroffen bij diabetische nefropathie. Daarom zou urinemicroscopie deel moeten uitmaken van de niet-invasieve diagnostische work-up van diabetici met proteïnurie om diabetici met hematurie te identificeren die mogelijk lijden aan een niet-diabetische glomerulonefritis.^{18,34}

Medicatie toxiciteit

Toxiciteit van bepaalde medicatie kan beoordeeld worden d.m.v. urine microscopie. Bijvoorbeeld Indinavir, Acyclovir en Amoxicilline zijn geassocieerd met variabele graden van leukocyturie, kristallurie en cellulaire cilinders.¹⁹

2. Hoe betrouwbaar is manueel microscopisch onderzoek?

Algemeen

Microscopisch onderzoek wordt traditioneel manueel uitgevoerd op een sediment van een gecentrifugeerd urinestaal. Dit proces is tijdrovend en arbeidsintensief. Bovendien vraagt het geavanceerde training van de analisten om accurate interpretatie te garanderen en is het gevoelig voor fouten door incomplete heroplossing van het sediment of degradatie van gevormde elementen gedurende centrifugatie of staalopslag.²⁰

Anderzijds kan men microscopisch onderzoek verrichten op niet-gecentrifugeerde urinestalen en eventueel gebruik maken van telkamers. De *European urinalysis guidelines* bevelen aan om

gestandaardiseerde procedures te hanteren voor het analyseren van urinestalen en tevens fasecontrastmicroscopie gekoppeld met gepolariseerd licht te gebruiken om urinesedimenten te onderzoeken. Meer bepaald wordt gesuggereerd stalen zo snel mogelijk te analyseren om lyse van urinaire partikels tegen te gaan ofwel als alternatief houdbaarheidsmiddelen toe te voegen.²¹

Pre-analyse

De meest frequente fouten gebeuren vooraleer het staal toekomt op het laboratorium. Praktijkrichtlijnen omtrent collectie en transport van urinestalen naar het klinische laboratorium zijn uiterst belangrijk omdat diagnostische en therapeutische beslissingen gebaseerd zijn op de resultaten van de urine analyse. Variabelen zoals collectiemethode, container, transport en opslag kunnen het resultaat van de analyse significant beïnvloeden.^{1,2}

Bijgevolg zouden geschreven, eenvoudige en heldere instructies voor correcte urinecollectie aan patiënten moeten gegeven worden (Tabel 1). Omdat urinaire partikels snel kunnen lyseren na collectie, meer bepaald wanneer urinaire pH alkalisch en/of het soortelijk gewicht of osmolaliteit laag is, is het aanbevolen om het staal binnen 2 à 4 uren na afname te analyseren.⁵

Tabel 1. Voorbeelden van instructies voor urinecollectie⁵

Voorbeelden van instructies voor urinecollectie

Vermijd fysieke inspanning (bv. lopen of voetbalmatch) 72 uren voor collectie om door inspanning geïnduceerde proteïnurie en/of hematurie of cilindrurie te vermijden.

Vermijd urine analyse gedurende menstruatie o.w.v. mogelijke contaminatie met bloed, die kan leiden tot een foutieve diagnose van hematurie.

In geval van mild genitaal verlies, gebruik interne tampons om contaminatie te vermijden.

Was uw handen.

Was de urethrale meatus en maak schoon met een doek.

Collecteer urine na de eerste portie mictie (*midstream*) om contaminatie te verminderen van urethrale en/of vaginale cellen en secreties.

Sluit de container volledig af en schrijf uw naam duidelijk en voluit op het label.

Bewaarmiddelen

Wanneer stalen niet binnen de 2 uren na afname kunnen verwerkt worden, wordt aanbevolen het urinestaal te conserveren door het in de koelkast te plaatsen, in te vriezen (niet geschikt voor microscopie), een specifiek chemisch preservatief toe te voegen of een transportmedium te gebruiken.¹ *Kouri et al.* hebben de effecten van 4 bewaarprocedures uitgetest op 6 urinaire partikels en werden deze onderling vergeleken en t.o.v. de traditionele opslag van stalen zonder bewaarmiddelen. De beste resultaten zijn bekomen met gelyofiliseerd boraat-formaatsorbitol poeder op 20°C (Becton Dickinson and Company Preanalytical Solutions). Daarnaast bekwam men goede resultaten bij koelen van stalen op 4°C zonder bewaarmiddelen en door toevoegen van een deel 10% formaldehyde bij 9 delen urine.^{21,22} Anderzijds gaan bij stalen die op temperaturen tussen 2°C en 8°C bewaard worden, gemakkelijker fosfaten en uraten neerslaan waardoor het onderzoek moeilijk en inaccuraat wordt. Als alternatief kan formaldehyde, glutaraaldehyde en *cell-FIX* (Becton Dickinson and Company) gebruikt worden als bewaarmiddelen voor urine, alhoewel deze middelen het voorkomen van partikels kunnen veranderen. Bijgevolg zou men zo goed mogelijke inspanningen moeten verrichten om alle stalen binnen termijn te analyseren.⁵

Inter-observer variabiliteit

Om de betrouwbaarheid van manuele fasecontrastmicroscopie na te gaan, werd op LAG een kleinschalig experiment uitgevoerd waarbij op 51 urinestalen door twee opgeleide assistenten, onafhankelijk en geblindeerd voor de resultaten van de teststrook en flowcytometer, microscopisch onderzoek werd uitgevoerd. De urinestalen werden onder een fasecontrastmicroscop met 400x vergroting geanalyseerd gebruik makend van Uriglass (A.Menarini, Italië) wegwerpbare telkamers. De resultaten werden geanalyseerd voor rode bloedcellen, witte bloedcellen en pathologische cilinders (Tabel 2-4). Nadat de resultaten in categorieën werden onderverdeeld, werd aan de hand van kruistabellen het aantal majeure discordante resultaten bepaald (verschil van ≥ 2 categorieën). Voor RBC en WBC werden 7.8% majeure discordante resultaten vastgesteld en voor PAT liep het aantal op tot 15.7%. Op basis van de kruistabellen werd d.m.v. Analyse-it (Analyse-it Software, Ltd) Cohen's Kappa berekend: voor RBC, WBC en PAT werd respectievelijk een kappawaarde van 0.56, 0.46 en 0.41 bekomen overeenstemmend met een matige overeenkomst. De inter-observer variabiliteit bij manuele fasecontrastmicroscopie kan te wijten zijn aan subjectieve interpretatie van de elementen in het urinestaal en aan de variatie door staalname uit het moederstaal (*sampling error*).

