

**Aus dem Zentrum für Labordiagnostik
am St. Bernward-Krankenhaus Hildesheim**

**Automatisierte Bakterienzahl-Bestimmung
im Urin mittels Durchflusszytometrie**

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
in der Medizinischen Hochschule Hannover**

**Vorgelegt von
Jan Friedrich Helling
aus Hamburg**

Hannover, 2002

**Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover
am 24.09.03**

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Rektor:	Prof. Dr. Horst v. der Hardt
Betreuer der Arbeit:	Prof. Dr. Norbert Gässler
Referent:	Prof. Dr. Christian-Georg Stief
Koreferent:	Priv.-Doz. Franz-Christoph Bange
Tag der mündlichen Prüfung:	24.09.03
Promotionsausschussmitglieder:	Prof. Dr. Hans Bigalke
	Prof. Dr. Michael Gebel
	Prof. Dr. Wolf-Rüdiger Külpmann

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Historie der Diagnostik	1
1.2	Epidemiologie des Harnwegsinfektes	3
1.3	Diagnostik des Harnwegsinfektes	3
1.4	Labordiagnostische Möglichkeiten	4
1.4.1	Teststreifen	4
1.4.2	Mikroskopie	5
1.4.3	Bakterienkultur	5
1.4.4	Durchflusszytometrie	6
1.5	Zielsetzung	7
2	Materialien und Methoden	9
2.1	Verwendete Materialien	9
2.2	Probengewinnung	10
2.3	Bakterienkulturen	11
2.3.1	Semiquantitative Anlage und Auszählung	11
2.3.2	Quantitative Anlage und Auszählung	12
2.3.3	Bakterienartbestimmung	12
2.3.4	Prüfung auf antibakterielle Hemmstoffe	13
2.3.5	Kriterien für das Vorliegen eines Harnwegsinfektes	13
2.3.5.1	Kriterien nach Laborarbeitsanleitung	13
2.3.5.2	Kriterien in Anlehnung an MiQ	13
2.4	Das Urindurchflusszytometer UF-50	15
2.4.1	Funktionsprinzip	15
2.4.2	Ausgabe der Messergebnisse	18
2.4.3	Verwendete Einstellungen	20
2.4.4	Analysedaten	21
2.4.5	Harnwegsinfekt-Marker	21
2.4.5.1	Harnwegsinfekt-Marker mit Herstellervorschlag	21
2.4.5.2	Harnwegsinfekt-Marker mit selbstgewählten Grenzen	23
2.5	Verwendete Programme und statistische Methoden	23

3	Ergebnisse	25
3.1	Separation von Proben mit antibakteriellen Hemmstoffen.....	25
3.2	Bakterienzahl in den semiquantitativ ausgewerteten Proben.....	25
3.3	Bakterienartenspektrum	25
3.4	Vorliegen eines Harnwegsinfektes	26
3.4.1	Harnwegsinfekte nach Laborarbeitsanleitung.....	26
3.4.2	Harnwegsinfekte in Anlehnung an MiQ.....	26
3.4.2.1	Bakterienartenspektrum der in Anlehnung an MiQ positiven Proben.....	27
3.5	Ergebnisse der Messungen mit dem UF-50	28
3.5.1	Bakterienzahl.....	28
3.5.2	Harnwegsinfekt-Marker	29
3.6	Vergleich der Bakterienzahlen semiquantitative Kultur mit UF-50.....	29
3.7	Vergleich Harnwegsinfekte semiquantitative Kultur mit UF-50.....	31
3.7.1	Vergleich Harnwegsinfekte mit Herstellervorschlag UF-50	31
3.7.1.1	Vergleich Harnwegsinfekte nach Laborarbeitsanleitung mit UF-50.....	33
3.7.1.2	Vergleich Harnwegsinfekte in Anlehnung an MiQ mit UF-50.....	34
3.7.1.3	Falsch negative Befunde UF-50.....	34
3.7.2	Vergleich Harnwegsinfekte mit selbst gewählten Grenzen UF-50.....	36
3.8	Bakterienzahl in den quantitativ ausgewerteten Proben	39
3.9	Vergleich der Bakterienzahlen der semiquantitativen mit quantitativen Kultur.....	39
3.10	Vergleich der Bakterienzahlen der quantitativen Kultur mit UF-50.....	41
4	Diskussion	43
4.1	Einführung.....	43
4.2	Erläuterung und Wertung der Ergebnisse	43
4.2.1	Korrelation Bakterienzahlen.....	43
4.2.2	Korrelation Harnwegsinfekt.....	44
4.2.2.1	Erläuterung der verschiedenen Grenzen.....	44
4.2.2.2	Ergebnisse der verschiedenen Grenzen	45
4.2.2.3	Verschiedene Grenzen in der Kultur	46
4.2.3	Erregerartspezifische Auswertung	47
4.3	Vergleich zur Literatur.....	47
4.3.1	Besonderheiten der eigenen Untersuchung.....	52
4.4	Würdigung der Ergebnisse	53

4.5	Weitere Möglichkeiten des Einsatzes der Durchflusszytometrie	55
4.6	Bedeutung für das eigene Labor	56
4.7	Gesundheitsökonomische Aspekte.....	57
5	Zusammenfassung	59
6	Literaturverzeichnis	60
7	Anhang	65
7.1	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	65
7.2	Danksagung	67
7.3	Lebenslauf	68
7.4	Erklärung nach §2 Abs.2 Nrn. 5 und 6 der Promotionsordnung	69

Abkürzungsverzeichnis:

BACT	Bacteria, Bakterien
CAST	Hyaline Zylinder
ch	channels (Größenmeseinheit des UF-50)
Cond.	Conductivity, Leitfähigkeit
EC	Epithelial Cells, Epithelien
Enterok.	Enterokokken
Fl	Fluorescence, Intensität der Fluoreszenz
Flw	Fluorescence pulse width, Signaldauer der Fluoreszenz
Fsc	Forward scatter, Intensität des Streulichts
Fscw	Forward scatter pulse width, Signaldauer des Streulichts
KBE	Kolonie bildende Einheiten
p	Irrtumswahrscheinlichkeit (vgl. 2.5)
P. CAST	Pathologische Zylinder mit Einschlüssen
RBC	Red Blood Cells, Erythrozyten
r_s	Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (vgl. 2.5)
SOP	Standard Operating Procedure, Arbeitsanleitung
SPERM	Spermien
SRC	Small Round Cells, Nierentubuli u. Transitionalepithelien
τ (Tau)	Rang-Korrelationskoeffizient nach Kendall (vgl. 2.5)
UF-50/100	Durchflusszytometer UF-50/100
UTI-Flag	Urinary Tract Infektion-flag, Harnwegsinfektions-Marker
WBC	White Blood Cells, Leukozyten
X`TAL	Kristalle
YLC	Yeast Like Cells, Hefen-ähnliche Zellen

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Historie der Diagnostik

Die Untersuchung des Urins ist nicht nur aktuell von Bedeutung, sie hat auch eine lange Geschichte: Bereits um 400 vor Christus erwähnte Hippokrates (460 – 377 v. Chr.) die Untersuchung des Urins mit bloßem Auge. Er teilte Erkrankungen der Harnorgane in drei Arten von Störungen ein: (Schmerzhafte) Dysurie, Strangurie (tropfenweises Wasserlassen) und Ischurie (Harnverhaltung). Überliefert ist zum Beispiel sein Lehrsatz: „Wenn der Urin stinkt, gar zu dünn oder gar zu dick ist und schwarz von Farbe, so kann sich der Kranke allmählich zu seiner letzten Reise vorbereiten...“. Auch der heute als „Vorfater der klinischen und experimentellen Medizin“ bezeichnete Galen (Claudius Galenus) (um 131 bis 201 n. Chr.) beobachtete den Urin. Nach seiner allerdings überwiegend auf philosophischen Betrachtungen gefussten Lehre über die Ursache und Entwicklung von Krankheiten führte er die Erscheinungen auf vier Körpersäfte zurück. Diese waren das Blut, die gelbe Galle, die schwarze Galle und der Schleim. Er bezeichnete den Urin auch als „Abbild des Leberblutes“. Seine Anschauungen wurden nicht zuletzt durch deren Übernahme auch durch die Araber für viele Jahre beherrschend in der Medizin.

Auch von dem 540 in Mesopotamien geborenen Aetius ist überliefert, dass er sich intensiv dem Studium des Urins widmete. Er zog daraus aus heutiger Sicht wunderliche diagnostische und prognostische Folgerungen. Dennoch legte er die Grundlagen für die Uroskopie, die sogenannte Harnschau. Im 7. Jahrhundert stellt Theophil (genannt Protospatharios, „Oberst der Garde“) die Grundregeln für diese auf. Im 13. Jahrhundert wurden sie von Actuarius nach den Prinzipien der damals renommierten medizinischen Schule von Salerno modernisiert. Nach Giles de Corbeil (1140 bis 1224), ebenfalls einem Schüler der Schule von Salerno, Domherr von Notre Dame und Leibarzt Philipp Augusts, beruht die ganze Pathologie auf dem Studium des Pulsschlages (de pulsibus) und des Urins (de urinis). Diese Lehre wurde auch in den Regionen des heutigen Deutschland als Schlüssel zum Verständnis der Krankheiten gesehen.

Der erste „beim Hahnenschrei“ produzierte Urin wurde nach einer ausgeklügelten Technik in einem durchsichtigen Gefäß, dem Urinal oder „matula“, gesammelt. Dieses Gefäß findet sich noch heute beispielsweise in den Signets mehrerer urologischer Berufsverbände wie dem des Berufsverbandes Deutscher Urologen, der Deutschen Gesellschaft für Urologie und der Amerikanischen Urologischen Gesellschaft. Die Matula war vor Sonnenlicht und Wärme-

quellen zu schützen. In einem Weidenkorb wurde sie zum „Harnbeschauer“ gebracht, welcher die Probe frisch sowie zwei Stunden später begutachtete. Nach Galens Vorschriften prüfte man Dichte, Farbe, Geruch, Geschmack und Sediment. Der Zustand des Urins wurde unter Berücksichtigung der körperlichen Verfassung des Krankens, seines Temperaments, Geschlechtes und der Jahreszeit bewertet. Hieraus wurden minutiös erarbeitete „Urinkarten“ gezeichnet.

Bereits damals wurden also - wie auch heute - der klinische Befund des Patienten und der Urinbefund im Zusammenhang gewertet.

Der „harnschauende Arzt“ gehört auch zu den in die Kunstgeschichte eingegangenen urologischen Objekten. Über Jahrhunderte war die Harnschau die beherrschende urologische Tätigkeit. 1736 prägte Junker für die Kunst, „Das Wasser zu besehen“, den Begriff Urologie.

Auch nach der „geistigen Wiedergeburt“ in der Renaissance entwickelten sich nicht nur die Kenntnisse in der Urologie im Allgemeinen, sondern auch insbesondere die der Urindiagnostik im Speziellen nur langsam. Durch Vesal (1514 bis 1564) wurden viele der Thesen Galens insbesondere auf anatomischem Gebiet widerlegt. Durch Ambroise Pare (1510 bis 1590) kam es insbesondere zu Verbesserungen der Operationstechniken, er verfasste neben weiteren Werken 1564 auch Werke „Über den Tripper“, „Über die Steine“ und „Über den Harnverhalt“. Ein weiterer Meilenstein war die Entdeckung des Mikroskops um den Beginn des 17. Jahrhunderts. Es wurde jedoch zunächst nicht in der Diagnostik des Urins eingesetzt. Trotz aller neuen Erkenntnisse verstarben weiterhin viele Patienten an Infektion und Eiterung, da diese noch nicht wirkungsvoll bekämpfbar waren. Neben vielen weiteren Entdeckungen und Erkenntnissen erörterte Morgagni (1666 bis 1723) Ursachen für Harnverhalt und Harnzwang. Er gilt als Entdecker der Prostatahypertrophie (1761: *De sedibus et causis morborum per anatomen indagatis*).

Seit etwa 1750 wurde der Urin mit chemischen Methoden untersucht. Erst nach 1830 wurde die Mikroskopie zunehmend auch zur Beurteilung des Urins eingesetzt.

Im letzten Drittel des 19. Jahrhunderts kam es in der Urindiagnostik zu weiteren Fortschritten: Die Lehren zur Krankheitsübertragung von Semmelweis (1818 bis 1865) und die durch die Entdeckungen Pasteurs (1822 bis 1895) entstandene Bakteriologie sowie die 1867 durch Lister (1827 bis 1912) entwickelte Antisepsis erwirkten ein neues Verständnis der Infektio-

nen. Das 1882 von Robert Koch entdeckte „Tuberkelbakterium“ konnte im Urin aufgesucht und erkannt werden.

Eine wesentlich Beschleunigung der Entwicklung findet sich im 20. Jahrhundert: Durch die Entdeckung des Penicillin (Flemming 1929) und der Sulfonamide (Domagk 1934) standen erstmalig wirkungsvolle Mittel zur Behandlung von Infektionskrankheiten zur Verfügung.

1926 wurde durch Thomas Addis (1926) eine quantitative Analyse der Harnbestandteile beschrieben. Diese wird noch heute als „Addis-Count“ bezeichnet. Durch die Entwicklung der Trockenchemie wurde 1941 der erste Glucose-Schnelltest als Tablette kommerziell vermarktet. 1956 wurde der erste Urinteststreifen ebenfalls für den Glucosenachweis auf den Markt gebracht. Von diesem Zeitpunkt an entwickelte sich die Urinanalyse insbesondere auf dem Gebiet des Screening von Urinproben mittels Teststreifen. Die Mikroskopie verlor aufgrund des hohen Aufwandes und der schlechten Standardisierbarkeit einen Teil ihrer zwischenzeitlich erlangten Bedeutung. Als weitere Entwicklungen seien hier nur Teststreifen für Parameter wie Hämoglobin, Esterase als Marker für Granulozyten sowie automatisierte Lesegeräte genannt. Neueste Entwicklung ist die Durchflusszytometrie, auf die in dieser Arbeit im Besonderen eingegangen werden wird.

(Fogazzi et al. 1994; Moll 2002; Over und Blaseio 1998; Zglinicki 1982)

1.2 Epidemiologie des Harnwegsinfektes

Der Harnwegsinfekt ist die häufigste bakterielle Infektionskrankheit des Menschen. Zwar liegen genaue und aktuelle epidemiologische Zahlen nicht vor, jedoch wird seine Prävalenz in der Allgemeinarztpraxis von bis zu 3% aller Patienten (Gatermann et al. 1997) bis etwa 0,8% (Hummer-Pradier und Kochen 1999) geschätzt. In Schweden waren im Jahre 1996 1,6% aller ambulanten Konsultationen darauf zurückzuführen, damit lag der Harnwegsinfekt auf dem 9. Rang aller ambulanten Arztbesuche (Diagnosis and Therapy survey 1996). Der Harnwegsinfekt ist mit etwa 30 - 40% auch die häufigste nosokomial erworbene Infektion (Gatermann et al. 1997; Krieger et al. 1991).

1.3 Diagnostik des Harnwegsinfektes

Die Diagnose eines Harnwegsinfektes ergibt sich in der Regel aus zwei wesentlichen Komponenten: Zum einen aus dem typischen klinischen Befund mit insbesondere häufigem Harndrang und Schmerzen beim Wasserlassen, zum anderen aus Laboruntersuchungen des Urins. Beim sogenannten „unkomplizierten Harnwegsinfekt“ werden in der hausärztlichen

Leitlinie „Brennen beim Wasserlassen“ (Hummer-Pradier und Kochen 1999) unter bestimmten Voraussetzungen die geschilderten typischen Beschwerden zusammen mit dem Nachweis von Nitrit (als Marker für das Vorliegen von Bakterien, s.u.) und Leukozyten im Urin mittels Teststreifen als ausreichende Diagnostik angesehen. In allen anderen Fällen ist für die Diagnose eines Harnwegsinfektes der direkte Nachweis von Bakterien im Urin erforderlich. Bei speziellen Fragestellungen ist ferner die Bestimmung der Erregerarten und ihrer Empfindlichkeiten bzw. Resistenzen gegenüber Antibiotika, das sog. Antibiogramm, erforderlich.

Aufgrund der zu Beginn angegebenen Häufigkeiten und der Möglichkeiten zur einfachen Gewinnung machen Urinproben den größten Teil der in mikrobiologischen Laboren untersuchten Proben aus. Bei uns wurden im Jahr 2002 ca. 6.500 Urinproben mikrobiologisch untersucht.

1.4 Labordiagnostische Möglichkeiten

Zum labordiagnostischen Nachweis von Bakterien und Leukozyten im Urin und somit eines Harnwegsinfektes stehen heute verschiedene Verfahren zur Verfügung. Die gegenwärtig eingesetzten Verfahren sind im Folgenden mit ihren wesentlichen Vor- und Nachteilen kurz aufgezählt. Ein Standard- oder Referenzverfahren existiert hierzu nicht. Jedoch liegen international verschiedene Empfehlungen und erste Leitlinien vor (Aspevall et al. 2001; Kouri et al. 2000; NCCLS 1995). In diesen wird auch auf die Interpretation des erhobenen Befundes eingegangen.

1.4.1 Teststreifen

Hier erfolgt mit chemischen Methoden ein Nachweis bestimmter Inhaltsstoffe des Urins. Beispielsweise ist der Nachweis von Leukozyten über den Nachweis der Esterase aus Granulozyten möglich. Vorteilhaft ist, dass mit dieser Methode auch bereits lysierte Granulozyten nachgewiesen werden können. Andere Leukozyten werden jedoch nicht nachgewiesen. Der Nachweis von Bakterien ist nur über den Nachweis von Nitrit möglich. Zu berücksichtigen ist hierbei insbesondere, dass nur ca. 80% der bei Harnwegsinfektionen vorkommenden Bakterien Nitrit bilden, nicht aber beispielsweise Enterokokken, Staphylokokken und Pseudomonaden. Ferner muss dem Körper mit der Nahrung genügend Nitrat zugefügt werden und der Urin ausreichend lange (4-6 Stunden) in der Blase verweilen, damit Nitrit gebildet werden kann. Auch ist keine qualifizierte Aussage über die Bakterienart und ihre Anzahl möglich. Es handelt sich also nur um ein qualitatives, allenfalls semiquantitatives Verfahren. Dennoch

wird es aufgrund der einfachen und günstigen Durchführbarkeit vielfach benutzt. Es kann auch automatisiert durchgeführt werden. (Dörner 1998)

1.4.2 *Mikroskopie*

Die mikroskopische Untersuchung des Urins kann unter verschiedenen Bedingungen erfolgen: So ist sie mit zentrifugiertem / nicht zentrifugiertem, angefärbtem / nicht angefärbtem Urin und mit / ohne spezielle Zählkammern mit normalem / Phasenkontrastmikroskop möglich.

Die Zentrifugation stellt eine wesentliche Fehlerquelle dar (Gadehold 1968). Zwar erfolgt sie nach festgelegtem Schema mit 800g (entspr. 1000-2000 Umdrehungen/min) für 5 Minuten, dennoch ist sie schlecht standardisierbar. Auch können zuvor intakte Zellen durch sie zerstört werden. Teilweise werden Zellen auch nicht zentrifugiert und somit anschließend mit dem Überstand verworfen. Das Verfahren der Zellanfärbung schafft eine deutlich erhöhte Sicherheit (Fogazzi et al. 2000; NCCLS 1995), ist aber aufwändig. Auch lassen sich verschiedene Zellen nur mit verschiedenen Farbstoffen sicher anfärben, so dass keine generelle Empfehlung zum verwendeten Färbstoff gegeben werden kann. Durch die Anfärbung und Morphologie sind begrenzte Aussagen zur Bakterienart möglich. Erst die Verwendung spezieller Zählkammern, z.B. der gängigen Fuchs-Rosenthal-Kammer, erlaubt eine quantitative Aussage zu den im Urin enthaltenen Partikeln. Durch die Verwendung der Phasenkontrastmikroskopie können Partikel in Proben genauer wahrgenommen und identifiziert werden (Ben Ezra et al. 1998). Für die Mikroskopie ist geschultes und geübtes Personal erforderlich. Dieses stellt nicht nur einen bedeutenden Zeit-, sondern auch Kostenfaktor dar. Verschiedene Untersuchungen zeigen die schlechte Reproduzierbarkeit der verschiedenen Verfahren (Bradley und Schumann 1984; Gadehold 1968; Györy 1980; Hannemann-Pohl und Kampf 1999; Winkel et al. 1974). Die besten Ergebnisse ergibt die Zählkammer-Zählung von nicht zentrifugiertem und angefärbtem Urin mit dem Phasenkontrast-Mikroskop (Hannemann-Pohl und Kampf 1999). Dieses ist, wie oben bereits erläutert, ein insgesamt aufwändiges Verfahren.

1.4.3 *Bakterienkultur*

Mit diesem Verfahren lassen sich vitale Bakterien und, je nach verwendeten Nährmedien, auch Pilze im Urin nachweisen. Neben der Bestimmung der Bakterienzahl und -art ist die Anlage eines AntibioGramms möglich. Als Besonderheit ist ferner eine Prüfung des Urins auf

antibakterielle Hemmstoffe, z.B. Antibiotika, durchführbar. Nachteil dieser Untersuchungsmethode ist neben dem hohen personellen und materiellen Aufwand auch der Zeitfaktor: So liegen erste Ergebnisse frühestens nach etwa 24 Stunden vor. Im Falle einer weiteren Differenzierung mit Antibioogramm dauert die Untersuchung mindestens 48 Stunden. Nicht nachgewiesen werden mit dieser Untersuchung nicht kultivierbare Bakterien. Auch ein Nachweis von Leukozyten ist nicht möglich. Ferner können bestimmte, besondere Anforderungen an Nährmedien stellende Bakterien, wie beispielsweise auch Anaerobier, nur mit einem zumeist für eine Routinediagnostik nicht praktikablem Aufwand nachgewiesen werden. Die Genauigkeit der Bakterienzahlbestimmung ist bei diesem Verfahren allerdings geringer als oft angenommen. So konnten im Bereich von 10^4 bis 10^5 Bakterien/ml Differenzen von bis zu $\pm 90\%$ nachgewiesen werden (Collins und Lyne 1985).

Zur Durchführung stehen verschiedene Methoden wie das Oberflächenverdünnungsverfahren, Flüssigkulturen und als vereinfachte Methoden die Eintauch- oder Objektträgerkultur (z.B. Uricult®) zur Verfügung. Ausführliche Angaben zur Durchführung finden sich beispielsweise bei in den „Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, Teil 2, Harnwegsinfektionen (Gatermann et al. 1997) und in der DIN-Norm 58958-1 „Bakteriologische Urinuntersuchung“ (2000).

1.4.4 Durchflusszytometrie

Als neues Verfahren zur Urindiagnostik wurde von der Fa. Sysmex Corporation, Japan (vormals TOA MEDICAL ELECTRONICS Co., Ltd.) die Urindurchflusszytometrie vorgestellt: Dieses Verfahren beruht auf einem seit gut 30 Jahren in der Untersuchung von Blut auf zelluläre Bestandteile angewandten Prinzip und ist im nachfolgenden Teil Materialien und Methoden (2.4.1) ausführlich erläutert. Hiermit ist eine Klassifizierung und Zählung diverser korpuskulärer Bestandteile des nativen Urins in einem automatisierten und standardisierten Verfahren möglich.

Dieses Verfahren wird vom Hersteller als Screeningmethode empfohlen. Bei auffälligen Befunden wird eine weitere Untersuchung beispielsweise mittels Mikroskopie angeraten.

Im Gegensatz zur Kulturanlage ist über die Vitalität der Bakterien keine Aussage möglich. Ebenso ist eine Aussage zur Bakterienart nicht möglich. Das Ergebnis der Messung liegt bereits nach 72 Sekunden vor. Dieses Verfahren ist bereits in verschiedenen Untersuchungen

vergleichend zu den oben aufgezeigten Verfahren bewertet worden. Im Detail wird hierauf in der späteren Diskussion eingegangen werden.

Das Verfahren wird in zwei Geräten angeboten, welche sich insbesondere in Ihrer Leistungsfähigkeit bezüglich des Probendurchsatzes unterscheiden. Im UF-100 wird zusätzlich die Impedanz der Probe während der Messung bestimmt. Das übrige technische Verfahren ist in beiden Geräten gleich. Mittels des UF-50 können 50, mit dem UF-100 100 Proben pro Stunde automatisiert bearbeitet werden.

