

Der Durchfluß-Urin-Partikel-Analysator UF-100: Abschätzung von Referenzbereichen für Gesunde

Urine Flow Cytometer UF-100: Assessment of Reference Ranges for Healthy Probands

K. Hannemann-Pohl^{1,2}, S. C. Kampf¹

Zusammenfassung: Durch Messungen der Partikelkonzentrationen bei Urinproben von 201 gesunden Personen (82 weibliche/nicht menstruierende)/17-66 a, 119 männliche/16-62 a) wurden Referenzbereiche für das Urindurchflußcytometer UF-100 abgeschätzt. Es wurde Mittelstrahlurin eingesetzt, der nach vorhergehender Instruktion der Probanden unter den bei Personal- und Blutspenderuntersuchungen möglichen Bedingungen gewonnen wurde.

Ergebnisse: Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe weiblicher und männlicher Probanden bei den Analyten Erythrocyten, Leukocyten, Plattenepithelien, Bakterien, kleine Bakterien und Leitfähigkeit. Die Ergebnisse sind nicht Gauss-verteilt. Daher werden als Referenzbereichsgrenzen für Gesunde die jeweils abgeschätzten 2,5- und 97,5-Perzentilen empfohlen. Weibliche Gesunde: 1-43 Erythrocyten/ μ l, 1-36 Leukocyten/ μ l, 0-49 Epithelzellen/ μ l, 0-0,9 Zylinder/ μ l, 13-369 Bakterien/ μ l, 0-27 Kristalle/ μ l, 0-1,6 Rundepithelien/ μ l, Leitfähigkeit: 8-32 mS/cm. Männliche Gesunde: 1-24 Erythrocyten/ μ l, 1-10 Leukozyten/ μ l, 0-4 Epithelzellen/ μ l, 0-0,9 Zylinder/ μ l, 6-265 Bakterien/ μ l, 0-27 Kristalle/ μ l, 0-1,6 Rundepithelien/ μ l, Leitfähigkeit: 7-35 mS/cm. Wir nehmen an, daß die bei männlichen Probanden gefundenen Konzentrationsbereiche den physiologischen Partikelfluß von der Niere und den ableitenden Harnwegen zum Blasenurin widerspiegeln. Die höheren Konzentrationsbereiche im Mittelstrahlurin weiblicher Probanden entstehen unter den Bedingungen routinemäßiger Probengewinnung durch individuelle Beimischung einer vaginalen Flußkomponente.

Stichwörter: Urinanalytik; Durchflußzytometrie/Urin; Referenzwerte.

Summary: Reference ranges for the urine flow cytometer UF-100 were estimated by analysis of urine samples of 201 healthy persons (82 female/not men-

¹Institut für Laboratoriumsmedizin, Mikrobiologie und Transfusionsmedizin (Chefarzt: Dr. S. C. Kampf), Marienkrankenhaus Hamburg

²Korrespondenzadresse: Dr. Kurt Hannemann-Pohl, Institut für Laboratoriumsmedizin, Mikrobiologie und Transfusionsmedizin, Marienkrankenhaus, Alfredstraße 9, D-22087 Hamburg. Fax: +49-40-2546-2800

Einigegangen: 13. Februar 1998 / Angenommen: 28. April 1998

strating)/aged 17-66 a/119 male aged 16-62). Midstream urine samples gained under conditions possible during routine staff and blood donor medical examination were used. Results: A significant difference was found between the results of the female and male proband group for erythrocytes (RBC), leukocytes (WBC), epithelial cells (EC), bacteria (BACT), total count, small bacteria (H-BACT) and conductivity. The distribution of results is not Gaussian. Accordingly, estimated 2.5- and 97.5-percentiles are recommended as reference limits. Female healthy persons: 1-43 RBC/ μ l, 1-36 WBC/ μ l, 0-49 EC/ μ l, 0-0.9 CAST/ μ l, 13-369 BACT/ μ l, 0-27 X-TAL/ μ l, 0-1.6 SRC/ μ l, Conductivity: 8-32 mS/cm; male healthy persons: 1-24 RBC/ μ l, 1-10 WBC/ μ l, 0-4 EC/ μ l, 0-0.9 CAST/ μ l, 6-265 BACT/ μ l, 0-27 X-TAL/ μ l, 0-1.6 SRC/ μ l, conductivity: 7-35 mS/cm. We assume that the male ranges reflect the physiological particle flow from kidney and lower urinary tract to bladder urine whereas the higher female ranges include an individual vaginal flow component.

Keywords: Urinalysis; Flow Cytometry/urine; Reference Values.

Bereits 1926 beschrieb Addis [1] eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Erythro- und Leukocytenausscheidung pro Zeiteinheit. Trotz der großen diagnostischen Bedeutung konnte sich der „Addis-Count“ außer im pädiatrischen Bereich wegen des damit verbundenen Aufwandes nicht in der Routine durchsetzen. Man arbeitete halbquantitativ mit schlecht standardisierten Sedimentmethoden und später mit Teststreifen. Seit einiger Zeit steht jedoch ein Durchfluß-Urin-Partikel-Zählgerät, der UF-100 der Fa. Sysmex, für die Routine zur Verfügung. Dabei wird eine in der Hämatologie ausgereifte Partikelzähltechnik eingesetzt. Dieses Analysensystem ermöglicht die mechanisierte Abarbeitung der in jedem klinischen Laboratorium anfallenden Urinuntersuchung auf partikuläre Bestandteile. Durch den Einsatz des nativen Urins, ohne Vorschaltung der fehlerträchtigen, zeitraubenden und das Ergebnis verzögern Vorbereitungsschritte Zentrifugation und Dekantieren, wird dabei

eine bislang in der Routineanalytik nicht bekannte Präzision und Sensitivität erreicht [2]³.

Um dieses neue Verfahren im Routinelaboratorium einsetzen zu können, wurde zunächst ein Vergleich mit der bekannten Kombination von Sedimentmikroskopie und Teststreifen durchgeführt [2]. Wegen fehlender Referenzwerte konnte jedoch die gestiegerte Sensitivität des durchflußzytometrischen Verfahrens nicht ausgenutzt werden. Ziel dieser Arbeit war es daher, Referenzbereiche für den Durchfluß-Urin-Partikel-Analysator UF-100 durch Messungen an Urinproben von einer Gruppe offensichtlich Gesunder unter Routinebedingungen abzuschätzen.

Material und Methoden

Referenzgruppe

Die Probanden waren Dauerblutspender unserer Blutbank, Personal des Krankenhauses und offensichtlich gesunde Angehörige des Personals. Es wurde eine kurze Anamnese erhoben und der Blutdruck gemessen. Nur Personen, deren diastolischer Blutdruck unter 100 mmHg lag, wurden in die Studiengruppe aufgenommen. Frauen mit Regelblutung wurden ausgeschlossen.

