

Uit de laboratoriumpraktijk

Flowcytometrie op het urinelaboratorium: de SYSMEX UF-100™

M.H. de KEIJZER en R.W. BRANDTS

De resultaten verkregen met een flowcytometer voor geautomatiseerd sedimentonderzoek zijn vergeleken met parameters verkregen uit standaard urinetech- niken. Als gouden standaard is gebruik gemaakt van de microscopische beoordeling van het sediment. Wij concluderen dat voor sedimentonderzoek een flowcytometer goed in te zetten is op het urinelabora- torium, maar dat - voordat een dergelijk apparaat optimaal voor screening benut kan worden - de zuur- graad van de urine gemeten moet kunnen worden en dat tevens de aanwezigheid van glucose en eiwit ge- signaleerd zou moeten kunnen worden.

Trefwoorden: flowcytometrie; urine; urinesediment; dipstick; microscoop

Automatisering en mechanisering zijn begrippen die de afgelopen decennia met name op de hematologi- sche en klinisch-chemische werkplekken met succes zijn geïntroduceerd. Ook het urinelaboratorium zal hier de komende jaren mee geconfronteerd worden. Immers, de beide veel gebruikte technieken bij het al- gemeen routine urine-onderzoek zijn tijdrovend en nauwelijks te kwantificeren (sedimentonderzoek) of roepen vragen op over juistheid en gevoeligheid (dip- stick, al dan niet met geautomatiseerde aflezing) (1,2). Met de volledig geautomatiseerde urine analyzer UF- 100 (Sysmex, Charles Goffin Medical Systems BV, Tiel, Nederland) wordt het mogelijk om ook op het urinelaboratorium te mechatiseren (3). Het appa- raat maakt gebruik van licht en fluorescentie, waar- door de verschillende deeltjes naar grootte en inhoud worden geteld en in de diverse categorieën worden ingedeeld. Deze categorieën zijn: erythrocyten, leuko- cyten, bacteriën, epitheelcellen en cilinders. Ook gist- cellen, kristallen en spermatozyten kunnen gedete- cteerd worden. Tot slot kan onderscheid gemaakt worden tussen dysmorfe en isomorfe rode bloed- cellen. Wij hebben met deze flowcytometer een groot aantal urinemonsters onderzocht en relevante resul- taten hiervan vergeleken met die verkregen met rou- tintechnieken zoals wij die standaard gebruiken.

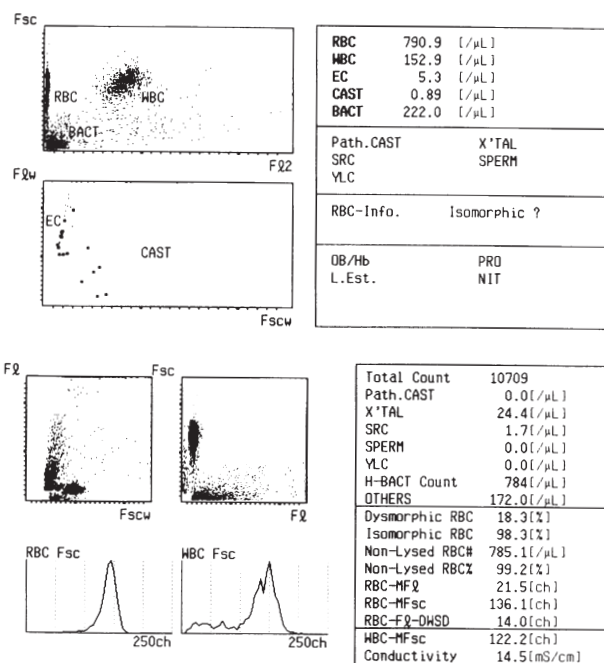
Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis St Radboud, Nijmegen

Correspondentie: Dr. M. H. de Keijzer, Academisch Zieken- huis Nijmegen, 564 CKCL, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
Ingekomen: 06.03.97

