

Analyse des performances de l'automate Sysmex UF4000 associé à l'analyseur d'images UD10 pour l'examen cytotobactériologique des urines

Performance analysis of the Sysmex UF4000/UD10 for diagnosis of urinary tract infections

Margaux Allain

Kévin Sun

Céline Predal

Xavier Nassif

Agnès Ferroni

Assistance publique hôpitaux de Paris,
Laboratoire de microbiologie clinique,
Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris,
France

Résumé. *Objectif :* l'automate de fluorocytométrie en flux UF-4000 et l'analyseur d'images UD-10 (Sysmex) ont été évalués en comparaison avec la microscopie optique et la culture. *Matériel et méthodes :* 2 695 urines consécutives de patients ont été incluses. Le comptage cellulaire a été réalisé sur l'automate et au microscope sur cellule Kova pour 316 échantillons, et comparé sur la base d'un seuil de 10 leucocytes (GB)/ μL et 10 hématies (GR)/ μL . Dans un second temps, le nombre seuil de bactéries à partir duquel une alerte bactérienne est déclenchée a été choisi par comparaison avec la culture. Enfin, la fiabilité (versus coloration de Gram et culture) de la nature des alarmes Gram négatif (GN?) et Gram positif (GP?) a été testée sur 362 échantillons. *Résultats :* le taux de discordances microscope/automate était de 8,5 % pour les GB, et de 16 % puis 6,9 % après passage sur l'UD-10 pour les GR. La majorité des discordances correspondaient à des quantités proches du seuil de 10 cellules/ μL , le plus souvent plus élevées avec l'automate. Avec un seuil d'alerte choisi de 200 bactéries/ μL , l'alarme «GN?» et l'alarme «GP?» étaient associées à 91%/86 % et 79 %/20 % de Gram/cultures significatives à bacilles GN et à cocci GP respectivement. *Conclusion :* la corrélation automate/microscopie est bonne pour le comptage des cellules, l'UD-10 permettant de corriger les discordances. L'alarme «GN?» est fiable, permettant d'orienter rapidement le clinicien pour la prise en charge de l'infection. Au total, ces deux automates ont montré des performances très satisfaisantes, permettant d'éliminer l'usage du microscope.

Mots clés : Sysmex UF4000/UD10, ECBU, comptage de cellules, infection urinaire, bactéries

Abstract. *Background:* we evaluated the performance of the flow cytometry-based UF-4000 automated urine analyzer associated with the UD-10 image analyzer (Sysmex), in comparison with optical microscopy and culture. *Materials and methods:* 2,695 consecutive urine samples of patients were included. The cell count was performed using the analyzer and the Kova cell for 316 samples, and compared according to a threshold of 10 white blood cells (WBC) and 10 red blood cells (RBC) / μL . In a second stage, the quantitative threshold of bacteria from which a bacterial alert is triggered was chosen by comparison with the culture. Finally, the reliability (versus Gram staining and culture) of the nature of Gram negative (GN?) and Gram positive (GP?) flags has been tested on 362 samples. *Results:* the microscopy/UF4000 discrepancy rate was 8.5% for WBC, and 16% for RBC which dropped to 6.9% after switching to UD-10. The majority of these discrepancies corresponded to quantities close to the clinical threshold, mostly higher by automatic than by microscopic counts. With a chosen warning threshold of 200 germs/ μL , the «GN?» and «GP?» flags resulted in 91%/86% and 79%/20% of Gram/significant cultures of GN bacilli and GP cocci, respectively.

Article reçu le 08 août 2019,
accepté le 24 octobre 2019

Correspondance : A. Ferroni
<agnes.ferroni@aphp.fr>

Conclusion: the correlation UF4000/microscopy is satisfactory for cellularities, the UD10 allowing to correct discrepancies. The «GN?» flag is reliable allowing a quick diagnostic orientation for the clinician. Finally, UF4000/UD10 has shown very good performances, notably thanks to the integration of the UD-10 image analyzer, which eliminates time consuming optical microscopy cell count.

