



İDRARIN MİKROSKOBİK İNCELEMESİNDE FLOW MİKROSKOBİ TEKNOLOJİSİ İLE MANUEL MİKROSKOBİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Buket TEKÇE¹, Asuman ORÇUN¹, İnci KÜÇÜKERCAN¹, Nazan ÇAMURSOY¹, Özlem ÇAKIR MADENCİ¹

Klinik tanıda yararlı bir test olarak kullanılmakta olan idrar sedimentinin manuel analizinin, birçok metodolojik problemi vardır. Bu nedenle doğruluk (accuracy) ve tekrarlayıcılık (precision) gibi metodolojik problemlerin düzeltilmesi, otomatize yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Biz bu çalışmamızda eritrosit, lökosit ve epitel hücrelerinin saptanmasında geleneksel görsel mikroskopi metodumuzun performansını otomatize mikroskobik metot ile karşılaştırmayı amaçladık. Çalışmamızda 203 hastanın idrar örneği flow mikroskopi yöntemini esas alan IRIS model 500 idrar analizörü ve manuel mikroskopi ile incelendi. Sonuçlar Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı ve aralarındaki ilişki için lineer regresyon analizi yapıldı. Her iki metotla saptanan hasta-sağlıklı oranının uyumunu incelemede McNemar testini kullandık. Otomatize ve manuel mikroskobiden elde edilen sonuçların lineer regresyon analizi ile karşılaştırılması ile elde edilen sonuçlara göre eritrosit ($r=0.7678$), lökosit ($r=0.8302$) ve epitel hücresi ($r=0.8570$) sayılarının iki yöntemde de iyi korelasyon gösterdiği saptandı. Her iki yöntemle elde ettiğimiz sonuçları, referans aralık çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre gruplandırıp her analit için 2x2 bir tablo oluşturarak incelediğimizde, her iki yöntemin de eritrosit için %84, lökosit için %81, epitel hücresi için %90 örneği aynı aralıkta bulunduğunu gördük. Her iki metodun her bir analiti saptayabilmedeki farklılıklarının istatistiksel analizini yaptığımızda, otomatize metot ile manuel metottan daha fazla sayıda eritrosit ($p=0.0367$) ve lökosit ($p<0.0001$) sayısı elde edildi. Bunun tersine manuel metotla bulunan epitel hücresi ($p=0.0037$) sayısı otomatize metottan fazla idi. Otomatize yöntem ile manuel mikroskobiden elde edilen sonuçların birbiri ile uyum gösterdiği ve otomatize mikroskobinin klinik karar noktasında daha fazla patolojik örneği saptayabildiği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: İdrar mikroskobisi, idrar sedimenti, idrar analizi, otomatize idrar partikül analizi

COMPARISON OF FLOW MICROSCOPY TECHNOLOGY WITH MANUEL METHOD FOR URINE MICROSCOPIC ANALYSIS

Manual analysis of urine sediment, although clinically useful, is fraught with methodological problems. To this end, there have been attempts to automate the process to improve accuracy and precision. In this study, we aimed to compare the performance of our conventional visual microscopic methods with that of the automated microscopic method in the detection of erythrocytes, leukocytes and squamous cells. Urine specimens from 203 patients were examined with IRIS Model 500 urine analyzer, which based on flow microscopic method and manual microscopy. Results matched with Mann-Whitney U test and we made linear regression analysis for searching relation each other. We use to study relation results, which obtained each method. We use McNemar's test to investigate each patient/healthy ratios importance and relations, which obtained each methods. When we compared results of automated and manual microscopy with linear regression analysis; the results of both methods erythrocytes ($r=0.7678$), leukocytes ($r=0.8302$) and squamous cells ($r=0.8570$) counts were correlated. We grouped each method's results according to reference range study and obtained 2X2 table. When we investigating this table; for erythrocytes 84%, for leukocytes 81%, for squamous cells 90% of all specimens were within the same range by both methods. When we made statistical analysis to find detection's difference, the automated method detected greater number of abnormal erythrocyte ($p=0.0367$) and leukocyte ($p<0.0001$) counts than did the manual method. In contrast, manual method detected greater number of squamous cell ($p=0.0037$) than did the automated method. Depending on this study; we conclude that microscopic urine analysis with automated method for erythrocytes, leukocytes and squamous cells counts were correlated, even better in determining pathological urine than did manual microscopic sediment analysis and automated method useful for providing standardization.

