

# Einbindung der Eiweißdifferenzierung im Harn am Analysensystem Hitachi 911 in eine diagnostische Strategie

Adaptation of the diagnostic strategy of urine protein differentiation to the Hitachi 911 analyzer

D. Schmidt<sup>1</sup>, W. Hofmann, W. G. Guder

## Zusammenfassung

Die quantitative Bestimmung definierter Einzelproteine im Harn hat sich als praktikables Verfahren zum Ausschluß und zur Differenzierung von Proteinurien und Hämaturien erwiesen. Durch Adaptierung etablierter Methoden für die turbidimetrische Bestimmung von Gesamteiweiß (Trichloressigsäure/HCL-Methode), Albumin, IgG,  $\alpha_1$ -Mikroglobulin und  $\alpha_2$ -Makroglobulin (Immunturbidimetrie) sowie der N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase ( $\beta$ -NAG, kinetisch) und Kreatinin nach Jaffé (kinetisch) an das Analysensystem Hitachi 911 konnten alle zur Differenzierung notwendigen Untersuchungen vollmechanisiert aus unverdünntem Urin durchgeführt werden. Durch Variation der Proben volumina wurden für die Proteine je ein sensitives und ein weniger sensitives Verfahren eingerichtet.

Zusätzlich wird die automatische Probenverdünnung des Analysensystems genutzt. So konnten alle im Harn vorkommenden Konzentrationen der Meßgrößen (bis auf Albumin über 25 g/l) abgedeckt werden. Die Präzision der Verfahren lag im Bereich klinisch-chemischer Routinemethoden. Probenverschleppungen bei gemischtem Betrieb Serum/Urin wurden durch Spülschritte vermieden. Durch bidirektionale Anbindung des Analysengerätes an die Labor-EDV-Anlage war eine vom Teststreifenresultat abhängige Methodenforderung möglich. Die Analysenergebnisse wurden nach analytischer Beur-

teilung zur medizinischen Validation und Interpretation an ein PC-gebundenes "wissensbasiertes System" weitergegeben.

## Schlüsselwörter

Harnproteine – Albumin –  $\alpha_1$ -Mikroglobulin – IgG –  $\alpha_2$ -Makroglobulin – N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase

## Summary

Quantification of defined urine proteins has become the optimal strategy for excluding and differentiating various causes of proteinuria and haematuria. The following quantitative methods were adapted to the Hitachi 911 analyzer: Total protein using turbidimetry (trichloroacetic acid/HCl), albumin, IgG,  $\alpha_1$ -microglobulin,  $\alpha_2$ -macroglobulin using immunoturbidimetry, N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (kinetic) and creatinine using the kinetic Jaffé procedure. The wide range of concentrations occurring in normal and pathological urines was covered by choosing two different method variations, a sensitive variation and a less sensitive one for each of the procedures protein, albumin, IgG,  $\alpha_1$ -microglobulin and  $\alpha_2$ -macroglobulin in combination with the analyzer specific dilution strategy. Inter- and intraassay precisions of these methods were in the range of routine procedures for clinical chemistry (below 5% C. V.). Carryover of sample was prevented by washing steps, thus making to analyze urines and plasma/sera in random sequence. Bidirectional coupling of the analyzer to the in-house computer system allowed optional method selection depending on the test strip result. Analytical results were transferred to a personal computer expert system for medical validation and interpretation.

## Key words

urine proteins – albumin – IgG –  $\alpha_1$ -microglobulin –  $\alpha_2$ -macroglobulin – N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase

## Anschriften der Autoren:

Institut f. Klinische Chemie, Städt. Krankenhaus München-Bogenhausen, München, FRC

<sup>1</sup> jetzige Anschrift: Kliniken der Stadt Köln, Krankenhaus Merheim, Zentrallabor, Osterheimer Straße 200, 51109 Köln

## Korrespondenz-Adresse:

Prof. Dr. Walter G. Guder, Institut für Klinische Chemie, Engelschalkinger Straße 77, 81925 München

## Einleitung

Die Proteinurie als ein Leitsymptom von Nierenerkrankungen läßt sich durch Analyse der Harnproteine differenzieren [1, 2, 3]. Mit Hilfe der qualitativen Polyacrylamidgelelektrophorese können prärenale, glomeruläre und tubuläre Proteinurien unterschieden werden [1]. Auf der Basis dieser Erkenntnisse schlagen wir vor, diese Differenzierung durch quantitative Messung von Leitproteinen mit bekanntem Molekulargewicht durchzuführen [4, 5].

Dabei diene Albumin als „glomerulärer“ und  $\alpha_1$ -Mikroglobulin als „tubulärer“ Marker. Darüberhinaus empfehlen wir die Bestimmung von IgG- und  $\alpha_2$ -Makroglobulin zur Differenzierung glomerulärer, tubulointerstitieller und postrenalier Ursachen der Hämaturie [2, 5].

Auch für den Ausschluß von Nierenerkrankungen wurde eine Ergänzung des bisher üblichen „Harn-Status“ empfohlen, da die Harnteststreifen und mikroskopischen Verfahren tubuläre Erkrankungen nicht mit der nötigen Empfindlichkeit nachweisen und eine Bence-Jones-Proteinurie übersehen wird [4, 6].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, eine mechanisierte Form der quantitativen Harnproteinanalytik zu entwickeln, die eine rasche Probenabarbeitung bei hoher analytischer Empfindlichkeit erlaubt. Das Programm sollte für den Einsatz als Screening geeignet sein, aber auch alle notwendigen Schritte zur Differenzierung einer bestehenden Proteinurie und Hämaturie beinhalten.

## Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden aus 2. Morgenurinen durchgeführt, die in 10 ml Polystyrolgefäßen mit Schraubverschluß (Greiner, Nürtingen) aufbewahrt wurden. Vor der Untersuchung wurden die Urine 10 Minuten bei 800 g zentrifugiert.

## Analytische Methoden

Die Meßprinzipien der analytischen Meßverfahren sind in Abbildung 1 dargestellt. Gesamteiweiß wurde nach einer turbidimetrischen Endpunktbe-

stimmung nach Cheung [7] mit 0,18 mol/l Trichloroessigsäure (30%) und 0,34 mol/l Salzsäure (1,25%) durchgeführt. Die Geräteeinstellung ist aus Tabelle 1 zu entnehmen.