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen der Diagnostik des Urinsedimentes wurden wir auf die Durchflusszytometrie mittels des UF-50 aufmerksam. Uns interessierte die Frage, ob der Einsatz dieses Gerätes auch im mikrobiologischen Labor im Sinne einer rationellen Diagnostik sinnvoll ist. Zielsetzung dieser Arbeit ist es, herauszufinden, ob damit „negative“ Urine, also solche mit einer klinisch nicht relevanten Erregerzahl, bestimmt werden können und von der weiteren aufwändigen mikrobiologischen Diagnostik ausgeschlossen werden können. Hiervon erwarten wir neben einer Kosten- und Arbeitseinsparung insbesondere in den „negativen“ Fällen eine wesentliche Zeitersparnis mit schnellerem Vorliegen des Ergebnisses. Während das Ergebnis der Untersuchung mit dem UF-50 im Labor bereits wenige Minuten nach Bearbeitungsbeginn vorliegt, dauert es bis zum Vorliegen auch eines negativen mikrobiologischen Befundes wie oben angegeben etwa 24 Stunden.

Ein weiterer Teil der Zielsetzung ist es, falls ein Einsatz grundsätzlich möglich sein sollte, sinnvolle Grenzen für das Vorliegen eines pathologischen Befundes zu finden. Auch aus forensischen Gründen muss ein „vorgeschaltetes“ Verfahren eine ausreichende Sensitivität und einen ausreichenden negativen Voraussagewert bieten. Kellogg (1987) fordert hierzu jeweils mindestens einen Wert von jeweils 0,95. Die Bedeutungen dieser Werte sind im Methodenteil unter 2.5 erläutert.

Ausdrücklich nicht berücksichtigt werden in dieser Arbeit die weiteren vom UF-50 ausgegebenen Parameter. Beispielfhaft genannt seien hier nur Erythrozytenzahl und deren Morphologie, welche gegenüber der reinen Bakterienkultur und teilweise auch sowohl der Teststreifen- als auch Sedimentuntersuchung einen weiteren Informationsgewinn darstellen.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurden in dieser Arbeit Urinproben wie im Folgenden angegeben jeweils sowohl mit den „klassischen“ mikrobiologischen Methoden als auch mit der Durchflusszytometrie mit dem UF-50 untersucht. Die Ergebnisse der Messungen beider Verfahren wurden pro Probe (intraindividuell) verglichen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

Labormaterialien:

Urinsammelgefäße	Sarstedt AG & Co. Nümbrecht (D)
Urin-Monovetten 10ml	Sarstedt AG & Co. Nümbrecht (D)
Einmalösen (Impfschlingen klein, 10µl)	Sarstedt AG & Co. Nümbrecht (D)
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf AG Hamburg (D)
sterile Pipettenspitzen	Eppendorf AG Hamburg (D)
Reagenzgläser	handelsübliche Laborware
Glasspatel	handelsübliche Laborware
Sterile Natriumchlorid-Lösung (0,9%)	Fresenius AG Bad Homburg v.d.H. (D)
Vortex-Rüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia (USA)
Brutschrank 42°Celsius	Memmert GmbH & Co KG Schwabach (D)
Brutschrank 35°Celsius	Memmert GmbH & Co KG Schwabach (D)

Nährböden:

Blut (Columbia)- Agar (5%)	bioMérieux Deutschland GmbH Nürtingen (D)
McConkey-Agar	bioMérieux Deutschland GmbH Nürtingen (D)
Enterokokkosel-Platten (D-Coccosel)	bioMérieux Deutschland GmbH Nürtingen (D)
DNase-Platten	Oxoid GmbH Wesel (D)
Mannit-/ Kochsalzplatten	Oxoid GmbH Wesel (D)
Hemmstoffplatten (Müller-Hinton)	bioMérieux Deutschland GmbH Nürtingen (D)

ApiE®-System	BioMérieux Deutschland GmbH Nürtingen (D)
Indol	BioMérieux Deutschland GmbH Nürtingen (D)

Durchflusszytometer UF-50	Sysmex Europe GmbH Norderstedt (D)
Qualitätskontrollreagenz UF-50 Check	Sysmex Europe GmbH Norderstedt (D)

Microsoft® Excel® 97	Microsoft GmbH Unterschleißheim (D)
SPSS® 10.0	SPSS GmbH Software München (D)

2.2 Probengewinnung

Untersucht wurden insgesamt 618 im Rahmen der Routinediagnostik im Labor des St. Bernward-Krankenhauses eintreffende Urinproben. Hierbei handelte es sich überwiegend um Mittelstrahlurin, in Einzelfällen auch um unter sterilen Bedingungen gewonnenen Katheter- oder Blasenpunktionsurin. Die Proben wurden nach Gewinnung bei Raumtemperatur in das Labor transportiert. Nach maximal zwei Stunden Lagerung bei Raumtemperatur wurden die unten angegebenen Kulturen angelegt. Unmittelbar anschließend erfolgte die Untersuchung der ausschließlich semiquantitativ ausgewerteten Proben mit dem UF-50. Die zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführte Untersuchung der ebenfalls quantitativ ausgezählten 125 Proben mit dem UF-50 erfolgte im Versuchslabor der Sysmex Europe GmbH, Norderstedt. Hierzu wurden unmittelbar nach Anlage der Kulturen jeweils mehrere Milliliter der Proben unter sterilen Bedingungen mit dem dazugehörigen aufsteckbaren Röhrchen in eine Urin-Monovette angesaugt. Während des Transportes wurden die Proben gekühlt, eine Transportzeit von maximal 24 Stunden wurde nicht überschritten.

Alter und Geschlecht der Patienten und die Art der Uringewinnung wurden dem der Probe beiliegenden Anforderungsschein entnommen. Klinische Angaben zum Vorliegen eines Harnwegsinfektes wurden ebenfalls dem Anforderungsschein sowie der Patientenakte entnommen.

Eine Selektion nach Abteilung, Alter oder Geschlecht des Patienten, Fragestellung oder Gewinnungsart des Urins fand nicht statt. Die Proben stammten aus allen Abteilungen des St. Bernward-Krankenhauses, überwiegend aus der Urologischen Klinik, der Urologischen Ambulanz und den Medizinischen Kliniken. Ferner stammten Proben aus den Chirurgischen Kliniken, der Orthopädischen Klinik, der Frauenklinik, der Neurologischen Klinik sowie der Klinik für Kinderheilkunde einschließlich aller intensivmedizinischen Stationen.

Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 62,3 Jahre, Standardabweichung 18,9 Jahre, Minimum 1/365 Jahr (1 Tag alter Säugling), Maximum 96 Jahre. 14 Patienten (2%) waren jünger als 16 Jahre, 275 (44%) zwischen 16 und 65 Jahre, 329 (53%) mindestens 65 Jahre alt. 176 (28%) Patienten waren mindestens 75 Jahre alt. 234 (38%) der Patienten waren weiblich, 384 (62%) männlich.

2.3 Bakterienkulturen

2.3.1 Semiquantitative Anlage und Auszählung

600 Proben wurden semiquantitativ ausgewertet. Hierzu wurde mit der Einmalöse eine Blut-Agar (Columbia) -platte sowie eine MacConkey- Agarplatte mit jeweils 10 µl der Urinprobe beimpft. Hierzu wurde der Urin mit geradem Strich von oben beginnend zur Plattenmitte ausgeimpft. Ohne erneute Materialaufnahme wurde das Probenmaterial vom Rand beginnend im engen Zickzack bis zur gegenüberliegenden Seite entsprechend Abbildung 1 verteilt.

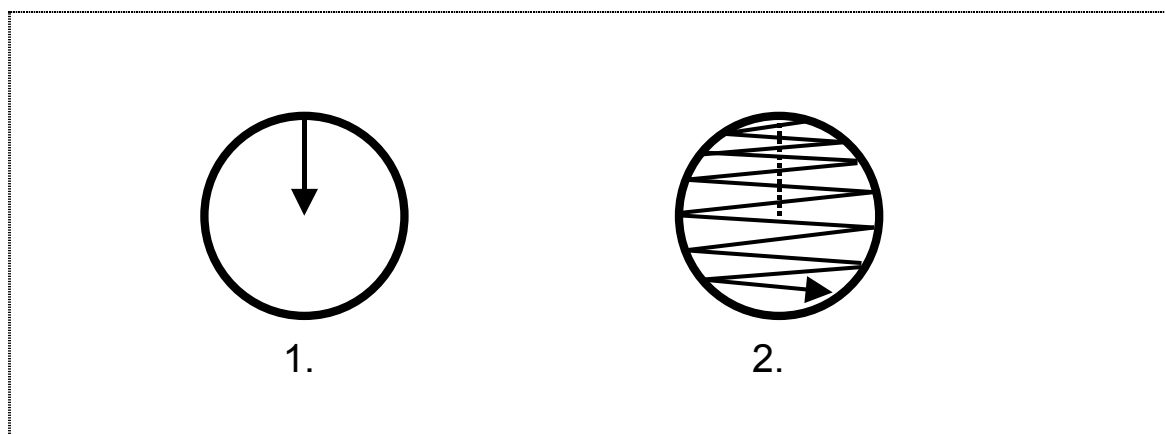


Abbildung 1: Ausstrich auf den Agarplatten

Die angelegten Kulturen wurden 24 Stunden im Brutschrank bei 35° Celsius inkubiert. Anschließend erfolgte die semiquantitative Ablesung der koloniebildenden Einheiten (KBE) und somit der Bakterienzahl in der Urinprobe entsprechend Abbildung 2:

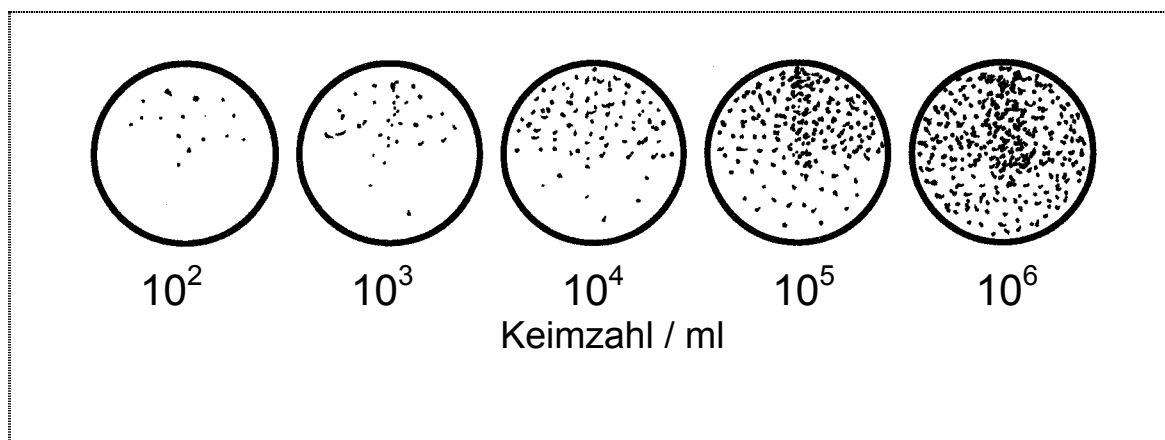


Abbildung 2: Semiquantitatives Ablesen der Agarplatten

2.3.2 *Quantitative Anlage und Auszählung*

125 Proben wurden quantitativ ausgewertet, 107 davon zusätzlich zur in 2.3.1 beschriebenen semiquantitativen Methodik, 18 ausschließlich.

Die Urinproben wurden mit steriler physiologischer (0,89%, 135mmol/l) Natriumchlorid (NaCl)-Lösung in 6 Stufen jeweils 1:10 verdünnt. Hierzu wurde jeweils 1ml der vorhergehenden Verdünnungsstufe in sterilen Reagenzgläsern mit der Eppendorf-Pipette mit sterilen Pipettenspitzen in 9 ml sterile NaCl-Lösung pipettiert und mittels des Vortex-Rüttlers gemischt. 100 µl der unverdünnten Proben und der Verdünnungsstufen wurden jeweils auf einen Blut-Agar-Nährboden pipettiert und mit einem sterilen Glasspatel ausgestrichen. Die Inkubation der Kulturen erfolgte über 24 Stunden bei 35° Celsius im Brutschrank. Die anschließende Auszählung erfolgte visuell. Es wurde der Nährboden der Verdünnungsstufe mit einer erkennbaren und zählbaren Zahl von Kolonien bis zu 80 ausgezählt. Bei Vorliegen mehrerer Bakterienspezies wurden diese gemeinsam gezählt, somit die Gesamtkolonienzahl ermittelt. Das Ergebnis wurde aus der Anzahl der Kolonien multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor berechnet und auf die Bakterienzahl pro Milliliter umgerechnet.

Von jeder Probe wurde weiterhin wie bei der in 2.3.1 beschriebenen semiquantitativen Anlage eine MacConkey-Agarplatte angelegt und bebrütet.

2.3.3 *Bakterienartbestimmung*

Zur Bakterienart-Bestimmung wurden von jeder Probe zusätzlich zu den oben angegebenen Columbia- und MacConkey-Agarplatten 10 µl der Proben jeweils mit der Einmalöse auf einer Enterokokkosel-Agarplatte verteilt. Diese Platten wurden 24 Stunden im Brutschrank bei 42° Celsius inkubiert. Anschließend erfolgte die Bakterienartbestimmung:

Enterokokken (*Enterococcus spp.*) konnten über die Enterokokkoselplatten durch das typische Wachstum auf diesen mit Schwarzfärbung und aufgrund ihrer Koloniemorphologie identifiziert werden.

Escherichia coli (*E. coli*) wurde aufgrund des phänotypischen Erscheinungsbildes, der Färbung über das Selektivmedium MacConkey-Agar sowie der positiven Indol-Reaktion identifiziert.

Proteus species (*Proteus spp.*) wurden über das charakteristische Schwärmen und die Indol-Reaktion identifiziert.

Staphylokokken wurden abhängig von der Species über DNase- und Mannit-/ Kochsalzplatten identifiziert.

Bei zweifelhafter Vordifferenzierung von *E. coli*, *Proteus spp.* und bei anderen Bakterienarten wurden diese mittels des ApiE®-Systems beurteilt. Hierbei werden die Bakterien in einem vorbereiteten Testkit mittels biochemischer Tests anhand vorgegebener Ergebnismuster identifiziert und differenziert.

2.3.4 Prüfung auf antibakterielle Hemmstoffe

Die Prüfung auf antibakterielle Hemmstoffe in den Proben erfolgte nach DIN 58958 (2000). Hierzu wurden jeweils 10 µl der Proben jeweils mit der Einmalöse auf eine Filterscheibe auf einer Hemmstoff-Agarplatte (mit *Bacillus subtilis* überspülter Mueller-Hinton-Agar) aufgetragen. Nach Inkubation über 24 Stunden bei 35° Celsius im Brutschrank wurde die Platte abgelesen. Zeigte sich ein Hof um die Auftragsstelle wurde dieser vermessen und bei ausreichender Hemmhofbildung damit ein antibakterieller Hemmstoff im Urin nachgewiesen.

2.3.5 Kriterien für das Vorliegen eines Harnwegsinfektes

2.3.5.1 Kriterien nach Laborarbeitsanleitung

Entsprechend der Arbeitsanleitung (SOP, Standard operating procedure) nach DIN EN ISO 2001 des Labors und der internen Leitlinie des St. Bernward-Krankenhauses wurde ein Harnwegsinfekt bei Vorliegen von mindestens 10^5 Kolonien pro ml angenommen. Bei 10^3 oder 10^4 Kolonien wurde das Ergebnis als zweifelhaft, bei Wachstum von 10^2 oder weniger Kolonien als negativ bewertet. Die Sonderregelungen für Kinder (≤ 6 Jahre), Katheter- und Blasenpunktionsurine sowie Urine mit Hemmstoffen kamen hier nicht zur Anwendung.

2.3.5.2 Kriterien in Anlehnung an MiQ

In einer weiteren Auswertung wurde das Vorliegen eines Harnwegsinfektes in Anlehnung an die „Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, Teil 2: Harnwegsinfektionen (MiQ 2) (Gatermann et al. 1997) nach folgenden Kriterien ausgewertet:

Proben mit drei oder mehr verschiedenen Spezies wurden als kontaminiert angesehen und auch bei Vorliegen der folgenden Kriterien als negativ gewertet.

Ein Harnwegsinfekt wurde angenommen:

Bei einer Bakterienzahl von 10^5 / ml oder mehr

Bei einer Bakterienzahl von 10^3 oder 10^4 /ml unter folgenden Kriterien:

- Vorliegen von Katheter- oder Blasenpunktionsurin
- bei Kindern
- bei Nachweis urinpathogener Spezies und einem für einen Harnwegsinfekt sprechenden klinischen Befund.

In allen übrigen Fällen wurde ein Harnwegsinfekt ausgeschlossen.

2.4 Das Urindurchflusszytometer UF-50

2.4.1 Funktionsprinzip

Das UF-50 ist ein automatisiertes Durchflusszytometer. Aus der unbehandelten, also auch nicht zentrifugierten, Urinprobe werden 800 µl Urin angesaugt. Hierfür ist bei manuellem Betrieb ein Probenvolumen von mindestens 1ml erforderlich. (Analyse- und Totvolumen) Bei automatisiertem Betrieb ist aufgrund der automatischen Mischung der Probe ein Volumen von mindestens 4 ml erforderlich. Letztlich gelangen 9 µl der Probe zur Partikelzählung. Zur Anfärbung der Probe wird eine fluoreszierende Zwei-Komponenten-Farbstofflösung verwendet. Diese färbt spezifisch Membranproteine bzw. Nukleinsäuren. Die angefärbte Probe wird anschließend mittels Durchflusszytometrie durch einen Argonlaser (Wellenlänge 488 nm) analysiert. Außerdem wird die Leitfähigkeit der Probe als Maß für ihre Dichte gemessen. Das Prinzip findet sich auf Abbildung 3.

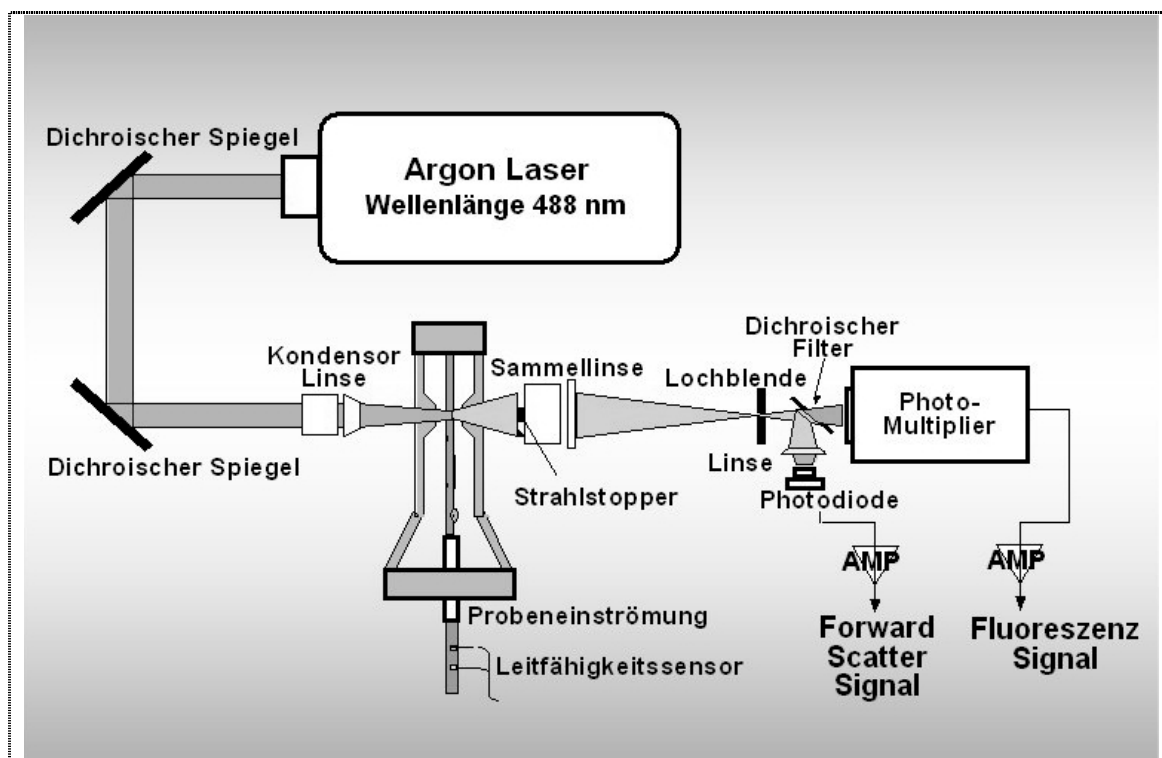


Abbildung 3: Funktionsprinzip des Durchflusszytometers (UF-50). AMP (Amplifier) = Verstärker. (Mit freundlicher Genehmigung der Fa. Sysmex Europe GmbH.)

Das Laserlicht wird gestreut und Fluoreszenzlicht von den in der Probe enthaltenen Partikeln emittiert. Widerstand, Streulicht und Fluoreszenz werden separat erfasst und in elektrische Signale umgewandelt. Für Fluoreszenz und Streulicht werden jeweils Signaldauer und Intensität erfasst. Über die Streulichtmessung wird die äußere Gestalt der Partikel bestimmt. Die

Intensität des Streulichts (Forward scatter, Fsc) ist das Maß für die Partikelgröße, die Signaldauer (Forward scatter pulse width, Fscw) ist das Maß für die Zelllänge. Die Intensität der Fluoreszenz (Fluorescence, Fl) ist das Maß für die Anfärbarkeit der Partikel, die Signaldauer (Fluorescence pulse width, Flw) ist das Maß für die Länge der angefärbten Bereiche in den Partikeln.

Anhand dieser vier Messparameter werden die Partikel mittels Clusteranalyse zugeordnet und gezählt. In zwei Darstellungen, sogenannten Scattergrammen, werden anschließend die Parameter der Partikel gegeneinander aufgetragen.

Zur Darstellung kleiner Partikel, z.B. Erythrozyten, Leukozyten und Bakterien, wird die Intensität des Streulichts (Fsc) als Maß für die Partikelgröße gegen die Fluoreszenz (Fl) als Maß für die Anfärbarkeit der Partikel aufgetragen. (Abbildung 4)

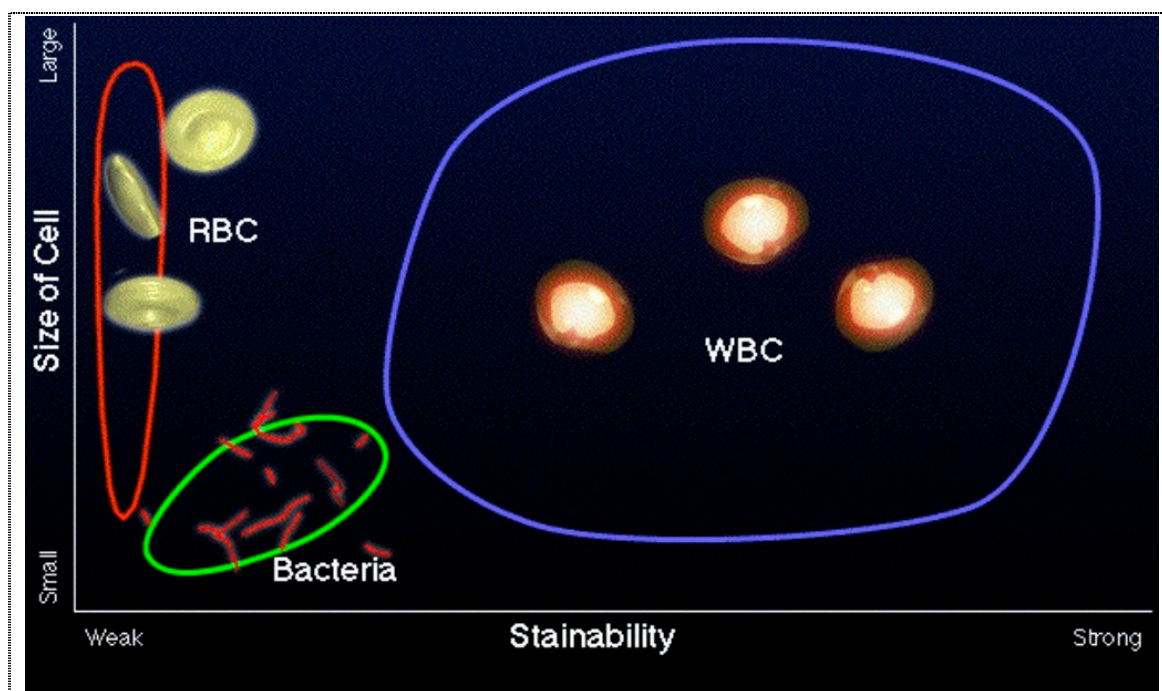


Abbildung 4: Scattergramm UF-50 für kleine Partikel: Intensität des Streulichts (Fsc) als Maß für die Zellgröße (Size of Cell) gegen Fluoreszenz (Fl) als Maß für die Anfärbarkeit der Zellen (Stainability). Bacteria = Bakterien, RBC= Erythrozyten, WBC=Leukozyten. (Mit freundlicher Genehmigung der Fa. Sysmex Europe GmbH.)

