



JÖNKÖPING UNIVERSITY
School of Health and Welfare

Utvärdering av instrumentet UF-5000 för automatiserad urinpartikelanalys i en metodjämförelse med manuell mikroskopering av urinsediment

HUVUDOMRÅDE: *Biomedicinsk laboratorievetenskap*

FÖRFATTARE: *Mulki Abiib, Anna Cvetkovic*

HANDLEDARE: *Therese Belge, Caroline Byljfors, Cathrine Larsson, Jenny Antonsson*

JÖNKÖPING 2018-05

Sammanfattning

Inledning: Mikroskopisk analys av urinsediment anses i dagsläget vara gold standard inom urinsedimentdiagnostik, trots att metoden ofta är otillräckligt standardiserad. En rad automatiserade instrument, såsom UF-5000, finns idag tillgängliga och kompenserar för problematiken med den gamla metoden. Analys av urinsediment är avgörande vid flertal njursjukdomar, där bland annat erythrocyter, leukocyter, epitelceller, cylindrar och kristaller är av stort diagnostiskt värde. **Syfte:** Syftet var att utvärdera det automatiserade urinpartikelinstrumentet UF-5000 samt att jämföra metoden med manuell ljusmikroskopering av urinsediment. **Metod:** Vid metodjämförelse analyserades 69 prover med instrumentet UF-5000 samt i mikroskop. Data bearbetades med Passing Bablok-regression, Bland-Altman differensanalys samt Spearmans rangkorrelationskoefficient. **Resultat:** Statistisk signifikant skillnad förekom vid metodjämförelsen. Utvärderingen av instrumentet visade hög mätnoggrannhet med undantag för variationskoefficienten vid låg leukocytkoncentration samt avvikelser för instrumentets linjäritet. **Diskussion:** Då ljusmikroskopering av urinsediment är en otillräckligt standardiserad metod kunde statistiskt signifikanta skillnader ses, vilket kan bero på den bristande referensmetoden. Fortsatta studier där automatiserad metod jämförs med en mer standardiserad manuell mikroskopi är av stor vikt. Även reducering av cut-off för diverse parametrar kan vara aktuellt. Instrumentutvärdering visade en generell mätnoggrannhet med enstaka undantag vilket kan bero på felhantering vid analys. För vidare analys av linjäritet skulle ett ytterligare instrument som komplement kunna användas.

Nyckelord: cylindrar, kristaller, njursjukdomar

Summary

Evaluation of the instrument UF-5000 for automated urine particle analysis in a method comparison with manual microscopy of urine sediment

Introduction: Microscopy is gold standard for urine sediment analysis, although the method is often insufficiently standardized. Several automated instruments, such as UF-5000, are commercially available on the market. Urine sediment analysis is crucial for diagnosis of kidney and urinary tract diseases where elements such as erythrocytes, leukocytes, epithelial cells, casts and crystals can be identified. **Aim:** The aim was to evaluate the performance of UF-5000 and compare the method with manual microscopic analysis of urine sediment. **Method:** Analysis with UF-5000 and microscopy was conducted on 69 samples. Data were processed with Passing Bablok-regression, Bland-Altman bias plot and Spearman's rank order correlation. **Result:** Comparison showed statistical significance between the two methods. Performance evaluation showed high accuracy apart from the coefficient of variation for low concentration of leukocytes and systematic error for linearity. **Discussion:** Since microscopy of urine sediment is an insufficiently standardized method, differences were acknowledged caused by discrepancies in the reference method. Further studies where UF-5000 is compared to a more standardized manual microscopy with a larger amount of pathological urine samples is of great importance. Reduction for cut-off may also be relevant. For further analysis of linearity, an additional instrument should be used as a complement.

Keywords: casts, crystals, kidney diseases

Innehållsförteckning

Inledning	1
Bakgrund	2
Njurens patofysiologi	2
<i>Glomerulära sjukdomar</i>	2
<i>Tubulär skada</i>	2
<i>Akut och kronisk njursvikt</i>	3
<i>Nefrotiskt syndrom</i>	3
Urinsediment och fynd vid njursjukdom	3
<i>Hematuri</i>	4
<i>Leukocyturi</i>	4
<i>Epitelceller</i>	4
<i>Cylindrar</i>	5
<i>Kristaller</i>	6
<i>Bakterier, jästsvamp och spermier</i>	6
Provtagning och preanalytiska faktorer för analys av urinsediment	7
Metoder för analys av urinsediment	7
<i>Metodprincip för Fully Automated Urine Particle Analyzer UF-5000 på urinsediment</i> ...	7
<i>Metodprincip för ljusmikroskopering av urinsediment</i>	8
Syfte	11
Material och metod	12
Provurval samt insamling av urinprover	12
<i>Urinprover för metodjämförelse</i>	12
<i>Urinprover för utvärdering av instrumentet UF-5000</i>	12
Metodjämförelse för urinsedimentanalys	13
<i>Analys i öppet system med UF-5000</i>	13
<i>Analys med ljusmikroskopering</i>	13

Utvärdering av instrumentet UF-5000	14
<i>Konstruerade prover</i>	14
<i>Inomliggande precision</i>	15
<i>Mellanliggande precision</i>	15
<i>Carry-over</i>	15
<i>Linjäritet</i>	15
Statistisk analys	15
Etiska överväganden	16
Resultat	17
Metodjämförelse av urinsedimentsanalys.....	17
<i>Sensitivitet och specificitet</i>	17
<i>Korrelation och överensstämmelse mellan metoderna</i>	18
Utvärdering av instrumentet UF-5000	20
<i>Inomliggande precision</i>	20
<i>Mellanliggande precision</i>	21
<i>Carry-over</i>	22
<i>Linjäritet</i>	22
Diskussion	23
Metodjämförelse av urinsedimentanalys	23
<i>Sensitivitet och specificitet</i>	23
<i>Mikroskopering av urinsediment som referensmetod</i>	24
<i>Överensstämmelse och korrelation mellan metoderna</i>	26
Utvärdering av instrumentet UF-5000	27
<i>Inomliggande precision</i>	27
<i>Mellanliggande precision</i>	28
<i>Carry-over</i>	28
<i>Linjäritet</i>	29
Slutsatser	30

Omnämmanden.....	30
Referenser.....	31

Inledning

Generellt är urinanalyser bland de vanligaste analyserna som beställs på laboratorier, då de är till stor nytta vid utredning av patologiska tillstånd som drabbar urinvägar och njurar [1]. Analys av urinsediment är en utav dem och analyseras främst manuellt i ljusmikroskop, där beståndsdelarna identifieras och mängden bestäms kvantitativt eller semikvantitativt. Trots att analysen ses som gold standard inom urinsedimentdiagnostik, bedöms den ofta som en otillräckligt standardiserad teknik [2, 3]. Faktorer som bland annat provmaterialets ålder, mängd, homogenitet samt metodskillnader bidrar till detta. Att provupparbetning och analys både är tids-och arbetskrävande är ytterligare nackdelar med metoden [4].

Idag finns en rad olika automatiserade instrument på marknaden för urinpartikelanalys. Studier har visat fördelarna med automatiserad analys, där tids-och arbetsbesparing samt möjlighet till utveckling av en standardiserad metod är de främsta [1]. Det kliniskt kemiska laboratoriet på Länssjukhuset Ryhov (Jönköping, Sverige) använder sig idag av en semikvantitativ ljusmikroskoperingsmetod. Målet är att ersätta en stor del av metoden med en automatiserad metod. Instrumentet UF-5000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) planeras användas för att konstruera metoden. För att möjliggöra införandet krävs utprovning av instrumentet samt utvärdering av metoden innan denna kan användas för diagnostik. Jämförelse med tidigare metod, inom-och mellanliggande precision samt carry-over är några av delarna som ingår vid verifiering enligt laboratoriets protokoll och är delar som studien berör.

Bakgrund

Njurens patofysiologi

Njursjukdomar som en individ kan drabbas av klassificeras efter vilken vävnad i njuren som påverkats. Initialt kan njursjukdomar endast påverka en morfologisk komponent, som till exempel glomeruli eller tubuli. Däremot kommer övriga strukturer i njuren påverkas då de ligger i anknytning till skadans ursprung eller är beroende av varandra samtidigt som sjukdomsprocessen fortskrider. Några exempel på vanliga tillstånd och sjukdomar är glomerulär skada, tubulär skada, akut eller kronisk njursvikt samt nefrotiskt syndrom [5].

Glomerulära sjukdomar

Vid glomerulära sjukdomar påverkas njurens kapillärnystan. De morfologiska förändringarna som kan förekomma är cellulär proliferation, leukocytinfiltration, förtjockning av glomerulära basmembran och hyalinisering med skleros. Den cellulära proliferationen utmärks av ökat antal endotelceller, mesangiala celler samt epitelceller. Cellproliferationen kan antingen vara segmental och involvera endast vissa delar av glomeruli, eller fokal, det vill säga att ett visst antal glomeruli påverkas. Proliferationen kan dessutom vara diffus och involvera alla glomeruli. De kliniska fynden som förekommer vid glomerulär skada innefattar hematuri, proteinuri, oliguri (minskad urinmängd), azotemi (förhöjda kvävehalter i blodet), ödem och hypertoni. Beroende på antal glomeruli som är involverade vid skada kan symtomen samt svårighetsgraden av dessa variera [5].

Tubulär skada

Akut tubulär nekros (ATN) innebär destruktion av renaltubulära epitelceller i njurarna. Tillståndet kan resultera i oliguri eller en akut njursvikt. ATN påverkar små segment av tubuli från njurens nefron längs med de medullära segmenten av proximala tubuli till det stigande partiet vid Henles slynga samt samlingsrören. Vid fullständig nekros av tubuliceller kan fenomenet leda till sönderdelning av tubulära basmembranen, vilket leder till att det renala interstitiet exponeras för tubulära lumen. Detta resulterar i att fragment av renaltubulära celler avges i urinen [5].

Akut och kronisk njursvikt

Akut renal njursvikt kännetecknas som en drastisk minskning i glomerulära filtrationshastigheten (GFR), azotemi och en urinmängd som understiger 400 ml/dygn. Orsaken till akut njursvikt kan delas upp i tre kategorier; prerenal, renal och postrenal. Lågt blodflöde till njurarna är en prerenal orsak som kan leda till akut njursvikt. Den främsta orsaken till akut njursvikt är renal skada, där glomerulär, tubulär och vaskulär skada är några exempel. Då orsaken till den akuta njursvikten ligger bortom njuren benämns den oftast som postrenal och omfattar bland annat obstruktion. Vid obstruktion kommer det hydrostatiska trycket i tubuli och Bowmans kapsel att öka och den normala filtrationen genom glomerulära barriären försämras, vilket leder till en minskning av GFR. Med tiden kommer tubuli att påverkas och njurfunktionen avta. Kronisk njursvikt råder då en individ sedan tidigare drabbats av irreversibla njurskador som lett till en förlust av njurfunktionen. GFR minskar stegvis och sjukdom är först detekterbart då 80–85% av njurfunktionen förlorats [5].