Tabel 2. Inter-observer variabiliteit rode bloedcellen

Inter-observer variabiliteit RBC							
Manuele microscopie 1 (M)	Manuele microscopie 2 (MM)						
		MM0-10	MM10-25	MM25-50	MM50-200	MM>200	Totaal
	M0-10	18	5	2	0	0	25
	M10-25	3	2	1	1	0	7
	M25-50	0	1	4	1	1	7
	M50-200	0	0	1	4	0	5
	M>200	0	0	0	1	6	7
	Totaal	21	8	8	7	7	51

Tabel 3. Inter-observer variabiliteit witte bloedcellen

Inter-observer variabiliteit WBC							
Manuele microscopie 1 (M)	Manuele microscopie 2 (MM)						
		MM0-10	MM10-25	MM25-50	MM50-200	MM>200	Totaal
	M0-10	14	11	1	0	0	26
	M10-25	0	3	2	2	0	7
	M25-50	1	0	1	1	0	3
	M50-200	0	0	0	5	0	5
	M>200	0	0	0	3	7	10
	Totaal	15	14	4	11	7	51

Tabel 4. Inter-observer variabiliteit pathologische cilinders

Inter-observer variabiliteit PAT				
Manuele microscopie I (M)	Manuele microscopie 2 (MM)			
		MM0	MMI	Totaal
	M0	39	3	42
	M1	5	4	9
	Totaal	44	7	51

Winkel et al. voerden 3 experimenten uit om de relatieve bijdrage van de staalvoorbereiding en aflezing door de analist, de tijdsspanne tussen ontvangst en analyse van het staal en het effect van de gebruikte microscoop na te gaan bij het microscopisch onderzoek van een urinesediment. In een eerste experiment werd de invloed van verschillende analisten en het gebruik van verschillende microscopen geëvalueerd. Er werd een significante variatie tussen verschillende analisten gezien in RBC-, WBC telling en ratio's tussen beide tellingen. De variatie te wijten aan de microscoop of het tijdsverschil was niet significant verschillend van de randomvariatie in het experiment. Ten tweede werden de verschillende stappen in de voorbereiding van het plaatje en het werkelijk aflezen afzonderlijk bekeken. In deze studie werd de geobserveerde systematische variatie tussen analisten voor witte bloedceltelling, som van RBC- en WBC tellingen en de ratio's tussen beide tellingen toegeschreven aan de voorbereidingstechnieken. Er was geen significant verschil tussen technologen onderling te wijten aan de aflezing. Ten laatste werden de verschillende stappen in het klaarmaken van een plaatje onderling vergeleken. Hieruit bleek de significante variatie onder technologen voornamelijk een resultaat te zijn van variabiliteit in het overgieten en mengen van het staal.²³

3. Is automatische urinemicroscopie een volwaardig alternatief voor manuele microscopie?

Algemeen

Aangezien visuele microscopie arbeidsintensief en tijdrovend is, draagt het dus onvermijdelijk bij aan een grotere kost. Omwille van de beperkingen van manuele microscopie is men oplossingen gaan zoeken in automatisatie. Zo zijn flowcytometers zoals UF-100 en zijn opvolger UF-1000i en op beelden gebaseerde toestellen zoals Iris iQ200 en sediMAX op de markt verschenen.²⁴

Flowcytometrie

UF-100 en UF-1000i

Sysmex bracht eerder het UF-100 systeem op de markt dat gebruik maakt van flowcytometrie en fluoroforen om cellen en cilinders te categoriseren in niet-gecentrifugeerde urine naar gelang hun fluorescentie, grootte, impedantie en *forward scattered* licht. In 2007 werd de UF-1000i (*FDA-cleared*) geïntroduceerd, een nieuwe generatie aan partikelanalyser die tellingen van WBC, RBC, EPI en bacteriën met hoge precisie uitvoert. Sensitiviteit voor PAT, CRY, YEA, SPRM, MUC en abnormale cellen zijn verbeterd, maar specificiteit is nog altijd laag voor differentiatie van deze elementen. Daardoor moeten deze tellingen geconfirmeerd worden d.m.v. manuele microscopie. Criteria kunnen gespecificeerd worden en eveneens kunnen vlaggen ingevoerd worden voor bevestiging door

manuele microscopie. De resultaten worden weergegeven als *scattergrams* en kunnen door de gebruiker bekeken worden.²⁰

Geautomatiseerde urine microscopie analyser

sediMAX

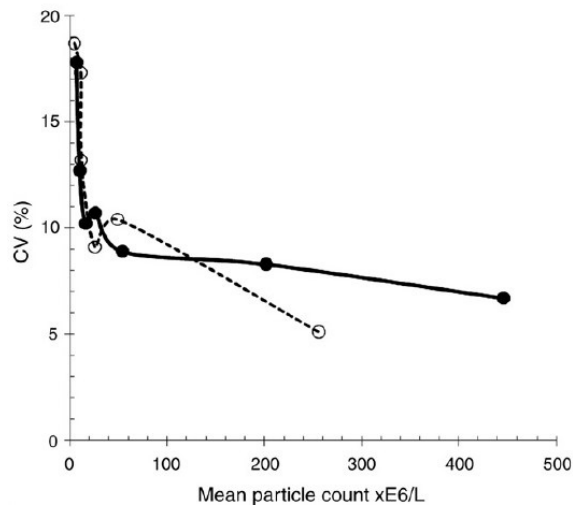
Toestelspecificaties

De meetprincipes van sediMAX, een volledig geautomatiseerd toestel, ook wel UriSed genoemd, is gebaseerd op de praktijk van visuele microscopische urinesedimentanalyse. Het toestel is in staat om urinaire partikels te detecteren, te tellen en te visualiseren na aanrijking door centrifugatie in een specifiek ontworpen wegwerpbaar cuvette. De analyser heeft minstens 2mL urine in een testtube nodig waarvan 200µL gepipetteerd wordt in een cuvette en vervolgens 10s gecentrifugeerd wordt op 2000 rpm (260g) waardoor de urinaire partikels in een laag op de bodem van de cuvette verzameld worden. De stalen worden microscopisch geëvalueerd onder 15 velden op 400x vergroting. Het toestel maakt 15 digitale beelden doorheen een ingebouwde lichtmicroscop tijdens verschillende stadia van het proces. Analyse van 15 digitale beelden komt overeen met analyse van 2.2µL urine. Data worden geëvalueerd d.m.v. hoge kwaliteit beeld processing software, AIEM, die in staat is specifieke urinaire elementen te herkennen op het ruwe beeld zonder gebruik te maken van de eigenschappen van de parameters. Daarna worden de partikels geclassificeerd onder categorieën zoals RBC, WBC, EPI, NEC, HYA, PAT, CRY, CaOxm, CaOxd, TRI, URI, BAC, YEA, SPRM en MUC (Figuur 1-8). Resultaten worden uitgedrukt in $\times E6/L$, n/hpf of semi-kwantitatief (1+, 2+, 3+ of 4+). Bij analyse van 15 beelden heeft sediMAX een capaciteit van 100 stalen/uur. Daarnaast worden stalen met een hoge partikel telling afgevlagd als *crowded* en is het aanbevolen om de beelden opnieuw te beoordelen.^{24,25,36}