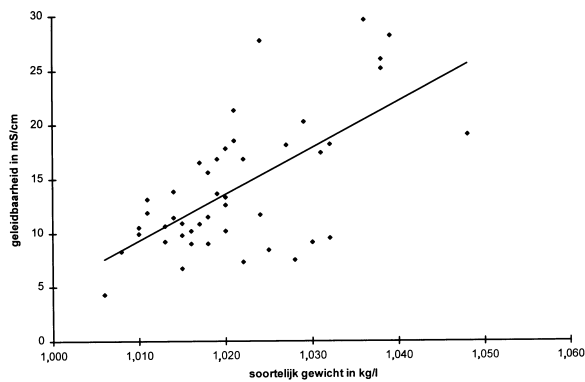
MATERIAAL en METHODEN

Urineflowcytometer UF-100

Het apparaat verricht per uur ongeveer 100 analyses en maakt daarbij gebruik van een monstervolume van 0,8 ml. Na mengen en opzuigen vanuit de monster- buis wordt de geleidbaarheid van de urine gemeten en worden de bestanddelen in de urine m.b.v. twee fluorescerende stoffen gekleurd. Door het phenan- thridine worden nucleïnezuren gekleurd, waarbij het emissielicht recht evenredig is met de hoeveelheid DNA. Deze kleurstof dringt echter moeilijk door in de membranen en daarom wordt als tweede kleurstof carbocyanine gebruikt voor het aankleuren van de celmembranen, kernmembranen en mitochondriën. De fluorescentie van de beide kleurstoffen, in combi- natie met lichtverstrooiing en impedantie maakt het mogelijk de verschillende deeltjes in de urine te kwa- lificeren, te clusteren en te kwantificeren (figuur 1). De meest belangrijke uitslagen worden op een hoofd- scherm gepresenteerd: de aantallen erythrocyten, leuko- cyten, epitheelcellen, cilinders en bacteriën worden per volumehoeveelheid gerapporteerd. Tevens wordt ge- alarmeerd voor de aanwezigheid van pathologische



Figuur 1. Voorbeeld van scattergrams en resultaatvelden van de UF-100.



Figuur 2. Correlatie tussen de geleidbaarheid (in mS/cm) en het soortelijk gewicht (in kg/l) in 48 urinemonsters. $y = 429,6x - 424,6$; $r = 0,64$; $p < 0,001$.

cilinders, “Small Round Cells”, gistcellen, kristallen en spermatozoïden. De aantallen hiervan worden op een tweede scherm vermeld, waarbij - waar mogelijk - ook de morfologie van de aanwezige erythrocyten wordt beschreven. Omdat de diversiteit in de grootte van bacteriën enorm is, wordt m.b.v. een meer gevoelige manier van tellen het totaal aantal bacteriën $< 1 \mu\text{m}$ (H-bact: high sensitivity mode bacteria) apart vermeld.

Dipstick

Op de urinewerkplek van ons laboratorium wordt gebruik gemaakt van Combur9-Test M teststroken, die op een Mditron-M reflectometer (Boehringer Mannheim BV, Almere, Nederland) worden afgelezen. Als een van de volgende criteria wordt overschreden: eiwit $> 250 \text{ mg/l}$; nitriet $> 0,3 \text{ mg/l}$; erythrocyten $> 25 /\mu\text{l}$; leukocyten $> 25 /\mu\text{l}$ vindt alsnog microscopisch onderzoek plaats.