Die Primärgruppe bestand aus 111 Frauen und 124 Männern. Nach Ausschluß der Probanden, deren Untersuchungsergebnisse in der Teststreifenuntersuchung oder in der Sedimentauswertung pathologische Ergebnisse gezeigt hatten, verblieben als eigentliche Referenzgruppe 82 Frauen und 119 Männer. Die Verteilung der Lebensalter der Probanden ist aus den Tabellen 2 und 3 zu ersehen.

Proben und Analytik

Das Untersuchungsmaterial war spontaner Mittelstrahlurin ohne Zusatz. Alle Probanden erhielten ein Schreiben mit einer kurzen Anleitung zur Gewinnung von Mittelstrahlurin und hatten die Gelegenheit, Fragen dazu an qualifiziertes Personal zu stellen. Der Urin wurde innerhalb zwei Stunden nach Gewinnung auf dem UF-100 vermessen. Das Meßprinzip wurde an anderer Stelle erläutert [2]. Qualitätssicherung und Impräzisionen: Die Stabilität des Systems bzw. die Von-Tag-zu-Tag-Impräzisionen wurden mit dem Sysmex Latex-Partikelstandard (UFC-100, Lot-No. A6001) überwacht.

Im Anschluß an die Messungen am UF-100 erfolgte jeweils die übliche Routinediagnostik, die aus einer Teststreifenuntersuchung und mikroskopischer Beurteilung des Sediments bestand. Es wurde der Teststreifen

Combur 9 eingesetzt und auf dem Urotron ausgewertet (beide Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim (Deutschland)). Die Erstellung des Urinsediments erfolgte nach den NCCLS-Vorgaben [3]. Vom Sediment wurden 20 µl entnommen, auf einem Objektträger mit einem 18x18-mm-Deckglas abgedeckt und bei 400-facher Vergrößerung betrachtet.

Mathematische Methoden

Die Perzentilen wurden mit dem Programm Excel der Fa. Microsoft Corporation (USA) abgeschätzt. Für die Testung der Daten auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und signifikantem Unterschied zwischen männlicher und weiblicher Gruppe (Mann-Whitney-Rangsummen-Test) wurde das Programm SigmaStat der Fa. Jandel Scientific (Erkrath, Deutschland) eingesetzt.

Ergebnisse

Präzision des Systems

Die Interassay-Impräzisionen während 24 Meßtagen innerhalb eines Monats wurden wie folgt ermittelt (Mittelwert (μl^{-1}) / VK): Leukocyten (WBC) 213/2,9%, Bakterien (BACT): 249/10,1%, Erythrocyten (RBC): 209/4,4 , Epithelzellen (EC): 62/8,8%.

Referenzwertuntersuchungen

Die Ergebnisse der statistischen Analyse der erhaltenen Daten sind in der Tabelle 1 dargelegt.

Geschlechtsabhängigkeit

Es finden sich signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen der männlichen und weiblichen Probandengruppen. Ausnahmen bilden die Parameter Zylinder (CAST), Pathologische Zylinder (Path.CAST), Kristalle (X'TAL) und Rundepithelien (SRC).

Die Ergebnisse dieser Meßgrößen wurden daher geschlechtsunabhängig ausgewertet.

Altersabhängigkeit

Bei einer weitere Einteilung in 4 Gruppen, die aus jeweils männlichen bzw. weiblichen Probanden bis bzw. ab 40 Jahre bestanden, konnte für keinen Parameter ein signifikanter altersabhängiger Unterschied nachgewiesen werden.

Prüfung auf Normalverteilung

Die Ergebnisse sind - mit Ausnahme der Leitfähigkeit in Urinproben weiblicher Probanden - nicht normalverteilt. Die Beschreibung der Ergebnisverteilungen erfolgte daher mit Perzentilen (Tabellen 2 und 3).

In den Abbildungen 1 bis 5 sind ausgewählte Ergebnisverteilungen als Histogramme dargestellt.

Nicht standardisierte Abkürzungen: EC, epithelial cells; NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards; RBC, red blood cells; SCR, small round cell; VK, Variationskoeffizient; WBC, white blood cells.

³ Dort ermittelte Intraassay-Impräzisionen (10-fach-Messungen, jeweils Mittelwert (μl^{-1})/VK): Leukocyten (WBC): 218/2,4%, 74/3,3%, 39/4,3%, 10/5,6%, Bakterien (BACT): 497/2,9%, 235/3,6%, 114/2,8%, Erythrocyten (RBC): 547/1,3%, 52/3,6%, 24/8,5%, 17/6,8%. Dort abgeschätzte untere analytische Meßgrenze: Leukocyten (WBC): 3,2 μl^{-1} , Bakterien (BACT): 7,4 μl^{-1} , Erythrocyten (RBC): 2,3 μl^{-1} .

Vorgeschlagene Referenzbereiche für Gesunde

Referenzbereiche für Gesunde können den Tabellen 2 und 3 entnommen werden. Wir empfehlen, die dort abgeschätzten, wenn möglich geschlechtsunabhängigen, 2,5- und 97,5-Perzentilen zu verwenden.

Diskussion

Zunächst muß bemerkt werden, daß das neue System die klassische Mikroskopie des Sediments selbstverständlich nicht vollständig ersetzen kann. Wir fanden in unserem Laboratorium bei 11% der Urinproben eine

Überlastung des Zählsystems durch sehr hohe Partikelkonzentrationen in hochpathologischen Urinproben. Solche Urinproben müssen mikroskopisch untersucht werden. Darüber hinaus sollte diese Untersuchung mindestens bei der Meldung von Kristallen und Bakterien folgen, um zusätzliche Informationen zu erhalten. Gleichwohl konnte so in unserem Laboratorium die personalaufwendige Mikroskopie zunächst um etwa 75% reduziert werden [2].

Die mechanisierte Partikel-Diagnostik muß auch weiterhin mit einer Teststreifenuntersuchung begleitet werden, um Informationen über gelöste Bestandteile (z. B. Proteine, Glukose, Hämoglobin aus hämolysierten Erythrocyten (!)) und den pH-Wert zu erhalten.

Tabelle 1 Statistische Prüfung der Daten

Meßgröße	82 weibliche Probanden		119 männliche Probanden		
	Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Probanden.	Die Daten sind normalverteilt.	Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen Probanden über und unter 40 a.	Die Daten sind normalverteilt.	
	p	p	p	p	
Erythrocyten (RBC)	< 0,001	< 0,001	0,106	< 0,001	0,442
Leukocyten (WBC)	< 0,001	< 0,001	0,086	< 0,001	0,496
Epithelzellen (EC)	< 0,001	< 0,001	0,795	< 0,001	0,131
Hyaline Zylinder (CAST)	0,695	< 0,001	0,722	< 0,001	0,644
Bakterien (Bacteria)	< 0,001	< 0,001	0,381	< 0,001	0,857
Gezählte Partikel (Total Count)	< 0,001	< 0,001	0,283	< 0,001	0,859
Pathologische Zylinder (Pathol.CAST)	0,389	< 0,001	0,329	< 0,001	0,575
Kristalle (XTAL)	0,841	< 0,001	0,832	< 0,001	0,272
Rundepithelien (SRC)	0,081	< 0,001	0,911	< 0,001	0,778
Kleine Bakterien (H-BACT)	< 0,001	0,001	0,563	< 0,001	0,695
Leitfähigkeit (Conductivity)	0,001	0,407	0,627	< 0,001	0,302

Tabelle 2 Verteilung der Meßwerte bei 82 weiblichen Probanden

Unter Zylinder (CAST), Pathol. Zylinder (Path. CAST), Kristalle (XTAL) und Rundepithelien (SRC) sind die geschlechtsunabhängigen, aus den Ergebnissen aller 201 Probanden gewonnenen Werte angegeben.