Nefrotiskt syndrom

Nefrotiskt syndrom kännetecknas främst av förhöjd permeabilitet av proteiner i glomeruli, där albumin är det vanligast förekommande. Även en ökad mängd av andra proteiner i urinen som immunoglobuliner, komplementkomponenter och antikoagulationsfaktorer kan ses. Syndromet uppstår vid många olika sjukdomar där det basala membranet skadats. Förutom kraftig proteinuri, med mängder på 3,5 g/dag, ses även symtom som hypoproteinemi, hyperlipidemi, lipiduri och ödem [3,5].

Urinsediment och fynd vid njursjukdom

Vid diagnostik av sjukdomar som drabbar urinvägar och njurar, är utmaningen att klargöra orsaken samt var skadan uppstått. Därför är hela analysprocessen viktig; den fysiska, kemiska och mikroskopiska undersökningen. På detta sätt kan sjukdomar upptäckas och processen följas. Sediment i urin är makroskopiskt den massa som efter centrifugering samlats på botten av röret och kan skifta i både mängd och färg beroende på innehåll. Det som är av intresse vid analys är erythrocyter, leukocyter, epitelceller, cylindrar, kristaller samt bakterier och jästsvamp i urinen [3, 5]. Sedimentfynd är i regel inte unika för en specifik sjukdom eller ett tillstånd. Informationen används som indikation av en pågående process, såsom infektion eller inflammation, eller en funktionell förändring i njurarna och urinvägar. Detta omfattar bland annat glomerulära förändringar, tubulär dysfunktion och obstruktion [5].

Hematuri

Förekomst av enstaka erythrocyter ses hos 1–5% av friska individer och räknas som normalt [3], medan förhöjda värden alltid är diagnostiskt signifikanta och klassas som hematuri. Dessa har sitt ursprung från det vaskulära systemet då den vaskulära barriären i njurar eller urinvägarna skadats, vilket tillåter erythrocyter att läcka ut. Ett flertal sjukdomstillstånd såsom glomerulonefrit, njurbäckeninflammation, urinvägsinflammation, njursten samt tumörer kan orsaka tillståndet. Även läkemedel, intensiv fysisk träning eller trauma på njurarna kan leda till hematuri. Erythrocyter i alkalisk eller hypoton urin tenderar att lyseras och klassificeras då som hemoglobinuri, vilket antingen sker i urinvägarna eller *in vitro*. Både hematuri och hemoglobinuri påvisas primärt vid kemiskt remstest, men säger inget om hur allvarlig skadan är eller var denna finns. Analys av urinsediment ger information om erythrocyternas koncentration, tillstånd och morfologi, vilket ger en diagnostisk fingervisning [5].

Leukocyturi

Förhöjt antal leukocyter i urinen är huvudindikatorn för njur-och urinvägsinfektion, men kan även ses vid många andra njursjukdomar. Normalt förekommer 0–10 leukocyter/ μl i urinen då dessa utsöndras från genitalierna hos både män och kvinnor. Vid högre koncentrationer kan däremot en misstanke om inflammation väckas. Vid inflammatoriska processer förflyttar sig leukocyter genom kemotaxis och cellerna deformeras för att kunna ta sig igenom de tubulära kapillärerna och renala vävnaden. Koncentrationen i urinen ökar vid både bakteriella infektioner samt inflammation och består främst av neutrofila granulocyter [5].

Epitelceller

Många olika typer av epitelceller kan förekomma i urinen där skivepitelceller, övergångsepitelceller och renaltubulära epitelceller är bland de vanligaste. Beroende på vilken typ av cell, utseende samt koncentration i urinen kan orsak och ursprung bestämmas. Att epitelceller förekommer i urinen kan bero på allt från åldrande celler som avges vid cellomsättning till epitelskada och sårskorpor i urinvägarna. Skivepitel avges från urinröret på grund av den normala cellomsättningen och saknar i regel klinisk signifikans då det oftast tyder på kontaminering vid provtagning. Övergångsepitel täcker insidan av blåsan, urinledare samt större delen av urinröret hos män. Dessa förekommer normalt i låga koncentrationer i urinen. Förhöjt antal ses vid infektion och inflammation i strukturer där dessa finns. I vissa fall kan även tumörer vara bakomliggande. Renaltubulära celler har sitt ursprung i nefronet och

njurtubuli, dessa förekommer även normalt i urinen i låga koncentrationer. Förhöjt antal ses vid ischemiska tillstånd som chock, sepsis, trauma samt toxiska tillstånd [5].

Cylindrar

Cylindrar bildas i distala tubuli samt samlingsrören och består i grunden av uromodulin (Tamm-Horsfall-protein) som är ett glykoprotein. Proteinet utsöndras från renaltubulära celler vid delar av Henles slynga och distala tubuli. Uromodulinet bildar fibrer som sätter sig fast på celler i lumen temporärt och påbörjar bildandet av cylindrar. Hyalina cylindrar består främst av uromodulinprotein och är den vanligast förekommande cylindern i urinsediment. Förekomst av ett fåtal hyalina cylindrar anses vara normalt, medan ökat antal kan tyda på hård fysisk aktivitet, uttorkning, feber eller stress. De kan även ses tillsammans med andra patologiska cylindrar vid njursjukdom. Hyalina cylindrar kan på grund av snarlikhet med slem orsaka interferens mellan dessa vid analys. Slem är vanligt förekommande i urinen och saknar klinisk relevans [5].

Alla urinkomponenter, bland annat erythrocyter, leukocyter, renaltubulära epitelceller och bakterier, kan ses inkorporerat i hyalina cylindrar och benämns då cellulära cylindrar. En ökad mängd erythrocyter i kombination med erythrocytcylindrar indikerar glomerulär eller tubulär njurblödning, medan avsaknad av dessa tyder på postrenal blödning eller kontamination. Närvaro av leukocytcylindrar indikerar njurinflammation eller infektion. Fynd av dessa åtföljs oftast av bakteriuri, proteinuri och hematuri. Vid glomerulär infektion förekommer även erythrocytcylindrar i större antal jämfört med leukocytcylindrar. För att ta reda på vart infektioner härrör från, det vill säga om den är glomerulär eller tubulär, bör vidare analys utföras. Renaltubulära cylindrar förekommer då delar av nefronet blivit skadat och tubulära basmembranets epitelceller avlägsnats. Bakteriella cylindrar ses främst vid pyelonefrit och dessa innehåller ofta även leukocyter [5].

Granulära cylindrar samt fettcylindrar är några exempel på cylindrar med inklusioner. Granulära cylindrar består av olika typer av granula inkorporerat i uromodulinet, där granula främst består av biprodukter från proteinmetabolismen som avgetts från renaltubulära epitelcellerna. Låga koncentrationer av dessa kan ses hos friska individer, men då de förekommer i större mängd samt specifika former eller i samband med cellulära cylindrar, kan detta tyda på njursjukdom samt ischemisk ATN. Fettcylindrar är dessutom en typ som kan förekomma och indikerar nekros av njurtubulära celler. Dessa cylindrars matrix kan antingen vara hyalina eller granulära och innehåller fria fettdroppar. Fettcylindrar tillsammans med en signifikant proteinuri ses vid flertalet njursjukdomar, bland annat nefrotiskt syndrom [5].

Vaxcylindrar är cylindrar med vaxliknande utseende och är den slutgiltiga versionen av andra cylindrar efter att dessa utsatts för långvarig stas eller tubulär obstruktion. De kan även tyda på kronisk njursvikt samt ischemisk ATN [5].

Kristaller

Ett flertal faktorer bidrar till kristallbildning, bland annat förekomst av ökad mängd lösliga ämnen i urinen, urinflödets hastighet genom njurar och urinvägar samt urinens pH. Ökad mängd av kristaller ses vid uttorkning, stort födointag samt behandling med vissa läkemedel. Dessa faktorer mättar urinen vid filtration med lösliga ämnen som precipiterar och bildar kristaller. Tillsammans med ett långsamt urinflöde koncentreras urinen maximalt och bidrar till bildning. Kristaller är specifika för vilket pH de förekommer i, därav bildas olika typer av dessa. Oorganiska kristaller som oxalat, fosfat, kalcium, ammonium och magnesium bildas i neutral eller alkalisk urin. Organiska kristaller såsom urinsyra, bilirubin och cystin förekommer istället i sur miljö. Kristaller tenderar att bildas efter provtagning då urinen uppnår lägre temperaturer och saknar då diagnostisk signifikans. Då kristaller förekommer i nykastad urin klassas de alltid som kliniskt signifikanta eftersom de bildats *in vivo* och kan orsaka tubulär skada i nefronet. Amorfa salter bildas i urin med lågt pH och låg temperatur och kan bestå av bland annat natrium, kalium och magnesium. Då salterna precipiterar bildas inte kristallformade partiklar, utan små korn som vid stor mängd kan störa analys av urinsediment genom att skymma partiklar av intresse i mikroskop [5].

Bakterier, jästsvamp och spermier

Bakterier i urinsediment tyder i regel på urinvägsinfektion eller kontamination, då bakterier återfinns naturligt på hud, könsorgan och gastrointestinalt. Ovanligare tillstånd omfattar fistlar som kan bildas mellan urinvägen och gastrointestinala vägen och orsaka bakteriuri. Stavformade bakterier är vanligast förekommande men även kocker kan ses. Då bakterietillväxt sker snabbt i kontaminerade urinprover som inte förvaras korrekt måste insamling och förvaring av provet ske enligt föreskrifter [5].

Jästsvamp i urinsediment hos kvinnor tyder oftast på kontaminering från omgivningen. Vid graviditet, användandet av preventivmedel samt diabetes kan jästsvamp orsaka primära urinvägsinfektioner samt vaginala infektioner. Vanligast förekommande jästsvampen i urin är *Candida albicans* [5].

Spermier i urinen saknar generellt klinisk relevans. De kan återfinnas i urinen till följd av retrograd ejakulation. Tillståndet innebär delvis eller total avsaknad av antegrad ejakulation då vätskan istället leds bakåt och in i blåsan. Diagnos upptäcks och fastställs ofta i samband med infertilitet hos män. Spermier i sediment kan även ses hos äldre män då de läcker ut i urinen på grund av reducerad sammandragning av urinrörets sfinkter [6, 7].