Sediment

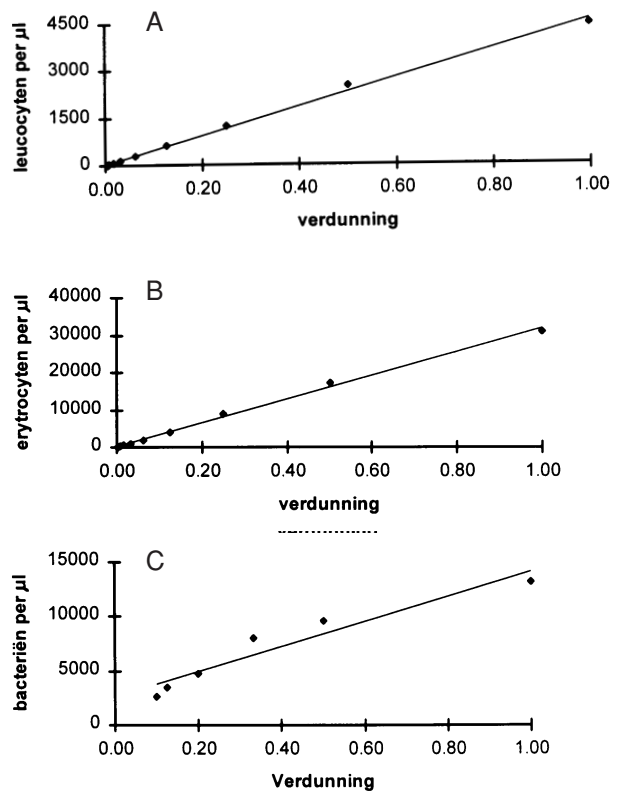
Voor het microscopisch onderzoek wordt ongeveer 9 ml urine in een plastic sedimentbuis met puntbodem gedurende 3 minuten bij 580 g gecentrifugeerd. Na afgieten van de supernatant wordt een deel van het sediment op een objectglasje gegoten en afgedekt. Onderzoek met een lichtmicroscop vindt plaats bij een vergroting van 10 x 40 (eventueel met een polarisatiefilter).

Uitvoering

De urinemonsters zijn porties afkomstig van de polikliniek Interne Geneeskunde en worden binnen twee uur na lozing beoordeeld. Voor de vergelijkingen tussen de resultaten van de dipstick, het sediment en de urineflowcytometer werd een urineportie met de drie technieken direct na elkaar onderzocht. Het soortelijk gewicht van de urines is bepaald met een refractometer (Uricon, Atago, Japan). Voor het vaststellen van de verschillende referentiewaarden met de UF-100 is alleen gebruik gemaakt van urineporties die negatief scoorden met de teststrook en die een $\text{pH} < 7$ hadden.

RESULTATEN

Om in verband met de opzuigsnelheid inzicht in de mate van geconcentreerdheid van de te onderzoeken

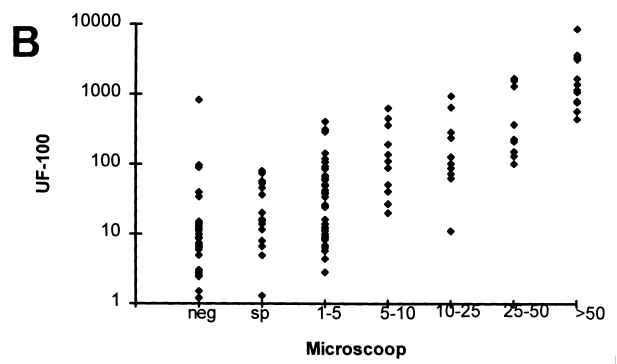
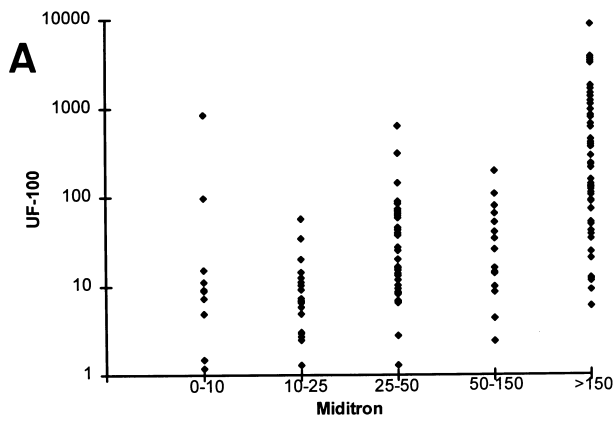