Precisie en lineariteit

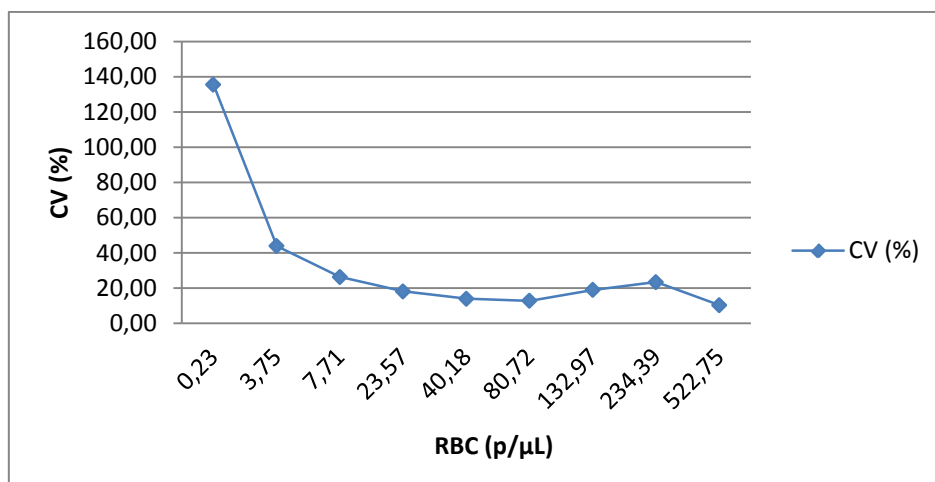
Within-run en between-run precisie

Zaman et al. voerden een precisie- en lineariteitsstudie uit voor RBC en WBC met Kova Liqua-Trol level 1 en level 2 (Hycor Biomedical, VSA). De within-run imprecisie van de sediMAX werd geëvalueerd door verschillende urinaire concentraties van RBC en WBC 20 maal te analyseren. De imprecisie (CV) voor RBC was 17.8% voor een gemiddelde concentratie van $7 \times E6/L$ en het nam af tot 6.7% voor een gemiddelde concentratie van $447 \times E6/L$. Voor WBC was de within-run CV 16.6% bij een gemiddelde concentratie van $4 \times E6/L$ en dit nam af tot 4.4% voor een gemiddelde WBC concentratie van $258 \times E6/L$ (Figuur 9). Voor de between-run imprecisie werden twee verschillende niveau's van gefixeerde RBC en WBC in duplo geanalyseerd gedurende 12 dagen. Voor RBC was de between-day CV 7.2% bij een gemiddelde RBC concentratie van $283 \times E6/L$ en 14.7% voor een gemiddelde RBC concentratie van $30 \times E6/L$. CV's van 5.4% en 3.0% bij respectievelijk een gemiddelde van $25 \times E6/L$ en $166 \times E6/L$ WBC waren uitstekend.²⁴ *Yüksel et al.* vonden voor de manuele methode hogere CV's dan voor geautomatiseerde systemen, specifiek bij lagere partikel telling. *Akin et al.* rapporteerden voor hun precisiestudie a.d.h.v. KOVA system een within-run CV van 28.7% bij gemiddeld 1.4 RBC/hpf en 7.1% bij gemiddeld 45.7 RBC/hpf. Voor WBC vond men een CV van 30.2% bij 1.2 WBC/hpf en 13.1% bij 37.8/hpf. De between-run imprecisie was 33.3% bij 1.5 RBC/hpf en 10.1% bij 44.7/hpf, en voor WBC bekwam men 30.8% voor 1.3/hpf en 15.2% voor 36.9/hpf.²⁶

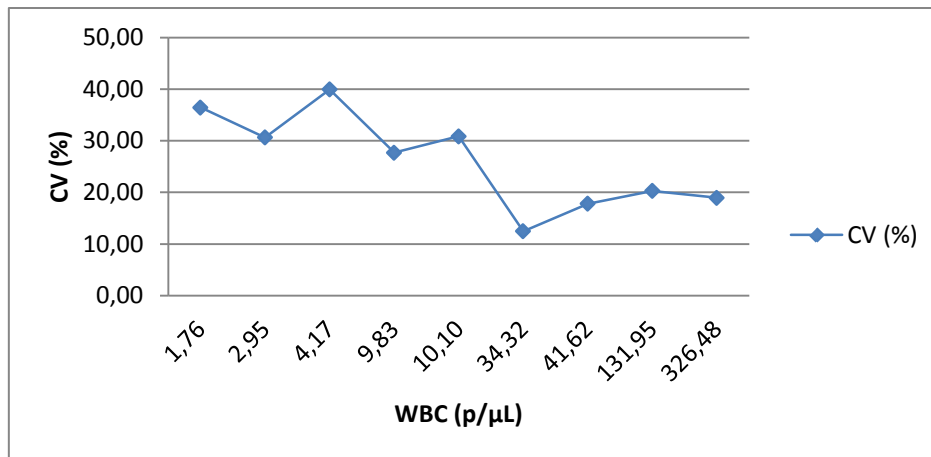


Figuur 9. Within-run precisie profiel voor RBC (●) en WBC (○).²⁴

Op LAG voerden wij eveneens een precisiestudie uit met urinestalen die minstens 15 keer na elkaar bepaald werden voor de within-run imprecisie en met 2 levels Kova Liqua-Trol (met gekende waarden voor RBC en WBC³⁷) gedurende 10 dagen in duplo voor de between-run imprecisie. Hierbij bekwamen we voor RBC een within-run imprecisie van 43.9% bij een gemiddelde van 3.75 RBC/ μ L en de imprecisie nam af tot 10.4% bij een gemiddelde van 522.75 RBC/ μ L (Figuur 10). De within-run imprecisie voor WBC was 36,4% bij een gemiddelde van 1.76 WBC/ μ L en 19% bij 326.48 WBC/ μ L (Figuur 11). Voor RBC bekwamen we een between-run CV van 15.23% bij een gemiddelde van 149.38 RBC/ μ L en voor WBC een CV van 19.74% bij een gemiddelde van 75.38 WBC/ μ L. Aangezien level 2 een te lage concentratie aan RBC en WBC bevat, was het niet mogelijk om de between-run CV te berekenen voor deze parameters.



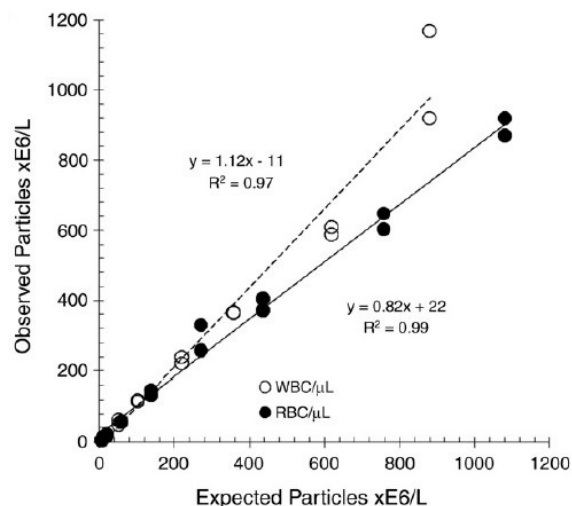
Figuur 10. Within-run precisieprofiel voor RBC (studie LAG).