Albumin, IgG,  $\alpha_1$ -Mikroglobulin und  $\alpha_2$ -Makroglobulin wurden immunurbidimetrisch bestimmt [4]. Als Trübungssignal wurde die Extinktionsdifferenz 340/700 nm verwendet (Abb. 1). Antikörper der Firmen Orion (Helsinki, Finnland), vertrieben durch BAG (Lich, FRG) wurden im Verhältnis 1:3 (Albumin), 1:5 (IgG) und unverdünnt ( $\alpha_2$ -Makroglobulin) eingesetzt. Als Verdünnungslösung diente ein Gemisch aus Polyethylenglycol-Reaktionspuffer (Orion Diagnostica, Helsinki, Finnland), der 1+1 mit 154 mmol/l NaCl verdünnt wurde. Antikörperkonzentrat gegen  $\alpha_1$ -Mikroglobulin (Boehringer Mannheim) wurde 1+4 verdünnt.

Als Standard für die Kalibration von Eiweiß, Albumin, IgG und  $\alpha_2$ -Makroglobulin diente N-Protein Standard Human (Behring, Marburg) aus dem 8 Verdünnungen mit 0,9% NaCl (1:10, 20, 60, 180, 540, 1620, 4860, 14580; für die Standards S19 bis S26 (Tabelle 1)) hergestellt wurden. Für die Kalibration von  $\alpha_1$ -Mikroglobulin diente ein Urinkonzentrat der Firma Behring AC, Marburg. Für alle turbidimetrischen Verfahren außer  $\alpha_2$ -Makroglobulin wurden zwei Methoden für den niedrigen und hohen Bereich kalibriert. Die verschiedenen Meßbereiche wurden durch Verwendung verschiedener Probenvolumina und Ausnutzung der geräteinternen automatischen Probenverdünnung erhalten (Tabelle 1). Die Aktivität der N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase wurde durch ein kinetisches Verfahren von Jung et al. [8] (Boehringer Mannheim, nach Rücksprache mit der Firma Boehringer Mannheim nicht mehr erhältlich), Kreatinin nach der kinetischen Jaffé-Methode (Boehringer Mannheim) mit 2  $\mu$ l Urin durchgeführt. Als Präzisionskontrolle verwendeten wir einen Patientenurin, der durch Zumischen von Ethylenglycol (5 mol/l), Timerosal (100 mg/l) und Trasyol (5000 KIE/l) stabilisiert wurde. Als Richtigkeitskontrollen diente Kontrollogen LP, Behring, Marburg (Kreatinin) und Precinorm NAG (Boehringer Mannheim). Als Waschlösung, die bei mehreren Methoden als Reagenz 3 bzw. 4 zugegeben wurde, verwendeten wir 1 mol/l NaOH, der 10 ml/l Extran zugesetzt war. Tabelle 1 faßt die Kenndaten der Geräteeinstellung zusammen.

## Ergebnisse

### Methodenadaptierung

Das Analysengerät Hitachi 911 erlaubt die Pipettierung von 4 Reagenzien, eine Inkubationsdauer von max. 15 Minuten und die Wahl von Wellenlängenpaaren. Abbildung 1 zeigt die Meßprinzipien und

#### Abkürzungen:

$\beta$ -NAG	= N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase
PEG	= Polyethylenglykol

## Meßprinzipien

Methode	Reagenz 1	Reagenz 2	Reagenz 3/4
---------	-----------	-----------	-------------

## Kinetische Methoden

Kreatinin Jaffé kinetisch	NaOH	Pikrinsäure	
$\beta$ -NAG	3.3'-Dichlorphenolsulfophthalein -N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminid		

## Turbidimetrische bzw. immunturbidimetrische Methoden

Gesamteiweiß (HCl/TCA)	HCl 1.25 %	TCA 30%	NaOH/ Extran
Albumin IgG $\alpha_1$ -Mikroglobulin $\alpha_2$ -Makroglobulin	PEG/Tris pH 8.0	Antikörper in PEG/Tris	(NaOH/ Extran)
"Probenleerwert"	PEG/Tris	PEG/Tris	

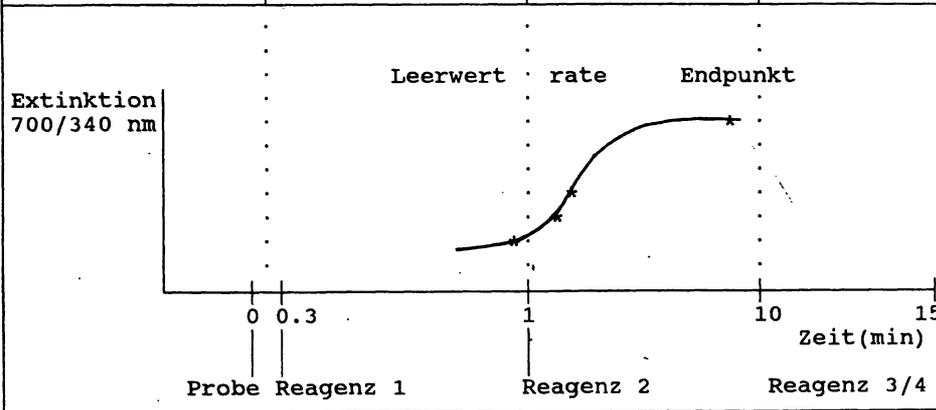


Abb. 1. Meßprinzipien der adaptierten Methoden zur Urineiweißdifferenzierung und Reaktionsverlauf einer turbidimetrischen Proteinbestimmung am Analysenautomaten Hitachi 911.