Key words: Sysmex UF4000/UD10, flow cytometry analyzer, cell count, urinary tract infection, bacteria

L'examen rapide des urines, dès le jour du prélèvement, est important pour décider de l'instauration d'un traitement avec un antibiotique adapté au germe en cause, sans attendre la culture.

La méthode de référence pour le diagnostic des infections urinaires est la détermination du nombre de leucocytes (GB) dans l'urine en fonction d'un seuil de signification clinique ($10/\mu\text{L}$) associée à la culture bactérienne [1]. Les hématies (GR) sont également recherchées pour le diagnostic d'hématurie microscopique, mais ne participent pas à la définition de l'infection urinaire. La visualisation des cellules et des micro-organismes présents dans l'urine est réalisée au microscope optique ou sur un automate. L'utilisation des automates de cytométrie en flux a permis d'améliorer la fiabilité de la quantification de ces cellules et micro-organismes par rapport à la lecture microscopique, en s'affranchissant de la variabilité interopérateurs [2]. Des versions récentes de la gamme Sysmex (UF4000, UF5000) permettent, grâce à quatre canaux différents, d'améliorer la discrimination entre les différentes cellules par rapport aux versions antérieures (UF500, UF1000), notamment dans la différenciation des bactéries à Gram positif et négatif grâce à un canal dédié. Ces automates comptent et classent les cellules par diffusion de lumière (FSC), diffusion latérale de la lumière (SSL), fluorescence latérale (SFL) et diffusion latérale de la lumière dépolarisée (DSS) [3]. Différentes alertes permettent de repérer les bactéries à Gram négatif (GN?), les bactéries à Gram positif (GP?) et les Gram indéterminés (Gram pos/neg). L'association de l'analyseur d'images UD10 couplé au cytomètre en flux permet de ne plus avoir recours au microscope en cas d'alarme du cytomètre. En effet, certaines urines sont réanalysées automatiquement sur l'UD10 suite au déclenchement de règles établies permettant de vérifier les résultats de l'UF (vérification de la présence de levures, vérification du nombre d'hématies en cas d'hématurie isolée par exemple). Sur l'unité centrale associée aux deux automates (UWAM), l'opérateur vérifie visuellement les résultats grâce aux images prises par la caméra de l'UD-10.

Dans cette étude, nous avons évalué dans un premier temps les performances du comptage des cellules par rapport à la lecture microscopique. Dans une deuxième étape, nous avons étudié les performances des alertes bactériennes par

rapport à la culture, afin de définir un seuil au-delà duquel une coloration de Gram devrait être réalisée.

Enfin, nous avons déterminé les performances du type d'alerte (GN?) et (GP?) en les comparant à la coloration de Gram et à la culture.

Matériel et méthodes

Comptage des cellules

Le comptage cellulaire de 316 urines consécutives de patients hospitalisés à l'Hôpital Necker-Enfants malades a été réalisé simultanément sur l'automate et en microscopie optique (cellule Kova). Les discordances ont été analysées en utilisant le seuil de 10 leucocytes (GB)/ μL (correspondant au seuil de décision clinique pour les urines prélevées par voie naturelle) et d'un seuil arbitraire de 10 hématies/ μL [1].

Performance des alertes bactériennes par rapport à la culture

Un total de 2 695 urines consécutives reçues durant 2 mois ont été passées sur le Sysmex, en utilisant deux seuils d'alertes bactériennes différents : $150/\mu\text{L}$ (préconisation du fournisseur) et $200/\mu\text{L}$. Une coloration de Gram a été réalisée pour chaque urine associée à une alerte. Les urines ont étéensemencées systématiquement sur un milieu Uri-Select4 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) et sur une gélose au sang en cas de visualisation de bacilles à Gram positif après coloration de Gram. Les déclenchements des alertes ont été comparés avec les résultats de la culture selon le référentiel en vigueur [1]. Les milieux ont été lus après 16 à 24h d'incubation à $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en aérobiose, puis relus à 48h en cas de leucocyturie isolée avec culture stérile. Une estimation semi-quantitative des bactéries a été réalisée (compte de Kass) de la façon suivante : « culture stérile », 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 ou $> 10^6$ UFC (unités formant colonies)/mL, « > 2 souches » (contamination probable). . . N'ont été prises en compte que les cultures présentant une signification clinique selon les recommandations du référentiel en vigueur [1], les seuils cliniques pouvant varier selon les espèces.