Provtagning och preanalytiska faktorer för analys av urinsediment

För analys av urinsediment rekommenderas en volym på 10–15 ml mittportionurin. Volymen fastställer att provet är representativt för de olika element som undersöks [5]. Mittportion försäkrar att uretafloran samt skivepitel har sköljts bort innan provmaterialet samlas in då dessa bidrar till kontaminering. Morgonurin är att föredra med minimalt 4 timmars inkubation i blåsan för mer koncentrerad urin. Den sura miljön som uppkommer vid längre inkubationstider bidrar dessutom till en stabilare miljö för erythrocyter, leukocyter och cylindrar vilket förhindrar att dessa bryts ner [5, 8].

Analys bör ske omgående av nykastad urin. Om det inte är möjligt kan provet förvaras i rumstemperatur (20°C) i 1–2 timmar, därefter i kylskåp (4–6°C) i upp till 8 timmar. Detta för att motverka bakterietillväxt i urinprovet innan analys. Urin med pH <7 är att föredra, då alkalisk urin både bidrar till nedbrytning av cellkomponenter samt bildning av vissa kristaller *in vitro*, som kan störa analysen [5]. Tillväxt av ureaspositiva bakterier i urinprovet kan medföra alkalisk urin då urea spjälkas till alkaliska ämnen, såsom ammoniak [3, 5]. Ett annat förvaringsalternativ är tillsats av konserveringsmedel efter provtagning för att bibehålla partiklarnas morfologi [5].

Metoder för analys av urinsediment

Metodprincip för Fully Automated Urine Particle Analyzer UF-5000 på urinsediment

Instrumentet UF-5000 analyserar urinsedimentpartiklar kvantitativt i humanurin samt human kroppsvätska, vilket anges i partiklar/ μl . Enligt tillverkaren kan inmatningen av ocentrifugerade urinprover ske på två sätt; öppet eller slutet system. Öppet system innebär att urinprover matas in manuellt, samtidigt som en urinvolym på minst 600 μl krävs. I det slutna systemet kan flera prover analyseras efter varandra då de matas in automatiskt. Däremot krävs en större urinvolym på minst 2 ml. Dessutom rekommenderar tillverkaren analys i det öppna systemet vid små urinvolymer [1].

Enligt tillverkarens beskrivning av UF-5000 används en flödescytometrisk metod där instrumentet analyserar provet i två olika kanaler; Core Channel (CR-kanal) och Surface Channel (SF-kanal). SF-kanalen analyserar partiklar som saknar nukleinsyror, till exempel cylindrar, kristaller och erythrocyter. CR-kanalen genomför analys på nukleinsyrainnehållande parametrar såsom leukocyter, bakterier och epitelceller. Urinprovet kommer till en början att fördelas av instrumentet till de två kanalerna och blandas med lyseringsvätska för respektive kanal. Denna löser upp strukturer som kan störa analys. I CR-kanalen löses erythrocyter och kristaller upp som annars kan störa vid klassifikation medan lösningen förstör de amorfa salter och slem som förekommer i SF-kanalen. För detektion och identifiering av de olika partiklarna erhålls information flödescytometriskt genom ljusets spridning och dessutom färgar fluorokromlösningar in de olika strukturerna. Genom att kombinera kanalerna omfattas ett flertal diagnostiska parametrar som instrumentet analyserar (Sysmex Corporation, Kobe, Japan), se Tabell 1.

Hydrodynamisk fokusering används för att partiklarna ska kunna analyseras separat. Partiklarna flödar då i en cellsuspensionsvätska samtidigt som vätskan omsluts av en flödesvätska, utan att de blandas. På så sätt bildas ett flöde mellan de två vätskorna där partiklarna sedan stöts ut en och en in i en flödescell [9]. När väl partiklarna befinner sig i flödescellen bestrålas de av en fokuserad laserstråle på 488 nm som sänds ut från en halvledarlaser, vilket leder till spritt ljus och fluorescerande ljus (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

Ljussignalerna detekteras och omvandlas därefter till elektriska signaler. Framåtspritt ljus fångas upp av fotodioder och tillhandahåller information om partiklarnas storlek och permeabilitet. Sidosprikt ljus, sidofluorescerande ljus samt depolariserat sidosprikt ljus kräver högkänsliga fotomultiplikatorer samt fotodetektorer då de annars är för svaga. Sidosprikt ljus omvandlas och genererar resultat för partiklarnas tjocklek och identifierar de intracellulära komplexa strukturerna. Sidofluorescerande ljus återspeglar partiklars färgbarhet, medan depolariserat sidosprikt ljus omvandlas och ger intensiteten för dubbelbrytning av partiklarna. Det depolariserande spridningsljuset är en ny funktion för instrumentserien och används för att förbättra sensitiviteten för analys av kristaller samt erhålla en förbättrad diskriminator mellan erythrocyter och kristaller [1,10].

Metodprincip för ljusmikroskopering av urinsediment

Ljusmikroskopering av urinsediment är den metod som länge använts och fortfarande ses som gold standard för analys. Det är den vanligast förekommande metoden för urinsedimentanalys

på laboratorier [2]. Analysen bör endast göras om det finns en känd och riktad frågeställning, då det ger en fingervisning till vad det är som ska identifieras. Den koncentrerade massan som lagt sig i botten av centrifugröret efter centrifugering placeras på objektglas, färgas och studeras i mikroskop. Partiklarna detekteras och identifieras visuellt, räknas och anges sedan semikvantitativt som partiklar/synfält eller kvantitativt som partiklar/ μl [3,11]. Vanligast är att både ofärgade och färgade preparat undersöks eftersom urinsediment i regel är genomskinliga och ibland konturlösa i ljusmikroskop, något som försvårar identifiering. Sternheimer-Malbin-färgning är den vanligast förekommande och används för att tydliggöra strukturer såsom celler och hyalina cylindrar i ett sediment. Färgen består av kristallviolett och saffranin i etanollösning [3, 5].

För att resultaten som svaras ut ska vara så exakta och noggranna som möjligt, är det av stor vikt att laboratorier standardiserar metoden för analys av urinsediment. Att preparering och analys utförs konsekvent av all analyserande personal lägger grund för en standardiserad metod. Centrifugeringshastighet och tid kan påverka provets ömtåliga komponenter som erythrocyter och cylindrar, speciellt om denna överstiger det rekommenderade 400–450 g i 5 minuter. Även pipettering av materialet, då det placeras på objektglas, kan leda till förlust av diagnostiskt viktiga parametrar som går sönder under hantering. Koncentrationen samt volymen sediment som granskas i mikroskop bör också standardiseras. Vid semikvantitativ analys, då antal partiklar anges per synfält, ska förstoring samt typen av synfält anges [5]. Omvandling av semikvantitativt resultat med partiklar/synfält till kvantitativt med partiklar/ μl kan göras med en rad olika formler där ursprungsvolym, granskad volym samt synfält tas i beräkning [5, 11]. Genom att räkna urinsediment i en kammare kan ett kvantitativt resultat erhållas direkt [8].

I samband med mikroskopering av urinsediment kan ett kemiskt remstest i form av ett urinstatus utföras. Analysen fungerar som screening av urinprover där parametrar som bland annat pH, protein, glukos, ketoner, acetoacetat, blod, bilirubin och nitrit kan avläsas och detekteras. Metoden bygger på en reagensimpregnerad sticka som efter kontakt med det specifika ämnet genomgår en kemisk reaktion, vilket resulterar i färgskiftning. Resultatet av färgändringen avläses sedan visuellt eller instrumentellt med reflektansfotometri och svaras ut semikvantitativt [5].

Tabell 1. Parametrar som kan identifieras med manuell och instrumentell metod för analys av urinsediment.

Diagnostiska parametrar		Forskningsparametrar
Erythrocyter**	Leukocyter **	Lyserade erythrocyter ***
Olyserade erythrocyter ***	Leukocytaggregat **	Skräp **
Cylindrar **	Epitelceller **	
Hyalina cylindrar **	Skivepitelceller **	
Patologiska cylindrar **	Icke-skivepitelceller ***	Atypiska celler ***
Cellulära cylindrar *	Övergångsepitelceller **	Konduktivitet ***
Granulära cylindrar*	Renaltubulära epitelceller **	Osmolalitet ***
Cylindrar med inklusioner *		
Spermier **	Bakterier **	
Jästliknande celler **	Slem **	
Kristaller **		
Amorfa salter *		

* = Mikroskopering, ** = Mikroskopering och UF-5000 och *** = UF-5000.

Problematik kring mikroskopisk analys av urinsediment fanns redan på 60-talet där flertal studier kommit fram till samma resultat; att metoden inte är tillräckligt standardiserad. Redan då utfördes en studie där delar av syftet var att korrigera de felaktigheter som förknippas med metoden. Bland annat nämns det att den mikroskopiska metoden är den urinanalys med mest betydande variation [12]. Anledningen till att en större variation förekommer vid semikvantitativ metod kan bero på att olika provmängd samt centrifugeringsintensitet används, analys av centrifugerade och ocentrifugerade prover, varierande preparering och avläsning samt att betydande interobservationsvariation råder [4, 12-13]. Det framkommer dessutom att en referensmetod bör ge korrekt identifiering av elementen och en noggrann kvantifiering [12]. Detta skulle kunna vara möjligt med en automatiserad metod då den ger högre specificitet samt sensitivitet, vilket också framkommer i tidigare forskning [1].

Syfte

Syftet var att utvärdera instrumentet UF-5000 samt att jämföra den automatiserade metoden för partikelanalys av urinsediment med manuell mikroskopisk urinsedimentundersökning.

Material och metod

Provurval samt insamling av urinprover

Urinprover för metodjämförelse

Vid jämförelse mellan de två metoderna ingick 69 urinprover bestående av färdiganalyserade urinstatus samt urinsediment som analyserats på kliniskt kemiska laboratoriet vid Länssjukhuset Ryhov (Jönköping, Sverige). Materialet bestod av mittportionurin. För samtliga urinprover erhöles ett urinstatus med CombiScreen® remstest (Analyticon Biotechnologies, Lichtenfels, Tyskland) som avlästes med instrumentet Urilyzer 100 Pro® (Analyticon Biotechnologies, Lichtenfels, Tyskland). Parametrarna som ingick i testet var hemoglobin, leukocyter, nitrit, glukos, albumin och acetoacetat. Resultatet angavs arbiträrt av instrumentet. Inom två timmar från att provet anlät till laboratoriet och förvarats i kylskåp (6°C), tillsattes två droppar 2,5% (w/v) natriumtiocyanat som konserveringsmedel per 10 ml urin.