Figuur 3. Lineariteit van de flowcytometer. Monsters met hoge aantallen leukocyten (A), erythrocyten (B) en bacteriën (C); verdunningen zijn gemaakt met fysiologisch zout. A: $y = 4567x + 28$, $r = 0,99$; B: $y = 31709x + 198$, $r = 0,99$; C: $y = 11521x + 2608$, $r = 0,95$.

urines te krijgen, maakt de flowcytometer gebruik van de geleidbaarheid van het monster. Wij hebben van 48 urines zowel de geleidbaarheid als het soortelijk gewicht gemeten (figuur 2) en vonden een significante correlatie tussen beide parameters ($r=0,64$; $p<0,001$). De inter-assay reproduceerbaarheid van de flowcytometer is volgens de specificaties en bedraagt $< 2\%$ voor de erythrocytenmeting ($1000 /\mu\text{l}$) en $< 2,5\%$ voor de leukocytenmeting ($1000 /\mu\text{l}$). De intra-assay reproduceerbaarheid ligt op dit niveau op 1% respectievelijk $1,5\%$.

Lineariteitsonderzoek wordt in figuur 3 getoond. Drie urines met respectievelijk veel erythrocyten, veel leukocyten en een groot aantal bacteriën worden met fysiologisch zout verdund en de aantallen cellen worden in de verschillende verdunningen daarna met de flowcytometer gemeten.

Voor de vergelijking tussen de flowcytometer enerzijds en de microscoop en de dipsticklezer anderzijds is gebruik gemaakt van 138 opeenvolgende urines. Alleen de resultaten betreffende de erythrocyten en de leukocyten worden hier vermeld (figuur 4 en 5). Voor de erythrocyten is de dipstickuitslag in 5 categorieën en de microscopische uitslag in 7 categorieën verdeeld. De dipstickuitslag van de leukocyten wordt alleen als negatief of positief afgegeven, terwijl de microscopische uitslag ook in 7 categorieën is verdeeld. Voor zowel erythrocyten als leukocyten geldt dat de relatie tussen de UF-100 en de microscoop beter is dan die tussen de UF-100 en de dipstick.



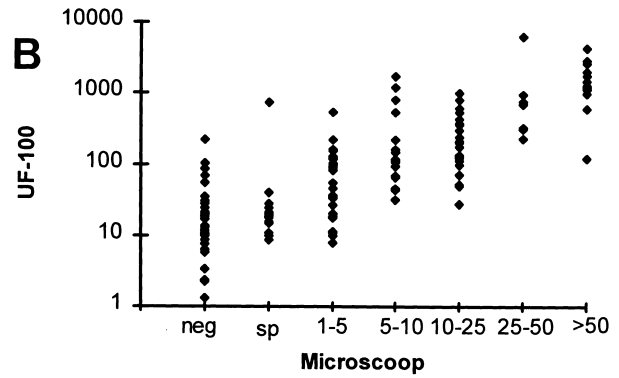
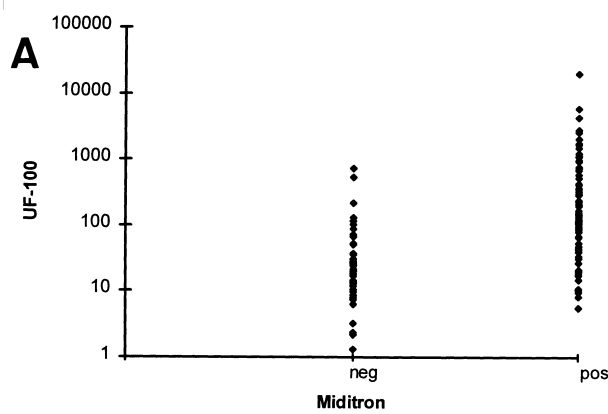
Figuur 4. Vergelijking (n = 138) van het aantal erythrocyten bepaald met