Performance des alertes dans la discrimination des bactéries à Gram positif et Gram négatif

Pour déterminer la fiabilité de la nature des alertes dans la différenciation des bactéries à Gram positif et négatif, 362 urines consécutives avec alarmes « GN ? » ou « GP ? » ont été colorées au Gram puis ensemencées. Les alarmes ont été interprétées par rapport au Gram et aux cultures présentant une signification clinique (cf protocole décrit plus haut) mais également aux cultures contaminées ou inférieures au seuil clinique.

Résultats

Comptage des cellules

Les résultats de la comparaison des comptages de cellules des 316 urines de patients, exprimés en fonction du seuil de décision clinique, sont présentés sur les *tableaux 1 et 2*.

Pour les GB, le taux de discordances était de 8,5 %. Toutes sauf une étaient des discordances automate GB $\geq 10/\mu\text{L}$ versus manuel GB $< 10/\mu\text{L}$. Les discordances en lecture manuelle ont toutes été vérifiées par un deuxième opérateur. L'urine présentant la discordance automate GB $< 10/\mu\text{L}$ versus manuel GB $\geq 10/\mu\text{L}$ a donné 31 GB/ μL (18 GB/ μL en première lecture) en lecture microscopique, et la culture était stérile. Parmi les 26 urines présentant une discordance automate GB $\geq 10/\mu\text{L}$ versus manuel GB $< 10/\mu\text{L}$, 24 (92 %) présentaient un nombre de GB $< 20/\mu\text{L}$, et 4 (15 %) étaient positives en culture.

Pour les GR, le nombre de discordances était de 50 (16 %) sur l'UF4000 puis 21 (6,9 %) après passage sur l'UD10 de 33 urines suite au déclenchement de la règle « hématurie isolée ». Après passage sur l'UD10, 4 discordances ont persisté, toutes avec des valeurs d'hématurie $< 60/\mu\text{L}$. La seule discordance automate GR $< 10/\mu\text{L}$ versus manuel GR $\geq 10/\mu\text{L}$ correspondait à un comptage manuel de 10 GR/ μL .

Performance des alertes par rapport à la culture

La comparaison des alertes (toutes alertes confondues) avec les résultats de la culture sont présentées sur le *tableau 3*, pour les trois seuils d'alertes 100/ μL , 150/ μL et 200/ μL .

Performance des alertes bactériennes « GN? » et « GP? » par rapport au Gram et à la culture

Comparaison alertes bactériennes versus coloration de Gram

La comparaison des alertes « GN? » et « GP? » avec les résultats du Gram des 362 urines étudiées est présentée sur le *tableau 4*. Parmi les urines dont les germes ont pu être visualisés au Gram, dans 91 % des cas l'alerte « GN? »

Tableau 1. Comparaison des leucocytes (GB) lecture manuelle/automate.

GB		Automate (GB/ μL)		
		< 10	≥ 10	Total
Microscope (GB/ μL)	< 10	172	26	198
	≥ 10	1	117	118
Total		173	143	316

Tableau 2. Comparaison des hématies (GR) lecture manuelle/automate.

GR		Automate (GR/ μL)		
		< 10	≥ 10	Total
Microscope (GR/ μL)	< 10	223	21	244
	≥ 10	1	71	72
Total		224	92	316

a donné la bonne morphologie pour les bactéries à Gram négatif contre 79 % pour l'alerte « GP? » vis-à-vis des bactéries à Gram positif. Il est précisé dans ce tableau les résultats des cultures en cas de discordance entre l'alerte et le résultat de la coloration de Gram.