Alter	Erythrocyten (RBC) (μl^{-1})	Leukozyten (WBC) (μl^{-1})	Epithelzellen (EC) (μl^{-1})	Zylinder (CAST) (μl^{-1})	Bakterien (BACT) (μl^{-1})	Gezählte Partikel (Total Count) (μl^{-1})	Pathol. Zylinder (Path. CAST) (μl^{-1})	Kristalle (XTAL) (μl^{-1})	Rundepithelien (SRC) (μl^{-1})	Kleine Bakterien (H-BACT) (μl^{-1})	Leitfähigkeit (Conductivity) (mS/cm)	
(a)												
Minimum:	17	0,1	0,4	0,0	0,0	8	394	0,0	0,0	0,0	259	3,7
2,5-Perzentile:	21	0,8	1,0	0,4	0,0	13	526	0,0	0,2	0,0	272	8,3
50,0-Perzentile:	32	7,8	6,95	8,4	0,0	90	2114	0,0	2,3	0,1	997	19,4
90,0-Perzentile:	54	24,8	19,9	35,7	0,4	242	5406	0,1	9,8	0,5	1995	28,7
95,0-Perzentile:	56	35,0	25,7	44,9	0,6	346	6487	0,1	15,1	1,0	2318	30,7
97,5-Perzentile:	59	43,5	35,5	48,5	0,9	369	6839	0,2	27,1	1,6	3023	32,2
Maximum:	66	69,6	45,3	73,5	1,9	475	8256	0,6	201	4,7	3411	32,6

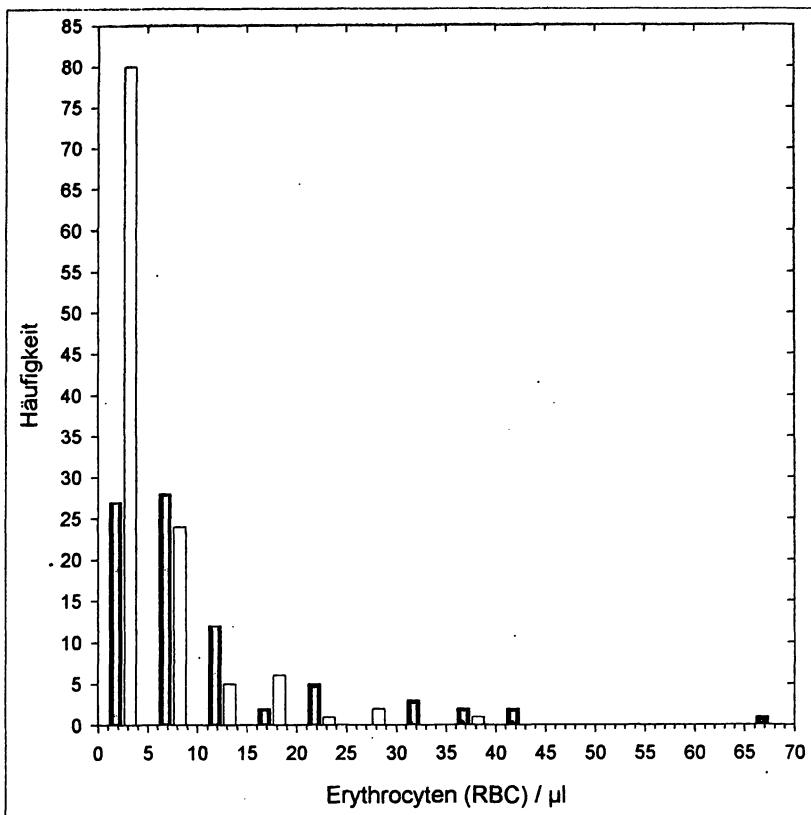


Abbildung 1 Verteilung der Ergebnisse der Bestimmung der Erythrocyten (RBC). Ergebnisse 82 weiblicher und 119 männlicher Probanden, die in der Teststreifen- und in der mikroskopischen Sediment-Untersuchung unauffällig waren. Schwarze Säulen: weibliche Probanden

Trotz der unterschiedlichen analytischen Prinzipien meinen wir, daß die durchflußcytometrisch und die sediment-mikroskopisch definierten Partikel weitgehend kongruent sind. Wir verwenden daher für die von dem durchflußcytometrischen System erfaßten Analyte deutsche Bezeichnungen, wie sie in der klassischen mikroskopischen Sedimentanalyse üblich sind. In den Tabellen und Abbildungen ist als Hinweis, daß durchflußcytometrisch definierte Partikel vorliegen, in

Klammern jeweils das von der englischen Benennung abgeleitete Kürzel angegeben.

Diskutieren muß man über das Partikel „Small Round Cells = SRC“ des Durchflußsystems, das sich im wesentlichen mit den Nierenepithelien der Mikroskopie deckt, jedoch wohl auch Urothelien umfaßt: Wir verwenden für diese vom Durchflußsystem erfaßten Partikel die Bezeichnung „Rundepithelien (SRC)“.

Tabelle 3 Verteilung der Meßwerte bei 119 männlichen Probanden.

Unter Zylinder (CAST), Pathol. Zylinder (Path. CAST), Kristalle (XTAL) und Rundepithelien (SRC) sind die geschlechtsunabhängigen, aus den Ergebnissen aller 201 Probanden gewonnenen Werte angegeben.