Zur Darstellung größerer Partikel, z.B. Epithelzellen und Zylinder mit oder ohne pathologischen Einschlüssen, wird die Dauer der Fluoreszenz (Flw) als Maß für die Länge anfärbbarer Einschlüsse gegen die Dauer des Streulichts (Fscw) als Maß für die Partikellänge aufgetragen. (Abbildung 5)

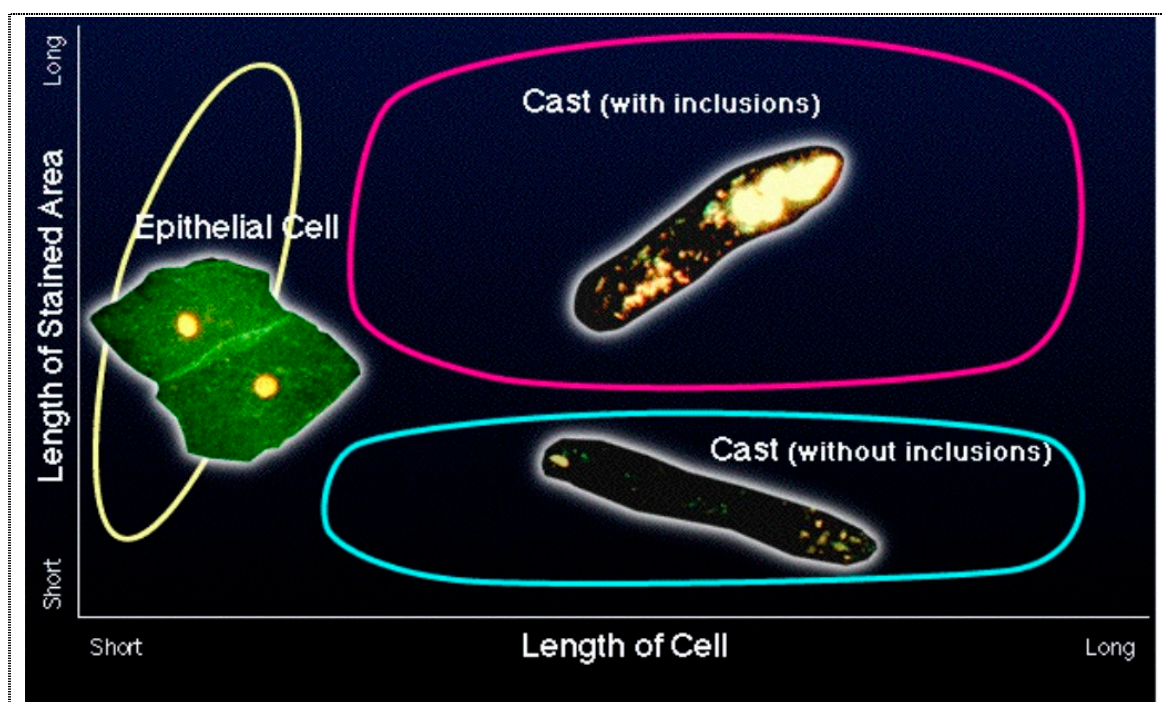


Abbildung 5: Scattergramm UF-50 für große Partikel: Dauer der Fluoreszenz (Flw) als Maß für die Länge anfärbbarer Einschlüsse (Length of Stained Area) gegen Dauer des Streulichts (Fscw) als Maß für die Zelllänge (Length of Cell). Epithelial Cell = Epithelien, Cast = Zylinder mit / ohne Einschlüsse. (Mit freundlicher Genehmigung der Fa. Sysmex Europe GmbH.)

Die erfassten Partikel werden den Kategorien Erythrozyten (RBC), Leukozyten (WBC), Epithelzellen (EC), Hyaline Zylinder (CAST) und Bakterien (BACT) zugeordnet und gezählt. Zusätzlich werden pathologische Zylinder mit Einschlüssen (P. CAST), Kristalle (XTAL), Rundepithelien (Nierentubuli und Transitionalepithel, Small Round Cells, SRC), Spermien (SPERM) und Hefen-ähnliche Zellen (Yeast-like cells, YLC) ausgewertet.

Die Gestalt von Erythrozyten und Leukozyten wird weiter analysiert. Da dieses nicht Bestandteil dieser Arbeit ist, wird hier auf eine weitere Beschreibung verzichtet. Diese findet sich beispielsweise bei Hannemann-Pohl und Kampf (1998b).

Ferner ausgewertet wird die mittlere Bakteriengröße (fsc2). Diese ist für die Frage nach Vorliegen eines Harnwegsinfektes (s.u.) bedeutsam. Auch die Leitfähigkeit (Conductivity, Cond.) wird ausgewertet.

Variierende Einstellungen des Gerätes erlauben, die für sämtliche Messgrößen vorgegebenen Grenzwerte (cut-offs) beliebig zu verändern. Bei Über- oder Unterschreiten dieser Grenzwerte wird der Messwert besonders gekennzeichnet. Ferner lassen sich beispielsweise für das Vorliegen eines Harnwegsinfektes anhand spezieller Algorithmen Marker, sogenannte Flags, ausgeben. Dieses ist beispielhaft in 2.4.5 weiter erläutert. Zum anderen werden mittels entsprechender Flags Warnungen vor möglichen fehlerhaften Befunden angezeigt. Dieses betrifft beispielsweise zu große Gesamtpartikelzahlen, bei denen eine differenzierte Auszählung der einzelnen Partikelarten teilweise nicht sicher möglich ist. Auch bei großen Zahlen einzelner Partikelarten, bei denen eine sichere Abgrenzbarkeit von „benachbarten“ Partikelwolken nicht sicher gegeben ist, werden entsprechende Warnmeldungen ausgegeben.

Bei Vorliegen jeglichen Flags als Warnmeldung oder als Hinweis für einen auffälligen Befund wird vom Gerät das Review-Flag gesetzt. Eine Kontrolle des Befundes ist also erforderlich. Diese kann je nach vorliegenden Ergebnissen und Untersuchungsgang im Labor unterschiedlich ausfallen. Beispielhaft erwähnt sei hier nur die Kontrolle des Befundes z.B. mittels Mikroskopie.

2.4.2 *Ausgabe der Messergebnisse*

Die Ausgabe der Messergebnisse des UF-50 ist mit verschiedenen Verfahren möglich. Stets erfolgt eine Ausgabe der Partikelzahlen auf dem monochromen Bildschirm. Die Ausgabe des Gesamtergebnisses erfolgt auf einem vorzugsweise farbig auszudruckenden DIN-A4-Papier. Alternativ ist auch eine Übertragung der Ergebnisse in ein Computersystem möglich. Für diese Arbeit wurden die ausgedruckten Ergebnisse weiterverwendet.

Auf dem Befundblatt werden im oberen Anteil die verschiedenen Partikelgruppen als diskrete, farblich differenzierte Punktwolken in den oben beschriebenen zwei Scattergrammen dargestellt. Ferner werden die Partikelzahlen ausgegeben. Im unteren Anteil werden Leukozyten und Erythrozyten jeweils als Histogramm ausgegeben, ferner die weiteren erfassten oben angegebene Parameter. Die Darstellung der Grafiken erlaubt dem geübten Benutzer weitere Interpretationen z.B. über verschiedene Leukozyten-Populationen oder mögliche Störungen durch Überlagerung. Zusätzlich ausgegeben werden eventuell vorliegende Flags.

Im Folgenden sind ein unauffälliges (Abbildung 6) und ein für einen Harnwegsinfekt typisches Befundblatt (Abbildung 7) mit erhöhter Bakterien- und Leukozytenanzahl sowie positivem Harnwegsinfekt-Flag (weißes Kreuz auf schwarzem Grund hinter der Bakterienzahl) exemplarisch dargestellt.

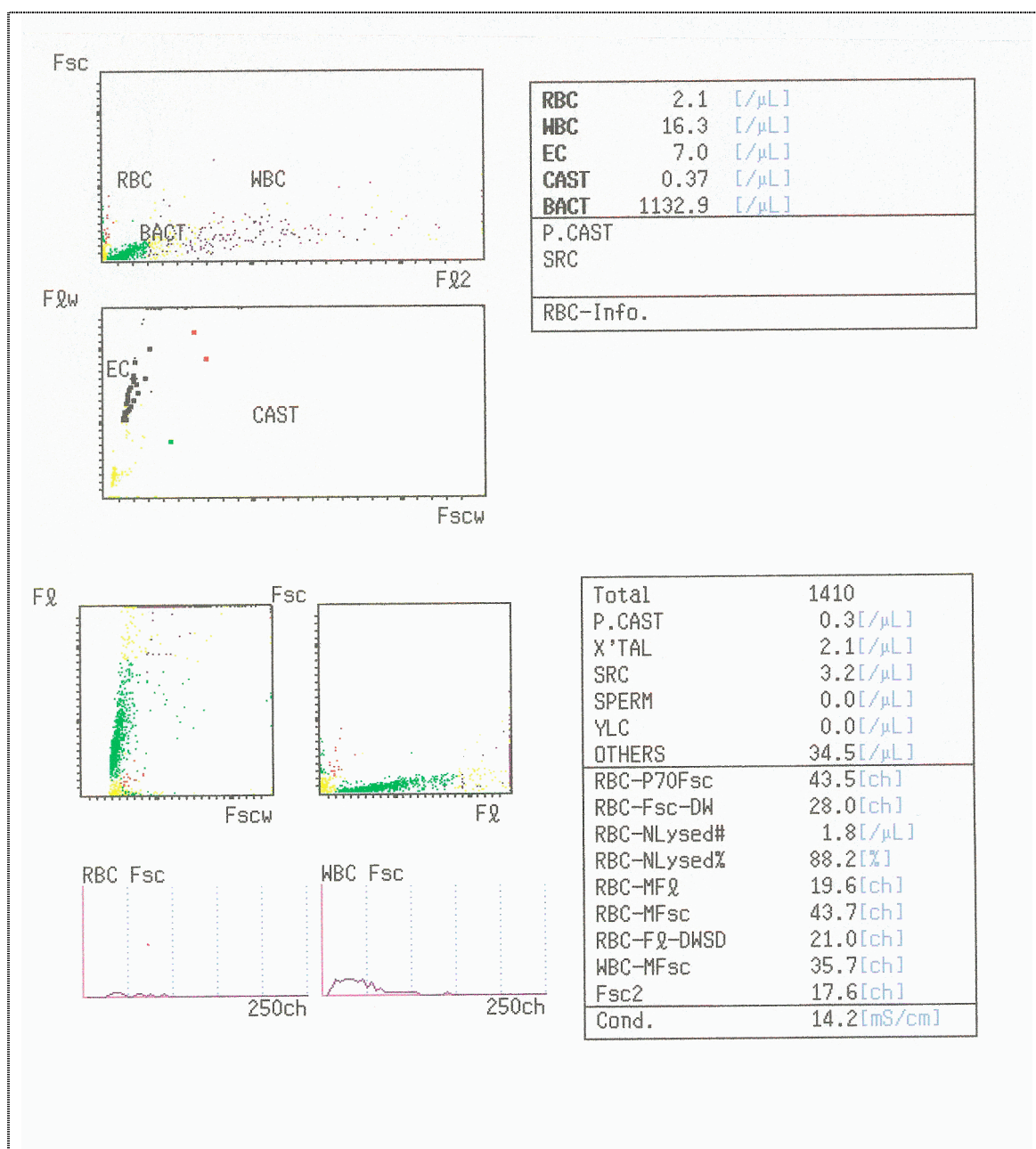


Abbildung 6: Ausgabe UF-50, unauffälliger Befund

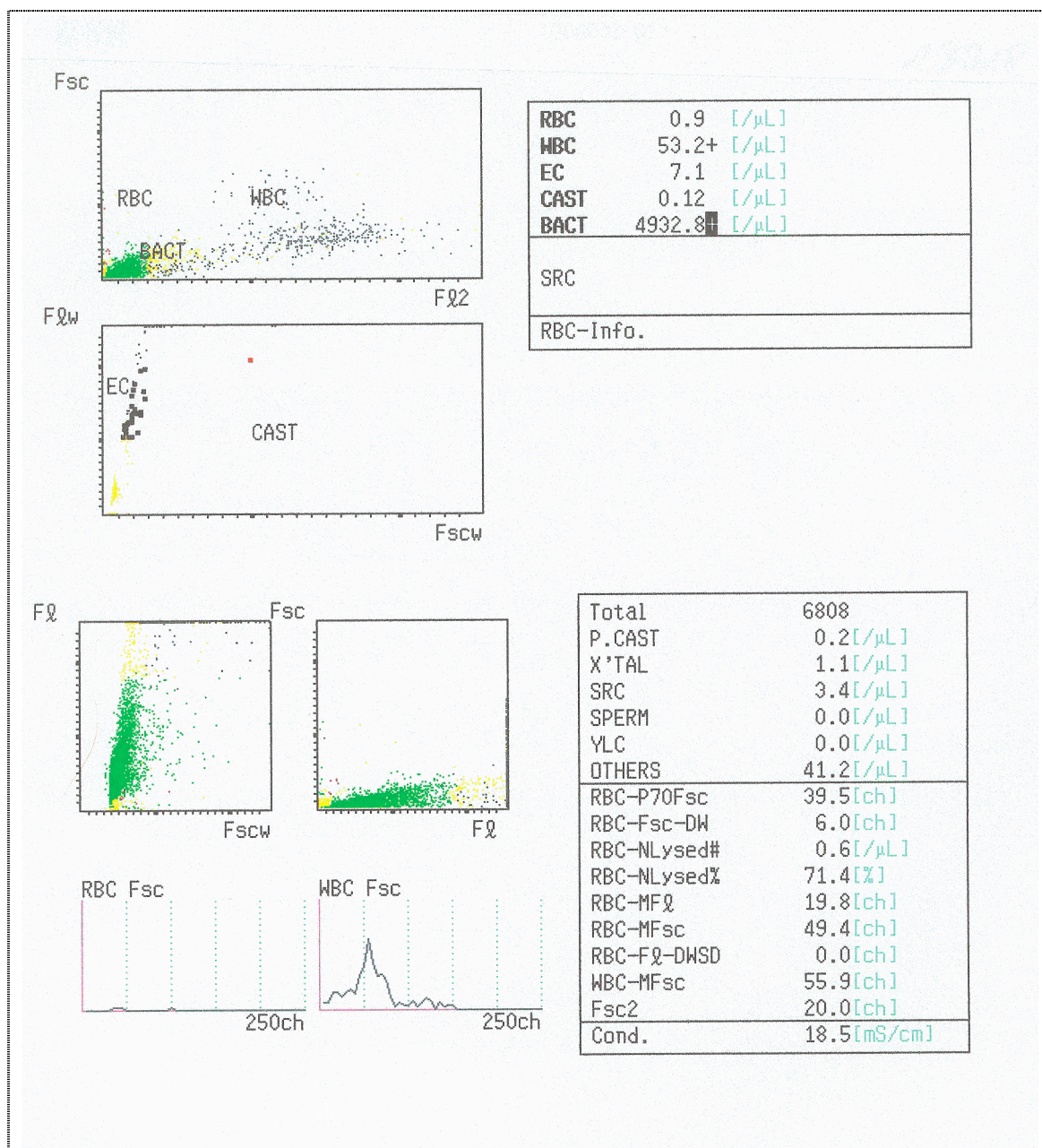


Abbildung 7: Ausgabe UF 50, Harnwegsinfekt: Erhöhte Werte für Leukozyten (WBC) und Bakterien (Bact), Harnwegsinfekt-Flag positiv (weißes Kreuz auf schwarzem Grund hinter Bakterienzahl)

2.4.3 Verwendete Einstellungen

Für die vorliegende Arbeit wurde das UF-50 in der Softwareversion 00-08 mit den Einstellungen entsprechend den Herstellervorgaben betrieben. Die Qualitätskontrolle erfolgte vor jeder Messserie mittels dem dafür vorgesehenen Reagenz UF-Check. Hierbei handelt es sich um Latexpartikel definierter Größe, mit denen eine Kontrolle der Messergebnisse des UF-50 möglich ist.

Wurde vom UF-50 der Fehlermarker aufgrund einer zu hohen Gesamtpartikelzahl ausgegeben, wurde die Urinprobe mittels steriler physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und erneut gemessen. Die ermittelten Partikelzahlen wurden entsprechend der Verdünnung umgerechnet.

Aus technischen Gründen kann das UF-50 nur Partikelzahlen kleiner als 100.000 (/µl) ausgeben. Wurde vom UF-50 eine nicht darstellbare, also 99.999,9 Bakterien/µl überschreitende Anzahl ausgegeben, wurde dieser Wert in die weiteren Auswertungen übernommen. Dieses betraf 18 Proben. Ein Fehler in den vergleichenden statistischen Auswertungen ergab sich hierdurch nicht, da in diesen mit Rang-Korrelationskoeffizienten gearbeitet wurde. (Vgl. 2.5, Seite 23)

2.4.4 Analysedaten

Für diese Arbeit wurden aus den vom UF-50 ausgegebenen Werten die Anzahl der Bakterien/µl (BACT), die Anzahl der Leukozyten/µl (WBC) und die durchschnittliche Bakteriengröße (Fsc2) (angezeigt in channels (ch) der Messeinrichtung) verwendet. Ferner wurde das Harnwegsinfekt-Flag (UTI-Flag, Urinary Tract Infection) in den verschiedenen Auswertungen registriert. (siehe 2.4.5)

2.4.5 Harnwegsinfekt-Marker

Das Vorliegen eines Harnwegsinfektes in den semiquantitativen Kulturen wurde mit verschiedenen Möglichkeiten der Erkennung eines Harnwegsinfektes durch das UF-50 verglichen.

2.4.5.1 Harnwegsinfekt-Marker mit Herstellervorschlag

Ein Harnwegsinfekt wurde aufgrund dieser Parameter entsprechend der Herstellervorgabe im sogenannten „high sensitivity mode“ wie in der folgenden Tabelle 1 aufgezeigt ausgewertet: Veranschaulicht finden sich diese Grenzen (cut-offs) und Ergebnisse auch in Abbildung 8.

Tabelle 1: Ermittlung des Harnwegsinfekt-Markers (UTI-Flag) nach Herstellervorschlag.
 Bact= Bakterien, WBC= Leukozytenzahl, Fsc 2= Durchschnittliche Bakteriengröße. Nummerierung
 vgl. Abbildung 8.

Feld	Bact/ μL	WBC/ μL	Fsc 2 (ch)	UTI-Flag
3,6,9,12	>8.040	egal	egal	POSITIV
2	>2.573 & <8.040	>20	>18	POSITIV
5	>2.573 & <8.040	>20	<18	FRAGLICH
8,11	>2.573 & <8.040	<20	egal	NEGATIV
1	<2.573	>20	>18	POSITIV
4	<2.573	>20	<18	NEGATIV
7,10	<2.573	<20	egal	NEGATIV

Bei mittlerer Bakterienzahl, hoher Leukozytenzahl und geringer Bakteriengröße ist möglicherweise eine Zahl nichtbakterieller Partikel fälschliche als Bakterien gezählt. Da eine eindeutige Aussage nicht möglich ist, wird der Befund als fraglich (low reliable) gewertet (Feld5).

Bei geringer Bakterienzahl und -größe wird möglicherweise eine große Zahl nichtbakterieller Partikel fälschlich als diese gezählt, so dass auch bei hoher Leukozytenzahl ein negativer Befund angenommen wird (Feld4).

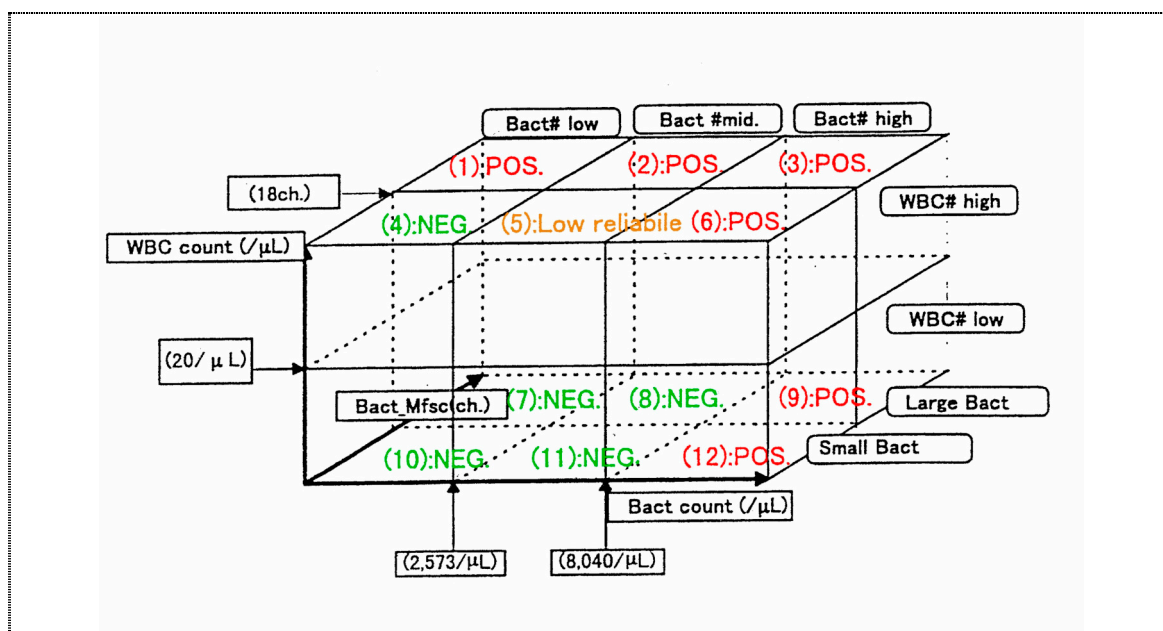


Abbildung 8: Auswertung des Harnwegsinfekt-Flags nach Herstellervorschlag. (Modifiziert; Mit freundlicher Genehmigung der Fa. Sysmex Europe GmbH.)

Bei Vorliegen der oben (2.4.1) erläuterten Fehler- oder Warnhinweise bei positivem Befund, also Vorliegen der Kriterien für den Harnwegsinfekt-Marker, wird aufgrund der Unsicherheit das Flag von dem Gerät ebenfalls als „fraglich“ (low reliable) bezeichnet. Diese Proben wurden in den weiteren Auswertungen als positiv für den Harnwegsinfekt-Marker bewertet.

2.4.5.2 *Harnwegsinfekt-Marker mit selbstgewählten Grenzen*

Zur Prüfung, ob mit selbstgewählten cut-offs für das Vorliegen eines Harnwegsinfektes aufgrund der Messung der vorliegenden Proben mit dem UF-50 eine höhere Sensitivität, Spezifität oder ein besserer Kompromiss gefunden werden kann, wurden die cut-offs für das Vorliegen eines Harnwegsinfektes in vier Auswertungen wie folgt gesetzt:

1. Zunächst wurden als cut-offs für das Vorliegen eines Harnwegsinfektes für Bakterien auf 2.573/ μl und für Leukozyten auf 20/ μl gesetzt. Dieses entspricht Teilen der in den Herstellervorgaben angegebenen Werte, für Bakterien dabei dem unteren cut-off.
2. Anschließend wurde der cut-off für Bakterien auf 8.040/ μl bei gleichgebliebenem cut-off für Leukozyten von 20/ μl gesetzt. Dieses entspricht Teilen der in den Herstellervorgaben angegebenen Werte, für Bakterien dabei dem oberen cut-off.
3. Des weiteren wurde als einziger cut-off eine Bakterienzahl von größer als 12.920/ μl gesetzt. Diese Grenze wurde aus dem Mittel zwischen 3. Quartil der Messwerte des UF-50 bei 10^4 Bakterien/ml in der semiquantitativen Kultur und dem 1. Quartil bei entsprechend 10^5 Bakterien/ml ermittelt. (berechnet 12.919.613/ml) Die Grenze $10^4/10^5$ Bakterien/ml markiert nach der Laborarbeitsanleitung die Grenze für den Nachweis eines Harnwegsinfektes. (Vgl. Abbildung 14, Seite 30)
4. In einem weiteren Schritt wurde zusätzlich zu dem cut-off von 12.920 Bakterien/ μl ein Nachweis von mehr als 20 Leukozyten/ μl gefordert.

2.5 **Verwendete Programme und statistische Methoden**

Die Erfassung und Verarbeitung der erhobenen Daten erfolgte mit Microsoft® Excel® 97. Hiermit wurden auch statistische Daten wie Mittelwert, Median, Quartile, Standardabweichung, Minimum und Maximum bestimmt. Die Bestimmung der unten angegebenen weitergehenden statistischen Methoden und Fragestellungen erfolgte mit SPSS® 10.0.