Minst 8 ml urin krävdes för analys med både manuell och automatisk metod, där 1–2 ml alikvoterades till instrumentet medan resterande användes vid mikroskopering. Urvalet bestod av 43 icke-patologiska och 26 patologiska prover. För de icke-patologiska proverna låg alla analyserade parametrar inom de referensintervall som kliniskt kemiska laboratoriet vid Länssjukhuset Ryhov tagit fram för mikroskopisk metod. För de patologiska proverna låg en eller flera parametrar utanför intervallet. Prover valdes ut så att alla parametrar och hela analysintervallet ingick. Analys utfördes först med UF-5000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) och sedan utfördes mikroskopering med maximalt 48 timmar mellan analyserna där proverna under tiden förvarats i 6°C.

Urinprover för utvärdering av instrumentet UF-5000

Vid utvärdering av UF-5000 krävdes urinprover med värden som omfattade hela analysintervallet för de tre undersökta parametrarna erythrocyter (0–10 000/μl), leukocyter (0–10 000/μl) och epitelceller (0–200/μl). Urinprover med extremt låga och höga värden av parametrarna förekommer sällan vid kliniskt kemiska laboratoriet vid Länssjukhuset Ryhov. För framställning av dessa urinprover, se “Konstruerade prover”.

Metodjämförelse för urinsedimentanalys

Analys i öppet system med UF-5000

Urinprover (n=69) överfördes till konade centrifugrör (Sarstedt, Nümbrecht, Tyskland) och blandades innan de analyserades i instrumentets öppna system. De av intresse i utvärderingen var samtliga diagnostiska parametrar, se Tabell 1. Resultaten svarades ut avbildade i ett spridningsdiagram och i antal/ μl .

Inför varje dag som analys utfördes på instrumentet analyserades positiva kvalitetskontroller (QC). En låg kontroll UF-Control-L och en hög kontroll UF-Control-H (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) användes. Kontrollerna bestod av partiklar som motsvarade erythrocyter, leukocyter, epitelceller, cylindrar och bakterier lösta i en buffert.

Analys med ljusmikroskopering

Kravet för analys var en urinmängd på minst 6 ml. Urinen fördes över till ett graderat centrifugrör med konisk botten (Sarstedt, Nümbrecht, Tyskland). Provet centrifugerades vid 400g i 5 minuter och därefter pipetterades ovanvätskan av så att cirka 0,3 ml sediment återstod. Sedimentet rördes om och 100 μl fördes ner i ett ellermanrör tillsammans med 2–3 μl Sedi-Stain (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). Därefter placerades 20 μl färgat samt ofärgat prov på ett objektglas med ett täckglas över respektive prov. Direkt efter preparering undersöktes hela ytan på objektsglasen i ljusmikroskop samt mikroskop med faskontrast vid 100x-förstoring och vid eventuella fynd vid 400x-förstoring. Partiklarna angavs per synfält vid 400x-förstoring, förutom cylindrar där antal angavs per 10 synfält vid 100x-förstoring.

Mikroskopering utfördes av två legitimerade biomedicinska analytiker vid kliniskt kemiska laboratoriet på Länssjukhuset Ryhov, med behörighet för mikroskopering av urinsediment. För konvertering av semikvantitativt resultat till kvantitativt, användes en omräkningsformel som omvandlar enheten partiklar/synfält till partiklar/ μl . Nedanstående formel användes. High Power Field (HPF) definieras som den synliga arean av maximala förstoringen och syftar på okular 10x och objektiv 40x vilket ger en förstoring på 400x, medan omvandlingsfaktorn F_o tar hänsyn till provets ursprungsvolym innan centrifugering [11].

$$\frac{\text{Antal erythrocyter}}{\text{per HPF}} = \text{Antal erythrocyter} \times F_o = \frac{\text{Antal erythrocyter}}{\text{per } \mu\text{l urin}}$$

Utvärdering av instrumentet UF-5000

För utvärdering av UF-5000 analyserades endast parametrarna erythrocyter, leukocyter och epitelceller. Detta för att prover med högre koncentrationer av dessa parametrar förekommer mer frekvent på laboratoriet. Dessutom kan prover med högre koncentrationer konstrueras genom att celler tillsätts till provet.

Konstruerade prover

För prövning av inomliggande precision, carry-over och linjäritet framställdes prover med koncentrationer motsvarande övre och nedre analysintervallet för erythrocyter, leukocyter och epitelceller. För de höga värdena på erythrocyter och leukocyter ($10\,000/\mu\text{l}$) användes koncentrat innehållande erythrocyter och leukocyter som konstruerats med instrumentet Reveos automatiskt blodbearbetningssystem (Terumo BCT Incorporated, Lakewood, CO) vid Blodcentralen på Länssjukhuset Ryhov (Jönköping, Sverige). Materialet centrifugerades vid $2400g$ i 10 minuter för att skilja på cellerna. Därefter pipetterades buffy-coat respektive erythrocyter ner i urinprover eller 0,9% (w/v) natriumkloridlösning för att få fram prover med de önskvärda koncentrationerna. UF-5000 användes för att bekräfta koncentrationen av provet.

Vid erhållandet av urinprover med en epitelcellskoncentration motsvarande övre delen av analysintervallet ($200/\mu\text{l}$) samlades urin in under en dag och överfördes i en cylinder. Två droppar 2,5% (w/v) natriumtiocyanat per 10 ml urin tillsattes och därefter överfördes hela urinmängden i 50 ml Falconrör (Sarstedt, Nümbrecht, Tyskland) för centrifugering. Materialet centrifugerades vid $400g$ i 5 minuter och därefter pipetterades supernatanten av så att enbart sediment kvarstod. Sedimenten från de olika rören pipetterades alla över till ett gemensamt rör och blandades. Genom spädning med 0,9% (w/v) natriumkloridlösning uppnåddes önskad koncentration på $200/\mu\text{l}$ som bekräftades med UF-5000.

Prover med låg koncentration ($0\text{--}2/\mu\text{l}$) för de tre parametrarna erhöles genom att urinprover spädades med 0,9% (w/v) natriumkloridlösning till önskad koncentration som även här avlästes med UF-5000.

Inomliggande precision

Erythrocyter, leukocyter och epitelceller analyserades för att bestämma inomliggande precision. Vid analys användes låga och höga QC (UF-Control-L och UF-Control-H), samt konstruerade prover med låg, medel och hög koncentration för parametrarna. För att inomliggande precision skulle erhållas analyserades samma kontroll och urinprov tio gånger i rad på instrumentet.

Mellanliggande precision

Vid prövning av mellanliggande precision för erythrocyter, leukocyter och epitelceller med UF-5000 användes enbart en låg och en hög kontroll (UF-Control-L och UF-Control-H). Dessa analyserades tre gånger/dag under en period av fem dagar för att mäta instrumentets reproducerbarhet. Kontrollerna analyserades som dubbelprover under tre tidpunkter för varje dygn, det vill säga sex analyser/dag.

Carry-over

För analys av carry-over användes de konstruerade proverna för erythrocyter, leukocyter och epitelceller. Tre alikvoter av höga värden analyserades (H1-H3) efter varandra, direkt följt av analys av tre låga urinprover (L1-L3). Dessa moment utfördes separat för erythrocyter, leukocyter och epitelceller. De erhållna värdena beräknades enligt nedanstående formel [1].

$$\text{Carry – over ratio} = \frac{L1 - L3}{H3 - L3} \times 100 [\%]$$

Linjäritet

Även linjäritet analyserades och beräknades för erythrocyter, leukocyter och epitelceller. Konstruerade höga urinprover med 0,9% (w/v) natriumkloridlösning späddes till följande koncentrationer; 1, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 och 10 000/μl för erythrocyter och leukocyter samt 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200/μl för epitelceller. Det ursprungliga provet med den högsta koncentrationen celler i serien analyserades på UF-5000. Utifrån det erhållna värdet beräknades sedan ett teoretiskt värde för alla koncentrationer i spädningsserien.

Statistisk analys

Framtagna resultat vid metodjämförelse bearbetades med SPSS 21.0.0.2 (IBM Analytics, Armonk, NY), Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA) samt Method Validator Version 5 (Philippe Marquis, Metz, Frankrike). Statistiska metoder som användes var Passing Bablok-regression för undersökning av överensstämmelse mellan analysmetoder samt om det

förekom någon systematisk avvikelse mellan dessa. Differensanalys med Bland Altman gjordes för att beskriva eventuella skillnader mellan metodernas resultat för proverna. Spearmans rangkorrelationskoefficient angav korrelationen mellan den automatiserade och manuella metoden. Värden som erhöles vid utvärderingen av instrumentet bearbetades med Excel 2016 för beräkning av medelvärde (\bar{x}) standardavvikelse (SD) samt variationskoefficient (CV). Vid signifikansprövning bestämdes signifikansnivån till $p=0,05$.

Etiska överväganden

Analys utfördes på urinprover som anlände till laboratoriet för diagnostiskt syfte. Dessa prover avkodades helt genom att patientetiketter ersattes med en egen nummerserie som enbart användes för studiens syfte. Avkodning utfördes med anledning av personuppgiftslagen där syftet var att skydda patienterna från kränkandet av personlig integritet samt upprätthållandet av sekretess [14, 15]. Proverna kasserades efter samtliga analyser och möjlighet till spårbarhet fanns därmed inte. En etikprövning krävdes inte då forskning avsedd människor och biologiskt material från människan inte gäller för arbeten vid högskoleutbildning på grundnivå samt avancerad nivå. Författningen grundades för skyddandet av människan som individ samt respekt för människan vid forskning [16].

Resultat

Totalt samlades 69 urinprover in och analyserades med både instrumentet UF-5000 och i mikroskop. Från dessa exkluderades tre prover då UF-5000 larmat för interferens mellan erythrocyter och jästceller. Ytterligare 15 urinprover exkluderades då de var icke-patologiska med för låg partikelkoncentration för att täcka övre delen av analysintervallet. Vid metodjämförelsen ingick därmed n=51 prover där 25 var icke-patologiska och 26 var patologiska.