Comparaison alertes bactériennes versus cultures

La comparaison des alertes « GN? » et « GP? » avec les résultats des cultures des 362 urines étudiées est présentée sur le *tableau 5*. Au total, ces alertes correspondaient à 86 % et 20 % de cultures significativement positives à bacilles à Gram négatif (BGN) et cocci à Gram positif (CGP) respectivement.

Discussion

Nous avons évalué dans cette étude les performances de l'automate Sysmex 4000, qui est la version la plus récente des automates de cytométrie en flux commercialisés en France. Cet automate a été développé pour améliorer la reconnaissance et le décompte des cellules et des micro-organismes grâce à de nouveaux fluorochromes de spécificité améliorée, et un laser semi-conducteur à 488 nm pour une meilleure sensibilité, associé à un filtre de dépolariation (différenciation GR/cristaux). Pour le décompte des cellules, la corrélation automate/microscopie optique est bonne pour les valeurs de l'UF situées en dessous du seuil théorique de 10 cellules/ μL . Cependant, cette corrélation est moins bonne pour les décomptes de cellules dépassant 10 éléments/ μL . Pour les GB, le nombre donné par l'automate est quasiment toujours supérieur à celui obtenu en microscopie (26 versus 1 cas), la majorité de

Tableau 3. Comparaison des alertes/culture pour les 2 695 urines testées.

	Culture +*	Culture -	Sensibilité %	Spécificité %	VPP %	VPN %
Alerte seuil 100/μL			70	87	48	94
+	283	308				
-	123	1 981				
Alerte seuil 150/μL			67	89	52	94
+	270	252				
-	135	2 038				
Alerte seuil 200/μL			61	93	60	93
+	245	166				
-	160	2 124				

* Culture dépassant le seuil de signification clinique recommandé ; VPP : valeur prédictive positive ; VPN : valeur prédictive négative.

Tableau 4. Comparaison des alertes/Gram pour les 362 urines présentant une alerte « GN? » ou « GP? ».

		Gram							
		BGN		BGN+GP	GP		0	Total	
Alerte	« GN? »	153		15	16	Cultures : 6 stériles, 9 BGN, 1 CGP	13	Cultures : 8 stériles, 5 BGN	197
	« GP? »	32	Culture : 21 stériles 10 BGN* 1 CGP*	17	101		15	Cultures : 14 stériles 1 CGP	165

* BGN : bacilles à Gram négatif ; CGP : cocci à Gram positif.

Tableau 5. Comparaison des alertes/cultures pour les 362 urines présentant une alerte « GN? » ou « GP? ».

		Culture					
		Quantité > seuil clinique			Négative	Quantité < seuil ou lactobacilles ou contamination (> 2 souches)	Total
		BGN*	CGP*	BGN +CGP			
Alerte	« GN? »	167	2	3	17	8 (incluant 1 lactobacille)	197
	« GP? »	12	32	1	55	65 (incluant 19 lactobacilles et 15 CGP)	165

* BGN : bacilles à Gram négatif ; CGP : cocci à Gram positif.

ces discordances se situant autour du seuil de signification clinique. La seule urine ayant donné un nombre de GB supérieur en microscopie versus automate présentait par ailleurs une hématurie (200 GR/ μ L) : il est donc possible que l'opérateur ait confondu certains GB avec des GR. Cette urine n'a pas donné lieu à un prélèvement de contrôle étant donné la stérilité de la culture et le faible nombre de leucocytes.