Figuur 11. Within-run precisieprofiel voor WBC (studie LAG).

Lineariteit

Zowel voor RBC als voor WBC vonden *Zaman et al.* een goede lineariteit tussen $10 \times E6/L$ tot $1000 \times E6/L$ en $5 \times E6/L$ tot $800 \times E6/L$ met de volgende regressievergelijkingen en kwadraten van correlatiecoëfficiënten: $y=0.82x+22$ ($R^2=0.99$) voor RBC en $y=1.12x-11$ ($R^2=0.97$) voor WBC (x is het verwachte aantal $\times E6/L$) (Figuur 12).²⁴



Figuur 12. Lineariteit voor voor RBC (●) en WBC (○).²⁴

De lineariteitsstudie uitgevoerd op LAG toonde een goede lineariteit aan voor RBC en WBC. Tussen $1800 RBC/\mu L$ en $150 RBC/\mu L$ bekwamen we een regressievergelijking van $y=0.829x+268.69$ met een bijhorend kwadraat van de correlatiecoëfficiënt van $R^2=0.97$. Voor WBC werd de volgende regressievergelijking en kwadraat van de correlatiecoëfficiënt gevonden tussen $1800 WBC/\mu L$ en $180 WBC/\mu L$: $y=0.91x-73,22$; $R^2=0.95$.

Carry-over

Aangezien sediMAX gebruik maakt van een unieke telkamer voor éénmalig gebruik en geen gebruik maakt van reagentia voor urine analyse, werd enkel de carry-over voor stalen door de probe gemeten in de studie van *Zaman et al.* Enkel 3 partikels, namelijk RBC, WBC en bacteriën, zijn frequent in groot aantal aanwezig in het urinestaal, daarom werd carry-over nagekeken voor deze partikels. Drie consecutieve aliquots (a1,a2,a3) van een urinestaal met heel hoge waarden werden 10

maal geanalyseerd gevolgd door 3 opeenvolgende aliquots (b1,b2,b3) met fysiologische oplossing als blanco. Na 10 consecutieve herhaaldelijke metingen voor elk partikel, bleek voor stalen met onmeetbare hoge tellingen, een gemiddelde van min 0.07×10^6 RBC/L, 0 WBC/L en 0.04 CFU/mL (bacteriën) overgedragen op de blanco fysiologische oplossingen. Hierdoor werd besloten dat er geen carry-over is bij sediMAX.²⁴

De carry-over werd tevens nagekeken op LAG voor RBC, WBC en bacteriën. Voor elk van de partikels werden 3 opeenvolgende aliquots van urinestalen met hoge waarden geanalyseerd, gevolgd door 3 opeenvolgende aliquots van fysiologische oplossing. De carry-over voor RBC, WBC en bacteriën was respectievelijk min 0.07 RBC/ μ L, min 0.20 WBC/ μ L en min 8.47 bacteriën/ μ L.

Carry-over werd berekend aan de hand van volgende formule:

$$\text{Carry - over} = \frac{b1 - b3}{a3 - b3} \times 100$$

Diagnostische performantie

Zaman et al. onderzochten de diagnostische performantie karakteristieken van sediMAX. Sensitiviteit was voor alle elementen behalve voor pathologische cilindres $\geq 80\%$ in I of beide studies. Positieve predictieve waarden waren ongeveer 90% voor RBC en WBC. In beide studies werd de overeenkomst tussen sediMAX en fasecontrastmicroscopie nagegaan a.d.h.v. lineair gewogen kappa (K). Voor RBC, WBC en EPI vond men een substantiele overeenkomst, voor gisten een matige overeenkomst en voor NEC, PAT en HYA een tamelijke overeenkomst.²⁴

Akin et al. vonden bij vergelijking van UriSed en manuele microscopie voor RBC en WBC Se van respectievelijk 68.7% en 75.9%, Sp van 98.8% en 97.6%, PPV van 95.8% en 90.2% en NPV van 89.2% en 93.4%.²⁶

Op LAG evalueerden we eveneens de mogelijkheden van sediMAX om urinestalen correct te identificeren met normale of abnormale aantallen van gevormde elementen in vergelijking met fasecontrastmicroscopie. Voor RBC en WBC werden respectievelijk 5.2% en 7.1% majeure discordante resultaten gevonden (verschil van ≥ 2 categorieën). Cohen's Kappa werd berekend (zonder reviews) en onthulde substantiële overeenkomst voor EPI (K=0.62), matige overeenkomst voor RBC en WBC (voor beide K=0.42) en tamelijke overeenkomst voor NEC, PAT en HYA (respectievelijk K=0.21, K=0.34, K=0.23). Voor PAT en NEC werden ook Se, Sp, PPV en NPV nagekeken: Se waren respectievelijk 27.8% en 26.7%, Sp 97.8% en 91.2%, PPV 62.5% en 42.1% en NPV 91.2% en 83.8%. Inclusief reviews waren de Se respectievelijk 50% en 47.6% en de Sp 98.1% en 92.3%.

Iris iQ200

Toestelspecificaties

In de Iris iQ200 analyser worden urinaire partikels in beeld gebracht in een planaire flow cel die partikels hydrodynamisch oriënteert en gevangen houdt in het focaal vlak van het microscoopobjectief. De iQ200 gebruikt APR om 12 partikels te classificeren en te kwantificeren. Resultaten kunnen automatisch gerapporteerd worden a.d.h.v. gebruiker-gedefinieerde criteria. Iris iQ200 maakt 500 beelden van elk urinestaal, vergelijkt deze beelden met standaardbeelden en classificeert partikels op basis van weefsel, contrast, vorm en grootte van het beeld. Na classificatie worden de beelden aan de gebruiker getoond en kunnen correcties en nieuwe definities aangebracht worden.²⁶

Methodevergelijking

Methodevergelijking UF-100i en sediMAX vs. manuele fasecontrastmicroscopie

Op LAG werd de correlatie tussen de UF-100i enerzijds, sediMAX anderzijds en manuele fasecontrastmicroscopie onderzocht aan de hand van een vergelijking d.m.v. 184 random uit de routine geselecteerde patiëntenstalen. De patiëntenstalen werden geanalyseerd op AutionMAX AX4280, UF-100i, sediMAX en ten slotte werd manuele fasecontrastmicroscopie verricht d.m.v. wegwerpbaar Uriglass telkamers door twee onafhankelijke microscopisten. Aangezien klinische interpretatie categorisch is, werden resultaten voor RBC, WBC, HYA en EPI georganiseerd in 5 categorieën. Daarnaast werden resultaten voor PAT, NEC en CRY in 2 categorieën ingedeeld. Alle resultaten werden uitgezet in kruistabellen waarbij majeure discordante resultaten (verschil van ≥ 2 categorieën) bepaald werden en voor elke parameter werd een niveau van overeenkomst bepaald a.d.h.v. Cohen's Kappa.