Die Methoden werden charakterisiert durch die Basisreagenzien (Reagenz 1) und die Startreagenzien (Reagenz 2). Reagenz 3 bzw. 4 dient Spülvorgängen. Die Kinetik zeigt einen typischen Verlauf einer immunturbidimetrischen Proteinbestimmung mit den Meßpunkten a. Leerwert, b. Endpunktmeßwert, c-d. Messung der Reaktionskinetik beim „Prozonencheck“.

den Verlauf der turbidimetrischen Endpunktmethode, wie er für Gesamteiweiß, Albumin, IgG,  $\alpha_1$ -Mikroglobulin und  $\alpha_2$ -Makroglobulin durchgeführt wurde. Die Extinktionsdifferenz zwischen den Meßpunkten A und B diente zur Berechnung der Konzentration mittels einer nichtlinearen Eichkurve. Nur bei  $\alpha_1$ -Mikroglobulin mußte die zusätzliche Messung der Steilheit der Reaktionskurve über die

Meßpunkte C und D als „Prozonencheck“ eingerichtet werden (Abb. 1). Dieser sollte für jede Antikörpercharge neu definiert werden. Wenn die relative Steilheit der Meßkurve den angegebenen Grenzwert überschreitet, wird der Prozenalarm ausgelöst. Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen, wurde nach Ablauf der Reaktion in einem Waschschritt Reagenz 3 bzw. 4 zugegeben, um mögliche Proteinausflockungen

Tabelle 1. Geräteeinstellungen der verwendeten Analysenverfahren am Hitachi 911.

Meßart	TP Methode 1		TP Methode 2		Albumin Methode 1		Albumin Methode 2		α <sub>2</sub> -Makroglobulin		β-NAG	
	[2 PUNKT END] [10]	[800/450]	[2 PUNKT END] [10]	[800/450]	[2 PUNKT END] [15]	[700/340]	[2 PUNKT END] [15]	[700/340]	[2 PUNKT END] [15]	[700/340]	[2 PUNKT KIN.] [10]	[660/570]
Neben-/Hauptwellenl	[4]-[30]-[0]-[0]	[4]-[15]-[0]-[0]	[4]-[15]-[0]-[0]	[4]-[15]-[0]-[0]	[4]-[44]-[0]-[0]	[4]-[30]-[0]-[0]	[4]-[30]-[0]-[0]	[4]-[49]-[0]-[0]	[4]-[49]-[0]-[0]	[15]-[30]-[0]-[0]	[15]-[30]-[0]-[0]	[13]-[0]-[0]
Meßpunkte	[50]-[0]-[0]	[50]-[0]-[0]	[20]-[10]-[180]	[20]-[10]-[180]	[20]-[0]-[0]	[20]-[0]-[0]	[20]-[0]-[0]	[20]-[0]-[0]	[20]-[0]-[0]	[50]-[0]-[0]	[7]-[0]-[0]	[7]-[0]-[0]
Pr. Vol. (normal)	[50]-[0]-[0]	[50]-[0]-[0]	[20]-[0]-[0]	[20]-[0]-[0]	[30000] [STEIGEND]	[30000] [UEBER]	[30000] [UEBER]	[30000] [UEBER]	[30000] [UEBER]	[32000] [STEIGEND]	[25000] [STEIGEND]	[25000] [STEIGEND]
Pr. Vol. (reduziert)	[20000] [STEIGEND]	[30000] [UEBER]	[20000] [STEIGEND]	[30000] [UEBER]	[250] [0]	[250] [0]	[30000] [UEBER]	[30000] [UEBER]	[30000] [UEBER]	[200] [0]	[0] [UEBER]	[0] [UEBER]
Pr. Vol. (erhöht)	[205] [0]	[28] [0]	[150] [50]	[150] [50]	[35] [0]	[35] [0]	[0] [0]	[0] [0]	[40] [0]	[0] [0]	[0] [0]	[0] [0]
Prozongrenze	[150] [50]	[0] [0]	[0] [0]	[0] [0]	[150] [50]	[150] [50]	[20] [100]	[20] [100]	[0] [0]	[0] [0]	[0] [0]	[0] [0]
Reagenz R1	[0] [0]	[0] [0]	[LOGIT-LOG(4P)] [5] [5]	[LOGIT-LOG(4P)] [6]	[LOGIT-LOG(4P)] [6] [6]	[LOGIT-LOG(4P)] [6] [6]	[LINEAR] [2] [2]	[LINEAR] [2] [2]				
Reagenz R2	[0] [100000]	[0] [100000]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[U/l]	[U/l]
Reagenz R3	[0] [1] [50]	[0] [1] [50]	[0] [1] [10]	[0] [1] [10]	[0] [130]	[0] [130]	[20] [2500]	[20] [2500]	[0] [100]	[0] [100]	[0] [80]	[0] [80]
Reagenz R4	[46] [21] [50]	[139] [22] [10]	[139] [22] [10]	[139] [22] [10]	[3.2] [19] [30]	[3.2] [19] [30]	[87] [22] [2]	[87] [22] [2]	[0.0] [1] [50]	[0.0] [1] [50]	[0.0] [1] [13]	[0.0] [1] [13]
Technische Grenzen	[139] [22] [50]	[416] [23] [10]	[416] [23] [10]	[416] [23] [10]	[9.6] [20] [30]	[9.6] [20] [30]	[261] [23] [2]	[261] [23] [2]	[1.2] [21] [50]	[1.2] [21] [50]	[69.0] [16] [13]	[69.0] [16] [13]
STD KONZ. POS. VOL.	[416] [23] [50]	[1250] [24] [50]	[1250] [24] [50]	[1250] [24] [50]	[29] [21] [30]	[29] [21] [30]	[783] [24] [2]	[783] [24] [2]	[3.5] [22] [50]	[3.5] [22] [50]	[0] [0] [10]	[0] [0] [10]
(1)	[1250] [24] [50]	[0] [0] [1]	[0] [0] [1]	[0] [0] [1]	[87] [22] [30]	[87] [22] [30]	[1566] [24] [4]	[1566] [24] [4]	[10.6] [23] [50]	[10.6] [23] [50]	[0] [0] [10]	[0] [0] [10]
(2)	[0] [0] [1]	[0] [0] [1]	[0] [0] [1]	[0] [0] [1]	[174] [23] [20]	[174] [23] [20]	[2350] [25] [2]	[2350] [25] [2]	[31.7] [24] [50]	[31.7] [24] [50]	[0] [0] [1]	[0] [0] [1]
(3)									[95] [25] [50]	[95] [25] [50]	[0] [0] [1]	[0] [0] [1]
(4)												
(5)												
(6)												