Alter (a)	Erythrocyten (RBC) (μl^{-1})	Leukozyten (WBC) (μl^{-1})	Epithelzellen (EC) (μl^{-1})	Zylinder (CAST) (μl^{-1})	Bakterien (BACT) (μl^{-1})	Gezählte Partikel (Total Count) (μl^{-1})	Pathol. Zylinder (Path. CAST) (μl^{-1})	Kristalle (XTAL) (μl^{-1})	Rundepithelien (SRC) (μl^{-1})	Kleine Bakterien (H-BACT) (μl^{-1})	Leitfähigkeit (Conductivity) (mS/cm)	
Minimum:	16	0,4	0,1	0,0	0,0	3	145	0,0	0,0	0,0	141	2,6
2,5-Perzentile:	21	0,6	0,3	0,0	0,0	6	205	0,0	0,2	0,0	219	7,2
50,0-Perzentile:	32	4,0	2,3	0,7	0,0	32	920	0,0	2,3	0,1	667	26,0
90,0-Perzentile:	57	10,5	6,0	1,8	0,4	104	2651	0,1	9,8	0,5	1364	32,9
95,0-Perzentile:	60	17,4	8,0	2,8	0,6	144	3271	0,1	15,1	1,0	1680	33,9
97,5-Perzentile:	61	24,2	10,1	4,2	0,9	265	3692	0,2	27,1	1,6	2414	34,8
Maximum:	62	38,3	21,1	49,3	1,9	657	14232	0,6	201	4,7	5946	36,6

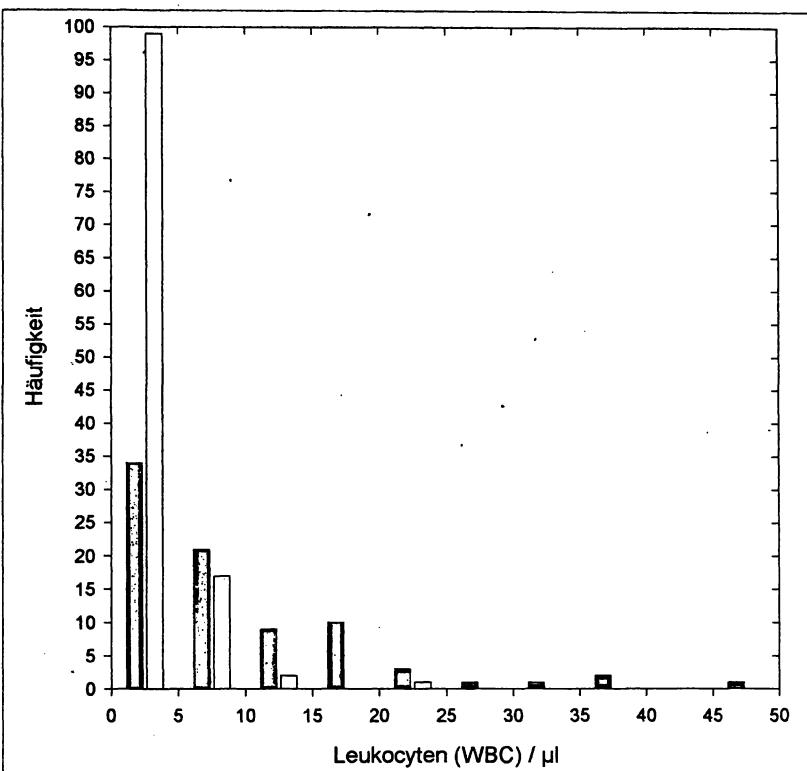


Abbildung 2 Verteilung der Ergebnisse der Bestimmung der Leukocyten (WBC). Ergebnisse 82 weiblicher und 119 männlicher Probanden, die in der Teststreifen- und in der mikroskopischen Sediment-Untersuchung unauffällig waren. Schwarze Säulen: weibliche Probanden

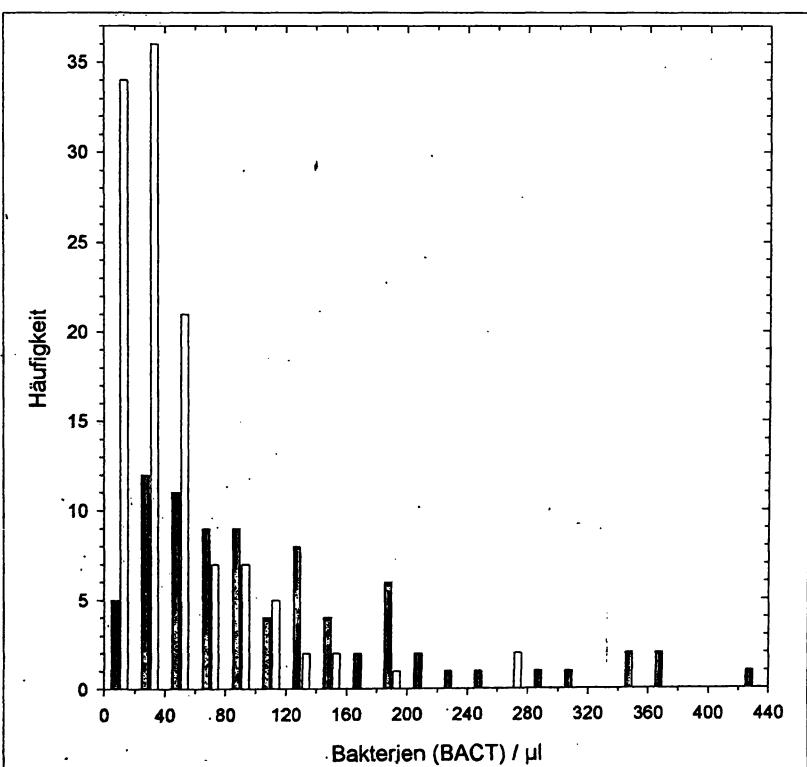


Abbildung 3 Verteilung der Ergebnisse der Bestimmung der Bakterien (Bacteria). Ergebnisse 82 weiblicher und 119 männlicher Probanden, die in der Teststreifen- und in der mikroskopischen Sediment-Untersuchung unauffällig waren. Schwarze Säulen: weibliche Probanden

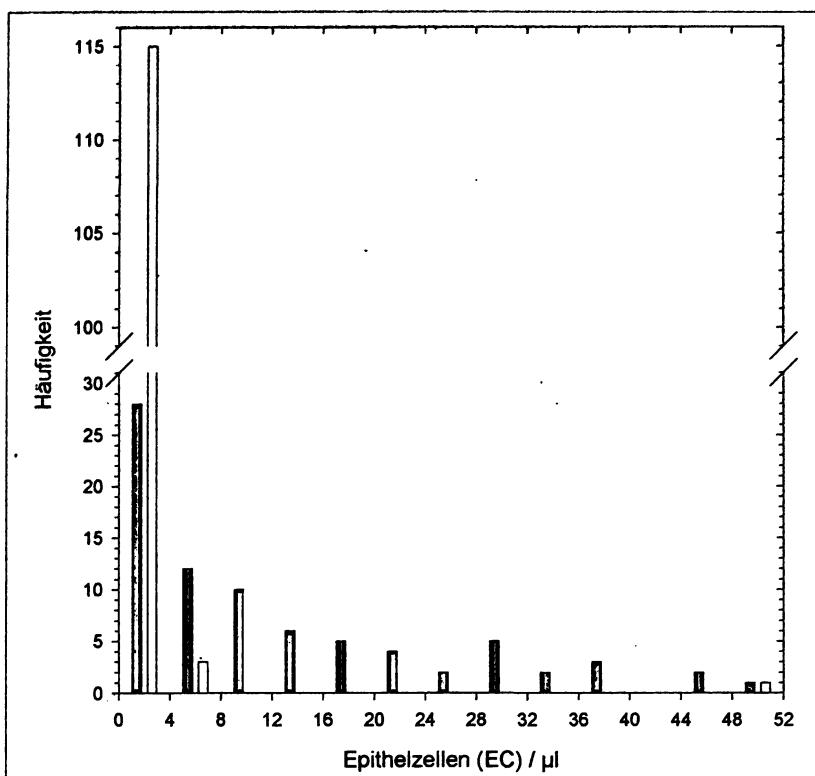


Abbildung 4 Verteilung der Ergebnisse der Bestimmung der Epithelzellen (EC). Ergebnisse 82 weiblicher und 119 männlicher Probanden, die in der Teststreifen- und in der mikroskopischen Sediment-Untersuchung unauffällig waren. Schwarze Säulen: weibliche Probanden