A: de UF-100 (per μl ; logaritmische schaal) en de dipstick-methode (per μl)

	0-10	10-25	25-50	50-150	>150
mediaan	8,9	6,6	16,4	26,0	236,0
gemiddelde	98,7	10,9	57,4	56,7	800,3

B: de UF-100 (per μl ; logaritmische schaal) en de microscop (per gezichtsveld).

	neg.	sp.	1-5	5-10	10-25	25-50	>50
mediaan	8,0	15,9	24,5	101,2	117,2	236,0	1329,0
gem.	40,3	27,8	55,6	179,1	280,9	663,0	2308,4



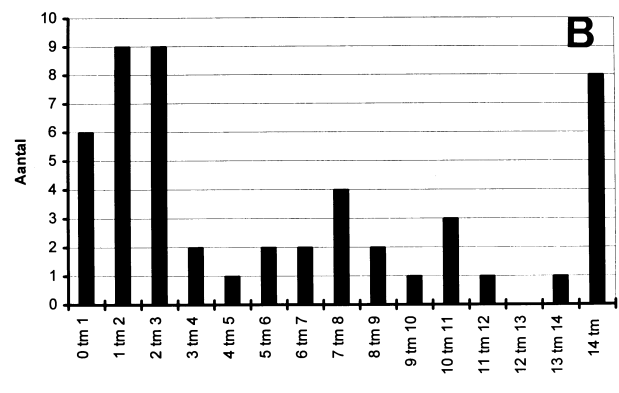
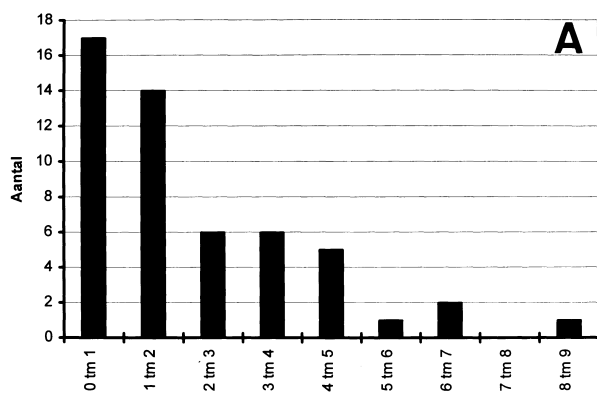
Figuur 5. Vergelijking (n = 138) van het aantal leukocyten bepaald met

A: de UF-100 (per μl ; logaritmische schaal) en de dipstick-methode (per μl)

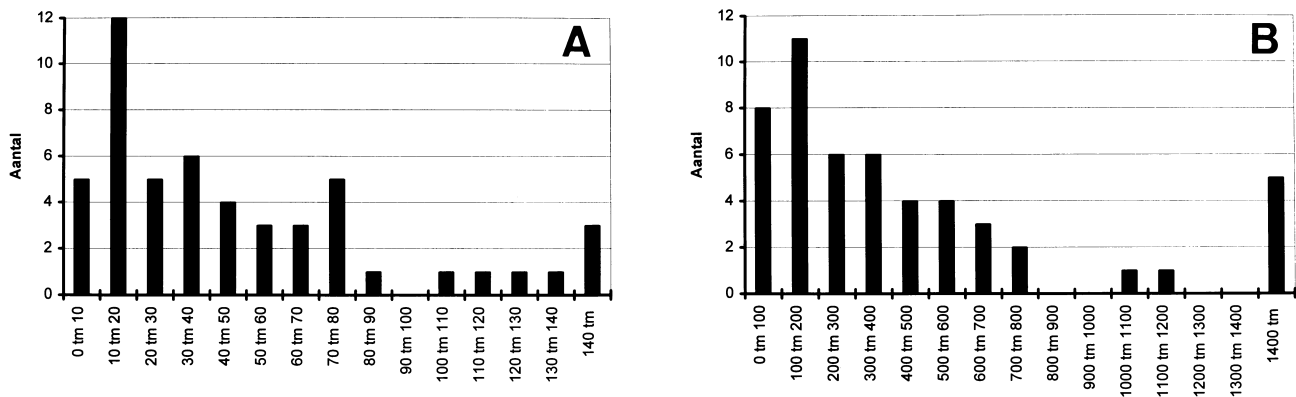
	neg.	pos.
mediaan	20,5	150,5
gemiddelde	60,6	784,7