Meßart	IGG Methode 1		IGG Methode 2		α <sub>1</sub> -Mikro. Methode 1		α <sub>1</sub> -Mikro. Methode 2		Probenleerwert	
	[2 PUNKT END] [15]	[700/340]	[2 PUNKT END] [15]	[700/340]	[2 PUNKT END] [15]	[700/340]	[2 PUNKT END] [15]	[700/340]	[2 PUNKT END] [15]	[700/340]
Neben-/Hauptwellenl	[4]-[30]-[0]-[0]	[4]-[30]-[0]-[0]	[4]-[30]-[0]-[0]	[4]-[49]-[0]-[0]	[4]-[49]-[0]-[0]	[4]-[49]-[0]-[0]	[4]-[49]-[0]-[0]	[4]-[49]-[0]-[0]	[4]-[49]-[0]-[0]	[4]-[49]-[0]-[0]
Meßpunkte	[50]-[0]-[0]	[50]-[0]-[0]	[20]-[10]-[180]	[20]-[10]-[180]	[50]-[0]-[0]	[50]-[0]-[0]	[50]-[0]-[0]	[50]-[0]-[0]	[50]-[0]-[0]	[50]-[0]-[0]
Pr. Vol. (normal)	[50]-[0]-[0]	[50]-[0]-[0]	[20]-[0]-[0]	[20]-[0]-[0]	[30000] [STEIGEND]	[30000] [UEBER]	[30000] [STEIGEND]	[30000] [STEIGEND]	[30000] [STEIGEND]	[30000] [UEBER]
Pr. Vol. (reduziert)	[15000] [STEIGEND]	[30000] [UEBER]	[15000] [STEIGEND]	[30000] [UEBER]	[200] [0]	[200] [0]	[30] [UEBER]	[30] [UEBER]	[200] [0]	[200] [0]
Pr. Vol. (erhöht)	[140] [0]	[0] [0]	[140] [0]	[0] [0]	[150] [0]	[150] [0]	[240] [0]	[240] [0]	[140] [0]	[140] [0]
Prozongrenze	[20] [100]	[20] [100]	[20] [100]	[20] [100]	[0] [0]	[0] [0]	[20] [100]	[20] [100]	[0] [0]	[0] [0]
Reagenz R1	[LOGIT-LOG(4P)] [5] [5]	[LOGIT-LOG(4P)] [6] [6]	[LOGIT-LOG(4P)] [5] [5]	[LOGIT-LOG(4P)] [6] [6]	[SPLINE] [5] [5]	[SPLINE] [5] [5]	[SPLINE] [6] [6]	[SPLINE] [6] [6]	[LOGIT-LOG(4P)] [6] [6]	[LOGIT-LOG(4P)] [6] [6]
Reagenz R2	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
Reagenz R3	[0] [100]	[0] [100]	[0] [625]	[0] [625]	[0] [10000]	[0] [10000]	[0] [129]	[0] [129]	[0] [100]	[0] [100]
Reagenz R4	[0.0] [1] [50]	[2.6] [20] [50]	[0.0] [1] [10]	[7.7] [21] [10]	[0.0] [1] [50]	[3.2] [10] [50]	[0.0] [1] [14]	[6.3] [11] [14]	[0.0] [1] [50]	[1.2] [21] [50]
Technische Grenzen	[2.6] [20] [50]	[7.7] [21] [50]	[23.2] [22] [10]	[69] [23] [10]	[3.2] [10] [50]	[6.3] [11] [50]	[12.5] [12] [50]	[25] [13] [14]	[6.3] [11] [50]	[3.5] [22] [50]
STD. KONZ. POS. VOL.	[23.2] [22] [50]	[69] [23] [10]	[208] [24] [10]	[625] [25] [10]	[12.5] [12] [50]	[25] [13] [14]	[31.7] [24] [50]	[10.6] [23] [50]	[31.7] [24] [50]	[10.6] [23] [50]
(1)	[69] [23] [50]	[0] [0] [1]	[0] [0] [1]	[0] [0] [1]	[25] [13] [14]	[25] [13] [14]	[141] [14]	[31.7] [24] [50]	[31.7] [24] [50]	[10.6] [23] [50]
(2)	[0] [0] [1]	[0] [0] [1]	[0] [0] [1]	[0] [0] [1]	[0] [0] [1]	[0] [0] [1]	[100] [15] [14]	[95] [25] [50]	[95] [25] [50]	[95] [25] [50]

aufzulösen und damit einem Verstopfen der Wasch-einheit oder einer Verschleppung von Proteinpräzipitaten vorzubeugen.

Probenverschleppung wurde über das Nadelspülprogramm durch Spülung der Probenadel mit 1N NaOH vermieden. Die Reagenzverschleppung ließ sich in gleicher Weise über Spülen der Reagenzadel verhindern.

Um unspezifische Eintrübungen nach Mischung der Probe mit Polyethylenglycol-Reagenz zu erkennen, wurde ein eigenes Probenleerwertverfahren eingerichtet. Dieses Verfahren war identisch mit dem für  $\alpha_2$ -Makroglobulin, nur wurde anstelle Antikörper PEC-Reaktionspuffer zugegeben. Dieses Verfahren erwies sich als vorteilhaft, da es sich wegen des hohen Probevolumens als die störanfälligste Methode erwies. Wenn Probenleerwerte über einem Äquivalent von 3 mg/l gemessen wurden, gingen wir von einer Störung des Verfahrens durch Matrixeffekte aus. In diesem Fall wurde die Untersuchung mit verdünntem Urin wiederholt.

### Analytische Eigenschaften

Tabelle 2 faßt die Ergebnisse für die Präzision und Richtigkeit für die adaptierten Verfahren zusammen. Sofern in den Richtlinien der Bundesärztekammer angegeben, liegen die Ergebnisse innerhalb der geforderten Bereiche für Serumproteine. Für die Richtigkeitskontrolle fehlen bisher weitgehend vom Kalibrator unabhängige Materialien mit Urinmatrix. Bei Kreatinin und  $\beta$ -NAG lagen die Ergebnisse innerhalb von 10 % Abweichung vom Sollwert. Die Prüfung auf Probenverschleppung ergab nach Einrichten des Spülprogramms (siehe Methodik) eine Verschleppung unter 0,001 %. Unter diesen Bedingungen können Serum und Urinproben im Mischbetrieb analysiert werden. Ebenso war dieser Schritt Voraus-

setzung für die gleichzeitige Analyse normaler und hochpathologischer Urine, in denen mit Konzentrationsunterschieden von 4 Zehnerpotenzen gerechnet werden muß.