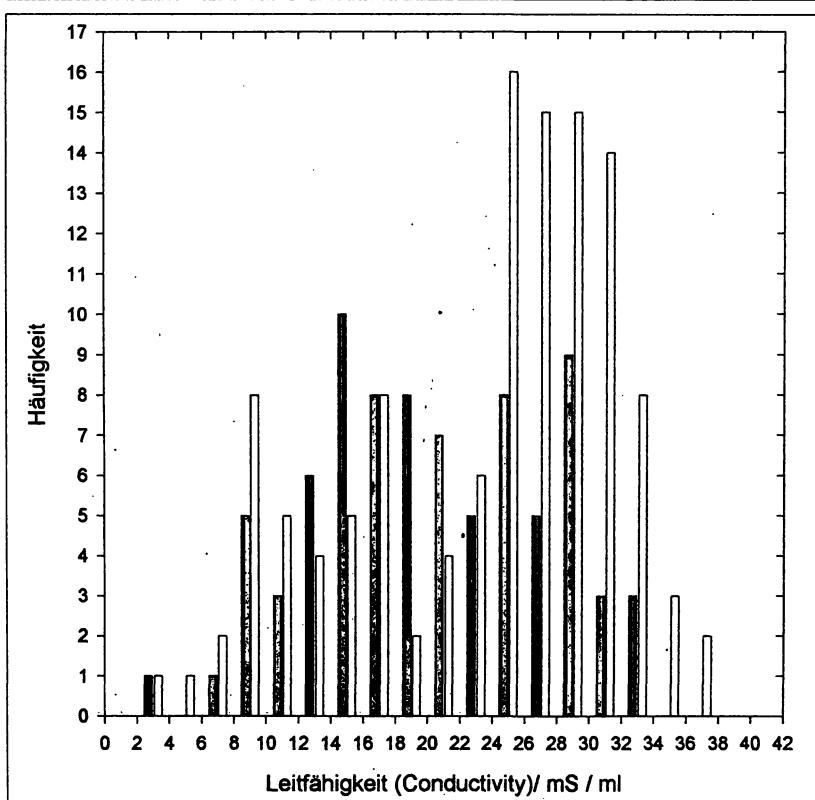


Abbildung 5 Verteilung der Ergebnisse der Leitfähigkeitsbestimmung (Conductivity). Ergebnisse 82 weiblicher und 119 männlicher Probanden, die in der Teststreifen- und in der mikroskopischen Sediment-Untersuchung unauffällig waren. Schwarze Säulen: weibliche Probanden

Das Durchflußsystem unterscheidet zwischen Bakterien, die größer sind als 1 μm (BACT) und solchen die mit ihrer Größe zwischen 0,7 und 1,0 μm liegen (H-BACT). In letzterer Gruppe werden sicherlich auch Zelldetritus und anorganische Partikel erfaßt. Die Bedeutung der Unterscheidung muß sich in der Zukunft erweisen. Da der UF-100 sofortige Abarbeitung der einzelnen Urin-Proben nach Eintreffen ins Laboratorium ermöglicht, sollte auch das irritierende in-vitro-Wachstum der Bakterien beim Sammeln zur bislang üblichen seriellen Bearbeitung entfallen.

Das System bietet einige neue Informationen, deren diagnostische Bedeutung diskutiert werden muß: Erstmals steht die Leitfähigkeit des Urins als Maßgröße an einem Routinegerät zur Verfügung. Sie erfaßt die im Urin gelösten Ionen. Wenn man davon ausgehen kann, daß die Elektrolytausscheidung bei normaler Ernährung in einem einigermaßen konstanten Verhältnis zu den nicht-ionischen gelösten Bestandteilen des Urins (z.B. Harnstoff) steht, ist sie wie die Osmolalität oder die Dichte interpretierbar. Tauchen allerdings zusätzliche, nicht zur Leitfähigkeit beitragende Substanzen im Urin auf - und hier muß besonders an Glukose gedacht werden - so bleibt die Leitfähigkeit hiervon unbeeinflußt. Denkbar ist eine automatische Korrektur oder Normierung, um verdünnte Urinproben auch bei unbekanntem Ausscheidungsvolumen auf ein Standardvolumen zu korrigieren. Es ist zu erwarten, daß man in verdünnten Urinen eine geringere Partikelkonzentration findet - und umgekehrt. Deshalb wurde von uns die Spannbreite der Leitfähigkeit bei Gesunden erfaßt.

Die vom System ermittelte Gesamtpartikelzahl (Total Count) ist zunächst eine technische Kontrollgröße, die etwas über die Belastung bzw. Überlastung des Durchflußsystems aussagt. Denkbar ist allerdings auch ein Einsatz in einem Algorithmus, der die Gesamtpartikelzahl einschließt.

In der Literatur sind für die Partikelkonzentrationen im Urin Angaben in Partikeln pro Mikroliter nativen Urins und Partikeln pro Gesichtsfeld im Sediment üblich.

Die letztere Angabe kann unter der Annahme, daß die NCCLS-Bedingen für Urinsedimentgewinnung [3] eingehalten wurden, nach der folgenden Umrechnungsformel [2] abgeschätzt werden (*Gleichung 1*):

Partikel/ μl (im Nativ-Urin!)
 $= \{(\text{Partikel}/\text{Gesichtsfeld}) / \text{Gesichtsfeldvolumen}\} \times \{\text{Residualvolumen} / \text{Ausgangsvolumen}\} \times \{100\% / \text{Effektivität der Zentrifugation}\}$

mit Gesichtsfeldvolumen (bei 400facher Vergrößerung) $\approx 0,02 \mu\text{l}$

Residualvolumen (nach Zentrifugation und Dekantieren) = 250 .. 500 μl

Ausgangsvolumen = 10.000 μl

Effektivität der Zentrifugation = 30 .. 100%

Es finden sich in der Literatur sehr widersprüchliche Angaben für die Erythrocyten- und Leukocytenkonzentration im Urin Gesunder. Bis auf Lit. [4] wird

nicht zwischen männlichen und weiblichen Proben unterschieden.