Vergelijking UF-100i en manuele fasecontrastmicroscopie

Voor 174 van de 184 stalen was het mogelijk om een vergelijking tussen UF-100i en fasecontrastmicroscopie te maken (voor 10/184 werd flowcytometrie niet aangevraagd). We includeerden 115/174 stalen (59 stalen werden gecategoriseerd als niet-betrouwbaar a.d.h.v. binnenhuiscriteria²⁷). In totaal werden 33.9% van de stalen als review aangegeven, d.w.z. manuele microscopie noodzakelijk. Voor RBC en WBC bekwamen we respectievelijk 6.1% en 4.3% majeure discordante resultaten (Tabel 5,6).

Tabel 5. Vergelijking manuele fasecontrastmicroscopie en UF-100i voor RBC (studie LAG).

Vergelijking manuele microscopie-UF-100i RBC							
Manuele microscopie	UF-100i						
		U0-10	U10-25	U25-50	U50-200	U>200	Totaal
	M0-10	53	10	5	0	0	68
	M10-25	7	11	5	2	0	25
	M25-50	0	5	4	1	0	10
	M50-200	0	0	0	4	1	5
	M>200	0	0	0	0	7	7
	Totaal	60	26	14	7	8	115

Tabel 6. Vergelijking manuele fasecontrastmicroscopie en UF-100i voor WBC (studie LAG).

Vergelijking manuele microscopie -UF-100i WBC							
Manuele microscopie	UF-100i						
		U0-10	U10-25	U25-50	U50-200	U>200	Totaal
	M0-10	58	10	2	0	0	70
	M10-25	7	8	3	0	0	18
	M25-50	1	3	2	3	0	9
	M50-200	0	0	5	4	1	10
	M>200	2	0	0	1	5	8
	Totaal	68	21	12	8	6	115

Cohen's kappa-waarden waren voor RBC, WBC en EPI matige levels, respectievelijk 0.50, 0.44 en 0.43. Voor NEC en HYA was er een geringe overeenkomst (beide $K=0.10$) en voor PAT zo goed als geen overeenkomst ($K=0$).

Vergelijking sediMAX en manuele fasecontrastmicroscopie

Een vergelijking tussen sediMAX en manuele fasecontrastmicroscopie werd gemaakt voor 184 stalen waarbij 155 stalen geïnccludeerd werden (29 op regels van de firma gebaseerde reviews geëxcludeerd). In totaal werden 15.6% stalen als *crowded* aangegeven en was het herbekijken van de beelden/manuele fasecontrastmicroscopie noodzakelijk.

Voor RBC en WBC werden respectievelijk 5.2% en 7.1% majeure discordante resultaten bevonden (Tabel 7,8):

Tabel 7. Vergelijking manuele fasecontrastmicroscopie en sediMAX voor RBC (studie LAG).

Vergelijking manuele microscopie-sediMAX RBC							
Manuele microscopie	SediMAX						
		S0-10	S10-25	S25-50	S50-200	S>200	Totaal
	M0-10	79	3	0	0	0	82
	M10-25	24	4	1	0	0	29
	M25-50	5	12	1	0	0	18
	M50-200	1	2	3	7	0	13
	M>200	0	0	0	2	11	13
	Totaal	109	21	5	9	11	155

Tabel 8. Vergelijking manuele fasecontrastmicroscopie en sediMAX voor WBC (studie LAG).

Vergelijking manuele microscopie - sediMAX WBC							
Manuele microscopie	SediMAX						
		S0-10	S10-25	S25-50	S50-200	S>200	Totaal
	M0-10	74	5	0	0	0	79
	M10-25	22	8	1	0	0	31
	M25-50	5	4	5	0	0	14
	M50-200	1	4	6	8	0	19
	M>200	0	1	1	5	5	12
	Totaal	102	22	13	13	5	155

We hebben geprobeerd om een verklaring te vinden voor de majeure discordante resultaten. Verklaringen voor majeure discordante resultaten bij RBC werden gevonden in *sampling error*, gezien bij 6/8 majeure discordanties effectief weinig RBC te zien waren op de beelden, en bij het missen van *ghost cells* (RBC met verminderde hoeveelheid hemoglobine). Voor WBC werd een verklaring gevonden in een moeilijk onderscheid tussen RBC en WBC bv. i.g.v. dysmorfe RBC bij 2/12 stalen, een onderschatting van sediMAX (2/12), wazige beelden waardoor de interpretatie bemoeilijkt werd (1/12) en de andere bleven onverklaard.

Omwillen van het aanzienlijk aantal onverklaarde majeure discordante resultaten voor WBC werd een bijkomende studie uitgevoerd op 40 patiëntenstalen die tevens random geselecteerd werden uit de

routine. Hierbij werden 3 majeure discordante resultaten geobserveerd waarbij 1 staal afgevlagd was waardoor we het buiten beschouwing laten. De andere 2 majeure discordante resultaten was enerzijds omdat dysmorphe RBC als WBC werden geteld en anderzijds omdat er een onderschatting gebeurd was door slechte kwaliteit van de beelden door sterke aanwezigheid van mucus.

Aan de hand van Cohen's kappa-waarden bekwamen we een substantieel niveau van overeenkomst voor EPI (K=0.62), matig voor RBC en WBC (beide K=0.42) en tamelijk voor PAT, NEC, HYA (respectievelijk K=0.34, K=0.21, K=0.23).

Discussie

Yüksel et al. rapporteerden een matige correlatie tussen manuele microscopie en Urised met specifiek voor RBC ($r=0.496$) en voor WBC ($r=0.597$) telling, en deze correlaties waren statistisch significant. Eveneens werd een vergelijking gedaan tussen de FUS-100 en manuele microscopie, waarbij men voor RBC en WBC gelijkaardige correlatiecoëfficiënten vond. De FUS-100 was beter voor bacteriën en epitheelcellen, maar de Urised was meer concordant voor kristallen.²⁸

Zaman et al. beschreven een slechtere precisie bij manuele microscopie dan d.m.v. telling door een toestel, specifiek voor hoge aantallen partikels. Er werd een goede correlatie tussen sediMAX en resultaten van visuele microscopie voor RBC en WBC gevonden met Spearman correlatiecoëfficiënten van respectievelijk 0.77 en 0.86, behoorlijk goede correlatie voor squameuze epitheelcellen ($r=0.65$), een matige correlatie voor gisten ($r=0.41$) en een aanvaardbare correlatie voor NEC en ook voor CaOx, hyaline cilinders en pathologische cilinders (respectievelijk $r=0.35$, $r=0.23$ en $r=0.30$).²⁴

SediMAX(/Urised) is hoog productief en is in staat om grote aantallen urinestalen snel en simultaan te analyseren. Ten opzichte van manuele microscopie resulteert dit in een minder tijdrovend en arbeidsintensief proces, een snellere TAT, ter beschikking zijn van beelden en vermindering van inter-observer variabiliteit. In vergelijking met de UF-100 zorgt de sediMAX voor minder reviews, verbruikt het geen reagentia en kan men op de beelden de beoordeling verifiëren. Het systeem kent echter zijn limieten waardoor een deel van de pathologische stalen nog zullen moeten nagekeken worden op de beelden of door manuele microscopie.