### Analytische Strategie

Ausgehend von der Idee, daß das analytische Programm je nach Fragestellung und Proteinmenge auszuwählen ist, wählten wir das Proteintestfeld des Teststreifens als Selektionskriterium für die Wahl der Methode für Gesamteiweiß, Albumin und IgG. Bei im Teststreifen positiven Harnproben wird die jeweils weniger sensitive Methode gewählt, so daß die Konzentration des Analyten mit hoher Wahrscheinlichkeit im Meßbereich dieser Methode liegt. Wird die obere Meßbereichsgrenze dennoch überschritten, wird automatisch eine Wiederholungsanalyse nach automatischer Probenverdünnung durchgeführt.

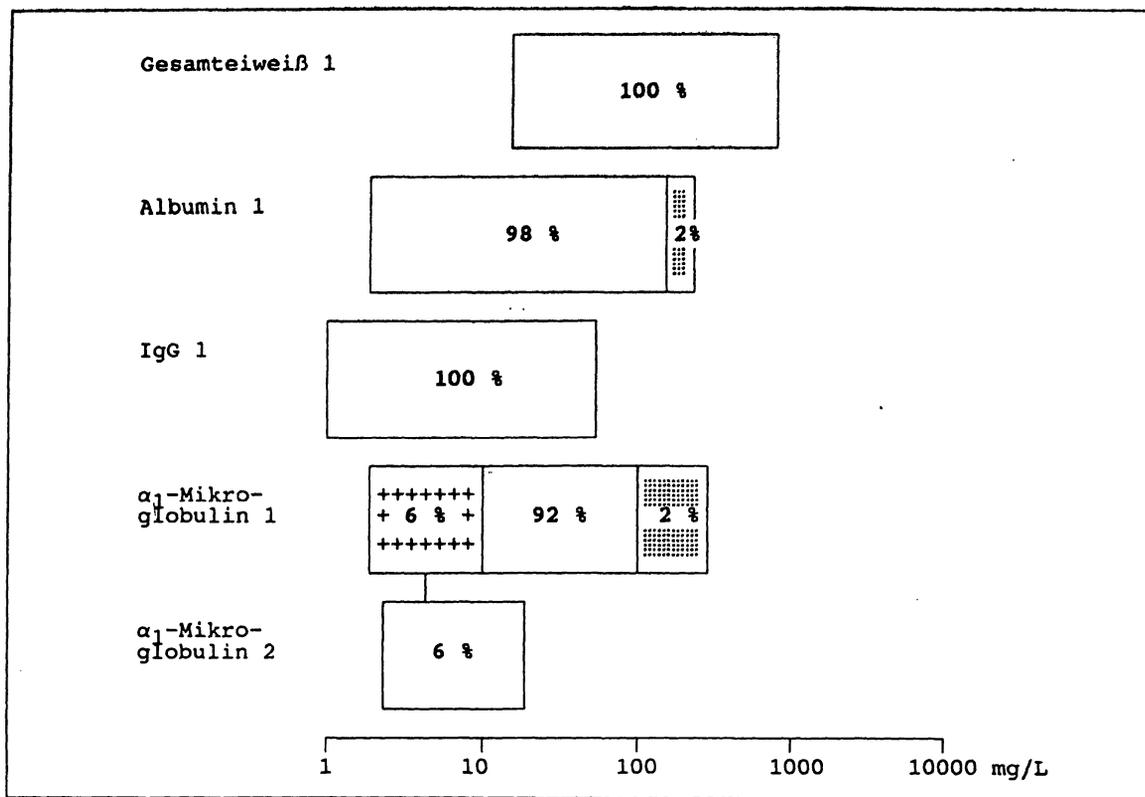
Abbildung 2 faßt die derzeit praktizierte Strategie zusammen, die durch Untersuchung von 400 Urinen aus einer nephrologischen Abteilung überprüft wurde. Dabei waren etwa die Hälfte der Proben im Proteinteststreifen negativ bzw. positiv. Abbildung 2 gibt einen Überblick über Art und Anzahl notwendiger Wiederholungsanalysen. Bei im Teststreifen negativen Harnproben (Abb. 2a) lagen 92–100 % der Ergebnisse im Meßbereich der angewählten Methode. 2 % der Albuminbestimmungen und  $\alpha_1$ -Mikroglobulin-Bestimmungen wurden mit automatischer Probenverdünnung wiederholt. 6 % der  $\alpha_1$ -Mikroglobulin-Messungen mußten aktiv mit der empfindlicheren Methode nachgemessen werden, da das Ergebnis im Bereich der Nachweisgrenze lag, um eine tubuläre Proteinurie auch bei niedriger Harnkonzentration des Markers auszuschließen. Bei den anderen Verfahren konnten Resultate unterhalb der Meßbereichsgrenze des angewählten Verfahrens durch automatische Wiederholung mit erhöhtem Probevolumen richtig bestimmt werden (Abb. 2b). 6–21 % der Daten wurde über die Wiederholungsanalyse nach automatischer Verdünnung erstellt. In unserem Kollektiv lagen jedoch bei 75,5–87 % der Proben die ersten Meßergebnisse im Meßbereich der angewählten Methode. Nur bei 2 Proben mußte für die Albuminbestimmung manuell verdünnt werden. 4 % der  $\alpha_1$ -Mikroglobulinmessungen mußten aktiv mit der empfindlicheren Methode nachgemessen werden.