- Erythrocyten

Kammerzählung im Nativurin: 2 .. 5/ μl [5], bis 3/ μl [6], „90% der Gesunden wiesen weniger als 8 Erythrocyten/ μl auf“ [7],

Zählung im Sediment (/Gesichtsfeld): bis 2 [6], Proben männlicher Probanden: bis 3 [4], Proben weiblicher Probanden: bis 5 [4], bis 4 [9], bis 8 [8], bis 9 [9], Aus Gleichung 1 folgt, daß 3 .. 75 Erythrocyten / μl Nativurin vorliegen können!

Urinflowcytometrie im Nativurin: bis 10/ μl [10], bis 14/ μl (mit UF-100) [11].

- Leukocyten

„Vereinzeltes Auftreten von Leukocyten ist ohne Bedeutung“ [12],

Kammerzählung in Nativurin: 4 .. 6/ μl [5], bis 10/ μl [6], Zählung im Sediment: bis 5/Gesichtsfeld [4], bis 4/Gesichtsfeld [6, 13].

Aus Gleichung 1 folgt, daß 5 .. 33 Leukocyten/ μl Nativurin vorliegen können!

Urinflowcytometrie im Nativurin: bis 16/ μl (mit UF-100) [11].

- Epithelzellen

Zählung im Sediment: bis 15/Gesichtsfeld [13]

Aus Gleichung 1 folgt daraus, daß im Nativurin 38 .. 63 Epithelzellen/ μl vorliegen können.

Urinflowcytometrie im Nativurin: bis 9/ μl (mit UF-100) [11].

Andere Maßgrößen werden in der Routine mikroskopie des Sediments üblicherweise halbquantitativ, z.B. mit 0 .. +++, „vereinzelt“, „massenhaft“, angegeben.

- Zylinder

bis 4 hyaline Zylinder/Gesichtsfeld [4]

- Bakterien

In der Bakteriologie vermutet man bei 10^5 „Kolonien bildende Einheiten“ (=KBE) / ml Urin einen Harnwegsinfekt. Falls jedes Bakterium einer KBE entspräche, wären dies 100 Bakterien/ μl Urin.

„Bakterien im Urin sind nur pathologisch, wenn gleichzeitig mehr als 8 Leukocyten/ μl beobachtet werden“ [14].

Urinflowcytometrie im Nativurin: bis 173/ μl (mit UF-100) [11].

Die beträchtlichen Unterschiede in der Literatur sind im wesentlichen auf die mangelnde Standardisierung, aber auch die bereits oben erwähnten Fehlerquellen bei der Sedimentgewinnung zurückzuführen. Neben der Zerstörung von Zellen während der Zentrifugation, die dazu führt, daß bei Gesunden bei den Sedimentmethoden oft weniger Erythrocyten als Leukocyten gesehen werden, und die von Urin zu Urin sehr unterschiedliche Sedimentation während der Zentrifugation, die - so meinen wir - beide nicht standardisiert werden können,

ist hier vor allem die Variation des Residualvolumens zu nennen. Der relative Fehler erreicht hier - wie oben anhand der Umrechnung mit Gleichung (1) demonstriert - leicht Werte über 100% [2].

Die von uns vorgeschlagenen Referenzbereiche für Erythrocyten und Leukocyten im Nativurin widersprechen daher nicht Literaturangaben, bei denen aus Referenzbereichen pro Gesichtsfeld Konzentrationen im Nativurin abgeschätzt wurden. Bis auf den Wert für die Leukocytenkonzentration in Urinproben männlicher Probanden sind die von uns gefundenen Referenzkonzentrationen höher als die in der Literatur für die Kammerzählung angegebenen Werte. Das gleiche gilt für die Referenzwerte, die in einer kürzlich vorgestellten Studie mit dem UF-100 erhalten wurden [11]. Allerdings zeigt diese Studie ebenfalls einen Trend zu höheren Werten im Vergleich zu den für die Kammerzählung in der Literatur angegebenen Werten.

Es konnte allerdings auch gezeigt werden, daß das UF-100-System aus nativem Urin die gleichen Konzentrationen liefert wie eine aufwendige Kammerzählung [15]. Bei diesen Vergleichen wurden überwiegend pathologische Urinproben eingesetzt; denn die korrekte Erfassung der Partikel-Konzentrationen in Nativurinen Gesunder mit der Kammerzählung ist sehr schwierig. Durch die Zufallsverteilung im Urin sind die zu erwartenden sehr kleinen Zahlen mit sehr großen statistischen Fehlern behaftet.

Das neue Durchflußsystem wertet ein Volumen von 9 µl aus, was 90 Großquadranten (1 mm Seitenlänge) oder 2250 Gruppenquadranten (0,2 mm Seitenlänge) der Neubauer-Kammer entspricht.

Neben der Tatsache, daß eine völlig neue diagnostische Methode eingesetzt wurde, müssen hier sicher auch die von in der vorliegenden Studie angewendeten Urinsammelbedingungen diskutiert werden:

Urinproben können in vielfältiger Weise gewonnen werden

- durch Blasenpunktion oder -katheterisierung,
- Uringewinnung nach den sehr aufwendigen Finnischen Empfehlungen zur Gewinnung sauberen Mittelstrahlurins [16],

- Mittelstrahluringewinnung ohne weitere Vorbereitungen und
- Spontanuringewinnung.

In der ambulanten Routine ist davon - wie sich in der Diskussion mit den klinisch tätigen Ärzten schnell zeigte -, allenfalls die Gewinnung von Mittelstrahlurin möglich. Üblicherweise wird der zu Untersuchende in der Ambulanz, bei Personal- oder der Blutspenderuntersuchung mit der Aufforderung, Urin zu sammeln unvorbereitet konfrontiert. Material zur Reinigung des Urogenitalbereichs ist nicht vorhanden und nicht vorgesehen. Insofern war unser Vorgehen mit einer den Probanden ausgehändigte Anleitung zum Sammeln von Mittelstrahlurin bereits ein wichtiger Schritt zur Reduzierung von möglichen Verunreinigungen, ist aber durchaus immer noch „am schlechteren Ende der Qualitätskala angeordnet“.

Wir fanden in unserer Untersuchung einen deutlichen Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Urinproben. Es ist zu vermuten, daß die Ergebnisse der männlichen Probandengruppe eher den physiologischen, sehr wahrscheinlich geschlechtsunabhängigen Harnwegs-Partikelstrom bei Gesunden repräsentieren. Dagegen addiert sich bei weiblichen Probanden in vielen Fällen unter den erwähnten Bedingungen der Gewinnung von Mittelstrahlurin zum Harnwegs-Partikelstrom eine vaginale Flusskomponente hinzu.

Diese führt bei offensichtlich gesunden Probandinnen individuell zu einer Steigerung der Leuko- und/oder Erythrocyten- und/oder Bakterienkonzentration im Urin. Tatsächlich fanden wir bei mikroskopischer Kontrolle in den Urinen weiblicher Probanden mit erhöhter Bakterienzahl „Döderleinstäbe“ und in der kulturellen Anzüchtung entsprechend Laktobakterien, die der physiologischen Vaginalflora entstammen. Das durchflußcytometrische Verfahren zählt Bakterien, vermag sie jedoch nicht zu identifizieren.