Metodjämförelse av urinsedimentsanalys

Sensitivitet och specificitet

Sensitivitet (SE) samt specificitet (SP) beräknades endast på de parametrar som båda metoder kunde analysera (erythrocyter, leukocyter, skivepitelceller, renaltubulära epitelceller, hyalina cylindrar samt patologiska cylindrar). Cut-off [17] bestämdes för samtliga parametrar för de två metoderna. Cut-off för mikroskopering av urinsediment erhöles från den nuvarande semikvantitativa mikroskopiska metoden på kliniskt kemiska laboratoriet vid Länssjukhuset Ryhov. Cut-off för instrumentet UF-5000 för de olika parametrarna erhöles från Previtali G. et al. artikel [1]. SE varierade mellan 50–100% för de sex parametrarna medan SP varierade mellan 63–97%, se Tabell 2.

För resterande parametrar övergångsepitelceller, spermier, jästsvamp och kristaller kunde SE och SP inte beräknas då otillräckligt antal patologiska prover avseende dessa parametrar fanns till förfogande. För övergångsepitel fann UF-5000 fyra prover innehållande dessa som inte setts i mikroskop medan resterande 47 prover visade sant negativt resultat. Sju prover med kristaller identifierades i mikroskop medan UF-5000 hittade ett. Resterande 47 prover var negativa för kristaller med båda metoder. Ett prov identifierades innehålla jästsvamp med mikroskopering, medan resterande 50 prover var negativa. Två prover innehållande spermier identifierades med manuell metod medan den automatiserade identifierade ett. Resterande 48 prover klassades som sant negativa, se Tabell 2.

Tabell 2. Metodjämförelse mellan ljusmikroskopering av urinsediment och urinpartikelanalys med instrumentet UF-5000 för parametrarna.

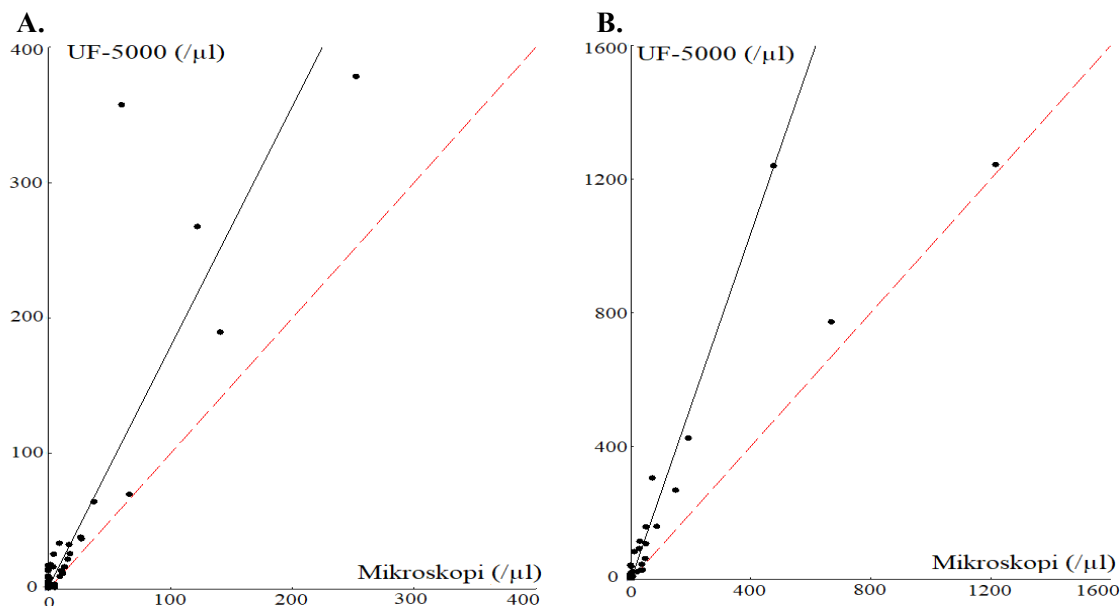
	Mikroskopering			UF-5000						
	Cut-off (partiklar/HPF)	+	-	Cut-off	S+	F+	S-	F-	SE (%)	SP (%)
Erythrocyter	2	8	43	10,1	8	14	29	0	1	0,67
Leukocyter	5	8	43	10	8	17	26	0	1	0,6
Skivepitelceller	1	15	36	10	12	2	34	3	0,8	0,94
Övergångsepitelceller	1	0	51	0,9	0	4	47	0	*	*
Renaltubulära epitelceller	1	2	49	3,1	2	29	20	0	1	0,63
Kristaller	0	7	44	9,85	0	1	43	7	*	*
Jästsvamp	0	1	50	4,7	0	0	50	1	*	*
Spermier	0	2	49	3,1	0	1	48	2	*	*
Hyalina cylindrar	2	16	35	0,81	8	1	34	8	0,5	0,97
Patologiska cylindrar	0	3	48	0,23	2	13	35	1	0,67	0,73

Positiva prover (+), negativa prover (-), sant positiva (S+), falskt positiva (F+), sant negativa (S-), falskt negativa (F-), sensitivitet (SE) och specificitet (SP).

*=Otillräckligt antal S+ prover för att räkna ut SE och SP.

Korrelation och överensstämmelse mellan metoderna

Regressionsanalys och korrelationsanalys utfördes endast på erythrocyter och leukocyter då urinprover med dessa parametrar förekommer mer frekvent på laboratoriet. Vid regressionsanalys med Passing Bablok för UF-5000 och mikroskopering av urinsediment, erhöles en lutning på 1,77 respektive 1,10 samt skärning på 1,80 respektive 2,60, se Figur 1 och Tabell 3.

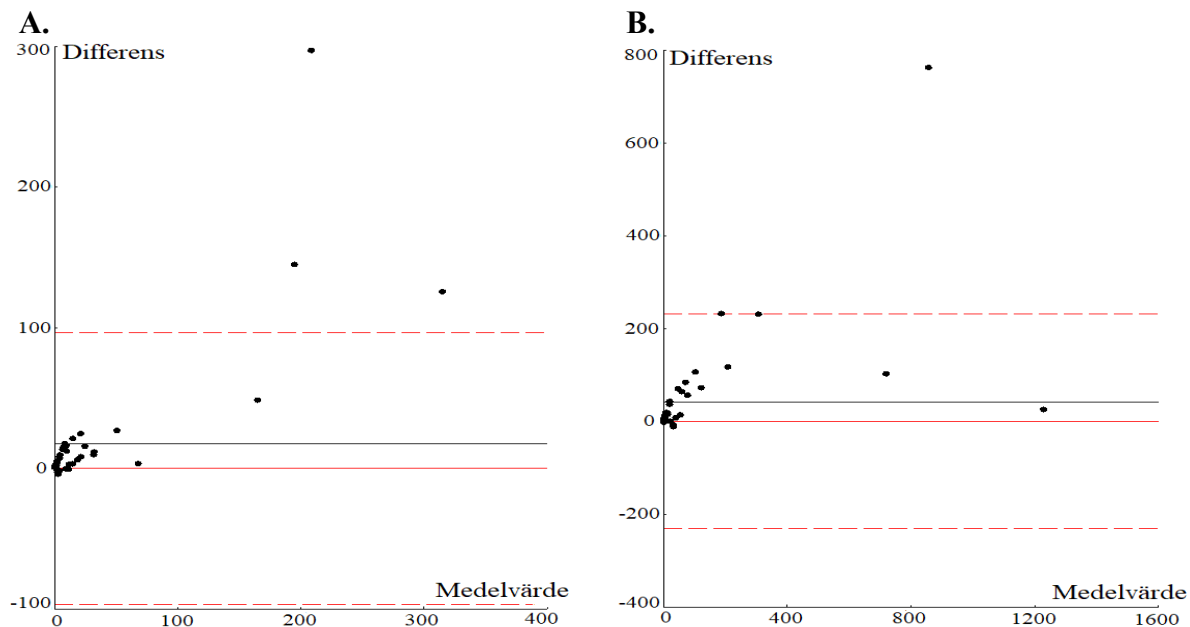


Figur 1. Jämförelse mellan UF-5000 och mikroskopering för erythrocyter (A) och leukocyter (B) med Passing Bablok-regression. Funnen överensstämmelse (—), fullständig överensstämmelse (-----).

Vid korrelationsanalys med Spearmans rangkorrelation för de två parametrarna erhöles Spearmans rangkorrelationskoefficient (r_s) på 0,64 samt 0,80, se Tabell 3. Differensanalys med Bland Altman av värdena för de två parametrarna gav medelvärdet 17,48 för erythrocyter respektive 42,11 för leukocyter. För samtliga värden sågs en statistiskt signifikant skillnad mellan de två metoderna, se Figur 2 samt Tabell 3.

Tabell 3. Jämförelse mellan UF-5000 och mikroskopi för erythrocyter och leukocyter med Passing Bablok-regression, Bland Altman samt Spearmans rangkorrelationskoefficient med 95% konfidensintervall (CI).

	Passing Bablok		Bland Altman	Spearmans
	Skärning (95% CI)	Lutning (95% CI)	Medelvärdets bias (95% CI)	r_s p-värde
Erythrocyter	1,80 (0,70–1,90)	1,77 (1,43–3,10)	17,48 (3,93–31,00)	0,64 <0,001
Leukocyter	2,60 (1,91–3,50)	1,10 (0,70–1,70)	42,11 (9,71–74,5)	0,80 <0,001



Figur 2. Jämförelse mellan UF-5000 och mikroskopering för erythrocyter (A) och leukocyter (B) med Bland Altman-test. Medeldifferens (—), fullständig överrensstämmelse (—), 95% konfidensintervall (-----).

Utvärdering av instrumentet UF-5000

Inomliggande precision

För att bestämma den inomliggande precisionen analyserades både låg och hög kontroll samt konstruerade prover tio gånger efter varandra. De konstruerade proverna hade tre olika nivåer; låg, medel och hög. Dessa hade för erythrocyter medelkoncentrationerna 1,94/ μl , 16,52/ μl samt 5011,96/ μl . Den låga och höga QC medelvärde för erythrocyter låg på 38,2/ μl respektive 206,15/ μl . De konstruerade proverna för leukocytparametern hade medelkoncentrationer på 0,53/ μl , 19,64/ μl samt 4799,17/ μl . För leukocyternas låga och höga QC var medelkoncentrationen 40,05/ μl samt 812,04/ μl . För de konstruerade epitelcellsproverna var medelkoncentrationen för de tre nivåerna 0,97/ μl , 7,64/ μl samt 133,64/ μl medan den låga och höga QC hade medelkoncentrationen 11,02/ μl och 78,93/ μl , se Tabell 4.

Tabell 4. Inomliggande precisionens variationskoefficient (CV) för erythrocyter, leukocyter och epitelceller analyserat med instrumentet UF-5000.