Les variations de lecture en méthode manuelle ont un impact uniquement pour les valeurs de leucocyturie à la limite de la significativité clinique. Cette variabilité inter opérateurs est apparentée à une incertitude de mesure, qui peut être approchée par le calcul du coefficient de variation autour du seuil décisionnel. Ce coefficient avait été retrouvé à 30 % en méthode manuelle, à comparer au coefficient de variation de 12 % obtenu pour l'évaluation de

l'incertitude de mesure en méthode automatique, calculé sur un pool d'urines présentant une leucocyturie autour de la valeur seuil. Ces résultats ont permis de réduire l'intervalle d'incertitude par rapport à la microscopie optique. Cet intervalle autour du seuil décisionnel de 10 GB/ μ L est pris en considération dans l'interprétation de l'ECBU si la bactériurie est significative (leucocyturie à la limite de la significativité clinique).

Pour le diagnostic d'hématurie microscopique, les discordances manuel/automate ont été notées plus fréquentes avec les GR qu'avec les GB si seul l'UF4000 avait été utilisé. Le comptage de GR plus élevé observé avec l'automate peut être dû à la prise en compte d'hématies « fantômes » qui ne sont pas observées en lecture visuelle. Le passage sur l'UD10 qui, grâce à sa caméra, permet de retrouver les conditions de la lecture visuelle, permet de gommer ces discordances. Cette vérification est réalisée automatiquement grâce à l'alerte déclenchée lorsqu'un nombre élevé de GR est associé à un nombre faible de leucocytes.

L'étude des alertes bactériennes d'un grand nombre d'échantillons d'urines nous a permis de choisir le seuil d'alerte de 200 bactéries/ μ L à partir duquel un Gram est réalisé, plutôt que le seuil de 150/ μ L préconisé par le fournisseur, ce qui nous permet d'obtenir une spécificité élevée de l'alerte par rapport à la culture, sans augmenter le nombre de colorations de Gram par rapport à la période précédant l'arrivée de l'automate. La valeur prédictive positive, bien que meilleure qu'avec les deux autres seuils d'alerte, ne permet pas d'utiliser la présence de germes à l'examen direct comme un argument fiable d'infection urinaire.

Dans notre hôpital, toutes les urines étantensemencées, l'élimination de la culture grâce à une sensibilité accrue de la détection de germes n'était pas le but recherché. Mais certains centres préfèrent réaliser un screening préalable en recherchant la meilleure valeur prédictive négative, afin de diminuer le nombre d'échantillons à ensemencer. Les valeurs seuils des leucocytes et des bactéries sont alors choisies en fonction de la population étudiée, expliquant leur variabilité dans la littérature [2, 4-7]. Une équipe, par exemple, a utilisé un seuil bactérien bas (30/ μ L) sur l'UF5000, qui, associé à un seuil de leucocytes de 200/ μ L lui permettait d'obtenir une sensibilité et une valeur prédictive négative du test très élevées autorisant à éviter les cultures inutiles [6].

La comparaison entre la nature de l'alerte bactérienne et l'examen microscopique du Gram a montré que l'alerte « GN? » était plus performante que l'alerte « GP? ». Il est constaté que sur 11 urines associées à une alerte « GP? », lues BGN au Gram et de cultures significativement positives, 10 ont poussé à BGN, et une seule à CGP, ce qui est en défaveur de l'alerte « GP? ».

Par ailleurs, des erreurs de lecture du Gram sont possibles, certains frottis d'urines étant difficiles à interpréter. Cela peut d'ailleurs être suspecté si l'on compare les résultats du Gram à ceux de la culture : sur 10 urines dotées d'une alerte « GN? », lues GP au Gram et de culture significativement positive, 9 ont poussé à BGN, et une seule à CGP, ce qui est en faveur de l'alerte « GN? ». Il serait donc envisageable de n'utiliser que l'information de l'automate sans vérification du Gram dans le cas d'une alerte « GN? ».

Si l'on compare maintenant les alertes uniquement à la culture, la faible proportion de cultures significativement positives à CGP (20 %) correspondant à l'alerte « GP? » ne permet pas d'utiliser l'information de cette alerte pour la prise en charge thérapeutique. Ce faible rendement est en grande partie expliqué par la quantité importante de lactobacilles et de cultures contaminées pouvant contenir des bactéries à Gram positif. En revanche, dans 86 % des cas l'alerte « GN? » correspondait à une infection urinaire à BGN, permettant ainsi d'orienter le clinicien sur un traitement probabiliste adéquat dès le premier jour.