Auch die signifikant erhöhte Zahl der Epithelzellen (EC) in Urinproben weiblicher Probanden ist sehr wahrscheinlich vaginalen Ursprungs und als Hinweis auf unsaubere (= vaginale Beimischung enthaltende) Uringewinnung zu deuten. Eventuell ist hierüber

Tabelle 4 Verteilung der Meßergebnisse von 34 weiblichen Probanden, die wegen pathologischer Ergebnisse bei der Mikroskopie des Sediments oder der Teststreifenuntersuchung von der Referenzwertermittlung ausgeschlossen wurden

	Alter (a)	Erythro- cyten (RBC) (µl ⁻¹)	Leuko- cyten (WBC) (µl ⁻¹)	Epithel- zellen (EC) (µl ⁻¹)	Zylinder (CAST) (µl ⁻¹)	Bakterien (BACT) (µl ⁻¹)	Gezählte Partikel (Total Count) (µl ⁻¹)	Pathol. Zylinder (Path. CAST) (µl ⁻¹)	Kristalle (XTAL) (µl ⁻¹)	Rund- epithelien (SRC) (µl ⁻¹)	Kleine Bakterien (H-BACT) (µl ⁻¹)	Leitfähig- keit (Conduc- tivity) (mS/cm)
Minimum:	22	1,4	1,5	0,3	0,0	34	1015	0,0	0,0	0,0	429	3,7
2,5-Perzentile:	23	3,7	1,9	0,5	0,0	38	1469	0,0	0,4	0,0	505	4,4
50,0-Perzentile:	31	20,5	36,3	25,4	0,3	333	5857	0,1	2,6	0,7	1674	23,4
90,0-Perzentile:	50	116	129	74,0	1,0	1055	16775	0,3	8,3	2,7	4662	32,4
97,5-Perzentile:	56	220	471	199	3,1	2873	59133	0,6	10,9	3,9	10758	34,6
Maximum:	57	236	543	313	4,7	3529	92409	0,7	12,6	4,7	22766	34,6

zukünftig ein Ansatz zur Abschätzung der vaginalen Flußkomponente zu finden. Daß diese Diskussion nicht ganz neu ist, zeigt beispielhaft eine Formulierung in der Literatur [17]: „Normalwert: Im Harn des Mannes und im *Katheterurin* der Frau nur vereinzelt Erythrocyten.“

Die Proben der männlichen Probanden waren in der Teststreifen- und in der mikroskopischen Sedimentuntersuchung nahezu vollständig negativ. Dagegen mußte eine größere Gruppe weiblicher Probanden aus der Studiengruppe ausgeschlossen werden, weil sie in diesen Untersuchungen positive Ergebnisse zeigten. Es muß dabei betont werden, daß auch diese Frauen gesund waren und keine sonstigen Hinweis auf Harnwegsinfekte aufwiesen. Die durchflußcytometrischen Ergebnisse dieser von der Referenzbereichabschätzung ausgeschlossenen weiblichen Probandengruppe sind in der Tabelle 4 dargestellt. Wir schließen hieraus, daß die gefundenen weiblichen Referenzgrenzen die Empfindlichkeit der Teststreifen- und in der mikroskopischen Sedimentuntersuchung widerspiegeln. In der Tat decken sie sich weitgehend mit den in unserer früheren Arbeit gefundenen Vergleichswerten zum Teststreifen und mikroskopischen Sediment [2].

Die männlichen Referenzgrenzen zeigen hingegen die gegenüber dem Teststreifen und der Sedimentmikroskopie überlegene analytische Sensitivität des durchflußcytometrischen Prinzips, das in der Lage ist, den niedrigen, physiologischen Harnwegs-Partikelstrom quantitativ zu erfassen.

Ein weiteres Problem, das wir hier nur streifen können, stellen gutartige Mikrohämaturien [8, 9, 19] und Leukocyturien [19] dar, die über viele Jahre bestehen können, ohne daß eine Nieren- oder Blasenerkrankung entsteht. Solche Probanden (männliche und weibliche) fanden wir auch in unserer Studiengruppe. Sie wurden allerdings automatisch ausgeschlossen, da sie in der Teststreifen- und in der mikroskopischen Sedimentuntersuchung pathologische Ergebnisse aufwiesen.

Unter den von uns angewendeten Bedingungen der Gewinnung von Mittelstrahlurin müßten unter Berücksichtigung der offensichtlich gesunden Probandinnen der Tabelle 4 die weiblichen Referenzgrenzen eigentlich noch höher gelegt werden. Da dabei jedoch die Referenzgrenzen der bislang eingesetzten Diagnostikmethoden deutlich überschritten würden, empfehlen wir bis auf weiteres, die 2,5- und 97,5-Perzentilen der Tabellen 2 u. 3 zu verwenden. In der Routine genügt die Angabe der 97,5-Perzentile. Bei unplausiblen Patientenwerten oberhalb dieser Grenzen sollte eine Kontrolle nach Uringewinnung auf höherer Stufe [16] erwogen werden. Eine Absehung auf z.B. die 90-Perzentilen bei Patientinnen oder gar geschlechtsunabhängiger Einsatz der männlichen 90- oder 97,5-Perzentilen würde demgegenüber eine Vielzahl überflüssiger Kontrolluntersuchungen nach sich ziehen.

Optimal sollte die Festlegung eines Cut-off-Wertes auf der jeweiligen Inzidenz der nachzuweisenden oder auszuschließenden Harnwegs- und Nierenerkrankungen in dem jeweiligen Laboratorium bzw. auf den zu-

gehörigen prädiktiven Werten des negativen oder positiven Ergebnisses basieren [20].

Wahrscheinlich stehen zukünftig Algorithmen zur Überprüfung der Plausibilität (unter Einbeziehung der Plattenepithelien, Verknüpfung von Leukocyten und Bakterien usw.) zur Verfügung.

Wir befinden uns hinsichtlich der Urinuntersuchung am Beginn einer erneut angestoßenen Diskussion. Wenn der jetzt möglichen sehr guten Präzision der Partikel-Bestimmung eine entsprechende Standardisierung der Uringewinnung folgt, werden Algorithmen, in die verschiedene Partikelkonzentrationen und auch andere Urinmeßgrößen eingehen, die starren Referenzbereiche ersetzen können. Am Ende könnte ein deutlich verbesserter Beitrag des Laboratoriums zur Diagnostik von Nieren- und Harnwegserkrankungen stehen.