Zur Ermittlung eines möglichen Zusammenhanges und seiner Stärke der nicht normalverteilten unabhängigen paarigen stetigen Messwerte (Bakterienzahl in den Kulturen und Bakterienzahl des UF-50) wurde der Spearmansche Rang-Korrelationskoeffizient (r_s) verwendet. Zusätzlich wurde der Rang-Korrelationskoeffizient Tau (τ) nach Kendall gebildet, da bei gehäuften Bindungen (mehrfachen gleichen Werten) bei den die semiquantitative Messung einschließenden Auswertungen der Spearmansche Rang-Korrelationskoeffizient zu Überschätzungen des Zusammenhanges führen kann. Für beide Auswertungen wurde jeweils die Irrtumswahrscheinlichkeit p festgestellt.

Mögliche Korrelationen in den Mehrfeldertafeln mit nominalen Merkmalen (wie Harnwegsinfekt ja/fraglich/nein) wurden mittels des Chiquadrat-Testes (χ^2) überprüft. Auch hier wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit festgestellt. Die Straffheit des möglichen Zusammenhanges wurde mittels des korrigierten Kontingenzkoeffizienten nach Pawlik (CC_{kor}) überprüft. Dieser basiert auf dem Pearsonschen Kontingenzkoeffizienten korrigiert nach der Tafelgröße und kann Werte zwischen Null (völlige Unabhängigkeit) und Eins (Völlige Abhängigkeit) annehmen.

Für diese Auswertungen wurden jeweils die diagnostische Sensitivität und Spezifität sowie der diagnostische negative und positive Voraussagewert (= prädiktive Wert) bestimmt. Die Sensitivität bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, mit der positive Befunde (Bakteriurie) auch als solche erkannt werden, die Spezifität die Wahrscheinlichkeit, dass ein negativer Befund (keine Bakteriurie) auch als solcher erkannt wird. Hieraus wurden anhand des Satzes nach Bayes die Voraussagewerte eines positiven bzw. negativen Tests errechnet. Der positive Voraussagewert bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, mit der ein positives Testresultat auch wirklich einen positiven Befund bezeichnet, der negative Voraussagewert die Wahrscheinlichkeit, dass ein negatives Testresultat auch wirklich einen negativen Befund bezeichnet. Diese vier Parameter können Werte zwischen Null und im Idealfall Eins annehmen.

Für statistische Signifikanz wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von höchstens 5% gefordert. Als sehr signifikant wurde das 1%-Niveau bezeichnet, als hochsignifikant das 0,1%-Niveau.

(Büttner 1977; Sachs 1997)

3 Ergebnisse

3.1 Separation von Proben mit antibakteriellen Hemmstoffen

In 151 Proben fanden sich anamnestisch auf dem Anforderungsbeleg Angaben über eine vorherige Behandlung des Patienten mit Antibiotika oder in der Prüfung auf antibakterielle Wirkstoffe nach 2.3.4 eine antibakterielle Potenz. Diese Proben wurden separiert und von den weiteren Auswertungen ausgenommen.

3.2 Bakterienzahl in den semiquantitativ ausgewerteten Proben

453 Proben konnten in die Auswertung der semiquantitativen Untersuchung einbezogen werden. Von diesen zeigte sich in 186 Proben kein Bakterienwachstum (10^0), in 104 Proben ein Wachstum von 10^2 , in 50 Proben von 10^3 , in 34 Proben von 10^4 , in 42 Proben von 10^5 und in 37 Proben von 10^6 Bakterien/ml. (Abbildung 9)

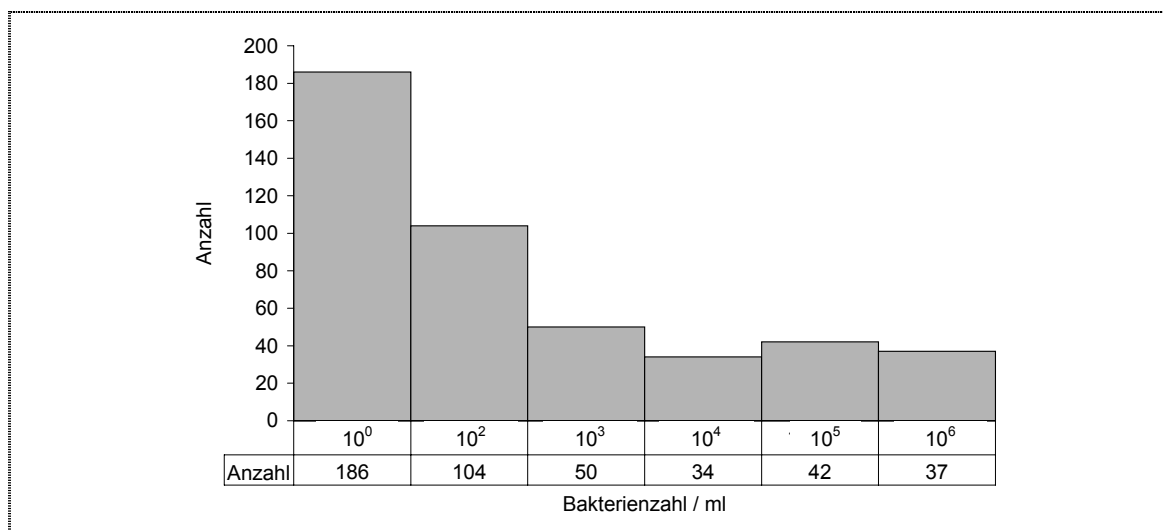


Abbildung 9: Häufigkeit gemessener Bakterienzahlen semiquantitativ

3.3 Bakterienartenspektrum

Insgesamt 467 Proben wurden der Bakterienartbestimmung zugeführt. Diese setzen sich aus den 453 semiquantitativ ausgewerteten Proben sowie weiteren 14 ausschließlich quantitativ ausgewerteten Proben zusammen. Den größten Teil der untersuchten Proben stellten Proben ohne Wachstum (186 Proben) oder mit nur geringem Wachstum ($\leq 10^2$ oder 10^3 Bakterien/ml) (109 Proben) dar. In diesen wurde die Bakterienarten nicht bestimmt (nicht best.). In 84 Proben wuchsen mindestens zwei verschiedene Bakterienspezies, davon in 61 Proben mindestens drei. In 88 Proben konnte jeweils eine isolierte Bakterienspezies nachgewiesen werden. Diese setzten sich wie folgt zusammen: In 38 Proben *E.Coli*, in 23 Proben *Enterococ-*

cus spp., in 6 Proben *Staphylococcus aureus* (*St. aureus*), in 5 Proben *Enterobacter species*, in 4 Proben *Proteus mirabilis*, in 4 Proben *Pseudomonas species*, in 3 Proben *Staphylococcus epidermidis* (*St. epidermidis*). In 5 Proben wurden andere Bakterienspezies (Streptokokken der Gruppe B, Klebsiellen, andere Streptokokkenspezies) isoliert nachgewiesen. (Abbildung 10)

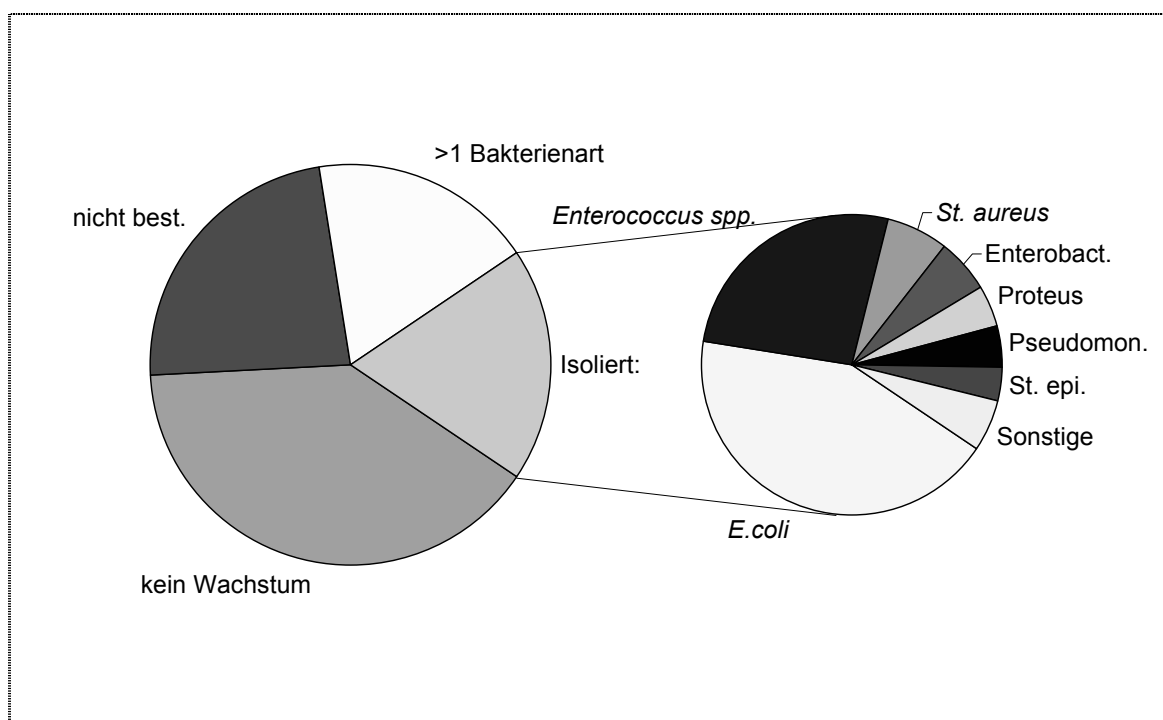


Abbildung 10: Bakterienartenspektrum aller untersuchten Proben.

Enterobact. = *Enterobacter spp.*, Proteus = *Proteus mirabilis*, Pseudomon. = *Pseudomonas spp.*, St. epi. = *St. epidermidis*. nicht best. = Bakterienart nicht bestimmt ($\leq 10^3$ Bakterien/ml)

3.4 Vorliegen eines Harnwegsinfektes

3.4.1 Harnwegsinfekte nach Laborarbeitsanleitung

Unter ausschließlicher Berücksichtigung der Bakterienzahl nach 2.3.1 ist in 290 Proben ein Harnwegsinfekt ausgeschlossen (kein Wachstum oder Bakterienzahl $\leq 10^2$ /ml), in 79 Proben anzunehmen (Bakterienzahl 10^5 oder 10^6 /ml). In 84 Proben ist der Befund fraglich (Bakterienzahl 10^3 oder 10^4 /ml).

3.4.2 Harnwegsinfekte in Anlehnung an MiQ

Unter Berücksichtigung der an die „Qualitätsstandards in der Mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, Teil 2: Harnwegsinfektionen (MiQ 2)“ (Gatermann et al. 1997) angelehnten und in 2.3.5 angegebenen Kriterien sind 72 Proben als positiv anzusehen, davon 65 Proben aufgrund der Bakterienzahl von 10^5 oder mehr. Von 7 Proben mit 10^4 Bakterien

sind zwei aufgrund des Vorliegens von Katheter-Urin, eine bei einem Kind sowie 4 weitere aufgrund des klinischen Befundes und Nachweises urinpathogener Spezies als positiv anzusehen. 14 der oben in 3.4.1 ausschließlich aufgrund der Bakterienzahl als positiv angesehenen Proben mit 10^5 (8 Proben) oder 10^6 (6 Proben) Bakterien/ml sind aufgrund des Wachstums von mehr als zwei Spezies in dieser Auswertung als kontaminiert und somit als negativ anzusehen.

3.4.2.1 Bakterienartenspektrum der in Anlehnung an MiQ positiven Proben

In den 72 in Anlehnung an die MiQ als positiv für das Vorliegen eines Harnwegsinfektes angesehenen Proben verteilt sich das Bakterienartenspektrum folgendermaßen: In 56 Proben wurde jeweils eine isolierte Bakterienspezies nachgewiesen: Davon in 31 Proben *E. coli*, in 9 Proben *Enterococcus spp.*, in 4 Proben *Pseudomonas spp.*, in 3 Proben *St. aureus*, in 3 Proben *Enterobacter spec.*, in 3 Proben *Proteus spp.* und in je einer Probe *St. epidermidis*, Klebsiellen und Streptokokken der Gruppe B.

In 16 Proben fanden sich jeweils zwei Species, davon in 8 Proben *E. coli* mit *Enterococcus spp.*, in je einer Probe *E. coli* mit *St. epidermidis* bzw. nicht zu differenzierenden gramnegativen Stäbchen. In 3 Proben fanden sich *Enterococcus spp.* und *Proteus spp.*, in je einer Probe *Enterococcus spp.* mit Streptokokken der Gruppe G, sonstigen (vergrünenden) Streptokokken bzw. *Serratia marcescens*. (Abbildung 11)

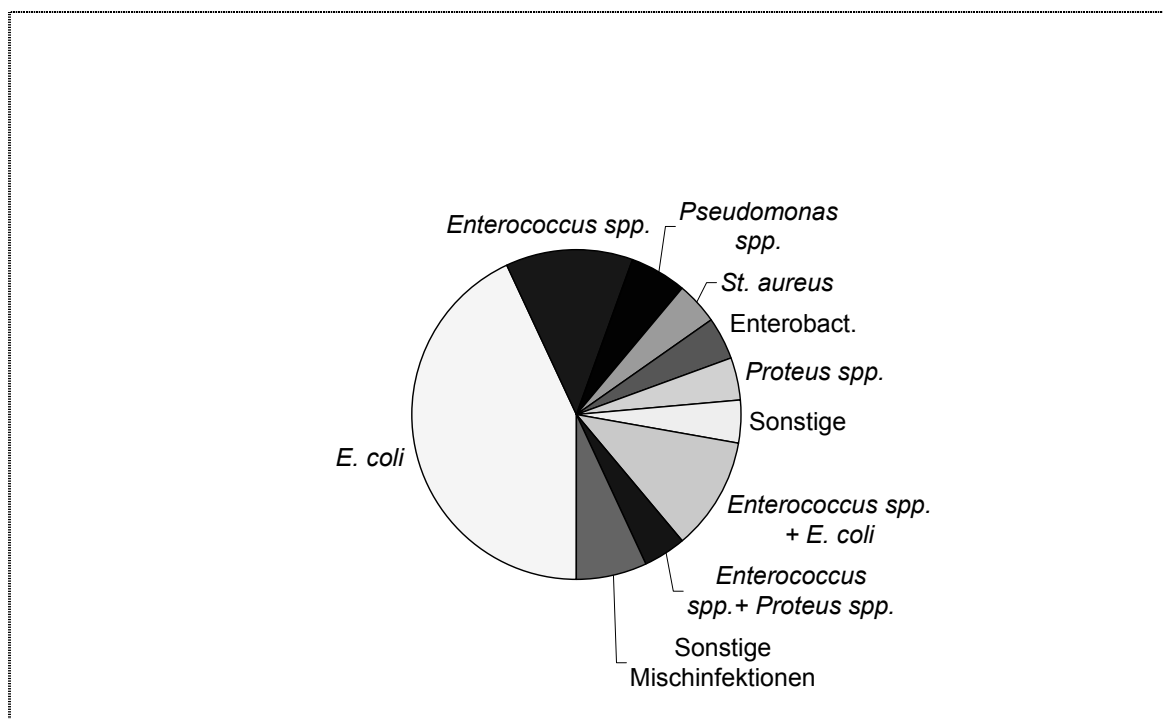


Abbildung 11: Bakterienartenspektrum der in Anlehnung an MiQ positiven Proben. Enterobact. = *Enterobacter spp.*,

3.5 Ergebnisse der Messungen mit dem UF-50

3.5.1 Bakterienzahl

Sämtliche 467 Proben ohne antibakterielle Wirkstoffe wurden mit dem UF-50 ausgewertet. Die minimal gemessene Bakterienzahl betrug $8,10 \cdot 10^4$, das Maximum $1,00 \cdot 10^8$ Bakterien/ml entsprechend den Erläuterungen in 2.4.3. Der Mittelwert der 467 Proben betrug $1,39 \cdot 10^7$, der Median $2,97 \cdot 10^6$, die Standardabweichung $2,55 \cdot 10^7$ Bakterien/ml. Die Häufigkeitsverteilung ist analog zu der Häufigkeitsverteilung der Ergebnisse der semiquantitativen Kultur in 3.2 in Abbildung 12 aufgetragen.

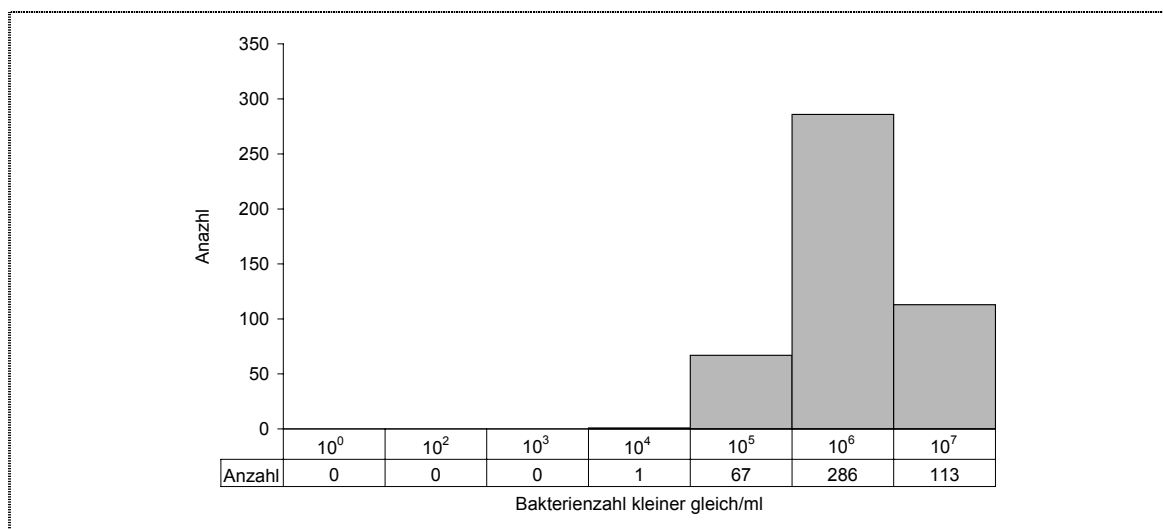


Abbildung 12: Häufigkeit gemessener Bakterienzahlen UF-50

3.5.2 Harnwegsinfekt-Marker

Unter den in 2.4.5.1 angegebenen Herstellervorgaben wurden vom UF-50 251 Proben als negativ und 182 Proben als positiv beurteilt. 34 Proben wurden als fraglich beurteilt.

3.6 Vergleich der Bakterienzahlen semiquantitative Kultur mit UF-50

453 Proben wurden sowohl semiquantitativ als auch mit dem UF-50 ausgewertet. Die sich aus dem Vergleich der jeweils ermittelten Bakterienzahlen ergebende Übersicht zeigt die folgende Abbildung 13.

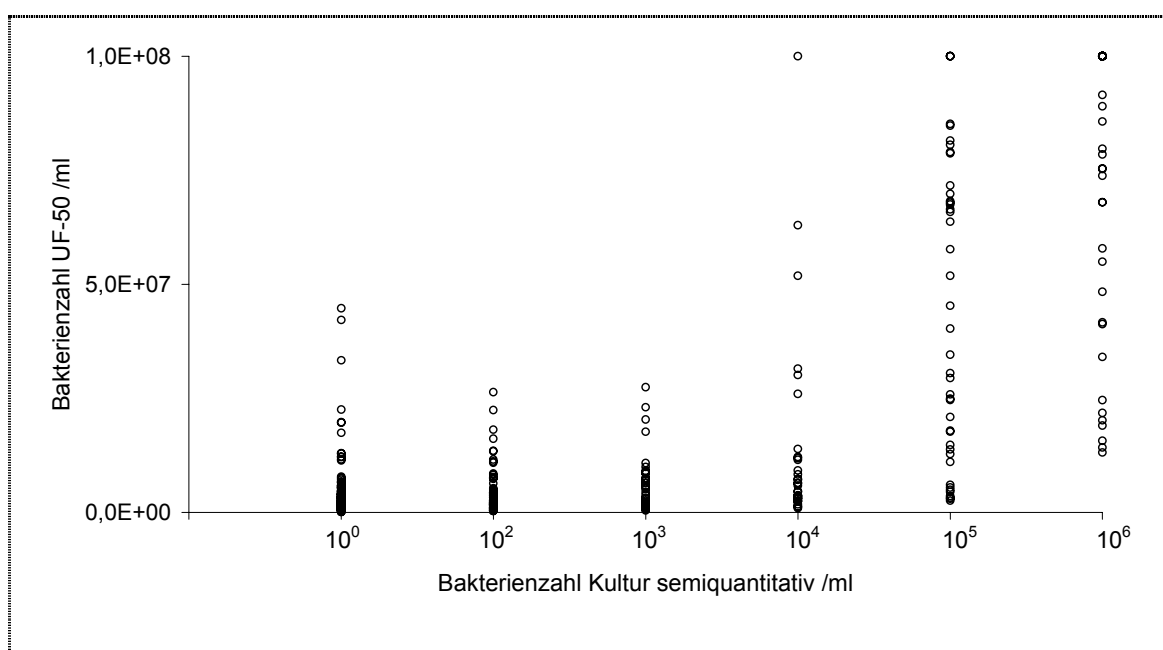


Abbildung 13: Vergleich Bakterienzahlen Kultur semiquantitativ / UF-50

Die statistische Analyse der mit dem UF-50 gemessenen Bakterienzahlen, gruppiert nach den korrespondierend gemessenen Bakterienzahlen in den semiquantitativen Kulturen, ist in der folgenden Tabelle 2 angegeben:

Tabelle 2: Statistische Werte UF50 gruppiert nach Bakterienzahl der semiquantitativen Kultur, jeweils in Bakterien/ml (außer Anzahl)

UF50/Semiqu.	10^0	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
Anzahl:	186	104	50	34	42	37
Mittelwert:	3.595.177	3.663.633	5.312.444	13.264.785	43.763.885	70.046.586
Median:	1.977.850	2.067.200	2.769.200	5.239.750	37.445.600	78.478.200
Minimum:	81.000	309.000	417.500	931.100	2.566.600	13.127.200
Maximum:	44.757.600	26.355.800	27.448.900	99.999.900	99.999.900	99.999.900
1. Quartil:	1.223.850	1.062.575	1.485.850	3.023.575	14.031.700	41.670.500
3. Quartil:	3.523.425	4.052.850	7.340.475	11.807.525	69.416.725	99.999.900
Standardabw.:	5.831.504	4.490.511	5.857.692	20.574.129	31.884.658	31.379.546

In der folgenden Abbildung 14 sind die wesentlichen dieser statistischen Kennzahlen als Box-Whisker-Plots aufgetragen.

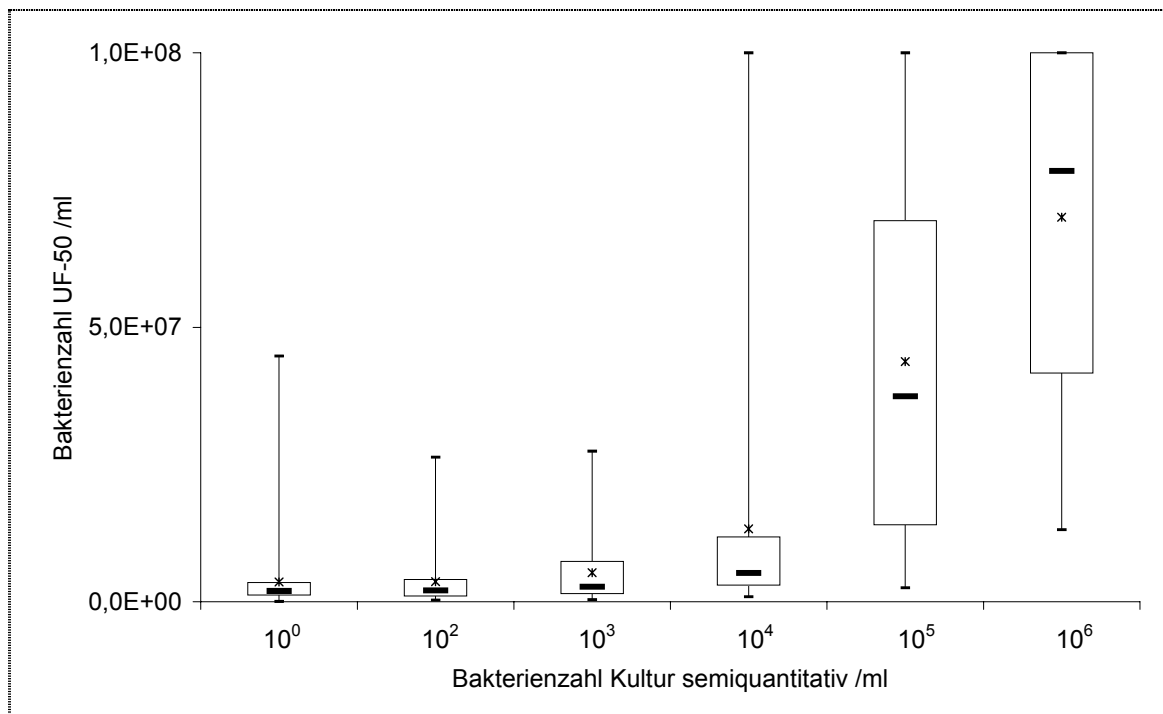


Abbildung 14: Box-Whisker-Plot Vergleich Bakterienzahlen Kultur semiquantitativ / UF-50.