	Erythrocyter			Leukocyter			Epitelceller		
	QC (CV%)	Prov (CV%)	CV _L (%)	QC (CV%)	Prov (CV%)	CV _L (%)	QC (CV%)	Prov (CV%)	CV _L (%)
Låg	5,28	22,30	≤ 50	9,39	56,29	≤ 50	9,13	37,03	≤ 50
Medel		12,34	≤ 15		12,6	≤ 15		8,31	≤ 30
Hög	1,99	1,35	≤ 10	2,59	3,22	≤ 10	8,59	5,47	≤ 30

Kvalitetskontroller UF-Control-L och UF-Control H (QC), konstruerade urinprover (Prov) samt Sysmex Co., Kobe, Japan variationskoefficient (CV_L).

Mellanliggande precision

CV för parametrarna erythrocyter, leukocyter och epitelceller som analyserades på QC under de fem dagar som mätningen pågick sammanställdes. Erhållna CV för parametrarna ligger under tillverkarens utlovade värde, ses i Tabell 5.

Tabell 5. Mellanliggande precisionens variationskoefficient (CV) för erythrocyter, leukocyter och epitelceller analyserat med instrumentet UF-5000.

	Erythrocyter			Leukocyter			Epitelceller		
	\bar{x} (/μl)	CV (%)	CV _L (%)	\bar{x} (/μl)	CV (%)	CV _L (%)	\bar{x} (/μl)	CV (%)	CV _L (%)
Låg QC	39,76	5,53	≤15,0	39,59	6,2	≤15,0	11,82	16,44	≤ 30,0
Hög QC	200,93	3,24	≤10,0	794,61	1,59	≤10,0	77,96	8,21	≤ 30,0

Medelvärde (\bar{x}), variationskoefficient (CV), kvalitetskontrollerna (QC) samt leverantörens variationskoefficient (CV_L).

Carry-over

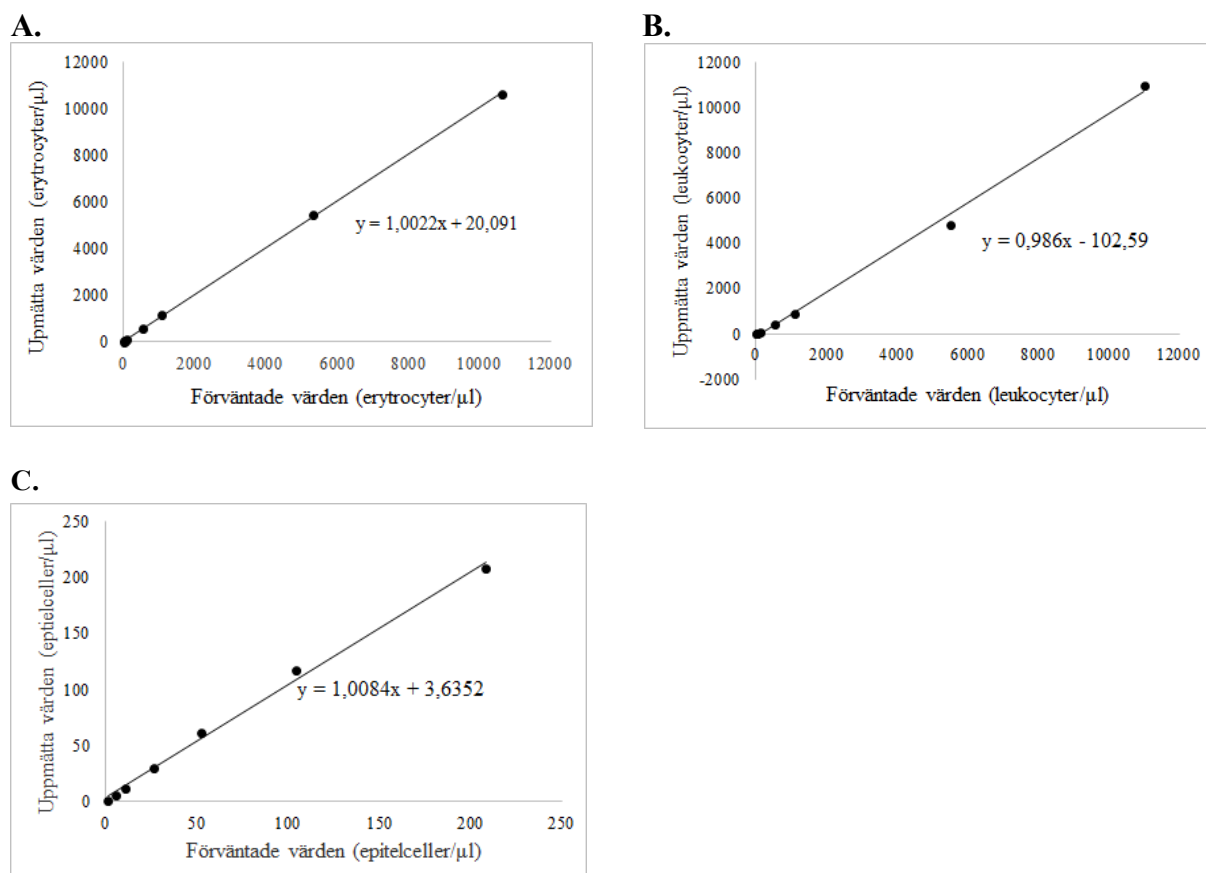
Vid analys av tre urinprover med hög koncentration direkt följt av tre stycken med låg koncentration, beräknades resultatet för carry-over till 0–0,01 % för de tre parametrarna, se Tabell 6.

Tabell 6. Medelvärden (\bar{x}) samt carry-over för erythrocyter, leukocyter och epitelceller analyserat på instrumentet UF-5000.

	Hög \bar{x} (μl)	Låg \bar{x} (μl)	Carry-over (%)
Erythrocyter	13 069,17	0,40	0
Leukocyter	18 390,03	0,80	0,01
Epitelceller	138,03	0,17	0

Linjäritet

Linjäriteten genomfördes i mätintervallet 1–10 000/ μl för erythrocyter och leukocyter samt 1–200/ μl för epitelceller. Regressionen för de tre parametrarna låg på 1,00, 0,99 respektive 1,00. Skärningen för de tre parametrarna var 20,09, -102,59 respektive 3,64, se Figur 3.



Figur 3. Linjäritet för analys av erythrocyter (A), leukocyter (B) samt epitelceller (C).

Diskussion

Studiens syfte var att jämföra den nuvarande referensmetoden för analys av urinsediment med en automatiserad metod, samt utvärdera instrument UF-5000 prestanda. Detta för att möjliggöra ett eventuellt upprättande av en ny analysmetod för urinsediment på kliniskt kemiska laboratoriet vid Länssjukhuset Ryhov (Jönköping, Sverige). Många av de faktorer som gör mikroskopering till en sämre metod kan undvikas med en automatiserad metod. I jämförelse med mikroskopering som både är en tidskrävande och oprecis metod, så levererar UF-5000 snabba och mer precisa resultat. Detta underlättar vid diagnostik och uppföljning av olika njursjukdomar där även små mängder och skillnader hos de olika parametrarna kan vara kliniskt relevanta [1].

Metodjämförelse av urinsedimentanalys

Sensitivitet och specificitet

SE anger en metods förmåga att korrekt klassificera om sjukdom förekommer hos en individ medan SP anger metodens förmåga att korrekt klassificera om sjukdom inte förekommer hos en individ [18]. SE omfattar värden över avsatt cut-off för metoden medan SP syftar till värden under. Sant positiva samt negativa värden innebär de resultat som testat positivt samt negativt för båda metoderna. Falskt negativt omfattar värden som testat positivt med ursprungsmetoden men metoden under utvärdering visat negativt. Falskt positivt syftar till de värden som testat negativt med första metoden medan den andra visat positivt [17].

Diskrepans sågs mellan de två metoderna som studerades. För erythrocyter sågs en perfekt SE (100%) medan SP var något sämre (67%). UF-5000 visar alltså god förmåga för detektion av prover med erythrocytmängd över cut-off medan förmågan att detektera negativa prover är sämre. Detta kan tolkas som att UF-5000 genererar falskt positiva resultat då mikroskopering ses som gold standard för analysen. Liknande utfall sågs även för parametern leukocyter, där SE visar 100% med en lägre specificitet på 60%. För skivepitelceller visade beräkning av SE och SP värden på 80 % respektive 94%, alltså förekommer falskt negativa resultat för parametern. Instrumentell metod detekterar därmed fler av de negativa proverna, medan 20% av de positiva proverna innehållande skivepitelceller inte identifieras. Vid analys av hyalina cylindrar sågs en lägre pålitlighet för automatiserad identifiering då en SE erhöles på 50% för dessa. Instrumentet detekterar alltså endast 50% av proverna med en koncentration över cut-off medan resterande positiva prover förblir oidentifierade. Däremot ses en högre SP på 97%. Lägre

SE och SP erhöles för patologiska cylindrar på 67% respektive 73%, vilket tyder på att både prover med värden över samt under cut-off inte detekteras med den automatiserade analysmetoden. Det är av vikt att notera det antalet sant positiva prover i studien kan behöva kompletteras med ytterligare patologiska prover och att vidare jämförelse mellan metoderna rekommenderas innan några definitiva slutsatser dras kring SE och SP.

Flera parametrar som analyseras i urinsediment är av högt diagnostiskt värde för njursjukdomar innefattande infektioner, ATN, nekros, njursvikt och nefrotiskt syndrom. Därför behöver de falskt negativa resultat som UF-5000 genererat åtgärdas för att säkerställa att dessa komponenter fångas upp. För hyalina cylindrar, patologiska cylindrar och kristaller sågs prover med falskt negativa resultat i studien. Möjlig åtgärd är ytterligare studier där cut-off för parametrarna sänks så att även mindre mängd detekterade partiklar uppmärksammas och utreds, vilket därmed höjer SE för metoden. En sänkning av värdet för cut-off medför dock en sänkning av SP, därav är det viktigt att gränsen mellan patologiskt och icke-patologiskt väljs ut med omsorg. Generellt är hög SE önskvärt för screeningtest medan hög SP är att föredra då testet används för att bekräfta sjukdom. För vidare studier av metodjämförelse för UF-5000 kan en så kallad "receiver operator characteristic-curve", eller ROC-kurva konstrueras för att definiera lämpliga cut-off för de olika parametrarna. Genom att konstruera ett diagram där SE är beroende av SP kan lämpliga koncentrationer för cut-off avläsas [17].