B: de UF-100 (per μl ; logaritmische schaal) en de microscop (per gezichtsveld).

	neg.	sp.	1-5	5-10	10-25	25-50	>50
mediaan	17	20	68	110	209	714	1413
gem.	29	66	90	312	297	1372	2950



Figuur 6. Aantallen erythrocyten (A) en leukocyten (B) per μl urine, gemeten met de UF-100, in 51 urinemonsters.



Figuur 7. Aantallen bacteriën (A) en bacteriën kleiner dan 1 µm (B), gemeten met de UF-100, in 51 urinemonsters

Met behulp van de urineflowcytometer zijn ook referentiewaarden bepaald voor erythrocyten, leukocyten en bacteriën (figuur 6 en 7). Hiervoor is gebruik gemaakt van 51 urines die met dipsticks zijn voorgescreend en waarin geen afwijkingen zijn gevonden. Het aantal erythrocyten varieerde van 0,1 per µl tot 8,3 per µl met als mediaan 1,6 per µl (gemiddelde 2,3 per µl). Bij 95% van de individuen is het aantal erythrocyten minder dan 6,1 per µl urine. Leukocyten varieerden in aantal van 0,4 tot 108,6 per µl met een mediaan van 4,0 per µl (gemiddelde 10,0 per µl). Het aantal leukocyten in de urine van 95% van de individuen bedraagt minder dan 34,2 per µl. Voor bacteriën werden de volgende waarden verkregen: een mediane waarde van 32,6 per µl en een referentiewaarde tot 175 bacteriën per µl. Voor bacteriën met een diameter < 1 µm (H-Bact) bedragen deze waarden respectievelijk 304 en 1524 per µl urine.

De urineflowcytometer blijkt in een aantal monsters problemen te hebben met de detectie van cilinders, kristallen en epitheelcellen. Met name in geval van een negatieve microscoopbevinding blijkt de UF-100 in een aantal gevallen toch deeltjes te detecteren en die als cilinders, kristallen en/of epitheelcellen te clusteren. In die gevallen dat met de microscoop wel kristallen, cilinders en/of epitheelcellen te zien waren, leidde dat in ons onderzoek altijd tot een signalering door de UF-100.

Tot slot hebben wij de UF-100 gebruikt om leukocyten in andere lichaamsvochten te meten. Met name in CAPD vloeistoffen werd een goede correlatie gevonden tussen de leukocyten-aantallen verkregen met de UF-100 en met onze hematologie-analysers.

DISCUSSIE

De UF-100 urineflowcytometer is een volledig geautomatiseerd apparaat voor de analyse van in urine aanwezige deeltjes en cellen. De identificatie ervan vindt plaats door het DNA en de membranen aan te kleuren, waarbij geen voorbehandeling van de urinemonsters nodig is. Dit maakt het mogelijk een verregaande automatisering en mechanisering op het urinelaboratorium door te voeren.

De reproduceerbaarheid is in overeenstemming met andere evaluaties van de UF-100 (3,4). De lineariteit voor wat betreft de leukocyten en de erythrocyten is

goed; doorverdunnen van een monster met een groot aantal bacteriën leidt tot onnauwkeurigheden. Problemen worden gezien bij de detectie van cilinders en kristallen. In een aantal monsters is het voorgekomen dat de UF-100 deze deeltjes detecteert, terwijl bij microscopisch onderzoek geen cilinders en/of kristallen werden waargenomen. In een aantal urines met - volgens de UF-100 - cilinders, bleek er sprake te zijn van amorf materiaal, terwijl ook de aanwezigheid van calciumoxalaat-, tripelfosfaat- en sulfakristallen tot vals-positieve cilinderuitslagen leidde.