Key words: Urine microscopy, urine sediment, urine analysis, automated urine particle analysis

İdrar sedimentinin mikroskobik incelenmesi özellikle böbrek hastalıkları ve idrar yolu enfeksiyonlarının tanı ve izlenmesinde önemli bir rol oynar^{1,2}. İdrarın mikroskobik incelemesinin doğruluk ve tekrarlayıcılığının sağlanması standardizasyon gerektirir. İyi standardizasyonun sağlanamaması halinde manuel mikroskopi ile güvenilir idrar analizi sonucu verilemez³. Standardizasyon sağlanma zorluğu nedeniyle görsel mikroskopi ile idrarda partikül sayılmasının güvenilir olmadığı kanısı yaygınlaşmıştır^{2,4-6}. National Committee of Clinical Laboratory Standarts (NCCLS) ve European Urinalysis Guidelines; idrar analizini standardize etmek için ya önceden belirlenmiş bir volümü bir odacık içinde sayan standardize prosedürleri veya otomatize sistemlerin kullanılmasını tavsiye etmiştir⁷⁻⁹.

Yeni geliştirilen yöntemlerden olan flow sitometreler büyük sayıda partikülü kısa zamanda sayabilmekte ve onları karakterlerine göre ayırabilmektedirler. Bu yöntemler her hangi bir işleme tabi tutulmamış idrarı incelediğinden hata kaynağı olan bir çok basamak bertaraf edilebilir¹⁰.

Biz bu çalışmamızda bir optik lens sistemi sayesinde flow mikroskopi tekniği ile idrarın mikroskobik incelemesini yapan, otomatik bir idrar analizörünün hücre analizi sonuçlarını değerlendirdik. Bu değerlendirmeyi yaparken standardize manuel mikroskopi sonuçları ile flow mikroskobisinden elde ettiğimiz sonuçları karşılaştırarak, bu yeni yöntemin standardize yönteme göre nasıl sonuçlar elde ettiğini görmeyi, güvenilirliğini test etmeyi, özellikle klinik karar noktasındaki etkinliğini saptamayı ve bu yöntemin rutinde uygulanabilirliğini görmeyi amaçladık.

¹Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü

Başvuru tarihi: 29.12.2003, Kabul tarihi: 26.10.2004



GEREÇ VE YÖNTEM

Referans aralık çalışması için, üriner sisteme ait bilinen bir hastalığı ve şikayeti olmayan, hastanemizin polikliniklerine farklı nedenlerle başvurmuş 110 olgu seçildi. Çalışma grubu olarak Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi polikliniklerine başvurmuş ve idrar tetkiki yaptırmak üzere laboratuvarımıza gelmiş olan olguların idrar örnekleri, idrar stribi ile semikantitatif olarak incelendi ve lökosit esteraz, eritrosit peroksidaz reaksiyonu 1+ ve üzerinde olup karar düzeyinde patoloji bulgusu veren 203 tanesi seçildi. Her hangi bir koruyucu kullanılmadı. Her iki yöntemle de analiz edilene kadar örneklerin bir saatten fazla bekletilmemesine dikkat edildi.

Manuel mikroskopik inceleme için 6 ml idrar örneği, tavsiye edildiği üzere 400-450g'de 5 dakika santrifüje edildi. Santrifüj işlemi takiben idrarların çökelti üzerinde kalan berrak kısımları 250 µl çökelti kalacak şekilde dikkatlice boşaltıldı. Böylece idrar 24 kez konsantre edilmiş oldu (6/0.025 ml=24). Arta kalan çökelek iyice karıştırıldıktan sonra bir pipet vasıtasıyla 20 µl alınarak lam-lamel arası preparat hazırlandı. Mikroskopik inceleme yapıldı ve her sahaya düşen ortalama sayı hesaplandı.

Tüm idrar örneklerinin sediment analizi ayrıca tam otomatik bir idrar analizi cihazı olan IRIS Model 500'de flow mikroskopi ile çalışıldı.

Çalışmamızın istatistiksel analizi "Graph Pad Instat" isimli istatistik programında yapıldı. Grup medyanları Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Sonuçlar arasındaki ilişki lineer regresyon analizi ile incelendi. Her iki yöntemle belirlenen hasta/sağlıklı oranı McNemar testi ile değerlendirildi.

BULGULAR

Referans aralık analizi için çalışılan 110 olgunun idrar sedimentinden elde edilen mikrolitrede görülen eritrosit, lökosit ve epitel hücresi sayısının 95. persantil değerleri, otomatize mikroskopi için eritrosit 15/µl, lökosit 11/µl, epitel hücresi 31/µl bulunurken; manuel mikroskobide eritrosit 13/µl, lökosit 15/µl ve epitel hücresi 20/µl hücre bulundu.