De avvikande resultaten kan även bero på analysfel. I tidigare studier har interferens mellan hyalina cylindrar och slem i urinen noterats [1], vilket även skulle kunna förklara den låga SE för dessa i den här studien. En felkälla vid analys av kristaller i urin är att de kan bildas *in vitro* då ämnena precipiterar på grund av temperatur- och pH-ändringar vid förvaring [5]. Att den maximalt tillåtna tiden bestämdes till 48 timmar mellan analys i instrument och i mikroskop för studien är viktigt att ha i åtanke. Eftersom mikroskopering utfördes efter analys med UF-5000 kan kristaller ha bildats under förvaring och ligga bakom mängden falskt negativa prover som mikroskopi genererat. Analys av spermier stämde inte heller överens mellan metoderna. För provet innehållande spermier vid mikroskopering, bekräftades det att dessa saknade huvud och att enbart svansen kunde identifieras. Det här kan vara en anledning till att instrumentet inte lyckats identifiera dem och är därmed en svaghet i de fall då spermier inte är intakta.

Mikroskopering av urinsediment som referensmetod

Flertalet tidigare studier där manuell partikelanalys av urinsediment jämförts med andra automatiserade metoder och instrument redovisar problematiken i att jämföra resultaten

utifrån dessa [4, 19, 20]. Många faktorer kan ligga till grund, där den främsta anledningen till dålig överensstämmelse anses vara svårigheten att standardisera den manuella semikvantitativa metoden. Att UF-5000 genererar falskt positiva resultat kan därför tolkas som att den automatiserade metoden hittar mer än vad den manuella metoden gör. Bristen behöver alltså inte ligga hos UF-5000 utan i referensmetoden, vilket även tidigare studier resonerat kring där andra urinpartikelinstrument jämförts med mikroskopering som referensmetod [4, 19, 20]. Det faktum att det inte finns någon visuell bekräftelse för att de partiklar som UF-5000 identifierar faktiskt klassificeras korrekt, leder till att mikroskopi fortfarande ska anses vara referensmetod.

Korrekt och konsekvent hantering, preparering samt analys av provet i mikroskop ligger till grund för pålitliga resultat. Rekommenderade ursprungsmängden urin för mikroskopering bör enligt litteraturen ligga mellan 10–15 ml för ett representativt resultat [5]. Enligt kliniskt kemiska laboratoriet vid Länssjukhuset Ryhovs protokoll är kravet för analys 8 ml medan det i studien bestämdes att gränsen var 6 ml på grund av begränsat antal prover med önskad volym. Att lägre ursprungsvolym användes kan ligga bakom de lägre värdena för mikroskopi i jämförelse med UF-5000. Även volymen kvarstående sediment efter avpipettering av supernatanten var ostandardiserad, då den enligt protokoll bestämdes till cirka 0,3 ml, alltså kan denna ha varierat. En ytterligare faktor som kan påverka är observatörsvariation, vilket uppstår då flera olika personer analyserar prover. Två biomedicinska analytiker med behörighet för mikroskopering av urinsediment analyserade proverna, vilket innebär en risk för att observatörsvariation råder. Det i sin tur påverkar klassificering och bedömning för SE och SP [4, 19, 21].

Då en ny automatiserad metod för analys av urinsediment ska upprättas krävs en referensmetod som kvantifierar urinsedimentpartiklarna korrekt och ger tillförlitliga resultat för jämförelse. För ändamålet rekommenderas räkning av ocentrifugerat urin i räknekammare av instrumentets tillverkare (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) då denna är mer standardiserad och genererar mer jämförbara resultat. Partiklar riskerar att förloras under de prepareringssteg som materialet genomgår innan analys, vilket kan påverka kvantitativ bestämning. Även brister i formeln som användes för omräkning av semikvantitativt till kvantitativt värde kan ha påverkat resultatet. Formeln rekommenderas användas enbart för erythrocyter och leukocyter medan de andra parametrarna ska noteras arbiträrt [8]. I den här studien användes formeln även för övriga parametrar. Att därför gå vidare med ytterligare studier där mikroskopi av urinsediment sker med hjälp av kammare istället för med omräkningsformel kan vara av värde [22].

Överensstämmelse och korrelation mellan metoderna

Regressionsanalys används för att se om det går att prediktera värdet på ena variabeln genom den kunskap som är erhållen från en annan variabel samt detektera eventuella systematiska avvikelser [17, 23]. Passing Bablok-regression bygger på relationen mellan värden givna från två olika metoder och beskriver orsaken bakom skillnaderna som råder för dessa [24]. För att undersöka relationen mellan metoderna i studien ingick en regressionsanalys med Passing-Bablok för erythrocyter och leukocyter. Regressionskoefficienten för erythrocyter och leukocyter var 1,77 respektive 1,10 med en skärning på 1,80 respektive 2,60. Regressionskoefficienten tillsammans med det uträknade 95% CI på 1,43–3,10 för erythrocyter och 0,70–1,70 för leukocyter beskriver en proportionell avvikelse mellan metoderna. Då konfidensintervallet för båda parametrar inte täcker värdet 0, kan det konstateras att metoderna skiljer sig statistiskt signifikant från varandra och att en proportionell avvikelse existerar. Detsamma gäller för erythrocyternas och leukocyternas skärning med 95% CI 0,70–1,90 respektive 1,91–3,50, där perfekt överensstämmelse ses då linjen skär origo. Då värdet 0 inte återfinns i intervallet här heller tyder det ytterligare på systematiskt signifikant skillnad mellan metoderna. Då två avsevärt olika metoder jämförs, en manuell med en automatiserad, så är det väntat att signifikant systematisk skillnad förekommer mellan dessa.

Med korrelationsanalys undersöks och anges graden av samband som finns mellan två variabler [23]. I metodjämförelsen studeras det hur den automatiserade metoden förhåller sig till mikroskopering av urinsediment med ett Spearmans rangkorrelationstest. En statistiskt signifikant korrelation för erythrocyter och leukocyter sågs på 0,64 ($p < 0,001$) respektive 0,80 ($p < 0,001$). Då båda värden är positiva inom intervallet $-1 \leq r_s \leq +1$ tyder det på en positiv korrelation mellan metoderna, där ett värde på +1 hade indikerat perfekt korrelation. Högre korrelation sågs för leukocyter än erythrocyter.

Då överensstämmelse mellan två olika metoder jämförs är det även av intresse att undersöka hur stor differens som förekommer mellan den nya och gamla metoden. Det kan göras med ett Bland Altman-differenstest. Differens är en viktig aspekt då det klargör hur mycket en ny metod faktiskt skiljer sig och om denna skillnad i så fall har någon klinisk relevans [25]. Då Bland Altman konstruerades för erythrocyter och leukocyter i studien sågs en positiv differens för båda parametrarna, se Figur 2. Den positiva differensen visar att UF-5000 i regel genererar resultat med högre värden jämfört med mikroskopi för samma prov. Förutsatt att mikroskopi är referensmetod kan resultatet tolkas som att instrumentet genererar falskt positiva resultat.

Eftersom samma trend även sågs då SE och SP beräknades tyder det på att UF-5000 och den automatiserade metoden detekterar fler partiklar jämfört med mikroskopi.

Utvärdering av instrumentet UF-5000

Inomliggande precision

Precision används för att beskriva den variation som förekommer vid en mätmetod. När variation mellan upprepade mätningar studeras under identiska förhållanden kallas detta för inomliggande precision [26]. Ett CV anger hur stort en SD är i förhållande till ett \bar{x} och används oftast på laboratorier vid jämförelser av olika metoders mätnoggrannheten [23]. Däremot bör \bar{x} beaktas när CV erhålls då den procentuella skillnaden blir större för lägre koncentrationer på \bar{x} än för högre [27].

Resultatet för inomliggande precision i den här studien kan tolkas som goda då CV för kontrollerna stämmer väldigt bra överens med CV_L och bekräftas även då inomliggande precision utträttats på konstruerade prover. Den låga och höga kontrollens medelvärde för erythrocyter, leukocyter och epitelceller uppmättes till det som utlovats av leverantören. Däremot finns ett undantag för leukocytprovet med extremt låg koncentration ($0,53/\mu\text{l}$) där ett CV på 56,26 % erhöles och ett CV på $\leq 50\%$ enligt leverantören var acceptabelt, se Tabell 4. Eftersom väldigt låga koncentrationer analyserades bedöms dessa som att inte ha någon stor klinisk relevans, då värdet ändå ligger under cut-off och klassas som negativt. Det kan normalt förekomma 1–10 leukocyter/ μl i urinen och därmed kommer den låga mätnoggrannheten för leukocyter inte ha någon betydelse vid diagnostik. Det är först vid koncentrationer kring cut-off som det går att misstänka en infektion. Dessutom ses det att den låga kontrollen med koncentrationen $38,2/\mu\text{l}$ hade ett bättre CV på 9,39% än provet med låg koncentration. Detta beror på den högre koncentrationen för den låga kontrollen samt kontrollens stabilitet, då de enligt leverantören (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) är utvecklade för att hålla upp till 30 dagar. Urinprover är mer instabila och bör helst analyseras omgående, alternativt inom 1–2 timmar då de förvarats i 20°C [8]. Detta har inte alltid varit möjligt och kan därför ha påverkat analys av inomliggande precision. Partiklarna i proverna kan dessutom ha hamnat i botten av provrören, eventuellt fastnat på provrörskorken samt att lösningen inte homogeniserats vid blandning.

Då inomliggande precision vid koncentrationer kring cut-off samt höga koncentrationer är kliniskt signifikanta, är det väsentligt med högre mätnoggrannhet och lågt CV vid dessa

koncentrationer. Värdet kring cut-off är avgörande då svarsresultatet antingen klassificeras som positivt eller negativt, vilket kan avgöra om individen är sjuk eller inte. Då CV för olika koncentrationer (hög, medel, låg) analyserades kan det utifrån Tabell 4 ses en avsevärd skillnad vad gäller mätnoggrannheten. Det vill säga att UF-5000 får bättre mätnoggrannhet ju högre koncentration som analyseras. Detta kan konstateras med den inomliggande precisionen för parametrarna erythrocyter samt epitelceller, däremot inte leukocyter då en avvikelse för beräknat CV kunde ses, se Tabell 4. CV för höga koncentrationen leukocyter (4799/ μl) låg på 3,22% medan den höga kontrollens koncentration (812/ μl) fick ett bättre CV på 2,59%. Detta trots kontrollens lägre koncentration. Därför går det inte att konstatera en direkt korrelation mellan hög koncentration och lågt CV vid analys av leukocyter för instrumentet.