Het meten van cellen en kristallen in overige lichaamsvochten verloopt voor wat betreft pleuravochten en CAPD vloeistof zonder problemen en is met goed resultaat uit te voeren. Ook voor de detectie van kristallen in bijv. synoviaalvloeistof kan de UF-100 goede diensten bewijzen. Voor analyses in dit soort vloeistoffen valt de urineflowcytometer dan ook te prefereren boven hematologie-analysers.

De distributie van erythrocyten in de urines van bezoeker(sters) van de Polikliniek Interne Geneeskunde vertoont een log-normale verdeling. Hierbij moet aangetekend worden dat alleen urines die negatief scoorden met de dipstick en een pH < 7 hadden, gebruikt zijn. De door ons gevonden referentiewaarde tot 6,1 erythrocyten per µl komt goed overeen met een waarde tot 8 erythrocyten bepaald met een lichtmicroscoop (5) en een waarde tot 8,4 cellen per µl verkregen met een urineflowcytometer in een studie met 133 gezonde vrijwilligers (6). De referentiewaarde voor leukocyten (tot 34 cellen/µl) sluit aan bij een onderzoek onder urologische patiënten met en zonder cystitis, waarbij gevonden werd dat een aantal van 60 leukocyten/µl of meer indicatief is voor blaasontsteking (4). Literatuurgegevens met betrekking tot het aantal bacteriën in de urine van gezonde personen zijn door ons niet gevonden.

In dit onderzoek hebben wij om redenen van logistiek geen vergelijkend onderzoek kunnen doen tussen de microscoop en de UF-100 t.a.v. de morfologie van de erythrocyten. Voor de kliniek is het van groot belang om de oorzaak van de hematurie te achterhalen, zodat deze optie mogelijkheden kan bieden bij het onderscheiden van glomerulaire van niet-glomerulaire bloedingen.

Wij concluderen dat de urineflowcytometer de mogelijkheid kan gaan bieden tot verregaande automatisering en mechanisering op het urinelaboratorium. Om

het apparaat voor de screening van grote aantallen urines in te kunnen gaan zetten, moeten oplossingen bedacht worden voor de detectie van eiwit en glucose. Ook het meten van de pH zou mogelijk moeten zijn. Daarnaast moet de gevoeligheid voor het signaleren van cilindres verbeterd worden. Voor onderzoek waarbij het van belang is geringe aantallen erythrocyten of leukocyten te detecteren of waarbij een geringe toename van deze cellen te verwachten is, kan de flowcytometer nu al goed gebruikt worden. Immers, nauwkeurigheid en snelheid zijn - vergeleken met de microscoop - sterke kanten van deze techniek.

Dankbetuiging

Mw G. Veluwenkamp heeft met grote inzet de praktische uitvoering van deze evaluatie op zich genomen. Dhr G. Dulon heeft voor de verwerking van de resultaten en de grafische presentatie zorggedragen.

Literatuur

1. Bonnardeux A, Somerville P, Kaye M. A study on the reliability of dipstick urinalysis. *Clin Nephrol* 1994; 4: 167-172.
2. Marx AM, Kropf, Gressner AM. On the performance and reliability of mechanized urine teststrip measurement in comparison with visual reading. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27: 433-443.

Ned Tijdschr Klin Chem 1997; 22: 188-191

Bepaling van referentie-intervallen voor serumeiwitten na IFCC herstandaardisatie

P.J. HELMSING

Door het IFCC committee for plasma protein standardisation is nieuw referentiemateriaal (RPPHS) uitgebracht voor de standaardisatie van kalibratoren ten behoeve van de bepaling van plasma- of serumeiwitten. In dit onderzoek zijn referentielimieten berekend voor 17 serumeiwitten voor zowel vrouwen als mannen. Monstersselectie en berekeningsmethodiek zijn beschreven. Tevens zijn indicaties verkregen omtrent een mogelijke leeftijdsafhankelijkheid van de referentielimieten voor sommige eiwitten.