Die Messung der N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (Meßbereich: 1–70 U/l) und von  $\alpha_2$ -Makroglobulin (Meßbereich: 5–100 mg/l) erfolgte mit einem Verfahren, das die vorkommenden Konzentrationen der Meßgrößen abdeckte. Aufgrund der vorliegenden Erfahrungen wird die Bestimmung des tubulären

**Tabelle 2.** Präzision der Analysenverfahren in der beschriebenen Adaptierung am Hitachi 911

Verfahren	Präzision von Tag zu Tag			
	n	MW (mg/l)	SD	VK (%)
Gesamteiweiß	20	748	21,7	2,9
Albumin	20	456	13,2	2,9
IgG	20	111	5,1	4,6
$\alpha_1$ -Mikroglobulin	20	42,4	17,0	4,0
$\beta$ -NAG	17	6,7 (U/l)	0,24	3,6
$\alpha_2$ -Makroglobulin	20	20,2	0,6	3,0
Kreatinin/Urin	20	836	43,5	5,2

Die Untersuchungen zur Präzision wurden mit Patientenurin an mindestens 17 verschiedenen Tagen in Einfachbestimmungen durchgeführt.



**Abb. 2a.** Erfahrungen mit der Untersuchungsstrategie zur Urineiweißdifferenzierung am Hitachi 911. Untersuchungsergebnisse bei negativem Protein-Teststreifen.

400 Urine aus der nephrologischen Ambulanz wurden mit dem im Methodenteil beschriebenen Untersuchungsprogramm gemessen. Die waagerechten Balken stellen die angewählten Meßbereiche dar; offen: Standardverfahren, ...: geräteinterne automatische Verdünnung, bzw. geräteinterne automatische Wiederholung mit erhöhtem Probevolumen, „+++“: Wiederholungsanalyse mit dem sensitiven Verfahren für α<sub>1</sub>-Mikroglobulin. „Manuelle Verdünnung“ zeigt die außerhalb des geräteinternen Verdünnungsbereichs liegenden Ergebnisse an (> 25 g/l Albumin). Die Zahlen geben die prozentualen Anteile der Urinproben an, die in dem jeweiligen Meßbereich lagen.

Enzyms bei α<sub>1</sub>-Mikroglobulinkonzentrationen über 40 mg/l durchgeführt, um tubulotoxische von chronisch tubulo-interstitiellen Nephropathien zu unterscheiden (W. Hofmann, unveröffentlicht). α<sub>2</sub>-Makroglobulin wird auf der Basis früherer Erfahrungen bei Vorliegen einer Hämaturie und einer Albuminkonzentration über 100 mg/l durchgeführt, um renale von postrenalen Ursachen zu differenzieren [3].

### Einbindung der Strategie in die EDV-Umgebung

Nach Etablierung der Methodik am Analysensystem Hitachi 911 wurde dieses bidirektional an das Labor-EDV-System (David, Medat, München) ange-

schlossen. Auf die Anforderung Urineiweißdifferenzierung erfolgt zunächst die Anforderung des Teststreifenergebnisses. Dieses wird in der Labor-EDV in eine Anforderung an das System Hitachi 911 umgesetzt (Abb. 3). In Abhängigkeit des Teststreifenergebnisses wird in einem ersten Durchgang das Analysenprofil angefordert. Liegt eine Serumprobe vor, so wird parallel am gleichen Gerät α<sub>1</sub>-Mikroglobulin und Kreatinin bestimmt. Nach Vorliegen der Ergebnisse im Rechner wird mit Hilfe eines Rechenprogramms festgestellt, ob weitere Untersuchungen angezeigt sind. Hier wird entschieden, ob N-acetyl-β-D-Glucosaminidase oder α<sub>2</sub>-Makroglobulin indiziert sind [2, 5]. Unabhängig davon werden automatisch Verdünnungen im Analysensystem gesteuert. Nach Vorliegen aller Ergebnisse wird der vorläufige Befund einer analytischen Beurteilung unterzogen

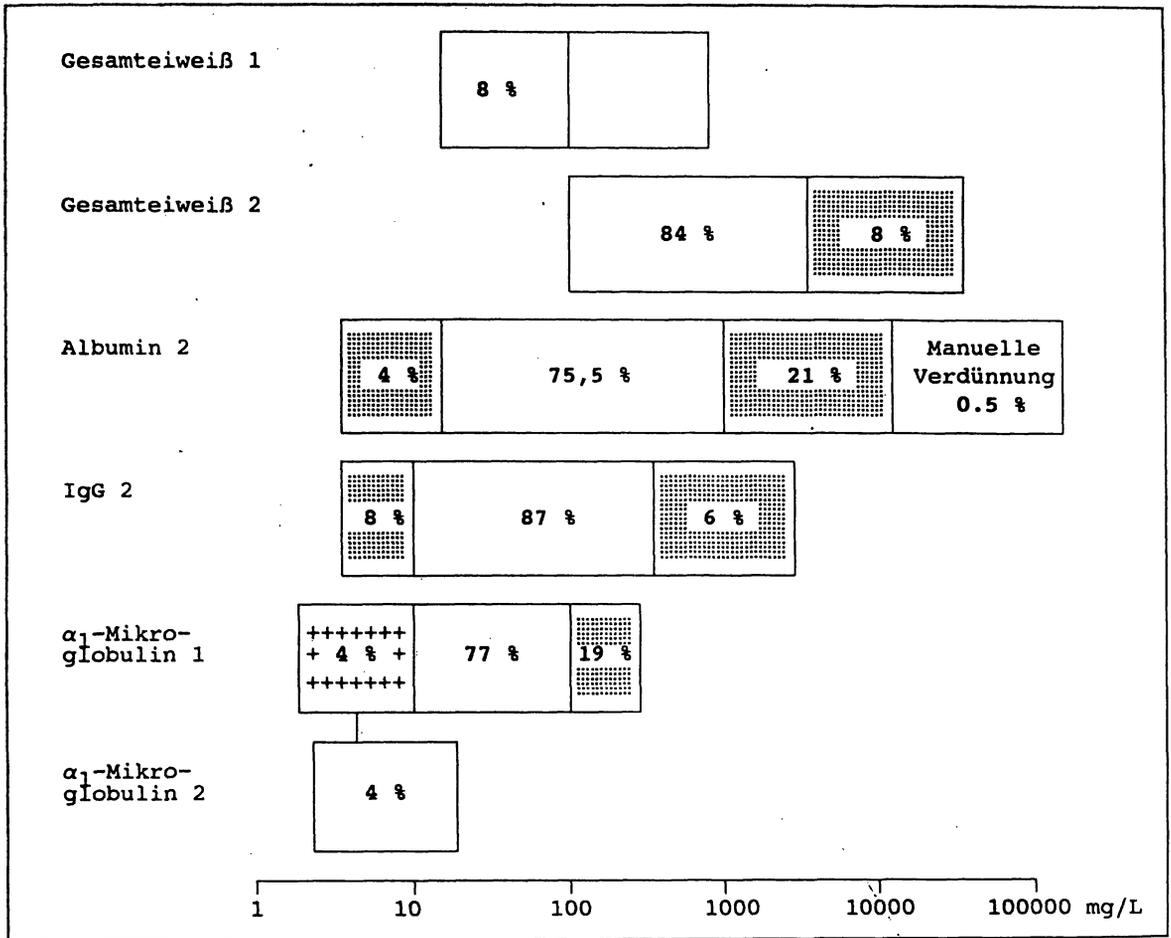


Abb. 2b Erfahrungen mit der Untersuchungsstrategie zur Urineiweißdifferenzierung am Hitachi 911. Untersuchungsergebnisse bei positiven Protein-Teststreifen.