Block et al. maakten een vergelijking van de technische specificaties en enkele voor- en nadelen van de Sysmex UF-100, UF-1000i, Iris iQ200, sediMAX en manuele microscopie (Tabel 9,10).²⁰

Kostenbeschouwing

Tijdens een kostenanalyse van de situatie AutionMAX AX4280/UF-100i en het alternatief AutionMAX AX4030/sediMAX mogen we er van uit gaan dat het verbruik van teststrips en wasoplossing alsook de personeelskost hetzelfde is. Voor de UF-100i zijn de reagentia de grootste kostendrijver. Voor de sediMAX (die geen reagentia verbruikt) zijn dit de cuvetten. Indien de firma ons prijzen in dezelfde lijn kan aanbieden, bekomen we een gelijkaardige kostenberekening voor beide situaties.

Tabel 9. Technische specificaties gerapporteerd voor automatische urine sediment analysers.²⁰

	Minimum Sample Volume (mL)	Analytical Volume (mL)	Approximate Cost	Throughput (samples / hour)	Percent Flagged for Manual Review	Particles Quantified (flagged)
Sysmex UF-100 ⁶	4 1 by manual mode	800	Discontinued	86	31-33	—
Sysmex UF-1000i ¹⁸	4 1 by manual mode	800	\$125,000 ^a	100	49	RBC, WBC, EC, casts ^b , bacteria (pathological casts, crystals, small round cells, sperm, yeast, mucus)
Iris iQ200 ⁶	3	2	Contact company	Options available: up to 101 samples per hour	<4 ^c	RBC, WBC, WBC clumps, casts ^b , bacteria, yeast, crystals, mucus, sperm, EC ^d
SediMAX ^{8,12,17}	2	200	No response to request	80	22-25 ^e 47 ^f	RBC, WBC, bacteria, yeast, crystals ^g , EC, casts ^h , small round cells, mucus, sperm
Manual Microscopy	12	One drop	\$5,000 / scope	~10 / FTE	—	RBC, WBC, EC ^d , crystals ^g , casts ^h , bacteria, yeast, parasites, contaminants

^a CLINITEK Atlas® Automated Urine Chemistry Analyzer and the Sysmex UF-1000i™ Urine Cell Analyzer from Siemens, 2012 list price

^b hyaline and unclassified

^c flagged by instrument, review and revision required an average of one minute, 50% required revision

^d squamous and nonsquamous

^e flagged due to discordant results with chemical strip test

^f samples reclassified when WBC is negative and bacteria flags positive, but only small debris is present upon manual review of whole-field images

^g calcium oxalate monohydrate, calcium oxalate dihydrate, uric acid, tri-phosphate

^h hyaline and pathologic

Tabel 10. Samenvatting van voor- en nadelen van 3 automatische urine sediment analysers.²⁰

	Sysmex UF-1000i	Iris iQ200	sediMAX
Advantages	<ul style="list-style-type: none"> Improved bacteria counting and flags for UTI Uses uncentrifuged samples Manual operation for urgent testing 	<ul style="list-style-type: none"> Uses uncentrifuged samples Accurately quantifies bacteria Results may be viewed from archived digital images 	<ul style="list-style-type: none"> No reagents required Results may be viewed from archived digital images Minimal retraining required to interpret images which are similar to manual microscopy
Disadvantages	<ul style="list-style-type: none"> Clinically significant pathologic casts not differentiated from benign casts Flagged results require manual microscopy (40%-70% of samples) dependent on lab practice 	<ul style="list-style-type: none"> Considerable technician training for viewing digital images that are different from manual microscopy Mistakes crystals for RBCs Lacks sufficient resolution to classify all dysmorphic RBC variants prompting manual microscopy 	<ul style="list-style-type: none"> Ultracentrifugation of sample may cause particle loss Mistakes yeast for RBC Mistakes ECs for WBCs Not FDA-approved

4. Is de combinatie van teststrooscreening en automatische urinemicroscopie nuttig?

Op LAG wordt momenteel gebruik gemaakt van de UF-100i en de AutionMAX AX4280 waarbij informatie van beide toestellen gekoppeld wordt aan de hand van *cross-checks*. Op basis van dit systeem hebben we een evaluatie van de koppeling van de sediMAX en AutionMAX AX4030 uitgevoerd.

Experiment

Gedurende één dag werd een totaal van 336 stalen uit routine geanalyseerd door de straat van AutionMAX AX4030 en sediMAX. Vooraf werden regels, die de resultaten van de teststrook en de automatische urinemicroscopie combineren, ingebouwd in de sedisoft software (A.Menarini, Italië).

Op 336 stalen werden 38% stalen afgevlagd door sedisoft waarvan 10% door sediMAX als review werd aangegeven. Het aantal maal dat de regels werden aangegeven staat vermeld in Tabel 11. Gezien de regels HYA01, HYA02 en HYA03 weinig effectief waren ging onze voorkeur naar het weglaten van deze *cross-checks* waardoor er in totaal nog 28% stalen werden afgevlagd. Voor dit

experiment hebben we van de meeste reviewstalen verdunningen gemaakt, maar gezien de mogelijke amplificatie van fouten maken we bij voorkeur geen gebruik van verdunningen.

Tabel 11. Cross-checks tussen AutionMAX en sediMAX.