Trefwoorden: nefelometrie; RPPHS; referentiewaarden; serumeiwitten; leeftijdsafhankelijkheid

De afgelopen decaden zijn verschillende primaire referentiepreparaten voor serumeiwitten onder het label van de World Health Organisation (WHO) beschikbaar gekomen. Met behulp hiervan zijn door professionele en commerciële organisaties een groot aantal secundaire referentiematerialen geproduceerd.

Klinisch chemisch en hematologisch laboratorium, Van Weel-Bethesda Ziekenhuis, Dirksland

Correspondentie: Dr. P. J. Helmsing, Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Stationsweg 22, Van Weel-Bethesda Ziekenhuis, 3247 BW Dirksland.
Ingekomen: 10.01.97

3. Yasui Y, Tatsumi N, Park K, Koezuka T. Urinary sediment analyzed by flow cytometry. *Cytometry* 1995; 22: 75-79.
4. Muranaka K. Clinical uses of the UF-100™ for the diagnosis of urinary tract infection. *Sysmex J Int* 1996; 6: 46-50.
5. Birch DF, Fairley KF, Whitworth JA, Forbes I, Fairley JK, Cheshire GR, Ryan GB. Urinary erythrocyte morphology in the diagnosis of glomerular hematuria. *Clin Nephrol* 1983; 20: 78-84.
6. Hyodo T, Kumano K, Haga M, Sakai T. Analysis of urinary red blood cells of healthy individuals by automated urinary sediment analyzer. *Kidney and Dialysis* 1995, Vol 38 no 5.

Summary

Flow cytometry and the urine laboratory: the SYSMEX-UF-100™. Keijzer MH de and Brandts RW. Ned Tijdschr Klin Chem 1997; 22: 184-188.

Results from a recently developed flow cytometer, for the investigation of urine sediments, were compared with parameters from standard urine techniques. As a golden standard the microscopic inspection of the sediment was used. We conclude that with regard to the investigation of sediments a flow cytometer is a good option in the urine laboratory. Before such an apparatus can be used for the screening of urine samples, features as the detection of glucose and protein and the measurement of pH should be added.

Key-words: flow cytometry; urine; sediment; dipstick; microscopy

In de praktijk bleek, dat tussen deze verschillende secundaire referentiepreparaten de waarden van sommige eiwitten meer dan 100% verschillen lieten zien. In 1984 is het Committee for Plasma Protein Standardization van de International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) begonnen aan de realisatie van een nieuwe internationale secundaire matrix als referentiepreparaat voor plasma- eiwitten. De betreffende 14 plasma-eiwitten zijn: pré-albumine (PAB), albumine (ALB), α_1 -zuurglycoproteïne (AAG), α_1 -antitrypsine (AAT), ceruloplasmine (CER), haptoglobine (HPT), α_2 -macroglobine (AMG), transferrine (TRF), complement C3 (C3), complement C4 (C4), immunoglobuline A (IGA), immunoglobuline G (IGG), immunoglobuline M (IGM) en C-reactive proteïne (CRP) (1). In 1993 en 1994 is dit materiaal vrijgegeven door het Bureau Communautaire de Référence (BCR) van de Europese Economische Gemeenschap als Certified Reference Material (CRM 470) en door het College of American Pathologists (CAP) als Reference Preparation for Proteins in Human Serum (RPPHS). RPPHS is bedoeld als secundair matrix referentiemateriaal op basis waarvan werkbare kalibratoren en controles voor de bepaling van serumeiwitten gemaakt kunnen worden. De bereidingswijze, waarde-toekenning en randvoorwaarden, zoals optische helderheid e.d. van RPPHS door het IFCC committee, zijn in de literatuur beschreven (2,3). Daarbij zijn