Literatur

1. Addis T. The number of formed elements in the urinary sediment of normal individuals. *J Clin Invest* 1926;2: 409.
2. Hannemann-Pohl K, Kampf SC. Automation of urine sediment examination: A comparison of the Sysmex UF 100 automated flow cytometer with routine manual diagnosis (microscopy, test strips, and bacterial culture). *Clin Chem Lab Med*. Zur Veröffentlichung eingereicht.
3. NCCLS. Urinalysis and collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens; Approved Guideline. NCCLS document GP 16 A. (ISBN 1 56238 282 9). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 1995: 7-10.
4. Jacobs DS, Kasten BL, DeMott WR, Wolfson WL. Laboratory Test Handbook. 2nd Edition. Hudson (Cleveland, USA): Lexi-Comp INC;1990:937.
5. Heintz R, Althof S. Das Harnsediment. 4., überarbeitete Auflage. Stuttgart (DE): Georg Thieme Verlag, 1989:7-8.
6. Thomas L. Labor und Diagnose. 4. Auflage. Marburg (DE): Die Medizinische Verlagsgesellschaft; 1992:483.
7. Birch DF, Fairley KF, Whitworth JA, Forbes I, Fairley JK, Cheshire GR, Ryan GB. Urinary erythrocyte morphology in the diagnosis of glomerular hematuria. *Clin Nephrol* 1983;20:78-84.
8. Corwin HL, Silverstein MD. Microscopic hematuria. *Clin Lab Med* 1988;8:601-10.
9. Ruttimann S, Dreifuss M, Di Gallo A, Huser B, Dubach UC. Asymptomatische Mikrohämaturie, Schweiz Med Wochenschr 1990;120:1461-5.
10. Hyodo T, Kumano K, Haga M, Sakai T, Fukuda M, Isami Y, Okada T. Analysis of urinary red blood cells of healthy individuals by an automated urinary flow cytometer. *Nephron* 1997;75:451-7.
11. Köchli H. Präsentation auf dem Sysmex Urinary Flow Cytometry Workshop, 22. September 1997, Hamburg.
12. Hallmann L. Klinische Chemie und Mikroskopie. 11., neubearbeitete Auflage. Stuttgart (DE): Georg Thieme Verlag, 1980:191-2.
13. Rick W. Klinische Chemie und Mikroskopie. 2. Neubearbeitete Auflage. Berlin (DE): Springer-Verlag;1973:298.
14. Holm S, Wahlin A, Wahquist L, Wedren H, Lundgren B. *Acta Med Scand* 1982;211:209-12.
15. Kouri T, Köchli H. Präsentation auf dem Sysmex Urinary Flow Cytometry Workshop, 22. September 1997. Hamburg.
16. Koivula T, Gronroos P, Gavert J, Icen A, Ijala K, Penttila I, Sitionen A, Siukola OA. Basic urinalysis and urin culture: Finnish recommendations from the working group on clean midstream specimens. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1990;200:26-33.
17. Klinisches Labor. 12. Auflage. Darmstadt (DE): E. Merck; 1974:398.
18. Blumenthal SS, Fritsche C, Leman Jr J. Establishing the diagnosis of benign hematuria. The importance of examining the urine sediment of family members. *JAMA* 1988;259: 2263-66.
19. Benbasset J, Froom P, Feldman M, Margalioth S. The importance of leukocyturia in young adults. *Arch Intern Med* 1985;145:79-80.
20. Keller H. Klinisch-chemische Labordiagnostik für die Praxis. Stuttgart (DE): Georg Thieme Verlag, 1986:156-8.

Veranstaltungen

7. Kursus für Klinische Durchflußzytometrie

5. - 9. 10. 1998, Universitätsklinikum Mannheim

Tag	Uhrzeit	Thema	Referent
Montag		Indikationen, Technik und Thrombozytenanalytik	
	10.00	Begrüßung und Einführung	Prof. Dr. Dr. H. Wisser
	10.15	Indikationen für die klinische Zytometrie	Dr. T. Nebe, Mannheim
	11.00	Kaffeepause	Dr. T. Nebe
	11.30	Prinzip der Durchflußzytometrie	
	12.30	Mittagessen	
	14.00	Durchflußzytometrische Analyse von Thrombozyten	Dr. K. Gutensohn, Hamburg
	15.00	Thrombozytenaktivierung / Thrombozytentdefekte	und Dr. A. Ruf, Karlsruhe
	15.30	Kaffeepause	
	16.00	Thrombozytopenie: Autoantikörper, HAT, young platelets	
	20.00	Gemeinsames Abendessen	
Dienstag		Immunologische und hämatologische Funktionstests (1)	
	09.00	Immundefekte	Dr. T. Nebe
	10.00	Phagozytose und oxidativer Burst	Dr. W. Hirt, Heidelberg
	11.00	Kaffeepause	Dr. W. Hirt
	11.30	NK-Assay	
	13.00	Mittagessen	
	14.00	Basophilen-Degranulationstest	Dr. T. Nebe
	15.30	Proliferationstests (FastImmune, DNA, BrdU)	Dr. T. Nebe
	16.30	Kaffeepause	Dr. W. Hirt
	17.00	Multi-Drug-Resistenz	
	20.00	Gemeinsames Abendessen	
Mittwoch		Immunologische und hämatologische Funktionstests (2)	
	09.00	Zytoplasmatische Zytokine	Dr. P. van der Mejden
	10.30	Kaffeepause	/ Dr. P. Werner, Hamburg
	11.00	Zytoplasmatische Zytokine (Teil 2)	/ Dr. T. Nebe
	13.00	Mittagessen	
	14.00	Dendritische Zellen und Antigenpräsentation	Prof. Dr. J.H. Peters, Göttingen
	16.00	Kaffeepause	
	16.30	Zelltod: Apoptose und Nekrose	Dr. T. Nebe
	20.00	Gemeinsames Abendessen	
Donnerstag		Hämatologie (1)	
	09.00	Hämatologische Meßtechniken für das kleine u. große Blutbild	Dr. H. Diem, München
	10.30	Kaffeepause	
	11.00	Mikroskopische Befunde	Drs. Diem, Nebe
	12.00	Anämiediagnostik: Retikulozyten, PNH, Autoantikörper	
	13.00	Mittagessen	
	14.00	Immunologische Färbetechniken, CD-Nomenklatur	Prof. Dr. Bettelheim, Linz
	15.00	Immunzytologie in der Tumordiagnostik	PD Dr. J. Hastka, Mannheim
	16.00	Kaffeepause	
	16.30	Progenitorzellen	Dr. Kleine, Rostock
	20.00	Abend zur freien Verfügung	
Freitag		Hämatologie (2) und neue Anwendungen	
	09.00	Immunphänotypisierung akuter Leukämien (Teil 1) Spezielle Färbetechniken, Mikroskopische und zytometrische Demonstration von Befunden	Dr. Diem Prof. Bettelheim Dr. Nebe
	12.30	Mittagessen	
	14.00	Immunphänotypisierung akuter Leukämien (Teil 2) Non-Hodgkin-Lymphome (REAL-Klassifikation)	PD Dr. Höffkes, Magdeburg Prof. Bettelheim
	15.30	Kaffeepause	
	16.00	Durchflußzytometrie in der Mikrobiologie	Dr. G. Nebe v. Caron, Sharnbrook
	18.00	Ende der Veranstaltung	

Information/Anmeldung über Fa. Becton Dickinson, Frau Lehmann, Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg, 06221/305-240