Metot karşılaştırma çalışmasında otomatize ve manuel mikroskobiden elde edilen ortanca değerleri eritrosit için sırasıyla 11.25 ve 6.79, lökosit için 16.42 ve 9.19 bulundu ve aralarındaki bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (p=0.145 ve p=0.4648). Otomatize mikroskobiden elde edilen epitel hücresi değerleri manuel mikroskobiden elde edilene göre düşük bulundu (ortanca değerleri sırasıyla 7.26 ve 7.6), fakat aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (p=0.7397).

Her iki yöntemle elde edilen eritrosit, lökosit ve epitel hücresi sayılarının lineer regresyon analizinin yapılması ile elde edilen korelasyon katsayıları eritrosit için 0.7678, lökosit için 0.8302, epitel hücresi için 0.8570 bulundu ve her iki yöntemle bulunan sonuçların birbiri ile korele olduğu görüldü (p<0.0001).

Karşılaştırma çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçları referans aralık çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre gruplandırıp her analit için 2x2 bir tablo oluşturduğumuzda; eritrosit için %84, lökosit için %81, epitel hücresi için %90 örneği aynı aralıkta bulunduğu görüldü. Patolojik ve normal olarak tanımladığı olguları karşılaştırdığımızda, eritrosit için IRIS ile daha fazla sayıda patolojik örnek tespit edildiği bulundu ve aradaki fark anlamlı idi (p=0.0367). IRIS ile bulunan patolojik lökosit sayısının da yine manuel yöntemle göre fazla olduğu ve aradaki farkın ileri derecede anlamlı olduğu bulundu (p<0.0001). Bunlara karşın IRIS ile bulunan epitel hücresi sayısı manuel yöntemle bulunandan azdı ve aradaki fark oldukça anlamlıydı (p=0.0037).

Her iki yöntemle bulunan eritrosit, lökosit ve epitel hücresine ait ortanca değerlerinin Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılması, referans aralık çalışmasında elde edilen sonuçlara ait 95. persantil değerleri ve her iki yöntemle referans aralık değerlerine göre tanımlanan patolojik eritrosit, lökosit, epitel hücresi değerlerine sahip örnek sayısı tablo I'de görülmektedir.

Tablo I. Her iki yöntemle bulunan eritrosit, lökosit ve epitel hücresine ait ortanca değerleri, referans aralık çalışmasında elde edilen sonuçlara ait 95. persantil değerleri ve her iki yöntemle referans aralık değerlerine göre tanımlanan patolojik eritrosit, lökosit, epitel hücresi değerlerine sahip örnek sayısı ve aralarındaki istatistiksel ilişki

	(Hücre sayısı / µl) ORTANCA		(Hücre sayısı / µl) 95. PERSANTİL		PATOLOJİK ÖRNEK	
	Otomatize mikroskopi	Manuel mikroskopi	Otomatize mikroskopi	Manuel mikroskopi	Otomatize mikroskopi	Manuel mikroskopi
ERİTROSİT	11.25	6.79	15	13	52	39**
LÖKOSİT	16.42	9.19	11	15	72	35***
EPİTEL HÜCRESi	7.26	7.6	31	20	11	25***

** P<0.05

*** P<0.005

TARTIŞMA

Yüz on sağlıklı olgu ile yaptığımız referans aralık 95. persantil değerleri otomatize mikroskopi için eritrosit 15/µl, lökosit 11/µl, epitel hücresi 31/µl bulunurken; manuel mikroskobide eritrosit 13/µl, lökosit 15/µl ve epitel hücresi 20/µl hücre bulunmuştur. İdrar analizinde genellikle alt referans aralık önemli değildir.



Sağlıklı ve hastayı ayırt etmede üst referans limit kullanılır¹⁰. Delanghe ve ark.nın çalışması sağlıklı kişilerden elde edilen idrarda partikül sayısı yatık bir dağılım gösterdiğinden ve rastlantısal uç değerler içerdiğinden, 95. persantilin üst referans limitini 97.5 persantilden daha iyi gösterdiğini söylemektedir².

Regeniter ve ark.nın 91 sağlıklı olguda yaptıkları referans değer çalışmasında, idrar analizi sonuçları mikrolitrede eritrosit, lökosit ve epitel hücresi olarak belirtilmiş olup 97.5 persantil değerlerini kullanmışlar ve sırasıyla 13.9, 15.7, 8.9 olarak elde etmişlerdir¹¹.