(Vergleich mit Qualitätskontrollen und Prüfen auf unplausible Muster) und freigegeben. Die analytisch freigegebenen Werte (technische Validation) werden vom EDV-System in einen PC übertragen und entsprechend den Erfahrungswerten an einem großen klinischen Kollektiv [9] mit Pro. M. D. [10] wissenschaftlich verarbeitet. Als Ergebnis wird ein kommentierter „ärztlicher Befund“ ausgegeben [9].

**Diskussion**

Die quantitative Bestimmung von Einzelproteinen im Harn gewinnt zunehmend an Bedeutung. Gegenüber der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese haben quantitative Verfahren den Vorteil, mit geringerem technischen Aufwand quantitative Informationen zu geben. Der wachsende Bedarf an Untersuchungen ließ es angezeigt erscheinen, diese Verfah-

ren auf Analysenautomaten zu adaptieren, um bei geringerem Reagenzverbrauch und Personalaufwand diese Methode einem breiteren Anwendungskreis zugänglich zu machen. Mit der vorliegenden Arbeit wurde eine frühere mechanisierte Version [4] wesentlich erweitert: Verdünnungen werden automatisch abgearbeitet, durch die Wahl von 2 Meßbereichen ist die Zahl der Wiederholungsanalysen minimiert. Darüberhinaus konnte auf diese Weise erstmals die Urin-Eiweißdifferenzierung bidirektional an ein Labor-EDV-System angeschlossen werden. Trotz des größeren Küvettenvolumens gegenüber dem früher verwendeten Kone Progress (250 µl gegenüber 120 µl) liegt der tatsächliche Antikörperverbrauch mit der hier beschriebenen Adaptierung niedriger. Dies ist zum einen bedingt durch die geringere Zahl notwendiger Wiederholungsanalysen, auf der anderen Seite durch die geringen Verluste im Totraum des Schlauchsystems (2–3,3 µl pro Test

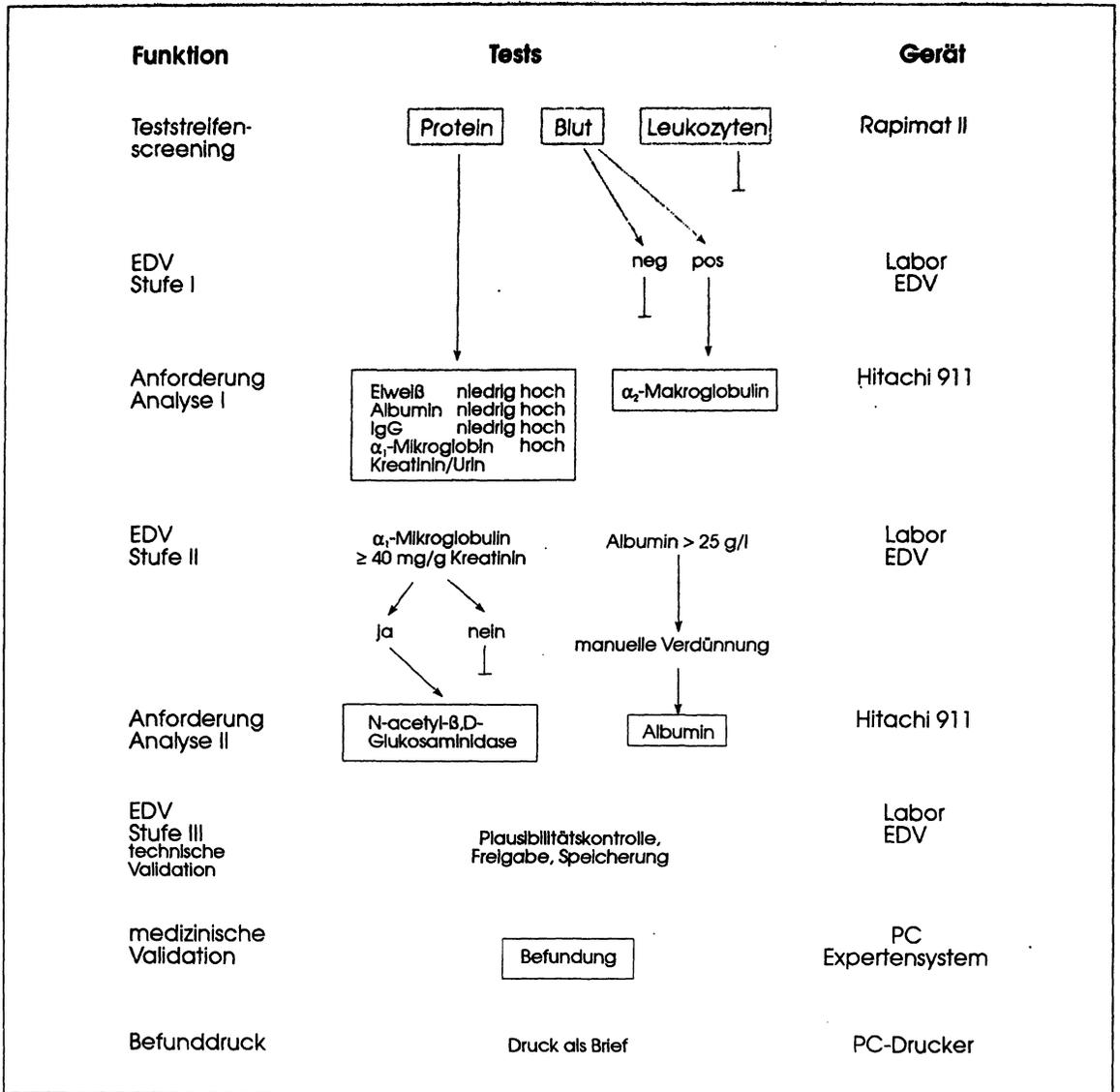


Abb. 3. Diagnostische Strategie mit Einbindung der Analysenschritte in die Labor-EDV und ein Befundungssystem.