Kästen: erstes und drittes Quartil, Striche: Minimum und Maximum sowie Median, Sterne: Mittelwert

Der Rang-Korrelationskoeffizient (τ) nach Kendall beträgt 0,421, die Irrtumswahrscheinlichkeit ist kleiner als 0,001, die Korrelation ist also auf dem 0,1%-Niveau signifikant. ($r_s=0,546$, $p<0,001$) Es besteht somit ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen den semiquantitativ in der Kultur ermittelten und den mit dem UF-50 gemessenen Bakterienzahlen.

3.7 Vergleich Harnwegsinfekte semiquantitative Kultur mit UF-50

In den folgenden Auswertungen wurde jeweils die Grenze von 10^5 Bakterien/ml nach den in 2.3.5 erläuterten Laborstandards als Marker für das Vorliegen eines Harnwegsinfektes angenommen. Die an die MiQ angelehnten Kriterien wurden ausschließlich in der Auswertung 3.7.1.2 auf Seite 34 gegenüber dem Herstellervorschlag für das UF-50 berücksichtigt:

3.7.1 Vergleich Harnwegsinfekte mit Herstellervorschlag UF-50

Erweitert man Abbildung 13 aus Absatz 3.6 um die Art des vom UF-50 angezeigten Harnwegsinfekt-Flags, ergibt sich die zur besseren Anschaulichkeit auf der Folgeseite vergrößert dargestellte Abbildung 15. Auf dieser sind vom UF-50 ausgegebene positive Flags als + (rot), fragliche als * (orange) und negative als o (grün) dargestellt. Die in 2.4.5.1 angegebenen Grenzen von 2.573 und 8.040 Bakterien/ml sind durch Querstriche markiert. Zur besseren Anschaulichkeit ist die Y-Achse (Bakterienzahl UF-50) logarithmisch dargestellt.

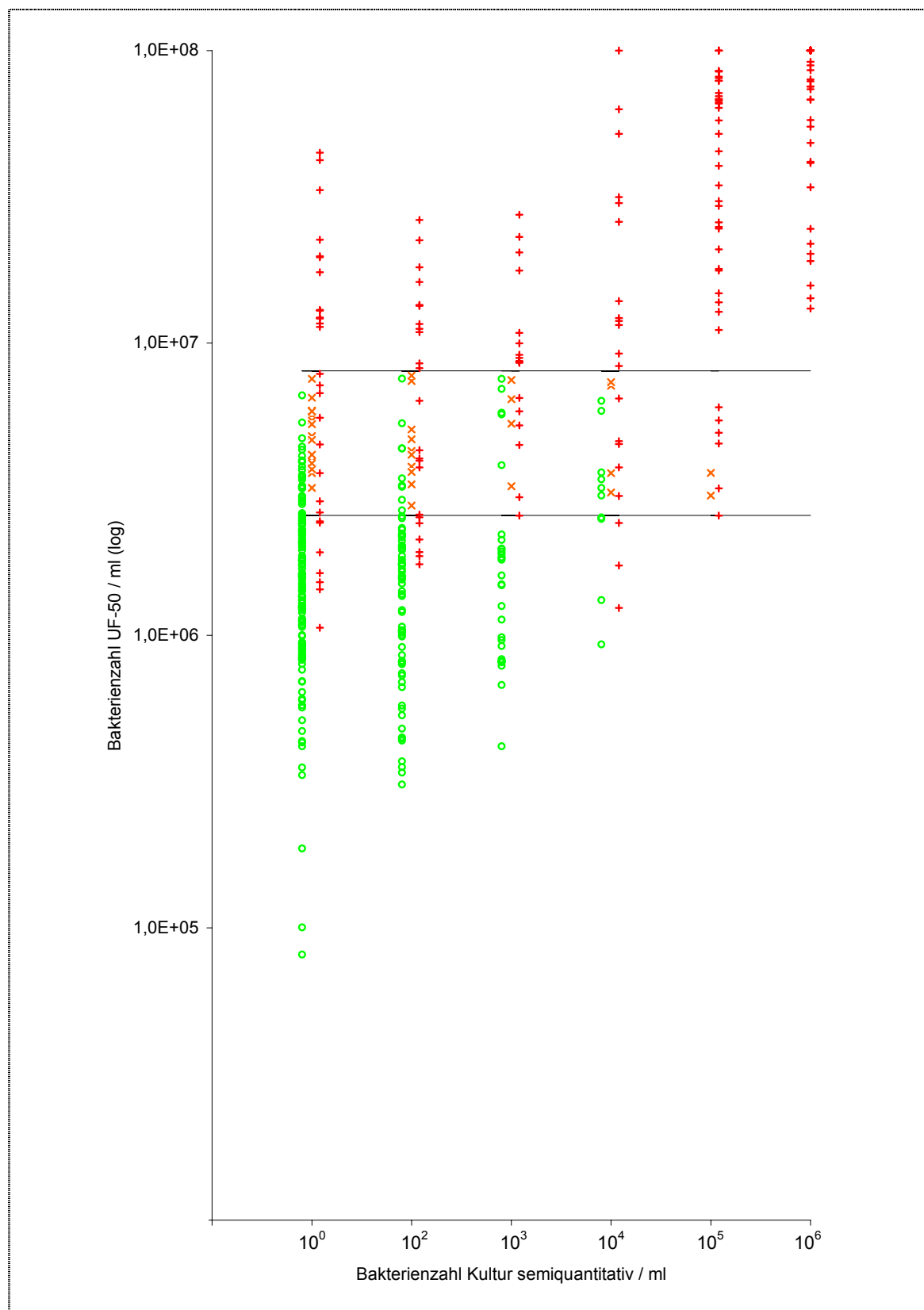


Abbildung 15: Vergleich Bakterienzahl semiquantitative Kultur / UF-50 mit Harnwegsinfekt-Flag (+=positiv, *= fraglich, o = negativ).

Wird die Ausgabe des Harnwegsinfekt-Flags des UF-50 in Werkseinstellung gegen die in der semiquantitativen Kultur ermittelten Bakterienzahlen aufgetragen, ergibt sich folgende Tabelle:

Tabelle 3: Vergleich Ergebnisse Kultur semiquantitativ (Bakterien/ml) mit UF-50 Harnwegsinfekt-Flag (Anzahl)

Kultur/HWI-Flag	negativ (-)	fraglich (*)	positiv (+)	Summe
10^0	141	17	28	186
10^2	67	14	23	104
10^3	29	4	17	50
10^4	10	4	20	34
10^5	0	2	40	42
10^6	0	0	37	37
Summe	247	41	165	n=453

Mit dem Chi-Quadrat-Test (χ^2) kann eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 0,001 ermittelt werden. Die Verteilung ist also hochsignifikant. Der korrigierte Kontingenzkoeffizient nach Pawlik (CC_{kont}) beträgt 0,661.

3.7.1.1 Vergleich Harnwegsinfekte nach Laborarbeitsanleitung mit UF-50

Unter Berücksichtigung des in 2.3.1 angegebenen cut-offs von 10^5 Bakterien/ml ergibt sich folgende zusammenfassende Tabelle:

Tabelle 4: Vergleich Ergebnisse Kultur semiquantitativ (Laborarbeitsanleitung, Bakterien/ml) mit UF-50 Harnwegsinfekt-Flag (Anzahl)

Kultur/HWI-Flag	negativ (-)	fraglich (*)	positiv (+)	Summe
Negativ/Fraglich ($<10^5$)	247	39	88	374
Positiv ($10^5, 10^6$)	0	2	77	79
Summe	247	41	165	N=453

Mit dem Chi-Quadrat-Test (χ^2) kann eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 0,001 ermittelt werden. Die Verteilung ist also hochsignifikant. Der korrigierte Kontingenzkoeffizient nach Pawlik (CC_{kont}) beträgt 0,713.

Die Sensitivität des UF-50 in Werkseinstellung für die mögliche Erkennung eines definitiven Harnwegsinfektes (Bakterienzahl $\geq 10^5$, UF-50 Flag * oder +) beträgt 1,00 (79/79), die Spezifität beträgt 0,66 (247/374).

Der hieraus berechnete Voraussagewert eines positiven Tests beträgt 0,38, der eines negativen Tests 1,00.

3.7.1.2 Vergleich Harnwegsinfekte in Anlehnung an MiQ mit UF-50

Unter Berücksichtigung der an die „Qualitätsstandards in der Mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, Teil 2: Harnwegsinfektionen“ (MiQ 2) (Gatermann et al. 1997) angelehnten und in 2.3.5 angegebenen cut-offs ergibt sich die folgende Tabelle:

Tabelle 5: Vergleich Ergebnisse Kultur semiquantitativ (in Anlehnung an MiQ) mit UF-50 Harnwegsinfekt-Flag (Anzahl)

Kultur/HWI-Flag	negativ (-)	Fraglich (*)	positiv (+)	Summe
MiQ negativ	244	39	98	381
MiQ positiv	3	2	67	72
Summe	247	41	165	n=453

Mit dem Chi-Quadrat-Test (χ^2) kann eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 0,001 ermittelt werden. Die Verteilung ist also hochsignifikant. Der korrigierte Kontingenzkoeffizient nach Pawlik (CC_{kor}) beträgt 0,645.

Die Sensitivität des UF-50 in Werkseinstellung für die mögliche Erkennung eines Harnwegsinfektes in Anlehnung an MiQ (MiQ positiv, UF-50 Flag * oder +) beträgt 0,96 (69/72), die Spezifität beträgt 0,64 (244/381).

Der hieraus berechnete Voraussagewert eines positiven Tests beträgt 0,33, der eines negativen Tests 0,99.

Mit den an MiQ angelehnten Kriterien ergibt sich also gegenüber der ausschließlichen Berücksichtigung der Bakterienzahl eine geringe Verringerung der Sensitivität (1,00 zu 0,96), Spezifität (0,66 zu 0,64) sowie sowohl des positiven (0,38 zu 0,33) als auch des negativen (1,00 zu 0,99) Voraussagewertes.

3.7.1.3 Falsch negative Befunde UF-50

Unter Berücksichtigung der Befunde in Anlehnung an die MiQ ergeben sich drei vom UF-50 nicht erkannte mittels der Urinkultur nachgewiesene Harnwegsinfekte:

Bei der ersten Patientin handelt sich um ein 9 Jahre altes Kind mit unklarem Fieber bei V.a. Mononukleose. Die Kultur des Mittelstrahlurins ergab 10^4 *St. epidermidis*/ml sowie 10^2 *E. coli*/ml. Aufgrund der Bakterienzahl von 10^4 /ml ist dieser Befund nach MiQ als positiv anzusehen. Es ist aber aufgrund des Nachweises von *St. epidermidis* eine Kontamination wahrscheinlich. Das Urinsediment war unauffällig, die Teststreifenuntersuchung auf Nitrit und Leukozyten negativ. Klinische Beschwerden im Sinne eines Harnwegsinfektes sind der Akte nicht zu entnehmen. Bis 3 Tage vor Untersuchung erfolgte eine antibiotische Behandlung. Die Untersuchung mit dem UF-50 ergab eine gering erhöhte Bakterienzahl (3.606,2/ μ l) bei ansonsten unauffälligem Befund.

Bei der zweiten Patientin handelt es sich um eine 34jährige Schwangere (drei Wochen vor Entbindung) mit unklaren Rückenschmerzen. Das Ergebnis der Urinkultur ist bei Katheterurin aufgrund 10^4 *St. aureus*/ml als positiv anzusehen. Eindeutige klinische Beschwerden im Sinne eines Harnwegsinfektes sind der Patientenakte nicht zu entnehmen. Eine Sedimentuntersuchung ist nicht erfolgt. Die Untersuchung mit dem UF-50 ergab eine gering erhöhte Bakterienzahl (3.004,7/ μ l) bei ansonsten unauffälligem Befund.

Bei der dritten Patientin handelt es sich um eine 51jährige Patientin mit einer bimalleolären Fraktur des oberen Sprunggelenkes und Alkoholkrankheit. Die Urinuntersuchung erfolgte im postoperativen Verlauf bei unklaren abdominellen Beschwerden mit Fieber. Sonstige Symptome eines Harnwegsinfektes sind der Krankengeschichte nicht zu entnehmen. Die Urinkultur ist bei Katheterurin nach MiQ bei 10^4 Streptokokken der Gruppe B/ml als positiv anzusehen. Im Urinsediment fanden sich Nitrit negativ, Bakterien und Leukozyten jeweils einfach positiv. Die Untersuchung mit dem UF-50 ergibt eine leicht erhöhte Bakterienzahl von 3.415/ μ l ohne Leukozytenzahlerhöhung (8,6/ μ l) bei kleinen Bakterien (fsc2 13,4ch). Wegen eines erhöhten Anteiles von Erythrozyten (28,8/ μ l) ist das Review-Flag gesetzt. Eine antibiotische Behandlung erfolgte nicht.

Zusammenfassend kann bei einer Patientin ein Harnwegsinfekt aufgrund der klinischen Angaben und der Bakterienart als Verunreinigung sicher ausgeschlossen werden, bei zwei Patientinnen kann er aufgrund der vorliegenden Angaben nicht eindeutig ausgeschlossen werden. Er erscheint aber unwahrscheinlich und wurde klinisch auch nicht als solcher gewertet oder durch Gabe von Antibiotika behandelt.

3.7.2 Vergleich Harnwegsinfekte mit selbst gewählten Grenzen UF-50

1. Mit den selbstgewählten cut-offs von 2.573 Bakterien/ μl und 20 Leukozyten/ μl aus 2.4.5.2 (Untere Grenzen der Herstellervorgaben des UF-50) ergibt sich folgende Tabelle:

Tabelle 6: Vergleich Ergebnisse semiquantitative Kultur (Bakterien/ml) mit Harnwegsinfekt-Flag nach selbst gewählten Grenzen (2.573 Bakterien/ μl , 20 Leukozyten/ μl)(Anzahl)

Kultur/UTI-Flag	negativ (-)	positiv (+)	Summe
Negativ ($<10^5$)	265	109	374
Positiv ($10^5, 10^6$)	4	75	79
Summe	269	184	n=453

Mit dem Chi-Quadrat-Test (χ^2) kann eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 0,001 ermittelt werden. Die Verteilung ist also hochsignifikant. Der korrigierte Kontingenzkoeffizient nach Pawlik (CC_{kon}) beträgt 0,641.

Die Sensitivität für das Erkennen eines Harnwegsinfektes beträgt 0,95 (75/79), die Spezifität 0,71 (265/374). Der hieraus berechnete Voraussagewert eines positiven Tests beträgt 0,41, der eines negativen Tests 0,99. Es liegen 4 falsch negative Proben vor.

Drei dieser Proben werden bei Auswertung mit den Herstellervorgaben aufgrund einer isolierten Erhöhung der Bakterienzahl (über 8.040/ μl) erkannt. Da keine Erhöhung der Leukozytenzahl vorliegt, werden diese bei Forderung nach einer Erhöhung der Bakterien- und Leukozytenzahl nicht erkannt. Klinisch bestand bei einem dieser drei Patienten ein Harnwegsinfekt.

Die vierte Probe wird bei Auswertung mit den Herstellervorgaben aufgrund einer Erhöhung der Leukozyten bei großen Bakterien (fsc2 41,8ch) erkannt. Die Bakterienzahl liegt knapp (2.567/ μl) unterhalb des cut-off von 2.573/ μl . In der Urinkultur wuchsen 10^5 *St. epidermidis*/ml. Bei diesem demenztem Patienten mit cerebrovasculärer Insuffizienz erscheint eine Kontamination des Urins möglich. Sichere Angaben zur Gewinnungsart des Urins und zu klinischen Symptomen eines Harnwegsinfektes sind weder dem Laboranforderungsbeleg noch der Krankengeschichte zu entnehmen.

2. Mit den selbstgewählten cut-offs von 8.040 Bakterien/ μl und 20 Leukozyten/ μl aus 2.4.5.2 (Obergrenzen der Herstellervorgaben des UF-50) ergibt sich folgende Tabelle:

Tabelle 7: Vergleich Ergebnisse semiquantitative Kultur (Bakterien/ml) mit Harnwegsinfekt-Flag nach selbst gewählten Grenzen (8.040 Bakterien/ μ l, 20 Leukozyten/ μ l) (Anzahl)

Kultur / UTI-Flag	negativ (-)	positiv (+)	Summe
Negativ ($<10^5$)	328	46	374
Positiv ($10^5, 10^6$)	11	68	79
Summe	339	114	n=453

Mit dem Chiquadrat-Test (χ^2) kann eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 0,001 ermittelt werden. Die Verteilung ist also hochsignifikant. Der korrigierte Kontingenzkoeffizient nach Pawlik (CC_{kont}) beträgt 0,767.

Die Sensitivität für das Erkennen eines Harnwegsinfektes beträgt 0,86 (68/79), die Spezifität 0,88 (328/374). Der hieraus berechnete Voraussagewert eines positiven Tests beträgt 0,60, der eines negativen Tests 0,97. Es liegen 11 falsch negative Proben vor.

Bei Berücksichtigung des oberen cut-offs (8.040 Bakterien/ μ l) der Herstellervorgaben kommt es also gegenüber der Berücksichtigung des unteren cut-offs (2.573 Bakterien/ μ l) zu sieben weiteren falsch negativen Proben. Die Sensitivität sinkt von 0,95 auf 0,86, die Spezifität steigt von 0,71 auf 0,88.

3. Mit dem selbst gewählten cut-off von 12.920 Bakterien/ μ l aus 2.4.5.2 (Mittelwert 3. Quartil 10^4 und 1. Quartil 10^5) ohne Berücksichtigung der Leukozytenzahl ergibt sich folgende Tabelle:

Tabelle 8: Vergleich Ergebnisse semiquantitative Kultur (Bakterien/ml) mit Harnwegsinfekt-Flag nach selbst gewählten Grenzen (12.920 Bakterien/ μ l) (Anzahl)

Kultur / UTI-Flag	negativ (-)	positiv (+)	Summe
Negativ ($<10^5$)	349	25	374
Positiv ($10^5, 10^6$)	10	69	79
Summe	359	94	n=453

Mit dem Chiquadrat-Test (χ^2) kann eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 0,001 ermittelt werden. Die Verteilung ist also hochsignifikant. Der korrigierte Kontingenzkoeffizient nach Pawlik (CC_{kont}) beträgt 0,851.

Die Sensitivität für das Erkennen eines Harnwegsinfektes beträgt 0,87 (69/79), die Spezifität 0,93 (349/374). Der hieraus berechnete Voraussagewert eines positiven Tests beträgt 0,73, der eines negativen Tests 0,97. Es liegen 10 falsch negative Proben vor.

4. Unter Berücksichtigung einer zusätzlich geforderten Leukozytenzahl von mindestens 20/ μ l ergibt sich folgende Änderung:

Tabelle 9: Vergleich Ergebnisse semiquantitative Kultur (Bakterien/ml) mit Harnwegsinfekt-Flag nach selbst gewählten Grenzen (12.920 Bakterien/ μ l, 20 Leukozyten/ μ l) (Anzahl)

Kultur / UTI-Flag	negativ (-)	positiv (+)	Summe
Negativ ($<10^5$)	349	25	374
Positiv ($10^5, 10^6$)	13	66	79
Summe	362	91	n=453

Mit dem Chiquadrat-Test (χ^2) kann eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 0,001 ermittelt werden. Die Verteilung ist also hochsignifikant. Der korrigierte Kontingenzkoeffizient nach Pawlik (CC_{korr}) beträgt 0,833.

Die Sensitivität für das Erkennen eines Harnwegsinfektes beträgt 0,84 (66/79), die Spezifität 0,93 (349/374). Der hieraus berechnete Voraussagewert eines positiven Tests beträgt 0,73, der eines negativen Tests 0,96. Die Zahl der falsch negativen Proben steigt auf 13. Die Mitberücksichtigung der Leukozytenzahl in der Probe führt hier also zu einer geringen Verschlechterung der Sensitivität (0,87 auf 0,84) bei gleicher Spezifität.

3.8 Bakterienzahl in den quantitativ ausgewerteten Proben

Von den 125 quantitativ ausgewerteten Proben wurden 20 wegen antibakterieller Hemmstoffe entsprechend 3.1 von der Untersuchung ausgeschlossen. Von den verbleibenden 105 Proben zeigten 46 kein Bakterienwachstum. Das maximal gemessene Wachstum betrug $4,00 \cdot 10^8$, der Mittelwert $1,90 \cdot 10^7$, der Median 70, die Standardabweichung $5,73 \cdot 10^7$ Bakterien/ml. Die Häufigkeitsverteilung ist in der folgenden Abbildung 16 aufgetragen. Hierbei sind analog zu Abbildung 9 und Abbildung 12 die Proben nach ihrer Bakterienzahl in logarithmischen Schritten zu Tausend in Gruppen eingeteilt und die jeweilige Häufigkeit bestimmt.

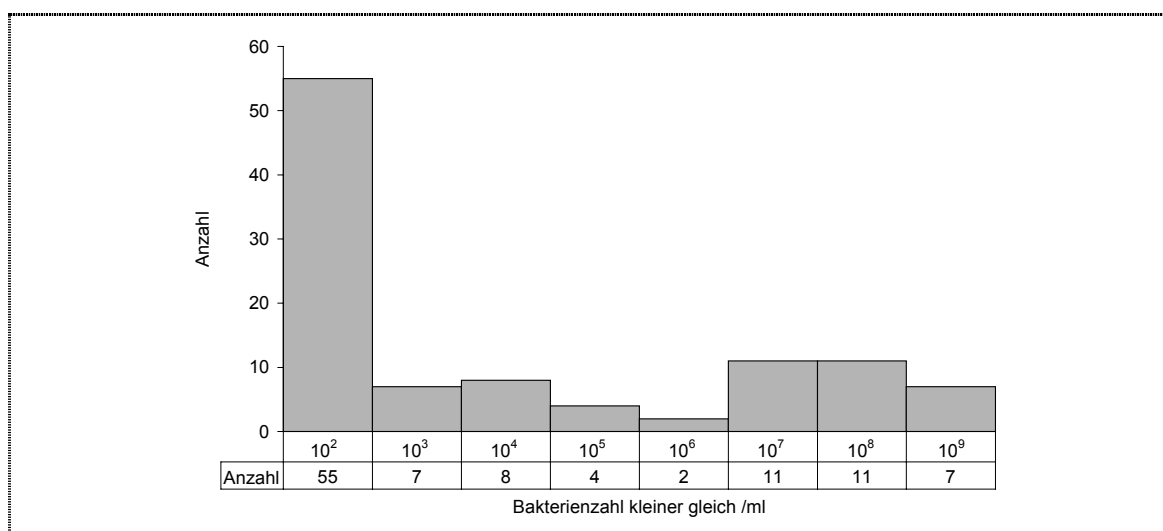


Abbildung 16: Häufigkeit quantitativ ermittelter Bakterienzahlen

3.9 Vergleich der Bakterienzahlen der semiquantitativen mit quantitativen Kultur

91 Proben wurden sowohl semiquantitativ als auch quantitativ ausgewertet. Die sich aus dem Vergleich der jeweils ermittelten Bakterienzahlen ergebende Übersicht zeigt die folgende Abbildung 17. In dieser sind die quantitativ gemessenen Bakterienzahlen zur besseren Anschaulichkeit logarithmisch aufgetragen. Die Wertepaare ohne Wachstum in der quantitativen Kultur können aufgrund des logarithmischen Maßstabes der Achse nicht angezeigt werden, ihre Anzahl ist oberhalb der x-Achse angegeben.