JCCLS (Japanase Committee for Clinical Laboratory Standarts) kriterlerine göre sağlıklı kişilerde idrarın odacık sayımı ile yapılan mikroskobik incelenmesinde, lökosit üst sınırı santrifüje edilmemiş idrarda 5-10/μl, santrifüj sonrasında ise 3-5/μl'ye kadar normal kabul edilmiştir¹²⁻¹⁴.

Sağlıklı erişkinde referans aralığı saptanması için farklı referans populasyonlar, örnek toplama prosedürleri ve preanalitik hazırlama teknikleri uygulanmaktadır¹⁵. Çocuklar da yine ayrı bir grup oluşturmaktadır¹⁶. Bu nedenle referans aralığı saptanmasında görülen bu farklı sonuçlar şaşırtıcı değildir².

Yaptığımız çalışma sonucunda her bir analit için elde ettiğimiz ortanca değerleri karşılaştırdığımızda; eritrosit ve lökosit için otomatize mikroskopi ile manuel mikroskopiye göre daha fazla sayıda hücre sayısı elde edildi, ancak aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Epitel sayısı ise manuel mikroskopi ile otomatize mikroskopiye nazaran daha fazla bulundu, ancak yine aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Bizim çalışmamızda manuel ve otomatize mikroskopi yöntemleri ile bulunan sonuçların lineer regresyon analizi ile karşılaştırılması sonucu eritrosit, lökosit ve epitel hücresi için korelasyon katsayıları (r) sırasıyla 0.7678, 0.8302, 0.8570 olarak bulunmuştur. Bu bulgular daha önce yapılmış çalışmalardaki sonuçlarla uyumludur^{10,11,17,18}.

Karşılaştırma deneyleri sonucunda, eritrosit için otomatize mikroskopi ile daha fazla sayıda anormal örnek tespit edildiği ve aradaki farkın anlamlı olduğu bulundu (p=0.0367). Otomatize mikroskopi ile bulunan anormal lökosit sayısının da yine manuel yöntemle göre fazla olduğu ve aradaki farkın ileri derecede anlamlı olduğu bulundu (p<0.0001). Bunlara karşın otomatize mikroskopi ile bulunan epitel hücresi sayısı manuel yöntemle bulunandan azdı ve aradaki fark oldukça anlamlı idi (p=0.0037).

Kaczmarek ve ark.nın çalışmasında, otomatize mikroskopi ile manuel mikroskopiye oranla oldukça fazla sayıda anormal eritrosit ve lökosit sayısı bulunmuş; otomatize metotların duyarlılığındaki bu artış idrar yolları enfeksiyonlarının daha da erken tanınmasına yol açabilir denmiştir¹⁹.

Akgün ve ark.nın çalışmasında, IRIS eritrosit açısından patolojik idrarı tespit etmede manuel yöntemlerden daha başarılı bulunmuştur (p<0.001). Lökosit sayısını tespit etmede IRIS boyasız manuel mikroskopiye üstünken (p<0.001), boyalı mikroskopi yöntemi her ikisinden de fazla sayıda anormal hücre tespit etmiştir (p<0.001). Epitel hücrelerinin belirlenmesinde IRIS manuel mikroskobik yöntemlerden daha az sayıda epitel bulmuştur (p>0.05). Bu durum IRIS ile sağlam epitel hücrelerinin değerlendirmeye alınıp, deforme olmuş epitel hücrelerinin değerlendirme dışı bırakılması ile açıklanmıştır²⁰.

Otomatize mikroskobik metot manuel mikroskobik metoda göre daha fazla hücre sayısı elde etmektedir^{17,19-22}. Bu muhtemelen manuel mikroskopi ile saptanılmayan hücrelerin doğru olarak saptandığını gösterir. Çünkü rutin idrar analizi santrifügasyon, dekantasyon ve resüpsansiyon basamaklarına sahiptir ki bu basamaklar hücrelerin yüzeylere yapışmasına yol açabilir, yetersiz karıştırma olabilir, tam veya kısmi hücre kaybı veya lizisine yol açabilir²².

Sonuç olarak; partikül flow sitometrinin idrarda partikül analizinde daha yüksek klinik yararlılık sağlayabileceği gösterilmiştir². Biz de bu çalışmamızda flow sitometri ile standardize manuel mikroskobiden elde ettiğimiz sonuçları karşılaştırdığımızda, her iki yöntemle elde ettiğimiz sonuçların birbiri ile korelasyon gösterdiğini; ancak flow sitometrinin klinik karar noktasında daha fazla patolojik örneği saptama yeteneğinde olduğunu bulduk. İdrar analizinin, otomatize mikroskopi yöntemi ile standardizasyonunun ve doğruluğunun manuel yöntemle göre daha iyi olduğu kanısına vardık.