Regel	Cross-check AutionMAX - sediMAX	Frequentie
RBC01	Heem > 0,06 mg/dL & RBC <= 5/ μ L	9
RBC02	Heem < 0,03 mg/dL & RBC >= 10/ μ L	5
RBC03	Heem >= 0,2 mg/dL & RBC <= 10/ μ L	6
WBC01	WBC-esterase > 75/ μ L & WBC <= 9/ μ L	0
WBC02	WBC-esterase < 25/ μ L & WBC >= 15/ μ L	20
WBC03	WBC-esterase >= 250/ μ L & WBC <= 15/ μ L	1
HYA01	Eiwitten <10 mg/dL & HYA >=1/ μ L	17
HYA02	Eiwitten +/- & HYA >=2/ μ L	10
HYA03	Eiwitten >=100mg/dL & HYA NEG	18
YEA01	Gist >10/ μ L	10
PAT01	Controleer voor PAT	8

Discussie

Om de kwaliteit van de verzonden resultaten te garanderen, is het creëren van een aantal filters, die de ontvangen informatie van beide systemen (teststrook en geautomatiseerde urine analysetoestellen) verwerken om incongruente resultaten te vermijden een essentiële voorwaarde.²⁹

Akin et al. observeerden in hun studie dat de analytische accuraatheid toenam indien de resultaten geëvalueerd werden d.m.v. teststrookscreening of wanneer visuele schatting werd uitgevoerd. Zij besloten dat een verificatie van microscopische urine analyse d.m.v. manuele microscopie en chemische analyse het aantal klinisch significante fouten zou reduceren, voornamelijk voor de gevallen nabij de limieten van het systeem voor cellen en cilinders.²⁶

Langlois et al. beschreven een mogelijke reductie van de fouten door manuele review door het gebruik van UF-100 gebaseerde beslissingsregels. Een additionele reductie van fouten kon bekomen worden door *cross-checks* van UF-100 en teststrook data (RBC vs. hemoglobine, WBC vs. WBC-esterase, cilinders vs. eiwit, bacteriën vs. nitriet). Bijgevolg konden de *cross-checks* van UF-100 en teststrookdata het aantal manuele reviews doen dalen. Bijvoorbeeld bij hoge RBC- en WBC tellingen wordt het staal afgevlagd voor manuele microscopie. Dus wanneer de RBC- en WBC data van de UF-100 overeenstemmen met de teststrook zou geen additioneel microscopisch onderzoek nodig zijn.³⁰

Aangezien de vals negatieve of vals positieve interfererende factoren van de UF-1000i en AX4280 totaal verschillend zijn, kan de combinatie van deze twee methoden het screeningsvermogen voor gevormde urinaire elementen aanzienlijk verbeteren. In deze studie van *Zhao et al.* werden voornamelijk vals positieve resultaten geobserveerd. Dus de combinatie van UF-1000i en AX4280 verminderde de tijd per test en verbeterde de accuraatheid.³¹

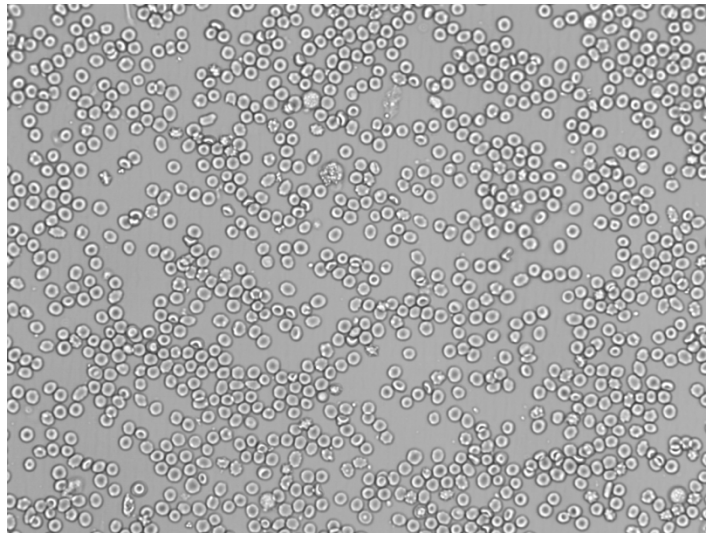
Verder werd de combinatie tussen de teststrook en UriSed nagegaan in kader van de voorspelling van het resultaat van de urineculturen. *Huysal et al.* besloten hun studie dat het gebruik van de UriSed en een teststrookscreening, ofwel apart ofwel in combinatie, het resultaat van de urineculturen niet accuraat kon voorspellen.²⁵

To do/Action

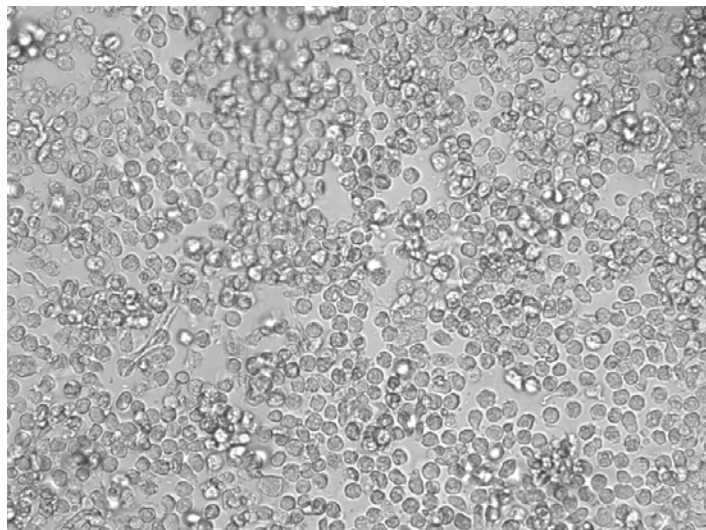
- Implementatie van sediMAX en AutionMAX AX4030 in routine: aanpassen van aanvraagbon en labogids, LIS connectie, documenten opstellen i.k.v. kwaliteitssysteem (validatiedossier, procedures, checklijst,...).
- Communicatie met de clinici m.b.t. rapportering van de resultaten.
- Opleiding van de MLT's en andere betrokken personen in het proces.
- Resultaten uitschrijven in een wetenschappelijk artikel voor publicatie.