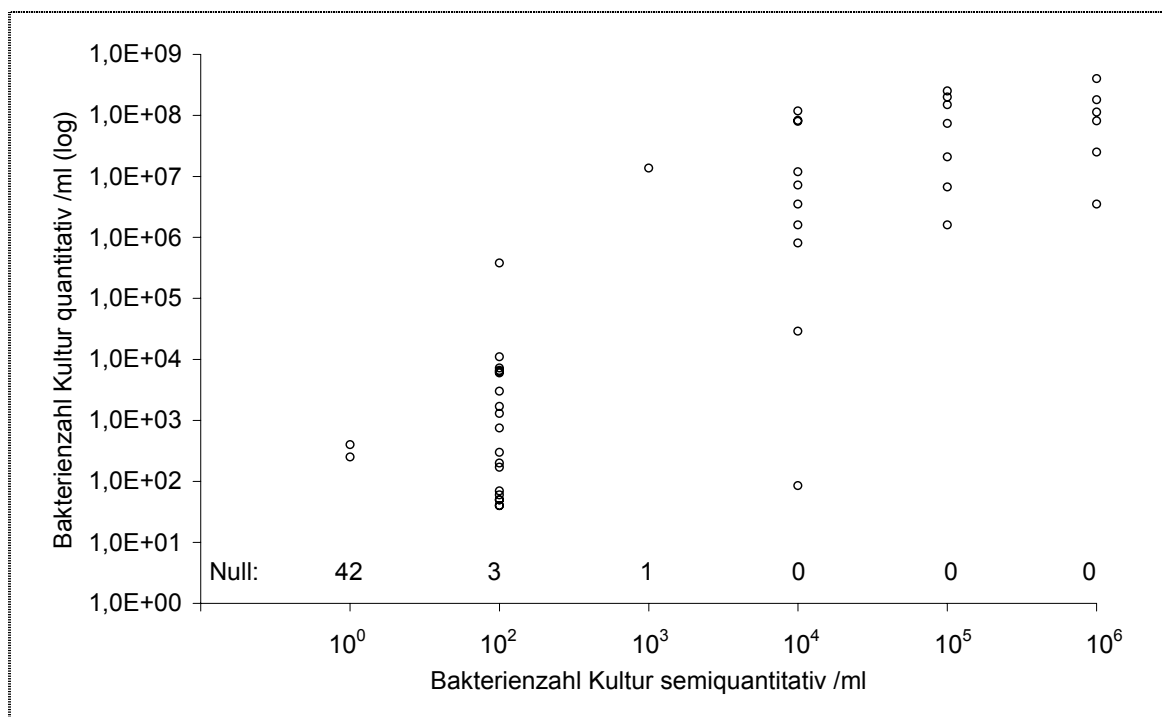


Abbildung 17: Vergleich Bakterienzahlen quantitative und semiquantitative Kultur in logarithmischer Darstellung.

Null: Kein Wachstum in der quantitativen Kultur

Die statistische Analyse der quantitativ gemessenen Bakterienzahlen, gruppiert nach den korrespondierend gemessenen Bakterienzahlen in den semiquantitativen Kulturen, ist in der folgenden Tabelle 10 angegeben:

Tabelle 10: Statistische Werte quantitative Kultur gruppiert nach Bakterienzahl der semiquantitativen Kultur, jeweils in Bakterien/ml (außer Anzahl). (:): Nur bedingt sinnvolle statistische Werte bei $n=2$ (10^3)

Quant./Semiquant.	10^0	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
Anzahl	44	22	2	10	7	6
Mittelwert:	15	19.310	6.850.000	30.603.909	100.471.429	133.750.000
Median	0	250	(6.850.000)	5.350.000	74.000.000	97.000.000
Minimum:	0	0	0	85	1.600.000	3.500.000
Maximum:	400	380.000	13.700.000	118.000.000	250.000.000	400.000.000
1. Quartil	0	50	(3.425.000)	1.007.500	13.850.000	39.000.000
3. Quartil	0	5.250	(10.275.000)	62.975.000	175.000.000	163.250.000
Standardabweichung	70	78.770	6.850.000	42.492.264	92.815.404	132.308.273

In Abbildung 18 sind die wesentlichen statistischen Kennzahlen als Box-Whisker-Plot aufgetragen.

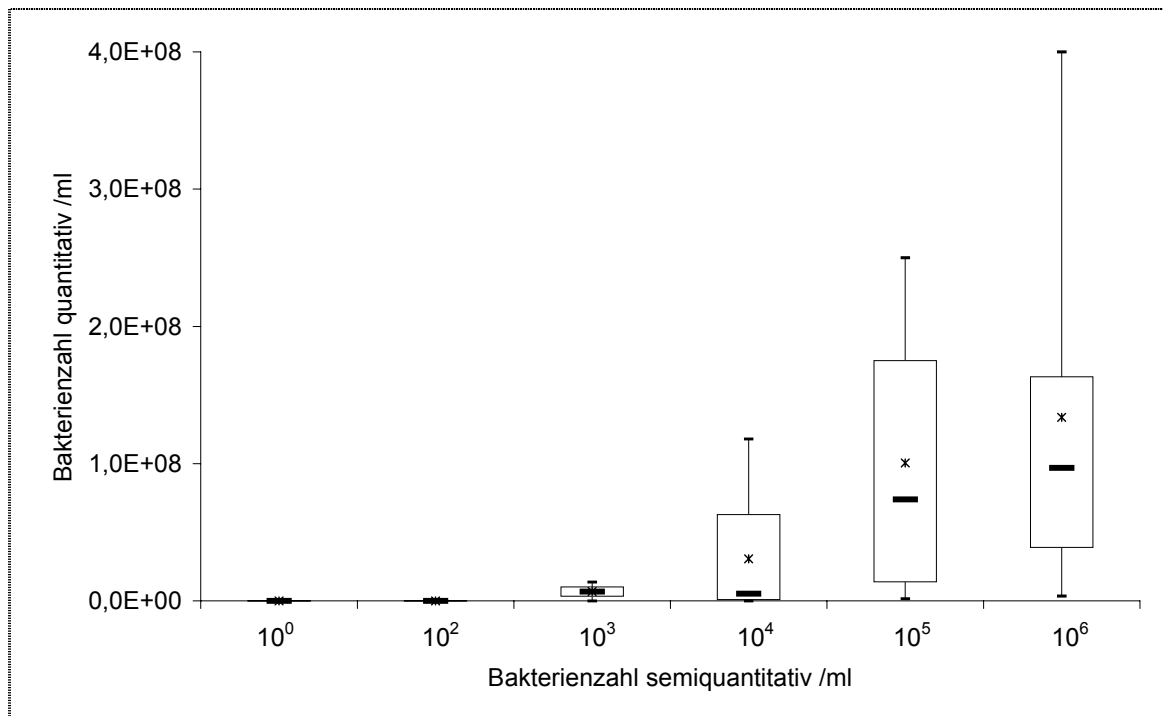


Abbildung 18: Box-Whisker-Plot Vergleich Bakterienzahl semiquantitative / quantitative Kultur

Kästen: erstes und drittes Quartil, Striche: Minimum und Maximum sowie Median, Sterne: Mittelwert

Der Rang-Korrelationskoeffizient (τ) nach Kendall beträgt 0,826, die Irrtumswahrscheinlichkeit ist kleiner als 0,001, die Korrelation ist also auf dem 0,1%-Niveau signifikant. ($r_s=0,909$, $p<0,001$) Es besteht somit ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen den in den Kulturen semiquantitativ und quantitativ ermittelten Bakterienzahlen.

3.10 Vergleich der Bakterienzahlen der quantitativen Kultur mit UF-50

105 Proben wurden sowohl quantitativ als auch mittels des UF-50 ausgewertet. Die Gegenüberstellung der sich aus dem Vergleich ergebenden Bakterienzahlen zeigt Abbildung 19. In dieser ist im Fenster die logarithmische Darstellung derselben Wertepaare zur besseren Veranschaulichung eingefügt. In dieser logarithmischen Darstellung nicht dargestellt sind 46 Wertepaare ohne Wachstum in der semiquantitativen Kultur.

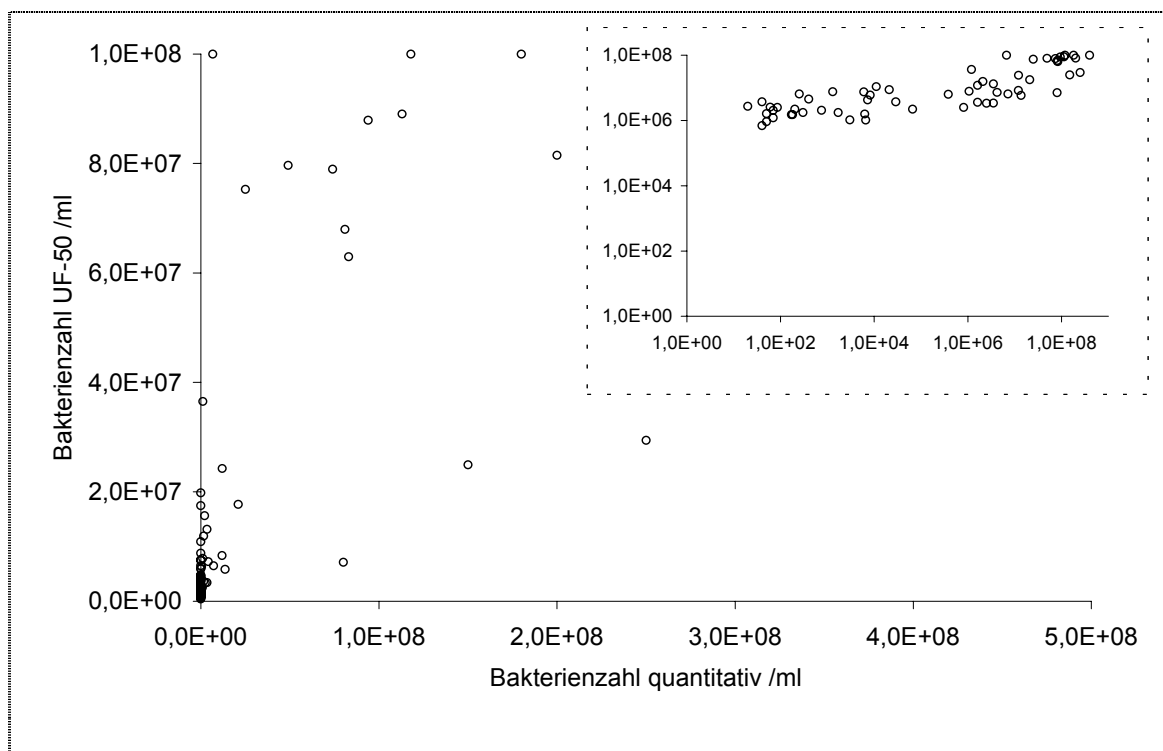


Abbildung 19: Vergleich Bakterienzahlen quantitative Kultur / UF-50. Im Fenster logarithmische Darstellung derselben Wertepaare. Nicht dargestellt dabei 46 Wertepaare ohne Wachstum in der quantitativen Kultur.

Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) beträgt 0,692, die Irrtumswahrscheinlichkeit ist kleiner als 0,001, die Korrelation ist also auf dem 0,1%-Niveau signifikant. ($\tau = 0,536$, $p < 0,001$) Es besteht somit ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen den quantitativ in der Kultur und den mit dem UF-50 ermittelten Bakterienzahlen.

4 Diskussion

4.1 Einführung

Zum Nachweis eines Harnwegsinfektes ist der Nachweis von Bakterien im Urin erforderlich. Hierzu existieren verschiedene, in der Einleitung angegebene und erläuterte Methoden. In der klinischen Routine etabliert sind neben der direkten Zählung von Bakterien – orientierend oder mittels Zählkammer – oder dem indirekten Nachweis von Bakterien durch Nachweis von Nitrit mittels Teststreifen die Untersuchung des Urins mittels Anlage von Kulturen. Diese Methode ist als einzige in der Lage, neben einer Bestimmung der Bakterienzahl sowohl eine sichere Differenzierung der Bakterien als auch ihrer antibiotischen Resistenzen festzustellen. Daher wird sie in unserem Labor als „Gold-Standard“ auch zur Bestimmung der Bakterienzahl im Urin verwendet. Da es sich um ein aufwändiges und personalintensives diagnostisches Verfahren handelt, ist es Aufgabe dieser Arbeit zu prüfen, ob sich die Durchflusszytometrie als neu eingeführtes Verfahren zum Screening der eingehenden Urinproben auf das Vorliegen eines Harnwegsinfektes eignet.

Für ein Screening-Verfahren ist eine hohe Sensitivität erforderlich, um positive Proben nicht fälschlich zu übersehen und von einer weiteren Diagnostik auszuschließen. Gleichzeitig ist ein hoher negativer Voraussagewert erforderlich. Beide Werte können zusammen als die Sicherheit eines Screening-Verfahrens bezeichnet werden. Kellogg et al. (1987) fordern jeweils einen Wert von mindestens 0,95.

Natürlich kann durch eine Bewertung möglichst vieler Proben als positiv eine maximale Sicherheit erreicht werden. Dieses könnte aber mit einer geringen Spezifität einhergehen, so dass viele negative Proben fälschlich als positiv bezeichnet würden. Der Sinn eines Screening-Verfahrens, nämlich die Einsparung von Kosten und Arbeit durch Ausschluss sicher negativer Proben von der nachfolgenden Diagnostik würde damit nicht erreicht werden. Eine hohe Sicherheit des verwendeten Verfahrens ist unabdingbar, da sich durch den Bakteriennachweis Konsequenzen für die Behandlung der Patienten ergeben können.

4.2 Erläuterung und Wertung der Ergebnisse

4.2.1 *Korrelation Bakterienzahlen*

In dieser Arbeit konnte eine gute Korrelation der (wie in unserem Labor üblich) semiquantitativ ermittelten Bakterienzahlen mit den quantitativ in der Verdünnungsreihe bestimmten Bakterienzahlen gezeigt werden. Die Korrelation beträgt 0,826 (Rang-Korrelationskoeffizient

nach Kendall τ), ($r_s=0,909$) sie ist hochsignifikant. Die nachfolgenden Ergebnisse der semi-quantitativ ermittelten Bakterienzahlen ($n=453$) sind also auf die quantitativ bestimmten Bakterienzahlen ($n=105$) übertragbar.

Der Vergleich der semiquantitativ ermittelten mit den mittels der Durchflusszytometrie mit dem UF-50 gemessenen Bakterienzahlen ergibt ebenfalls eine signifikante Korrelation von 0,421 (Rang-Korrelationskoeffizient nach Kendall τ) ($r_s=0,546$). Auch bei direktem Vergleich der quantitativ bestimmten Bakterienzahlen mit den mittels des UF-50 gemessenen zeigt sich eine ebenfalls signifikante Korrelation von 0,536 (Rang-Korrelationskoeffizient nach Kendall τ) ($r_s=0,692$).

4.2.2 *Korrelation Harnwegsinfekt*

4.2.2.1 *Erläuterung der verschiedenen Grenzen*

Für die Bewertung der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Messwerte für das Vorliegen eines Harnwegsinfektes wurden verschiedene Kriterien definiert. Einbezogen wurden hierbei jeweils die gemessene Bakterien- und Leukozytenzahl sowie in der ersten Auswertung die durchschnittliche Bakteriengröße (fsc2):

In der ersten Auswertung wurde das Vorliegen eines Harnwegsinfektes nach den differenzierten Kriterien nach Herstellervorgabe, welche in 2.4.5.1 erläutert sind, gewertet. Vom UF-50 als fraglich (low reliable) gewertete Befunde wurden als positiv gewertet, da diese ja auch im Labor einer weiteren Diagnostik zugeführt würden. Die Möglichkeiten des UF-50, eine Probe als positiv anzusehen und den Marker für das Vorliegen eines Harnwegsinfektes zu setzen (UTI-flag), waren wie folgt definiert: Proben mit mehr als 8.040 Bakterien/ μl wurden grundsätzlich als positiv gewertet. Proben mit mehr als 20 Leukozyten/ μl und großer durchschnittlicher Bakteriengröße (mehr als 18ch) wurden unabhängig von der Bakterienzahl als positiv gewertet, da aufgrund der Bakteriengröße das Vorhandensein von Bakterienmikrokolonien (z.B. Streptokokken in Ketten) wahrscheinlich erschien. Proben mit einer Bakterienzahl von mehr als 2.573/ μl und mehr als 20 Leukozyten/ μl wurden bei kleiner Bakteriengröße als fraglich bewertet. Anzunehmen war in diesem Fall, dass eine große Zahl nicht bakterieller Partikel fälschlich als Bakterien erkannt wurden. Da die Bakterienzahl aber über dem unteren cut-off lag, wurde die Probe als fraglich bewertet.

Entsprechend dieser cut-offs von 2.573 und 8.040 Bakterien/ μl erfolgte jeweils auch eine einzelne Auswertung, wobei in beiden Auswertungen eine Leukozytenzahl von mindestens 20/ μl gefordert wurde.

Außerdem wurde eine weitere Auswertung mit einem deutlich höheren cut-off für die Bakterienzahl (12.920/ μl) durchgeführt. Dieser cut-off entspricht, wie in 2.4.5.2 erläutert, dem Mittel zwischen dem 3. Quartil der Messwerte des UF-50 bei 10^4 Bakterien/ml und dem 1. Quartil bei entsprechend 10^5 Bakterien/ml in der semiquantitativen Kultur. Die Grenze $10^4/10^5$ Bakterien/ml markiert nach der Laborarbeitsanleitung die Grenze für den Nachweis eines Harnwegsinfektes. Auch in der Abbildung 14 auf Seite 30 kann hier eine deutliche Grenze ausgemacht werden.

Nicht differenziert wurde bei dieser automatisierten Auswertung nach patienten- und probenspezifischen Merkmalen wie zum Beispiel Geschlecht, Alter, Gewinnungsart der Probe und spezifischer Fragestellung. Die Möglichkeit, dieses in die Bewertung der Messwerte einzubeziehen, wird später diskutiert.

4.2.2.2 Ergebnisse der verschiedenen Grenzen

Die erzielten Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammenfassend dargestellt:

Tabelle 11: Zusammenfassung Ergebnisse Vergleiche Harnwegsinfekt-Flag semiquantitative Kultur / UF-50 mit verschiedenen cut-offs (Bakterien/Leukozyten, jeweils / μl). cc_{kor} =korrigierter Kontingenzkoeffizient nach Pawlik.

cut-offs:	Sensitivität	Negativer Voraussagewert	Spezifität	Falsch negative (von 79)	cc_{kor}
Herstellervorgabe	1,00	1,00	0,66	0	0,713
2.573/20	0,95	0,99	0,71	4	0,641
8.040/20	0,86	0,97	0,88	11	0,767
12.920/0	0,87	0,97	0,93	10	0,851
12.920/20	0,84	0,96	0,93	13	0,833

Es zeigte sich, dass eine Erhöhung der cut-offs zwar eine Erhöhung der Spezifität bewirkt, diese jedoch deutlich zu Lasten der Sensitivität geht. Eine ausreichende Sensitivität zusammen mit einem ausreichenden negativen Voraussagewert ergab sich lediglich bei der Ermittlung eines Harnwegsinfektes mit Herstellervorgabe nach 2.4.5.1 (differenzierte Betrachtung von Bakterienzahl, Leukozytenzahl und Bakteriengröße) sowie mit den vereinfachten cut-

offs von 2.573 Bakterien/ μl und 20 Leukozyten/ μl . Bei dieser Betrachtung fielen im Vergleich zur semiquantitativen Kultur vier falsch negative Befunde an. Bei der differenzierten Betrachtung wurden diese in drei Fällen aufgrund der isoliert erhöhten Bakterienzahl korrekt als positiv erkannt, in einem Fall aufgrund der erhöhten Leukozytenzahl bei großen Bakterien mit knapp unterhalb des cut-offs liegender Anzahl. Klinisch bestand in einem Fall ein Harnwegsinfekt, in zweien nicht, in dem vierten Fall waren die klinischen Angaben in der Krankengeschichte zur Beurteilung nicht ausreichend.

Da die differenzierte Auswertung nicht aufwändig per Hand, sondern automatisiert im Durchflusszytometer erfolgt, ist eine Auswertung nach dieser Methode für unsere Zwecke, also als Screeningmethode, am besten geeignet.

Für andere Aufgabenstellungen, bei denen eine geringere Sensitivität toleriert werden kann, können andere cut-offs sinnvoll sein. Insbesondere wird vom Hersteller für den Betrieb des UF-50 auch ein sogenannter „low sensitivity mode“ angeboten. In diesem werden getrennte Messwerte für kleine und große Bakterien ausgegeben und eine höhere Spezifität erreicht. Ein Einsatz des UF-50 in diesem Modus ist insbesondere unter den in Deutschland geforderten Qualitätsansprüchen nicht sinnvoll.

4.2.2.3 *Verschiedene Grenzen in der Kultur*

Ebenfalls erfolgten in dieser Arbeit verschiedene Auswertungen bezüglich der Grenzen für das Vorliegen eines Harnwegsinfektes in der semiquantitativen Kultur. Neben der in unserem Labor verwendeten Grenze von mindestens 10^5 Bakterien pro ml wurde in Anlehnung an die MiQ (Gatermann et al. 1997) eine differenzierte Auswertung vorgenommen. Hierbei ergaben sich in der Summe der Proben nur geringe Differenzen. Bei drei nach MiQ positiven und nach Untersuchung mit dem UF-50 negativen Proben fand sich klinisch jeweils kein Harnwegsinfekt.

Für den klinischen Alltag ist eine Einordnung des Befundes sowohl nach der Bakterienzahl als auch nach dem Bakterienspektrum in Zusammenhang mit weiteren Parametern notwendig. Genannt seien hier neben der Leukozytenzahl im Urin beispielhaft Alter des Patienten, Geschlecht und Gewinnung des Urins (Spontan, Mittelstrahl, Punktion). Die Einordnung des Befundes muss also letztlich durch den behandelnden Arzt unter Berücksichtigung solcher Aspekte erfolgen. Er kann nicht erwarten, aus dem Labor ein „ja oder nein“ zu erhalten. Werden diese Aspekte aber auf dem Anforderungsschein vollständig und zuverlässig über-

mittelt, ist eine Einbeziehung in die Befunddeutung möglich. Dieses kann bei Einsatz des UF-50 beispielsweise mit Hilfe eines computerisierten Expertensystems geschehen, in dem nach entsprechender Programmierung auch diese Aspekte bei der Bewertung des mittels Durchflussszytometrie erhobenen Befundes berücksichtigt werden können. Auch eine Verknüpfung mit anderen Analysesystemen ist möglich. Dieses wird beispielsweise bei Dimech und Roney (2002) beschrieben.

In Einzelfällen muss aber auch dem Kliniker klar sein, dass ein negatives Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchung einen Harnwegsinfekt nicht definitiv ausschließen kann. So sind beispielsweise Anaerobier und andere allerdings ebenso selten urinpathogene Bakterienarten mit der klassischen Kultur kaum bzw. nur sehr aufwändig nachzuweisen. Auch eine unsachgerechte Lagerung oder Transport der Urinprobe kann nicht nur zu falsch hohen, sondern auch zu falsch niedrigen Bakterienzahlen führen. Ebenso kann eine begonnene antibiotische Therapie das Ergebnis der Untersuchung verfälschen. Bei entsprechendem Verdacht muss also eine Kontrolle mit anderen Verfahren erfolgen.

4.2.3 Erregerartspezifische Auswertung

Eine statistische Auswertung nach einzelnen Bakterienspezies ist insbesondere bei einer Sensitivität von eins nicht sinnvoll, da alle in der semiquantitativen Kultur nach Laborarbeitsanweisung positiven Proben auch vom UF-50 als solche erkannt wurden.

Bei Vergleich zu den an die MiQ angelehnten Kriterien wurden jeweils eine Probe mit *St. epidermidis* (10^4 /ml) und *E. coli* ($\leq 10^2$ /ml) sowie eine Probe mit Streptokokken der Gruppe B (10^4 /ml) nicht erkannt. Diese waren jeweils die einzigen Proben mit dem entsprechenden Species, eine schlechte Erkennung dieser Bakterienarten kann daraus nicht geschlossen werden. Eine von drei Proben mit *St. aureus* (10^4 /ml) wurde ebenfalls nicht als positiv erkannt.

4.3 Vergleich zur Literatur

Beim Vergleich der Ergebnisse dieser Untersuchung mit denen der Literatur ist zu berücksichtigen, dass verschiedene Entwicklungsstufen der Betriebssoftware des UF-50 (und des UF-100) differente Werte für die Bakterienzahl ausgeben. Ältere Versionen geben einen Wert „Bact“ für große Bakterien (ca. $>1 \mu\text{m}$) und einen Wert „H-Bact“ für kleine Bakterien (ca. $<1 \mu\text{m}$) aus. Neuere Versionen (UF-50 ab 00-08, UF-100 ab 00-16) können bei entsprechender Einstellung einen zusammengefassten Wert für die Bakterienzahl ausgeben. Diese Einstellung wurden auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Der zusammengefasste Wert

beträgt ungefähr das zwanzigfache des ursprünglichen „Bact-Wertes (Delanghe et al. 2002). Zusätzlich wird die durchschnittliche Bakteriengröße (fsc2) ausgegeben. Bei dieser Einstellung ist auch die Ausgabe des Harnwegsinfekt-Markers (UTI-flag) mit Hilfe der oben angegebenen Algorithmen möglich. Ein Vergleich beider Methoden wurde von Fenili (1997) berichtet. Er ermittelte keine wesentlichen Änderungen der Ergebnisse, führte dieses aber nicht detailliert aus. Von Delanghe et al. (2002) wurde ein Vergleich anhand von 46 Proben berichtet. Er ermittelte eine „schwächere Performance“ der neuen Software betreffend der Bakterienerkennung und führte dieses darauf zurück, dass kleine Zelltrümmer („small debris particles“) und andere Bestandteile des Urins fälschlich als Bakterien erkannt würden. Dieses ist nach unserer Ansicht für eine Screening-Methode aber nicht als Nachteil, sondern positiv zu sehen.