Ces comparaisons avec la culture sont similaires à celles retrouvées dans l'étude de Geerts *et al.* qui avait montré que l'alerte « cocci/mixed » sur l'automate UF1000 n'était associée qu'à 29 % d'infections à cocci à Gram positif, contrairement à l'alerte « rods » associée à 91 % d'infections urinaires à BGN [8]. D'autres études, en évaluant les performances de l'UF5000, de même technologie que l'UF4000, ont également montré que la discrimination des BGN était supérieure à celle des bactéries à Gram positif [9, 10].

Conclusion

Cette étude a montré une bonne corrélation entre le comptage des GB sur l'automate versus l'observation microscopique en cellule Kova. Même si cette corrélation est légèrement plus faible pour les valeurs de l'automate dépassant le seuil de 10 cellules/ μ L, celles-ci restent peu élevées, avec des conséquences minimales sur l'interprétation finale de l'ECBU. Pour l'interprétation de l'hématurie microscopique, le nombre de discordances sur les GR est fortement diminué après passage sur l'UD10, ce qui permet d'éviter la lecture au microscope optique et ainsi une perte de temps en manipulation et en lecture. Enfin, l'UF 4000, par sa capacité à reconnaître les bactéries à Gram négatif, a montré son utilité dans l'orientation diagnostique rapide des infections à bacilles à Gram négatif et donc dans le choix d'une antibiothérapie ciblée de façon précoce.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêts en rapport avec cet article.

Références

1. Canis F, Chatelain N, Guérin F, Ranque S. Infections urinaires. In : Société française de microbiologie, ed. *Remic, référentiel en microbiologie médicale*. 6^e édition. Paris, 2018, p 181-98.
2. Oyaert M, Delanghe J. Progress in automated urinalysis. *Ann Lab Med* 2019 ; 39 : 15-22.
3. 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 : 123-30.
4. Garcia-Coca M, Gadea I, Esteban J. Relationship between conventional culture and flow cytometry for the diagnosis of urinary tract infection. *J Microbiol Methods* 2017 ; 137 : 14-8.
5. Monsen T, Ryden P. A new concept and a comprehensive evaluation of sysmex uf-1000i flow cytometer to identify culture-negative urine specimens in patients with UTI. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017 ; 36 : 1691-703.
6. Ren C, Wu J, Jin M, Wang X, Cao H. Rapidly discriminating culture-negative urine specimens from patients with suspected urinary tract infections by UF-5000. *Bioanalysis* 2018 : 1833-40.
7. Song D, Lee HJ, Jo SY, Lee SM, Chang CL. Selection of unnecessary urine culture specimens using Sysmex UF-5000 urine flow cytometer. *Ann Clin Microbiol* 2018 ; 21 : 75-9.
8. Geerts N, Jansz AR, Boonen KJ, Wijn RP, Koldewijn EL, Boer AK, et al. Urine flow cytometry can rule out urinary tract infection, but cannot identify bacterial morphologies correctly. *Clin Chim Acta* 2015 ; 448 : 86-90.
9. De Rosa R, Grosso S, Lorenzi G, Bruschetta G, Camporese A. Evaluation of the new Sysmex UF-5000 fluorescence flow cytometry analyser for ruling out bacterial urinary tract infection and for prediction of Gram negative bacteria in urine cultures. *Clin Chim Acta* 2018 ; 484 : 171-8.
10. Kim SY, Park Y, Kim H, Jimyung K, Koo SH, Kwon GC. Rapid screening of urinary tract infection and discrimination of gram-positive and Gram-negative bacteria by automated flow cytometric analysis using Sysmex UF-5000. *J Clin Microbiol* 2018 ; 56 : 2004-17.