Attachment

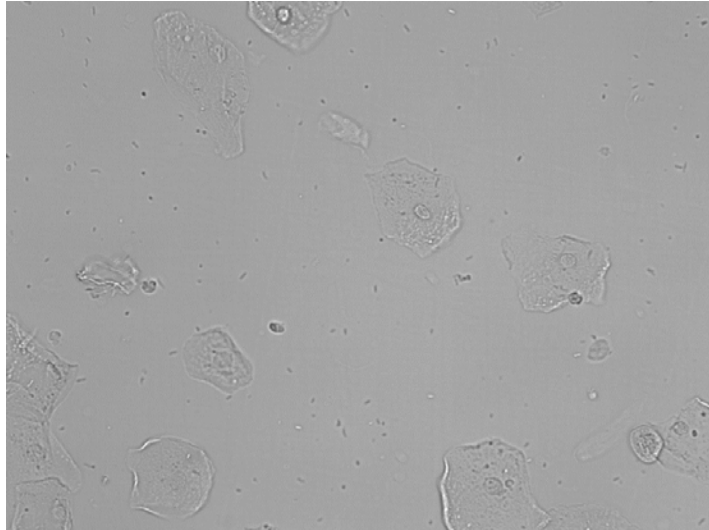
Beeldmateriaal sediMAX



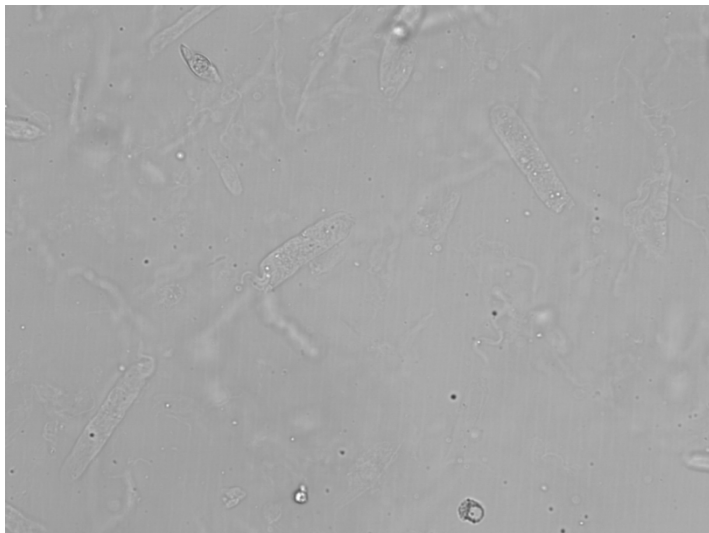
Figuur 1. Rode bloedcellen: hematurie



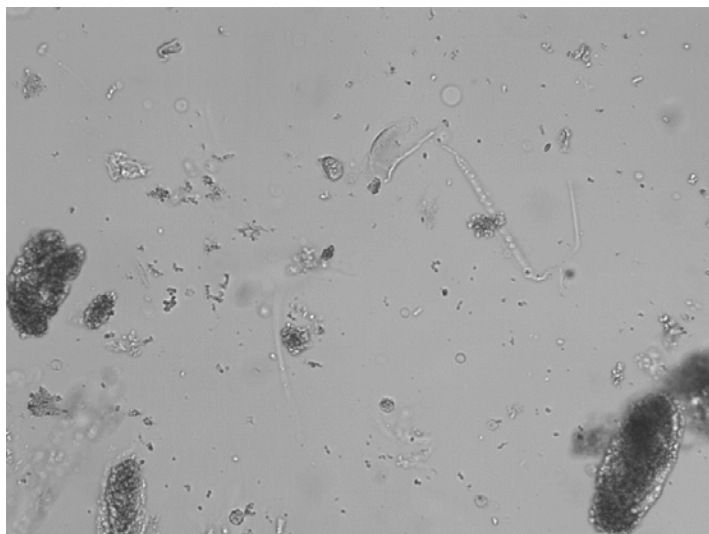
Figuur 2. Witte bloedcellen: pyurie



Figuur 3. Squameuze epitheelcellen en bacteriën



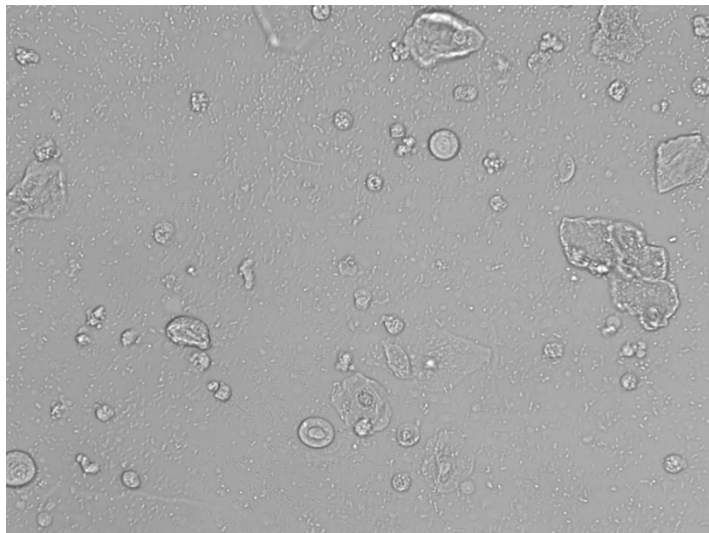
Figuur 4. Hyalijne cilinders en mucus



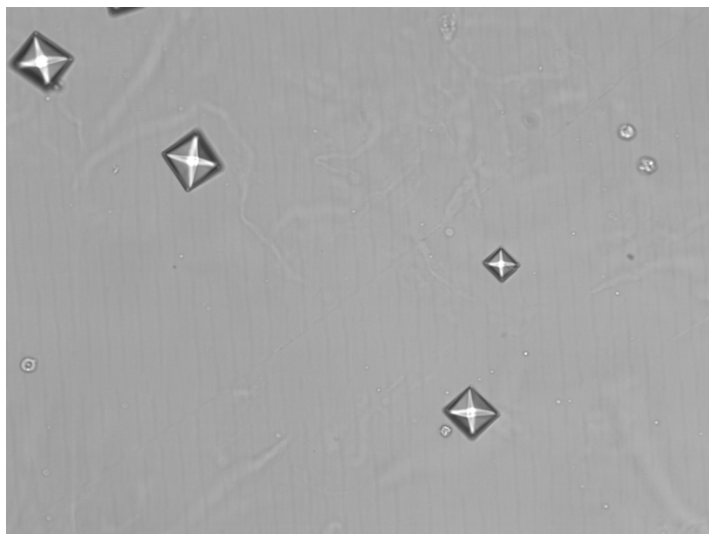
Figuur 5. Pathologische cilinders



Figuur 6. Gisten



Figuur 7. Niet-squameuze en squameuze epitheelcellen



Figuur 8. Calcium-Oxalaat dihydraat kristallen

Lijst van afkortingen:

aHT	Arteriële hypertensie
AIEM	Auto Image Evaluation Module
APR	Auto Particle Recognition
BAC	Bacteriën
C3	Complement 3
CaOxm	Calcium-oxalaat monohydraat kristal
CaOxd	Calcium-oxalaat dihydraat kristal
CFU	Colony forming units
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRY	Kristal
CV	Variatiecoëfficiënt
DM	Diabetes mellitus
EPI	Squameuze epitheelcellen
FSGS	Focale segmentale glomerulosclerose
GFR	Glomerulaire filtratie ratio
HBV	Hepatitis B virus
HCV	Hepatitis C virus
hpf	high power field
HYA	Hyalijne cilinders
K	Lineair gewogen kappa-waarde/ Cohen's kappa
LAG	Laboratoriumgeneeskunde UZ Leuven
MCD	Minimal change disease
MLT	Medisch laboratorium technoloog
MUC	Mucus
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NEC	Niet-squameuze epitheelcellen
NPV	Negatieve predictieve waarde
PAT	Pathologische cilinders
PPV	Positieve predictieve waarde
RBC	Rode bloedcellen
RTEC	Renale tubulaire epitheelcellen
Se	Sensitiviteit
SLE	Systemische lupus erythematosus
Sp	Specificiteit
SPRM	Spermacellen
TAT	Turn-around-time
TRI	Triple fosfaatkristallen
URI	Urinezuurkristallen
WBC	Witte bloedcellen
YEA	Gisten