Referenzwerte für Proben Gesunder wurden von Köchli (1997) sowie Hannemann-Pohl und Kampf (1998a) mit in Teilen durchaus differierenden Ergebnissen bestimmt. Da diese für die älteren Software-Versionen mit getrennter Ausgabe von „Bact“ und „H-Bact“ bestimmt wurden, sind die ermittelten Grenzen für Bakterien für diese Arbeit nicht übertragbar. Die ermittelten cut-offs für Leukozyten aber sind vergleichbar: Ausgewertet bei Proben Gesunder anhand der 97,5-Perzentile wurde von Köchli für Leukozyten eine Grenze von 15,7/ μl vorgeschlagen, von Hannemann-Pohl und Kampf eine Grenze von 35/ μl bei Frauen und 10/ μl bei Männern. Für Kinder und Neugeborene haben Lun et al. (1999) ebenfalls differenzierte Referenzwerte ermittelt.

Verschiedene Untersuchungen haben bisher den Vergleich des Nachweises eines Harnwegsinfektes mit der Durchflusszytometrie mit dem UF-50 oder dem vom Funktionsprinzip gleichen UF-100 mit verschiedenen anderen Methoden vorgenommen. Urinkulturen wurden dabei in den folgenden Arbeiten einbezogen, welche in Tabelle 12 auf Seite 52 mit ihren wesentlichen Merkmalen zusammengefasst sind.

- Mit der modifizierten Software und somit Ausgabe eines einzigen Wertes für Bakterien verglichen Fenili und Pirovano (1998) die bakteriologische Kultur mit dem UF-100. Bei einem cut-off in der Kultur von 10^5 CFU/ml erreichten sie den besten Kompromiss zwischen Sensitivität und Spezifität bei Grenzen von 1.800 Bakterien/ μl oder 45 Leukozyten/ μl . Die Sensitivität betrug 0,88, die Spezifität 0,95, der negative Voraussagewert 0,96, der positive 0,86. Sie kamen zu dem Schluss, dass sich die Urindurchflusszytometrie mit dem UF-100

zum Screening auf negative Proben eignet und dass sich damit Kosten für Bakterienkulturen signifikant senken lassen.

- In einer weiteren Veröffentlichung berichtete Fenili (1997) beim Gebrauch der alten Software mit cut-offs für „Bact“ von 80/ μl und „H-Bact“ von 1000/ μl über eine Sensitivität von 0,876 bei einer Spezifität von 0,783 ermittelt über alle Proben. Bei Herausnahme der Proben mit antibakteriellen Hemmstoffen ermittelte er eine Sensitivität von 0,934.

Mit der neuen Software kam er bei einem cut-off von 1600 Bakterien/ μl zu einer Sensitivität von 0,81 und Spezifität von 0,78. Spezifisch konnten alle in der Kultur nachgewiesenen Bakterienarten auch mit dem UF-100 nachgewiesen werden. Er schloss daraus, dass eine suffiziente Übereinstimmung zwischen der Kultur und dem UF-100 bestünde und dass die Untersuchung mit dem UF-100 eine bessere Sensitivität und Spezifität als die mikroskopische Untersuchung böte.

- Kouri et al. (1997; 1999) zeigten in ihren Arbeiten mit cut-offs von 2000/ μl für „H-Bact“, 500/ μl für „Bact“ und 20/ μl für Leukozyten bei einer Sensitivität von 0,55 und Spezifität von 0,90 verglichen zur mikrobiologischen Kultur mit einem cut-off von 10^3 eine Gleichwertigkeit zur Kammerzählung auf. Für die Untersuchung mit Teststreifen ermittelten sie bei Kombination der Ergebnisse für Bakterien und Leukozyten (Nitrit und Leukozyten-Esterase) eine Sensitivität von 0,85 und eine Spezifität von 0,49. Sie schlossen daraus, dass mit der Durchflusszytometrie 50 Prozent der Resultate der Urinuntersuchungen insgesamt unmittelbar vorlägen, bei 50 Prozent der Proben wäre eine längere Wartezeit aufgrund der Anlage von Kulturen erforderlich.

- Hannemann-Pohl und Kampf (1999) verglichen die Untersuchung von Urinproben mit dem UF-100 mit Kultur und Teststreifen: Nach Separation von Proben mit wachstumshemmenden Wirkstoffen wurden Kulturen mit einem Wachstum von mindestens 10^4 Bakterien als positiv gewertet. Ermittelt wurden verschiedene Ergebnisse bei unterschiedlichen cut-offs und Verbindungen (und/oder) der gemessenen Werte des UF-100 für „Bact“, „H-Bact“ und WBC. Ferner wurden die Ergebnisse der Untersuchung mittels Teststreifen und der Mikroskopie ermittelt. Bei Betrachtung der Teststreifen alleine bestimmten sie eine Sensitivität von 0,3 und Spezifität von 0,98. Bei alleiniger Betrachtung der Mikroskopie betrug die Sensitivität 0,87, die Spezifität 0,89. Mit verschiedenen cut-offs für den UF-100 konnte beispielsweise bei „Bact“ 600/ μl oder „H-Bact“ 3300/ μl eine Sensitivität von 0,74 und Spezi-

fität von 0,93 erreicht werden. Bei cut-offs von 600/ μl für „Bact“ oder 1000/ μl für „H-Bact“ oder 30/ μl für Leukozyten ermittelten sie eine Sensitivität von 0,96 bei Spezifität von 0,64. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass sich eine bessere Sensitivität unter Einbeziehung der kleinen Bakterien (H-Bact) erreichen ließe und dass sich im Routineeinsatz insgesamt mindestens 70 Prozent der Proben von einer weiteren, in diesem Fall mikroskopischen, Untersuchung ausschließen ließen.

- Okada et al. (2000) berichteten bei einem cut-off von $\geq 10^3$ Bakterien/ μl in der Kultur abhängig von der Bakterienart und der Spezieszahl ohne Angabe ihrer zugrundeliegenden cut-offs für das UF-50 von einer Sensitivität von 0,831 und Spezifität von 0,764. Der positive Voraussagewert betrug 0,764, der negative 0,907. Die Autoren berichteten über die Notwendigkeit nachfolgender Studien mit anderer Technologie zur Bakterienerkennung. Diese wird beispielsweise in der vorliegenden Arbeit unter anderem durch die differenzierte Auswertung unter Einbeziehung der mittleren Bakteriengröße (fsc2) verwendet.

- Regeniter et al. (2001) ermittelten als Referenzbereich < 16 Leukozyten/ μl und < 170 „Bact“/ μl (alte Software). Als Positiv in der Kultur wurden Proben mit einem Wachstum von ein oder zwei Bakterienarten von je 10^4 oder mehr Bakterien/ μl gewertet, Proben mit mehreren Bakterienarten mit einem Wachstum von jeweils 10^5 oder mehr wurden als kontaminiert von der Auswertung ausgenommen. Bei insgesamt 266 Proben wurden bei cut-offs von 16 Leukozyten/ μl , 165 „Bact“/ μl und 2500 „H-Bact“/ μl oder 800 nicht sicher zuordbare Partikeln/ μl eine Sensitivität von 0,86, eine Spezifität von 0,54, ein negativer Voraussagewert von 0,84 sowie ein positiver Voraussagewert von 0,59 ermittelt. Bei Wertung von Kulturen mit einem Wachstum von 10^5 oder mehr Bakterien betrug die Sensitivität 0,95. Für die Proben männlicher Patienten konnten eine höhere Sensitivität und ein höherer negativer Voraussagewert erreicht werden.

- Zaman et al. (2001) untersuchten insgesamt 554 Urinproben. Sie kamen bei Kombination der Auswertung mit dem UF-100 und Teststreifen zu folgendem Ergebnis: Das beste Resultat erreichten sie bei cut-offs von 10^4 Bakterien/ml in der Kultur verglichen mit 1000 Bakterien/ μl , 20 Leukozyten/ μl oder einem positiven Ergebnis des Teststreifens für Leukozytesterase. Sie ermittelten eine Sensitivität von 0,875, eine Spezifität von 0,418, einen negativen Voraussagewert von 0,875 und einen positiven Voraussagewert von 0,354. 24 von 159 in der Kultur als positiv gewerteten Proben wurden von der Kombination UF-100 und Test-

streifen nicht erkannt. 9 von diesen 24 Proben waren klinisch relevant. Zusammenfassend bezeichneten sie ihre Ergebnisse als unbefriedigend, den Einsatz des UF-100 zum Screening für Harnwegsinfekte als nicht empfehlenswert.

- Delanghe et al. (2002) schilderten in ihrer Erwiderung auf die Ergebnisse von Zaman et al. (2001) verschiedene Fehlerquellen der Durchflusszytometrie. Insbesondere stellten sie mögliche präanalytische Fehler durch die Zerstörung von Zellen durch Verwendung der Vacuumaspiration heraus. Hieraus ergäben sich viele Bestandteile unterhalb zellulärer Größe, welche neben aggregierten Thrombozyten fälschlich als Bakterien gezählt werden könnten. Ferner berichteten sie über die verschiedenen Software-Versionen (s.o.). Ausdrücklich wiesen sie auch auf die verschiedenen Marker (flags) des UF-50 und UF-100 hin, durch welche beispielsweise bei hohen Zahlen von Erythrozyten, Kristallen und Hefen-ähnlichen Zellen eine möglich Interferenz dieser zur Auswertung von Bakterien angezeigt wird.

- Dimech und Roney (2002) beschrieben die Urinanalyse durch vernetzte Analyse mittels der Durchflusszytometrie mit dem UF-100, der Urinchemie mit dem Klinitek Atlas (Bayer Corp., USA) sowie einer automatisierten Bakterienkulturabschätzung mit dem Uro-Quick (Alifax Diagnostici SPA, I). Da ein einzelner Vergleich der Auswertung für das Vorliegen eines Harnwegsinfektes mit dem UF-100 aber nicht erfolgte, ist ein Vergleich zu dieser Arbeit nur bedingt möglich. Zusammenfassend beschrieben sie die Verknüpfung der drei automatisierten Geräte als eine gute Screeningmethode.

Neben den in den oben angegebenen Arbeiten bereits teilweise enthaltenen Vergleichen des Nachweises eines Harnwegsinfektes mit der Durchflusszytometrie im Vergleich zu Teststreifen oder Mikroskopie liegen hierzu weitere Untersuchungen vor, beispielsweise von Muranaka (1996) und Okada et al. (2001).

Tabellarisch sind die wichtigsten der oben angegebenen Untersuchungen sowie die wichtigsten eigenen Untersuchungen mit ihren wesentlichen Ergebnissen in der folgenden Tabelle 12 zusammengefasst:

Tabelle 12: Literaturübersicht.

Sens.=Sensitivität, Spez.=Spezifität, Vor.=Voraussagewert. Grenzen Kultur in Bakterien/ml,
Grenzen UF in Zellen/ μ l

Autoren	Soft-ware	Grenzen Kultur	Grenzen UF	Sens.	Spez.	neg. Vor.	pos. Vor.	Bemerkungen
Fenili u. Pirovano 1998	neu	10^5	1800 Bact <u>oder</u> 45 WBC	0,88	0,95	0,96	0,86	
Fenili 1997	alt	10^5	1000 HBact, 80 Bact	0,876	0,783			auch mit Hemmstoffen
Fenili 1997	alt	10^5	1000 HBact, 80 Bact	0,934				ohne Hemmstoffe
Fenili 1997	neu	10^5	1600 Bact	0,81	0,78			
Kouri et.al.1997,1999	alt	10^3	2000 HBact 500 Bact 20 WBC	0,55	0,9			
Hannemann-Pohl u. Kampf 1999	alt	10^4	3300 HBact 600 Bact	0,74	0,93			
Hannemann-Pohl u. Kampf 1999	alt	10^4	1000 HBact <u>oder</u> 600 Bact <u>oder</u> 30 WBC	0,96	0,64			
Okada et.al. 2000	alt	10^3	nicht angegeben	0,831	0,764	0,907	0,764	
Regeniter et.al. 2001	alt	10^4 , diff.	2500 HBact 165 Bact 16 WBC	0,86	0,54	0,84	0,59	Grenzen UF auch 800 sonst. Partikel
Regeniter et.al. 2001	alt	10^5	2500 HBact 165 Bact 16 WBC	0,95				Grenzen UF auch 800 sonst. Partikel
Zaman et.al. 2001	neu	10^4	1000 Bact 20 WBC	0,875	0,418	0,875	0,354	+Teststreifen
<i>Eigene Analyse</i>	neu	10^5	differenziert (Bact,WBC,Fsc2)	1,00	0,66	1,00	0,38	
<i>Eigene Analyse</i>	neu	10^3 ,diff. (MiQ)	differenziert (Bact,WBC,Fsc2)	0,96	0,64	0,99	0,33	
<i>Eigene Analyse</i>	neu	10^5	2573 Bact 20 WBC	0,95	0,71	0,99	0,41	

4.3.1 Besonderheiten der eigenen Untersuchung

Im Vergleich zu den meisten Publikationen wurde in dieser Arbeit der sogenannte „high-sensitivity-mode“ benutzt, bei dem ein gemeinsames Resultat für kleine und große Bakterien ausgegeben wird. Im Gegensatz dazu wurden in einigen der anderen Publikationen kleine Bakterien nicht, in anderen als getrennter Messwert berücksichtigt. Bis auf Zaman et al. (2001) kamen alle Autoren zu dem Schluss, dass sich die Durchflusszytometrie mittels des UF-50 oder des UF-100 zum Screening von Urinproben auf das Vorliegen eines Harnwegsinfektes eigne. Insbesondere konnten Hannemann-Pohl und Kampf (1999) sowie Kouri et al.

(1997; 1999) zeigen, dass mit der Durchflusszytometrie im Vergleich zur Kultur ein mindestens der Mikroskopie und der Teststreifenbestimmung gleichwertiges Ergebnis erzielt werden kann.

In dieser Arbeit wurde erstmalig für das Vorliegen eines Harnwegsinfektes nach Analyse mittels Durchflusszytometrie mit dem UF-50 auch die mittlere Bakteriengröße (fsc2) eingesetzt. Durch diese differenzierte Analyse lässt sich eine Steigerung der Sensitivität sowie des negativen Voraussagewert auf je eins erreichen.

Erstmals wurde in dieser Arbeit auch ein Vergleich der in der Kultur quantitativ ermittelten mit den durch Durchflusszytometrie bestimmten Bakterienzahlen vorgenommen. Hierbei konnte wie oben angegeben eine signifikante Korrelation von 0,692 (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman r_s) (bzw. 0,536 nach Kendall τ) ermittelt werden. Mit diesem in 2.3.2 beschriebenen quantitativen Verfahren mit Anlage einer Verdünnungsreihe lässt sich eine präzisere Bakterienzahlbestimmung als mit dem in 2.3.1 beschriebenen und in der Labor-Routine sowohl in unserem als auch in anderen Laboren üblichen Verfahren erreichen. Dieses semiquantitative Verfahren unterliegt Schwankungen der Bakterienzahl von bis zu $\pm 90\%$ (Collins und Lyne 1985). Für den Vergleich der verschiedenen Verfahren konnte ebenfalls eine signifikante Korrelation (Rang-Korrelationskoeffizient nach Kendall $\tau=0,826$) gezeigt werden. (Vgl. 4.2.1)

4.4 Würdigung der Ergebnisse

Die Zielvorstellungen der Untersuchung wurden erreicht. Der Einsatz des UF-50 als Screeningmethode für unser Labor fordert eine hohe Sensitivität und einen hohen negativen Voraussagewert. Diese konnten erreicht werden.

Die falsch positiven Testresultate waren für diese Untersuchung nicht wesentlich. Dennoch sind die in der zum Einsatz favorisierten Werkseinstellung ermittelte Spezifität von 0,66 und der positive Voraussagewert von 0,38 unbefriedigend. Konkret bedeuten diese, dass bei angenommenem Einsatz der Durchflusszytometrie mittels des UF-50 als Screeningverfahren 62 Prozent der nach Untersuchung mit dem UF-50 weiter mittels Kultur untersuchten Proben in der Kultur kein relevantes Wachstum aufweisen. Dieses Ergebnis kann auch der Abbildung 15 auf Seite 32 entnommen werden. Alle vom UF-50 als positiv oder fraglich bezeichneten Proben bei $\leq 10^4$ Bakterien/ml in der Kultur sind in dieser Arbeit als falsch positiv gewertet und beschrieben. Bei Verwendung der Kriterien nach MiQ (Gatermann et al.

1997) sinken die Spezifität und der positive Voraussagewert weiter. Zwar werden jetzt auch Proben mit einem Wachstum von $\leq 10^4$ Bakterien/ml unter bestimmten Voraussetzungen als positiv gewertet, doch werden 14 Proben mit einem Wachstum von 10^5 oder 10^6 Bakterien/ml aufgrund des Wachstums von mehr als zwei Bakterienarten als kontaminiert von der Auswertung ausgenommen. Diese können vom UF-50 nicht differenziert werden. Abhängig von der Sorgfalt bei der Gewinnung muss immer mit einem gewissen Anteil an entsprechend kontaminierten Proben gerechnet werden.

Es kann aber davon ausgegangen werden, dass einige der falsch positiven Proben eigentlich doch als positiv für das Vorliegen eines Harnwegsinfektes bezeichnet werden müssen: So sind in diesen nicht nur bereits abgestorbene Bakterien denkbar, die natürlich in der Kultur nicht wachsen, vom UF-50 aber nachgewiesen werden, zum anderen sind einige Bakterienarten unter den gegebenen Kulturbedingungen nicht oder nur schwer anzuzüchten. Dieses trifft neben Anaerobiern beispielsweise auch für Mykoplasmen, *Ureaplasma urealyticum*, Mykobakterien und Chlamydien zu.

Bei einem Teil der aus der Urologie stammenden Proben wurden vorher Manipulationen am Harntrakt des Patienten wie z.B. Einlage eines Doppel-J-Katheters oder transurethrale Eingriffe vorgenommen. Hierdurch entstehen Zelltrümmer, welche fälschlich als Bakterien gezählt werden können. Bei Berücksichtigung der Fehlermarker (flags), welche beispielsweise eine mögliche Interferenz der Bakterienzählung mit der Zählung anderer Partikel anzeigen, könnten somit weitere Proben als negativ für das Vorliegen eines Harnwegsinfektes angesehen werden. Diese Bewertung wäre nicht nur von einem mit der Analyse mit dem UF-50 Erfahrenen, sondern auch in dem oben kurz beschriebenen Expertensystem verbessert möglich. Bei unserem gegenwärtigen Kenntnisstand wären diese Proben einer weiteren kulturellen Untersuchung zugeführt worden.

Zusammenfassend kann also eine sichere Aussage, dass eine von dem UF-50 in der Werkseinstellung als positiv für das Vorliegen eines Harnwegsinfektes gewertete Probe sich auch als solches in der Kultur bestätigt, aufgrund dieser Untersuchung nicht getroffen werden. Dieses war aber auch nicht primäres Ziel dieser Untersuchung.

Eine Änderung der cut-offs zur Verbesserung der Spezifität ist für unseren möglichen Einsatzbereich nicht sinnvoll, da diese wie oben gezeigt mit einer Verringerung der Sensitivität und somit der Sicherheit des Screening einhergehen würde.

Zur weiteren Untersuchung erscheint eine Studie sinnvoll, bei der neben dem Vergleich der Kultur mit der Durchflusszytometrie und ggf. der Mikroskopie und Teststreifenuntersuchung des Urins auch der Bezug zu klar definierten klinischen Kriterien für das Vorliegen eines Harnwegsinfektes hergestellt wird. Bei dem in dieser Studie vorgenommenem retrospektivem Studium der Patientenakten zeigten sich die enthaltenen Angaben oft zur Feststellung der klinischen Kriterien eines Harnwegsinfektes als unzureichend. Nur durch eine prospektive Betrachtung ließe sich mit wünschenswerter Sicherheit feststellen, welches Verfahren im Vergleich zum tatsächlichen Vorliegen eines Harnwegsinfektes valider ist.

4.5 Weitere Möglichkeiten des Einsatzes der Durchflusszytometrie

In dieser Untersuchung ausdrücklich nicht berücksichtigt wurden die weiteren Analysemöglichkeiten des UF-50. Neben den bereits zitierten Arbeiten wurden diese in verschiedenen weiteren (Apeland et al. 2001; Ben Ezra et al. 1998; Delanghe et al. 2000; Hannemann-Pohl und Kampf 1998a; Ito 2000; Kobayashi 1998; Köchli 1997; Kouri et al. 2002; Langlois et al. 1999; Roggeman und Zaman 2001; Sutheesophon et al. 2002) ausführlich untersucht. Zusammenfassend könnte der Einsatz des UF-50 auch einen Großteil der Untersuchungen des Urinsedimentes beispielsweise auf Erythrozyten, Leukozyten und Epithelien als Hinweise für z.B. Nierenerkrankungen entbehrlich machen.

Mit der gegenüber der Untersuchung des Urins im Labor wesentlich seltener vorkommenden Untersuchung von Liquor beschäftigten sich zwei weitere Arbeiten. Während Ziebig et al. (2000) zu dem Ergebnis kommen, dass das UF-100 wie auch der untersuchte CellDyn 3500 (Abbott) zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht zur Analyse von Liquor verwendet werden sollte, betrachteten Van Acker et al. (2001) die Durchflusszytometrie als eine schnelle und verlässliche Methode zur Zählung von Erythrozyten und Leukozyten im Liquor. Die Interpretation der Zählung von Bakterien sollte nach ihren Ergebnissen „mit Vorsicht“ erfolgen, da zwar alle positiven Proben vom UF-100 erkannt wurden, Liquor aus den Ventrikeln und blutige Proben aber häufig vom UF-100 als falsch positiv gewertet wurden.

Als experimentell und für unser Labor nicht relevant einzustufen ist eine weitere Arbeit (Aps et al. 2002), in welcher Speichelflüssigkeit mittels Durchflusszytometrie untersucht wurde. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Bestimmung des Leukozytengehaltes der Speichelflüssigkeit mittels der Durchflusszytometrie als Risikofaktor für eine Gingivitis geeignet sei.

4.6 Bedeutung für das eigene Labor

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei entsprechendem Setzen der cut-offs ein sicherer Ausschluss negativer Proben mittels der Durchflusszytometrie mit dem UF-50 möglich ist. Im Rahmen dieser Untersuchung hätten mehr als 50 Prozent (247 von 453, 54,5%) der eingehenden Proben von der aufwändigen mikrobiologischen Untersuchung ausgeschlossen werden können, ohne dass hierdurch eine signifikante Bakteriurie übersehen worden wäre.

In unserem Labor hätten dadurch hochgerechnet auf das Jahr 2002 mehr als 3.500 der eingehenden Proben von einer weiteren aufwändigen, zeit- und personalintensiven Anlage von Bakterienkulturen ausgeschlossen werden können. Bei diesen Proben hätte auch das negative Ergebnis den behandelnden Ärzten innerhalb weniger Minuten, also noch am gleichen Tag, vorgelegen.

Bei geplantem Einsatz einer mit dem Krankenhausinformationssystem (KIS) vernetzten Labor-EDV könnten die Resultate der Analyse mit dem UF-50 direkt in dieses übernommen werden. Eine manuelle Eingabe der Ergebnisse mit den möglichen Fehlerquellen könnte entfallen.

Dennoch sollte sorgfältig erwogen werden, Urinproben mit speziellen Fragestellungen neben der Analyse mit der Durchflusszytometrie stets auch durch Anlage von Bakterienkulturen zu untersuchen. Dieses trifft beispielsweise Proben von antibiotisch behandelten Patienten. Diese wurden in dieser Untersuchung ausdrücklich ausgenommen. Ist eine antibiotische Behandlung des Patienten bereits auf dem Anforderungsschein angegeben, muss davon ausgegangen werden, dass trotz der Antibiose weiterhin klinische Kriterien für einen Harnwegsinfekt vorliegen. In diesem Fall ist eine Bakteriendifferenzierung sowie die Erstellung eines Antibioграмms erforderlich.