KAYNAKLAR

1. Suthoesophen K, Wiwanitkit V, Booncholermvichion C, Charuruks N. Evaluation of the Sysmex UF 100 automated urinalysis analyzer and competitive study with JCCLS reference method. J Med Assoc Thai 2002; 85(1): 246-52.
2. Delanghe JR, Kouri TT, Huber AR, et al. The role of automated urine particle flow cytometry in clinical practice. Clin Chem Acta 2000; 301(1-2): 1-18.
3. Fogazzi GB, Cameron JS, Ritz E, Ponticelli C. The history of urinary microscopy to the end of the 19th century. Am J Nephrol 1994; 14: 452-7.
4. John BH. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. WB Saunders Comp, Philadelphia, Pennsylvania, 2001: 367-402.
5. Gadeholt H. Counting Of Cells. In: Urine. The valuability of haemocytometer counts. Acta Med Scand 1968; 183: 9-16.
6. Winkel P, Statland BE, Joergensen K. Urine microscopy, an ill defined method, examined by a multifactorial technique. Clin Chem 1974; 20: 436-9.
7. National Committee For Laboratory Standards. Urinalysis and collection, transportation and preservation of urine specimens. Approved Guideline NCCLS Document Gp16-A (ISNB 1-56238-269-1), Vilanova, Penn 1995.



8. European Urinalysis Guidelines Summary. *Scand J Clin Lab Invest* 2000; 60 (Suppl 231): 1-96.
9. Koori TT, Gant YA, Fogazzi GB, Hofmann W, Hallender HO, Guder WG. European Urinalysis Guidelines. Introduction of a project under European Confederation of Laboratory Medicine. *Clin Chim Acta* 2000; 297: 305-11.
10. Hannemann-Pohl K, Kampf SC. Automation of urine sediment examination: A comparison of the Sysmex UF-100 automated flow cytometer with routine manual diagnosis (microscopy, test strips, and bacterial culture). *Clin Chem Lab Med* 1999; 37(7): 753-64.
11. Regeniter A, Haenni V, Risch L, et al. Urine analysis performed by flow cytometry: Reference range determination and comparison to morphological findings, dipstick chemistry and bacterial culture results-a multicenter study. *Clin Nephrol* 2001; 55: 384-92.
12. Ishii T, Hara T, Nayakama A, Matsumoto H. Examination of remaining cells by UF-100, fully automated urine cell analyzer in the supernatant after centrifugation 2003; 13(1): 53-9.
13. Kesson AM, Talbot JM, Gyory AZ. Microscopic examination of urine. *Lancet* 1978; 14(2): 809-12.
14. Györy AZ. Urine microscopy. *Med J Aust* 1979; 2(7): 369-70.
15. Györy AZ, Kesson AM, Talbot JM. Microscopy of urine—now you see it, now you don't. *Am Heart J* 1980; 99: 537-8.
16. Lun A, Ziebig R, Hammer H, Otting U, Filler G, Sinha P. Reference values for neonates and children for the UF-100 urine flow cytometer. *Clin Chem* 1999; 45: 1879-80.
17. Ronald JE, Jeanette M, Hosseini BS, et al. Comparison of automated and manual methods for urinalysis. *Am J Clin Pathol* 1986; 86: 731-7.
18. Ottiger C, Huber AR. Quantitative urine particle analysis: Integrative approach for the optimal combination of automation with UF-100 and microscopic review with kova cell chamber. *Clin Chem* 2003; 49 (4): 617-23.
19. Kaczmarek DW, Walker A, Belo H, Deangelis L, Vangrouw C. A two-laboratory comparison of the detection of abnormal urine particulate levels by manual and automated microscopy. *Labor Med* 1988; 19(11): 744-7.
20. Akgün A, Sağır F, Alataş Ö. İdrarın mikroskopik incelemesi: Otomatik analizör ve manuel sonuçların karşılaştırılması. *T Klin Tıp Bilimleri* 2000; 20: 154-9.
21. Deindoerfer FH, Gangwer JR, Laird CW, Ringold RR. "The Yellow Iris" urinalysis workstation—the first commercial application of "Automated Intelligent Microscopy". *Clin Chem* 1985; 31(9): 1491-9.
22. Ben Ezra J, Bork J, McPherson RA. Evaluation of the Sysmex UF-100 automated urinalysis analyzer. *Clin Chem* 1998; 44(1): 92-5.