Att UF-5000 kan kvantifiera väldigt höga koncentrationer för de olika parametrarna är gynnsamt i de fall då läkare vill följa patienter med till exempel hematuri eftersom ett exakt värde erhålls. Med den mikroskopiska metoden anges frasen ">100 erythrocyter/leukocyter" då det förekommer extremt höga koncentrationer, vilket blir alltför omständligt då alla celler räknas. Dessutom är det svårt för de som mikroskopierar att detektera övriga fynd som täcks om ett prov skulle innehålla för mycket av erythrocyter, leukocyter, leukocytaggregat, amorfa salter samt skräp. Dessa prover går därmed inte att analysera med mikroskopisk metod och ett svar om att urinprovet inte går att analyseras ges.

Mellanliggande precision

Mellanliggande precision erhålls när upprepade mätningar studeras under förändrade omständigheter som tid, operatör, kalibratorer, reagenser och laboratorier [26]. För denna studie mättes mellanliggande precision under en längre tid. Mellanliggande precisionen för UF-5000 analyserades endast på kontroller eftersom identiskt material skulle studeras under en tidsperiod på fem dagar medan patientprover för urinsediment har en hållbarhet på maximalt 48 timmar. Den låga och höga kontrollen hade ett medelvärde som låg inom det utsatta av leverantören. Mellanliggande precisionen gav goda resultat då alla värden för CV som erhöles för parametrarna på låg och hög nivå befann sig inom det leverantören utlovat. Detta speglar en acceptabel mätnoggrannhet som studeras vid upprepade analyser under förändrade omständigheter och att värden inte varierar mellan utförda analyser.

Carry-over

Med ökad automatisering på laboratorierna innebär det en större risk för carry-over då många steg som pipettering, tvätt och alikvotering sköts av instrumenten. Det som studeras är

överförbarheten av partiklar som kan uppstå då prover med hög koncentration av erythrocyter, leukocyter, epitelceller analyseras strax innan prover med låg koncentration. Att studera carry-over är en viktig aspekt vid instrumentutvärdering eftersom patientprover kan komma att påverkas samt ha en negativ inverkan på diagnostiken då carry-over råder [28]. Vid studerandet av carry-over användes konstruerade prover med extremt höga koncentration ($\geq 10\,000/\mu\text{l}$ för erythrocyter och leukocyter och $\geq 130/\mu\text{l}$ för epitelceller), se Tabell 6. Dessa visade sig inte ha någon effekt när prover med väldigt låg koncentration analyserades direkt efter, eftersom den maximala carry-over låg på 0,01%. Resultatet kan bero på de automatiska sköljningssteg som utträttas efter att prover med höga koncentration analyserats. Därmed går det att konstatera att carry-over inte förekommer då erythrocyter, leukocyter samt epitelceller analyseras på UF-5000. Liknande resultat för carry-over på UF-5000 framgår även i tidigare studier [1, 10].

Linjäritet

För att säkerställa att instrumentet UF-5000 analyserar partiklarna korrekt över hela analysintervallet, prövas linjäritet för att se om sambandet mellan de beräknade värdena stämmer överens med de uppmätta värdena för intervallet. Det är även av intresse att identifiera eventuella systematiska skillnader. För samtliga parametrar sågs en lutning mellan 0,99–1,00, vilket tyder på ett proportionellt samband mellan värdena. För erythrocyter avlästes en skärning på 20,1 vilket visar att en konstant medelavvikelse finns på $20,1/\mu\text{l}$ mellan instrumentets och de förväntade värdena, då UF-5000 genererat högre resultat. För leukocyter ses istället en konstant medelavvikelse på -102,6, vilket talar för att de uppmätta värdena med UF-5000 i genomsnitt ligger lägre med en avvikelse på $102,6/\mu\text{l}$. För epitelceller ses en något lägre konstant medelavvikelse på $3,6/\mu\text{l}$.

I en tidigare studie då UF-5000 utvärderats har även den tidigare versionen av instrumentet UF-1000i använts som komplement [1]. På detta sätt har koncentrationerna kunnat kontrolleras med ett verifierat instrument vilket säkerställt koncentrationen av partiklar innan spädning påbörjats. Då koncentrationen för spädningsserien i detta fall inte kunnat bekräftas, kan detta vara orsak till de systematiska fel som uppstått.

Slutsatser

UF-5000 är ett effektivt och lätthanterligt instrument som har potential att underlätta både tids- och arbetsmässigt vad det gäller den manuella metoden för analys av urinsediment. Då resultaten inte konsekvent visat stor överensstämmelse mellan metoderna för alla parametrar krävs ytterligare utvärdering och prövning där faktorer som är av klinisk relevans behöver åtgärdas. Ytterligare studier med en mer exakt referensmetod samt ett större antal patologiska prover bör utföras för mer jämförbara resultat. I dagsläget kan instrumentet fungera som komplementmetod till mikroskopering men kan inte ersätta manuell mikroskopering fullständigt.

Omnämmanden

Ett stort tack till kliniskt kemiska laboratoriet vid Länssjukhuset Ryhov (Jönköping, Sverige) som gjort studien möjlig. Ett speciellt tack till handledarna som bidragit med sin hjälp och kunskap.

Referenser

1. Previtali G, Ravasio R, Seghezzi M, Buoro S, Alessio MG. Performance evaluation of the new fully automated urine particle analyser UF-5000 compared to the reference method of the Fuchs-Rosenthal chamber. *Clin Chim Acta*. 2017;472:123-130.
2. Sanchez-Mora C, Acevedo D, Porres A, Chaques M, Zapardiel J, Gallego A et al. Comparison of automated devices UX-2000 and SediMAX/AutionMax for urine samples screening: A multicenter Spanish study. *Clin Biochem*. 2017;50:714-718.
3. Nilsson-Ehle P, Söderlund M, Theodorsson E. Laurells klinisk kemi i praktisk medicin. Upplaga 9:4. Lund: Studentlitteratur; 2012. s. 20, 499-501, 507-508.
4. Lamchiaghase P, Preechaborisutkul K, Lomsomboon P, Srisuchart P, Tantiniti P, Khan-u-ra N et al. Urine sediment examination: A comparison between the manual method and the iQ200 automated urine microscopy analyzer. *Clin Chim Acta*. 2005;358(1-2):167-174.
5. Brunzel N. *Fundamentals of Urine & Body Fluid Analysis*. 3rd edition. Missouri: Elsevier; 2013. p. 38, 43, 54, 72, 111, 119, 122, 157-210, 239-270.
6. Colpi G, Weidner W, Jungwirth A, Pomerol J, Papp G, Hargreave T, et al. EAU Guidelines on Ejaculatory Dysfunction. *Eur Urol*. 2004;46(5):555-558.
7. Tomita M, Kikuchi E, Maeda T, Kabeya Y, Katsuki T, Oikawa Y, et al. Clinical Background of Patients with Sperm in Their Urinary Sediment. *PLoS One*. 2015;10(9).
8. European Confederation of Laboratory Medicine. European Urinalysis Guidelines. *Scand J Clin Lab Invest*. 2000;60:1-96.
9. Sunheimer R, Graves L. *Clinical Laboratory Chemistry*. 2nd ed. New Jersey: Pearson Education; 2018. p. 112-113.
10. Delanghe J, Kouri T, Huber A, Hannemann-Phol K, Guder W, Lun A, et al. The role of automated urine particle flow cytometry in clinical practice. *Clin Chim Acta*. 2000;301(1-2):1-18.
11. European Confederation of Laboratory Medicine. Microscopic examination of the sediment European Urinalysis Guidelines. 2008 [2018-05-01] Available: http://e-learning.studmed.unibe.ch/UroSurf_EN/theory/sedimethods4.html?urosurf|theory|sediment|sedimethods|4.
12. Gadeholt H. Quantitative Estimation of Urinary Sediment, with Special Regard to Sources Error. *Brit. med. J*. 1964(1):1547-1549.

13. Mayo S, Acevedo D, Quinones-Torrelo C, Cano's 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(4):262-270.
14. Personuppgiftslag (SFS 1998:204). Stockholm: Justitiedepartementet.
15. Offentlighets- och sekretesslag (SFS 2009:400). Stockholm: Justitiedepartementet.
16. Lag (2003:460) om etikprövning av forskning som avser människor. Stockholm: Utbildningsdepartementet.
17. Bishop M, Fody E, Schoeff L. *Clinical Chemistry - Principles, Techniques and Correlations*. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2013. p.57-59,80-85.
18. Parikh R, Mathai A, Parikh S, Sekhar C, Thomas R. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian J Ophthalmol.* 2008;56(1):45–50.
19. Bakan E, Ozturk N, Baygatalp NK, Polat E, Akpınar K, Dorman E, et al. Comparison of Cobas 6500 and Iris IQ200 fully-automated urine analyzers to manual urine microscopy. *Biochem Med.* 2016;26(3):365-375.
20. İnce F, Ellidğ H, Koseoğlu M, Şimşek N, Yalçın H, Zengin M. The comparison of automated urine analyzers with manual microscopic examination for urinalysis automated urine analyzers and manual urinalysis. *Pract Lab Med.* 2016;1(5):14-20.
21. Kanstrup F, Bjornbak C, Warnecke M, Heiberg P, Munck L. Observer variability in the histopathologic diagnosis of microscopic colitis and subgroups. *Hum Pathol.* 2013;44:2461–2466.
22. Kouri T, Gyory A, Rowan RM. ISLH Recommended Reference Procedure for the Enumeration of Particles in Urine. *Lab Hematol.* 2003;9(2):58-63.
23. Ejlertsson G. *Statistik för hälsovetenskaperna*. Upplaga 2:3. Lund: Studentlitteratur; 2012. s, 98, 107.
24. Medcalc. Passing Bablok regression. 2018. [2018-05-22]. Available: https://www.medcalc.org/manual/passing-bablok_regression.php
25. Bland J, Altman D. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurements. *Int J Nurs Stud.* 2010;47(8):931-936.
26. Cheser D. Evaluating Assay Precision. *Clin Biochem Rev.* 2008;(1):23-26.
27. Zaddy M. Mean, Standard Deviation, And Coefficient Of Variation. Westgard QC; 2009 [cited 2018-04-23]. Available: <https://www.westgard.com/lesson34.htm#6>

28. Armbuster D, Alexander D. Sample to sample carry-over: A source of analytical laboratory error and its relevance to integrated clinical chemistry/immunoassay systems. *Clin Chim Acta*. 2006; 373(1-2): 37-43.