gegenüber 14–130  $\mu$ l Antiserum beim früheren Verfahren). Von Vorteil ist weiterhin, daß alle Reagenzien in einem geschlossenen Reagenzteller gekühlt werden. Durch Auffüllen der leeren Reagenztellerpositionen mit Wasserbehältern läßt sich die Verdunstung im Reagenzfach weiter minimieren. Der größte Vorteil des vorliegenden Systems liegt jedoch in der Möglichkeit der automatischen Wiederholungsanalyse mit automatischer Probenverdünnung. Dies ist die Voraussetzung für die Anwendung von Analysengeräten für Urinalysen, da die Konzentrationen der Analyte einen Bereich von 3–5 Zehnerpotenzen umspannen. Durch die eingearbeiteten Wasch-

schritte ist eine Verschleppung weitgehend ausgeschlossen. Auch ein Mischbetrieb mit Serum und Urin ist problemlos durchführbar.

Die Verwendung der im Gerät vorgesehenen Barcode-Identifizierung von Primärröhrchen erlaubt eine Analytik ohne Verwendung von Sekundärgefäßen, wenn eine Materialerkennung gegeben ist. Damit sind Verwechslungen im Labor weitgehend ausgeschlossen.

Von großem Vorteil für die Erkennung von matrixbedingten Störungen ist auch die Darstellung des gesamten Reaktionsverlaufes am Monitor. Dies hilft, probenspezifische, methodenspezifische und

gerätespezifische Fehlerquellen wie z.B. Trübungen besser zu erkennen. So können mit Hilfe des Reaktionsverlaufes falsch hohe Gesamteiweißmessungen erkannt werden, die bei hoher Harnsäurekonzentration entstehen [7].

Die Überwachung der Reaktionsgeschwindigkeit dient dem Ausschluß von Antigenüberschuß als Ursache falsch niedriger Ergebnisse („Prozonencheck“). Dies ist jedoch nur bei der Bestimmung von  $\alpha_1$ -Mikroglobulin notwendig, da andere Formen durch die Vorselektionierung mit Teststreifen und die Wahl der entsprechenden Methode gelöst werden. Dennoch empfehlen wir eine Plausibilitätskontrolle jedes Urineiweißmusters, um diskrepante Befunde zu erkennen.

Dieses Verfahren ermöglicht, den traditionellen Harnstatus durch die Bestimmung von Albumin,  $\alpha_1$ -Mikroglobulin und/oder N-Acetyl- $\beta$ -D-Glukosaminidase zu ergänzen [11]. Bei einem Vergleich mit traditioneller mikroskopischer Sedimentanalyse war diese Strategie dem bisherigen „Urinstatus“ an Aussagekraft überlegen [11].

Es ist zu hoffen, daß der vorgeschlagene Weg der Mechanisierung der Urin-Eiweißdifferenzierung dazu beiträgt, dieses Verfahren im Routine-Labor eines Krankenhauses durchzuführen. Bei fachkompetenter Anwendung und Interpretation können diese Befunde wesentlich dazu beitragen, bei Verlaufsbeobachtungen invasive Untersuchungen bei Patienten zu reduzieren und die Qualität der Nieren-diagnostik zu erhöhen.

#### Danksagung

Die Autoren danken Frau Gisela Albert und Frau Gabriele Matschiner sehr herzlich für die versierte technische Assistenz. Frau Hannelore Weber war bei der Erstellung des Manuskripts behilflich.

#### Literatur

1. Boesken WH (1977) Die SDS-PAA-Elektrophorese der Urinproteine: Eine Methode zur Differentialdiagnose der Nephropathien und zur Analyse extrarenaler Proteinurien. *Urologe* 17, 140–144
2. Guder WC (1994) Niere und ableitende Harnwege. In: *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*, 3. Aufl. (Greiling H, Cressner AM, ed.) Schattauer-Verlag, Stuttgart-New York
3. Hofmann W, Rossmüller B, Guder WC, Edel HH (1992) A new strategy for characterizing proteinuria and haematuria from a single pattern of defined proteins in urine. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 30, 707–712
4. Hofmann W, Guder WC (1989) A diagnostic programme for quantitative analysis of proteinuria. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 27, 589–600
5. Hofmann W, Schmidt D, Guder WC, Edel HH (1991) Differentiation of hematuria by quantitative determination of urinary marker proteins. *Klin. Wochschr.* 69, 68–75
6. Boege F, Koehler B, Liebermann F, Luther A (1990) Identification and quantification of Bence-Jones proteinuria by automated nephelometric screening. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 28, 37–42
7. Cheung CK, Mak YT, Swaminatan R (1987) Automated trichloroacetic acid precipitation method for urine total protein. *Ann. Clin. Biochem.* 24, 140–144
8. Jung K, Priem F, Klein G (1991) A new kinetic method for the measurement of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase activity in urine. *Wiener Klin. Wochschr.* 103, Suppl. 189, 37–42
9. Hofmann W, Sedlmeir-Hofmann C, Ivandic M, Schmidt D, Guder WC, Edel H (1993) Befundung von Urin-Proteinmestern auf der Basis klinisch gesicherter Patientenkollektive. Typische Beispiele mit Textbefunden. *Lab. med.* 17, 502–512
10. Pohl B, Trendelenburg Ch (1988) Pro. M. D. – A diagnostic expert system shell for clinical chemistry test result interpretation. *Methods. Inf. Med.* 27, 111–117
11. Hofmann W, Regenbogen C, Edel HH, Guder WC (1994) Diagnostic strategies in urinalysis. *Kidney Int.* 46, Suppl. 47, 111–114