Mittels eines Expertensystems wäre auch eine differenzierte Betrachtung von beispielsweise Proben bei Kindern oder Erwachsenen möglich. Für diese können auch in der Kultur differenzierte cut-offs berücksichtigt werden. Ferner wäre eine differenzierte Festlegung von cut-offs für Männer und Frauen, wie von Hannemann-Pohl und Kampf (1998a) vorgeschlagen, hiermit möglich.

4.7 Gesundheitsökonomische Aspekte

In einem Gesundheitswesen, welches in einem zunehmenden Wettbewerb auch unter ökonomischen Aspekten betrachtet wird, muss und wird die Qualität eine zentrale Rolle spielen. Die zügige und sichere Erkennung eines Harnwegsinfektes als Krankheitsursache und auch als mögliche Komplikation wie auch dessen Ausschluss ist unter Qualitätsanforderungen unabdingbar. Man kann davon ausgehen, dass die mikrobiologische Diagnostik einen zunehmenden Stellenwert gewinnt.

Dieses ist aber auch damit zu begründen, dass im kommenden Abrechnungssystem für den stationären Bereich mittels Fallpauschalen (diagnosis related groups, drg) nach dem Fallpauschalen-Gesetz (2002) die Angabe eines Bakteriennachweises im Urin bei Vorliegen eines Harnwegsinfektes mittels entsprechender Codierung (ICD10: B95.0 und folgende, vergleiche DIMDI 2002) bei verschiedenen Hauptdiagnosen als schwerwiegende Komorbidität (comorbidity or complication, cc) angesehen wird. Dieses kann zu einer Erhöhung des Komplexitätsniveaus des Patienten (patient comorbidities or complications level, pcc) führen, welches wiederum zu einer Einstufung in eine höher bewertete Untergruppe einer Fallpauschale (drg) führen kann. Hiermit ist bei den gegenwärtigen (auf den australischen basierenden) Fallpauschalendefinitionen (Version 1.0) mit den gegenwärtigen Relativgewichten (cost weights, cw) teilweise eine Verdoppelung des abrechenbaren Betrages möglich. Inwiefern dieses bei den zu erwartenden Modifikationen der Regeln des Systems auch weiterhin zutreffen wird, kann allerdings derzeit nicht vorhergesagt werden.

Auch wird in dem Abrechnungssystem mittels Fallpauschalen eine schnelle und sichere Diagnostik an ökonomischer Bedeutung gewinnen. Jede Zeitspanne, also beispielsweise jeder Tag, an welchem auf das Ergebnis in diesem Falle mikrobiologischer Untersuchungen gewartet wird, mindert den Gewinn der behandelnden Klinik. Diese erhält ja für den Patienten (in Grenzen) einen fixen Erlös unabhängig von der Dauer der stationären Behandlung. Eine schnelle Diagnostik wird damit zu einer der Grundlagen einer Liegezeitverkürzung

Anders als für den stationären Bereich ist der ökonomische Aspekt im ambulanten Bereich zu betrachten. Dieses betrifft in unserem Labor die Proben aus dem kassenärztlichen Bereich (Ermächtigungen) und der Privatliquidation. Hier sind jeweils die einzelnen durchgeführten labordiagnostischen Verfahren für sich abrechenbar. Sowohl nach EBM als auch GOÄ ist die Durchflusszytometrie im Vergleich zu ihren Kosten nicht wirtschaftlich durchführbar,

während die Anlage von Bakterienkulturen insbesondere bei negativem Ergebnis (und somit im Vergleich zu positivem Ergebnis mit gegebenenfalls weiterer erforderlicher Differenzierung und sich daraus ergebendem höheren Aufwand) vergleichsweise günstig bewertet ist. Wünschenswert wäre insofern eine Neueinstufung der Flusszytometrie in diesen Abrechnungswerken.

5 Zusammenfassung

Der Harnwegsinfekt ist die zahlenmäßig bedeutendste Infektionskrankheit des Menschen. Entsprechend ist die Urinuntersuchung eine wesentliche Tätigkeit des mikrobiologischen Labors. Die Analyse mittels Anlage von Bakterienkulturen ist kosten-, personal- sowie zeit- aufwändig. Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob durch ein Screening der eingehenden Urinproben mittels Durchflusszytometrie mit dem UF-50 eine Kosten- und/oder Zeitersparnis ohne Verlust diagnostischer Sicherheit möglich ist.

Hierzu wurden insgesamt 618 aus der täglichen Routine stammende Urinproben sowohl mittels klassischer Anlage von Kulturen als auch mittels Durchflusszytometrie mit dem UF-50 untersucht. Nach Separation von Proben mit antibakteriellen Hemmstoffen zeigten die in der Kultur bzw. mit dem UF-50 ermittelten Bakterienzahlen eine signifikante Korrelation von 0,421 (Kendall, semiquantitative Auswertung, n=453) resp. 0,536 (quantitative Auswertung, n=105).

Das Vorliegen eines Harnwegsinfektes nach der Durchflusszytometrie wurde nach verschiedenen Kriterien untersucht. Bei Wertung anhand der Bakterienzahl, Leukozytenzahl und durchschnittlichen Bakteriengröße konnten im Vergleich zur Bakterienkultur (cut-off 10^5 Bakterien/ml) eine Sensitivität und ein negativer Voraussagewert von eins erreicht werden. Die mäßige Spezifität von 0,66 (positiver Voraussagewert 0,38) bei dieser Untersuchung muss in Kauf genommen werden. Eine hohe Spezifität war nicht Ziel dieser Untersuchung. Möglichkeiten zu Ihrer Verbesserung bestehen und werden aufgezeigt. Bei Wahl verschiedener Einstellungen der cut-offs des Durchflusszytometers ist eine Verbesserung der Spezifität möglich, allerdings bedingt diese eine Verschlechterung der Sensitivität und des negativen Voraussagewertes. Dieses ist für unsere Fragestellung nicht sinnvoll.

Es konnte gezeigt werden, dass bei entsprechender Festlegung der Grenzwerte (cut-offs) ein sicheres Screening der eingehenden Urinproben für das Vorliegen eines Harnwegsinfektes möglich ist. Da der Einsatz des UF-50 aufgrund der vorliegenden Literatur auch im Sedimentlabor sinnvoll erscheint, ist die Anschaffung für unser Labor sinnvoll. Zwar ist eine sichere Kostenrechnung derzeit nicht möglich, eine Zeit- und Personalersparnis durch den Ausschluss von mehr als 50% der eingehenden Proben von der weiteren Untersuchung mittels Kultur ist aber sicher.

6 Literaturverzeichnis

1. Anonymus (1997) *Diagnosis and Therapy survey 1996*. Apoteksbolaget, Stockholm
2. Anonymus (2002) *Gesetz zur Einführung des diagnose-orientierten Fallpauschalensystems für Krankenhäuser*. Bundesgesetzblatt 27/2. 1412 (29.04.2002)
3. Addis, T. (1926) *The number of formed elements in the urinary sediment of normal individuals*. J. Clin. Invest. 2, 409-415
4. Apeland, T., Mestad, O., und Hetland, O. (2001) *Assessment of haematuria: automated urine flowmetry vs microscopy*. Nephrol. Dial. Transplant. 16 (8), 1615-1619
5. Aps, J. K., Van den Maagdenberg, K., Delanghe, J. R., und Martens, L. C. (2002) *Flow cytometry as a new method to quantify the cellular content of human saliva and its relation to gingivitis*. Clin. Chim. Acta 321 (1-2), 35-41
6. Aspevall, O., Hallander, H., Gant, V., und Kouri, T. (2001) *European guidelines for urinalysis: a collaborative document produced by European clinical microbiologists and clinical chemists under ECLM in collaboration with ESCMID*. Clin. Microbiol. Infect. 7 (4), 173-178
7. Ben Ezra, J., Bork, L., und McPherson, R. A. (1998) *Evaluation of the Sysmex UF-100 automated urinalysis analyzer*. Clin. Chem. 44 (1), 92-95
8. Bradley, M. und Schumann, G. B. (1984) *Examination of Urine*. in: Henry, J. B. (Hrsg.): *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 17. Auflage, WB Saunders, Philadelphia, 380-458
9. Büttner, J. (1977) *Die Beurteilung des diagnostischen Wertes klinisch-chemischer Untersuchungen*. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 1-12
10. Collins, C. H. und Lyne, P. M. (1985) *Microbiological Methods*. 5. Auflage, Butterworths, London, 128-134
11. Delanghe, J. R., Kouri, T. T., Huber, A. R., Hannemann-Pohl, K., Guder, W. G., Lun, A., Sinha, P., Stamminger, G., und Beier, L. (2000) *The role of automated urine particle flow cytometry in clinical practice*. Clin. Chim. Acta 301 (1-2), 1-18

12. Delanghe, J. R., Langlois, M. R., Wuyts, B., und De Buyzere, M. L. (2002) *Performance of urinary flow cytometry in predicting outcome of urine cultures*. J. Clin. Microbiol. 40 (6), 2314-2315
13. DIMDI Deutsches Institut für medizinische Dokumentation und Informatik (2002) *Internationale Statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme 10. Revision Version 2.0 Ausgabe für die Zwecke des SGB V*. Frankfurt
14. Dimech, W. und Roney, K. (2002) *Evaluation of an automated urinalysis system for testing urine chemistry, microscopy and culture*. Pathology (Phila). 34 (2), 170-177
15. DIN 58 958 - 1 (2000) *Medizinische Mikrobiologie und Immunologie: diagnostische Verfahren*. in: DIN, Deutsches Institut für Normung e. V. (Hrsg.): Beuth, Berlin, Wien, Zürich
16. Dörner, K. (1998) *Klinische Chemie und Hämatologie*. 3. Auflage, Enke, Stuttgart
17. Fenili, D. (1997) *UF-100 Evaluation Experiences*. The Sysmex Urinary Flow Cytometry Workshop, Sysmex Europe GmbH, Hamburg, 33-40
18. Fenili, D. und Pirovano, B. (1998) *The automation of sediment urinalysis using a new urine flow cytometer (UF-100)*. Clin. Chem. Lab Med. 36 (12), 909-917
19. Fogazzi, G. B., Cameron, J. S., Ritz, E., und Ponticelli, C. (1994) *The history of urinary microscopy to the end of the 19th century*. Am. J. Nephrol. 14 (4-6), 452-457
20. Fogazzi, G. B., Ponticelli, C., und Ritz, E. (2000) *The urinary sediment An integrated view*. 2. Auflage, University Press, Oxford
21. Gadehold, H. (1968) *Counting of cells in urine*. Acta. Med. Scand. (183), 9-16
22. Gatermann, S., Podschun, R., Schmidt, H., Wittke, J., Naber, K., Sietzen, W., und Straube, E. (1997) *Harnwegsinfektionen*. in: Mauch, H. (Hrsg.): *MIQ: Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik / Expertengruppe Mikrobiologische-Infektiologische Qualitätsstandards (MiQ) ; Fachgruppe "Diagnostische Verfahren in der Mikrobiologie" der deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)*. (2), G. Fischer, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm

23. Györy, A. Z. (1980) *Microscopy of urine - now you see ist, now you don't*. Am. Heart J. (99), 537-538
24. Hannemann-Pohl, K. und Kampf, S. C. (1998a) *Der Durchfluß-Urin-Partikel-Analysator UF-100: Abschätzung von Referenzbereichen für Gesunde*. J. Lab. Med. 22 (7/8), 383-391
25. Hannemann-Pohl, K. und Kampf, S. C. (1998b) *Der Sysmex UF-100: Ein Meilenstein in der Diagnostik des Urinsedimentes*. Sysmex GmbH Deutschland, Norderstedt
26. Hannemann-Pohl, K. und Kampf, S. C. (1999) *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. 37 (7), 753-764
27. Hummer-Pradier, E. und Kochen, M. M. (1999) Leitlinie Brennen beim Wasserlassen. www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/ll/degam001.htm, Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin, Letzte Aktualisierung: 13.12.2002
28. Ito, K. (2000) *Recent advances on routine urinalysis (Zusammenfassung)*. Rinsho Byori 48 (9), 823-828
29. Kellogg, J. A., Manzella, J. P., Shaffer, S. N., und Schwartz, B. B. (1987) *Clinical relevance of culture versus screens for the detection of microbial pathogens in urine specimens*. Am. J. Med. 83 (4), 739-745
30. Kobayashi, H. (1998) *Efficacy and problems associated with automatic analyzers of urinary sediments. a. Introduction of UF-100 to daily operations (Zusammenfassung)*. Rinsho Byori Suppl. 107, 101-107
31. Köchli, H.-P. (1997) *Experience from the Swiss UF-100 Multicentre Evaluation*. The Sysmex Urinary Flow Cytometry Workshop, Sysmex Europe GmbH, Hamburg, 24-31
32. Kouri, T. T., Fogazzi, G. B., Gant, V., Hallander, H., Hofmann, W., und Guder, W. G. (2000) *ECLM European Urinalysis Guidelines*. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.
33. Kouri, T. T., Kahkonen, U., Malminiemi, K., und Vuento, R. (1997) *Counting by the Sysmex UF-100 compared with chamber counts of Sternheimer Stained Urine Elements*. Prolab News (Oriola)

34. Kouri, T. T., Kahkonen, U., Malminiemi, K., Vuento, R., und Rowan, R. M. (1999) *Evaluation of Sysmex UF-100 urine flow cytometer vs chamber counting of supravitaly stained specimens and conventional bacterial cultures.* Am. J. Clin. Pathol. 112 (1), 25-35
35. Kouri, T. T., Vuotari, L., Pohjavaara, S., und Laippala, P. (2002) *Preservation of urine for flow cytometric and visual microscopic testing.* Clin. Chem. 48 (6 Teil 1), 900-905
36. Krieger, J., Bahr, E., und Rüden, H. (1991) *Nosokomiale Infektionen.* in: Gundermann, K.-O., Rüden, H., und Sonntag, H.-G. (Hrsg.): *Lehrbuch der Hygiene.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 286-345
37. Langlois, M. R., Delanghe, J. R., Steyaert, S. R., Everaert, K. C., und De Buyzere, M. L. (1999) *Automated flow cytometry compared with an automated dipstick reader for urinalysis.* Clin. Chem. 45 (1), 118-122
38. Lun, A., Ziebig, R., Hammer, H., Otting, U., Filler, G., und Sinha, P. (1999) *Reference values for neonates and children for the UF-100 urine flow cytometer.* Clin. Chem. 45 (10), 1879-1880
39. Moll, F. (2002) *Geschichte der Urologie.* www.urologenportal.de, Letzte Aktualisierung: 13.12.2002
40. Muranaka, R. (1996) *Clinical uses of the UF-100 for the diagnosis of urinary tract Infection.* Sysmex Journal Int. 6 (1), 46-50
41. NCCLS (1995) *NCCLS. Urinalysis and Collection, Transportation and Preservation of Urine Specimens; Approved Guideline.* in: NCCLS. (Hrsg.): NCCLS Document GP16-A, NCCLS, Wayne
42. Okada, H., Sakai, Y., Kawabata, G., Fujisawa, M., Arakawa, S., Hamaguchi, Y., und Kamidono, S. (2001) *Automated urinalysis. Evaluation of the Sysmex UF-50.* Am. J. Clin. Pathol. 115 (4), 605-610
43. Okada, H., Sakai, Y., Miyazaki, S., Arakawa, S., Hamaguchi, Y., und Kamidono, S. (2000) *Detection of significant bacteriuria by automated urinalysis using flow cytometry.* J. Clin. Microbiol. 38 (8), 2870-2872

44. Over, S. und Blaseio, U. (1998) *Urinanalytik heute: Stillstand oder Fortschritt?* Management & Krankenhaus 11/98, 56-57
45. Regeniter, A., Haenni, V., Risch, L., Kochli, H. P., Colombo, J. P., Frei, R., und Huber, A. R. (2001) *Urine analysis performed by flow cytometry: reference range determination and comparison to morphological findings, dipstick chemistry and bacterial culture results--a multicenter study.* Clin. Nephrol. 55 (5), 384-392
46. Roggeman, S. und Zaman, Z. (2001) *Safely reducing manual urine microscopy analyses by combining urine flow cytometer and strip results.* Am. J. Clin. Pathol. 116 (6), 872-878
47. Sachs, L. (1997) *Angewandte Statistik.* 8. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
48. Sutheesophon, K., Wiwanitkit, V., Boonchalermvichian, C., und Charuruks, N. (2002) *Evaluation of the Sysmex UF-100 automated urinalysis analyzer and comparative study with JCCLS reference method.* J. Med Assoc. Thai. 85 Suppl. 1, 246-252
49. Van Acker, J. T., Delanghe, J. R., Langlois, M. R., Taes, Y. E., De Buyzere, M. L., und Verstraete, A. G. (2001) *Automated flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid.* Clin. Chem. 47 (3), 556-560
50. Winkel, P., Statland, B. E., und Joergensen, K. (1974) *Urine-microscopy, an ill-defined method, examines by a multifactorial technique.* Clin. Chem. 20, 436-439
51. Zaman, Z., Roggeman, S., und Verhaegen, J. (2001) *Unsatisfactory performance of flow cytometer UF-100 and urine strips in predicting outcome of urine cultures.* J. Clin. Microbiol. 39 (11), 4169-4171
52. Zglinicki, F. v. (1982) *Die Uroskopie in der bildenden Kunst: Eine kunst- und medizinhistorische Untersuchung über die Harnschau.* G-I-T Verlag, Darmstadt
53. Ziebig, R., Lun, A., und Sinha, P. (2000) *Leukocyte counts in cerebrospinal fluid with the automated hematology analyzer CellDyn 3500 and the urine flow cytometer UF-100.* Clin. Chem. 46 (2), 242-247

7 Anhang

7.1 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1:	Ermittlung des Harnwegsinfekt-Markers (UTI-Flag) nach Herstellervorschlag.	22
Tabelle 2:	Statistische Werte UF50 gruppiert nach Bakterienzahl der semiquantitativen Kultur	30
Tabelle 3:	Vergleich Ergebnisse Kultur semiquantitativ mit UF-50 Harnwegsinfekt-Flag	33
Tabelle 4:	Vergleich Ergebnisse Kultur semiquantitativ (Laborarbeitsanleitung) mit UF-50 Harnwegsinfekt-Flag	33
Tabelle 5:	Vergleich Ergebnisse Kultur semiquantitativ (in Anlehnung an MiQ) mit UF-50 Harnwegsinfekt-Flag	34
Tabelle 6:	Vergleich Ergebnisse semiquantitative Kultur mit Harnwegsinfekt-Flag nach selbst gewählten Grenzen (2.573 Bakterien/ μ l, 20 Leukozyten/ μ l)	36
Tabelle 7:	Vergleich Ergebnisse semiquantitative Kultur mit Harnwegsinfekt-Flag nach selbst gewählten Grenzen (8.040 Bakterien/ μ l, 20 Leukozyten/ μ l)	37
Tabelle 8:	Vergleich Ergebnisse semiquantitative Kultur mit Harnwegsinfekt-Flag nach selbst gewählten Grenzen (12.920 Bakterien/ μ l)	37
Tabelle 9:	Vergleich Ergebnisse semiquantitative Kultur mit Harnwegsinfekt-Flag nach selbst gewählten Grenzen (12.920 Bakterien/ μ l, 20 Leukozyten/ μ l)	38
Tabelle 10:	Statistische Werte quantitative Kultur gruppiert nach Bakterienzahl der semiquantitativen Kultur	40
Tabelle 11:	Zusammenfassung Ergebnisse Vergleiche Harnwegsinfekt-Flag semiquantitative Kultur / UF-50 mit verschiedenen cut-offs.	45
Tabelle 12:	Literaturübersicht.	52
Abbildung 1:	Ausstrich auf den Agarplatten	11
Abbildung 2:	Semiquantitatives Ablesen der Agarplatten	11
Abbildung 3:	Funktionsprinzip des Durchflusszytometers (UF-50).	15
Abbildung 4:	Scattergramm UF-50 für kleine Partikel.	16
Abbildung 5:	Scattergramm UF-50 für große Partikel.	17
Abbildung 6:	Ausgabe UF-50, unauffälliger Befund	19
Abbildung 7:	Ausgabe UF 50, Harnwegsinfekt	20
Abbildung 8:	Auswertung des Harnwegsinfekt-Flags nach Herstellervorschlag.	22
Abbildung 9:	Häufigkeit gemessener Bakterienzahlen semiquantitativ	25
Abbildung 10:	Bakterienartenspektrum aller untersuchten Proben.	26
Abbildung 11:	Bakterienartenspektrum der in Anlehnung an MiQ positiven Proben.	28
Abbildung 12:	Häufigkeit gemessener Bakterienzahlen UF-50	29
Abbildung 13:	Vergleich Bakterienzahlen Kultur semiquantitativ / UF-50	29
Abbildung 14:	Box-Whisker-Plot Vergleich Bakterienzahlen Kultur semiquantitativ / UF-50.	30

Abbildung 15:	Vergleich Bakterienzahl semiquantitative Kultur / UF-50 mit Harnwegsinfekt-Flag	32
Abbildung 16:	Häufigkeit quantitativ ermittelter Bakterienzahlen	39
Abbildung 17:	Vergleich Bakterienzahlen quantitative und semiquantitative Kultur	40
Abbildung 18:	Box-Whisker-Plot Vergleich Bakterienzahl semiquantitative / quantitative Kultur	41
Abbildung 19:	Vergleich Bakterienzahlen quantitative Kultur / UF-50.	42

7.2 Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. N. Gässler, gilt mein besonderer Dank für die Zurverfügungstellung des Themas, seine Anleitung bei der Planung und Durchführung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien sowie seine uneingeschränkte Unterstützung und sein kritisches Urteil bis zur Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Dr. M. Runge, ehemaliger Assistent am Zentrum für Labordiagnostik am St. Bernhard-Krankenhaus in Hildesheim, gilt mein Dank für sein kritisches Urteil bei der Abfassung dieser Arbeit.

Weiterer Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des mikrobiologischen Labors im Zentrum für Labordiagnostik, insbesondere dessen Leiterin, Frau Engwicht, für die Anleitung bei den Laboruntersuchungen.

Ebenso gilt mein Dank der Fa. Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, für die Bereitstellung des Durchflusszytometers UF-50. Frau S. Jäkel, Produktmanagerin Urinanalyse, gilt mein Dank für die Einarbeitung in dieses Gerät.

7.3 Lebenslauf

Am 3. April 1968 wurde ich in Hamburg als Sohn der Ärztin Frau Dr. Anneliese Helling, geb. Sauer und Ihres Ehemannes, Herrn Kapitän Friedrich Helling, geboren.

Nach Grundschule und Orientierungsstufe besuchte ich das Gymnasium Süd in Buxtehude. Zur 11. Klasse wechselte ich 1984 auf das Halepaghen-Gymnasium in Buxtehude. Im Juni 1987 erlangte ich dort die Allgemeine Hochschulreife.

Von Juli 1987 bis Juni 1989 leistete ich meinen Wehrdienst als Soldat auf Zeit für zwei Jahre in der Laufbahn der Offiziersanwärter der Reserve im Sanitätsdienst im Sanitätsbataillon 3 in Hamburg-Heimfeld.

Zum Wintersemester 1989 begann ich mein Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Im November 1995 beendete ich dieses ebenda mit dem III. Staatsexamen.

Vom Dezember 1995 bis Dezember 1998 war ich zunächst als Arzt im Praktikum, anschließend als Assistenzarzt in der Abteilung für Unfallchirurgie am Kreiskrankenhaus Pinneberg bei Herrn Chefarzt Dr. med. B. Rischke tätig.

Von Dezember 1998 bis Juni 2002 war ich in der Abteilung für Chirurgie an der Westküstenklinik Brunsbüttel bei Herrn Chefarzt Dr. med. J. Geisthövel tätig.

Seit Juni 2002 setzte ich meine Facharztausbildung im Gebiet Chirurgie in der Klinik für Allgemein-, Gefäß- und Viszeralchirurgie am Klinikum Itzehoe bei Herrn Chefarzt Prof. Dr. med. G. Schürmann fort.

Im Jahr 2001 habe ich berufsbegleitend an der ebs-Gesundheitsakademie GmbH in Oestrich-Winkel den Kontaktstudiengang Gesundheitsökonomie erfolgreich abgeschlossen.

Hannover, den 30. Dezember 2002

7.4 Erklärung nach §2 Abs.2 Nrn. 5 und 6 der Promotionsordnung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Automatisierte Bakterienzahl-Bestimmung im Urin mittels Durchflusszytometrie“ im Zentrum für Labordiagnostik am St. Berward-Krankenhaus Hildesheim unter Betreuung von Herrn Professor Dr. rer. nat. Norbert Gässler ohne sonstige Hilfe durchgeführt habe und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden unter dem Titel „Device supported bacteria counting of urine samples“ als Poster auf dem „18th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine“ vom 20. bis 25. Oktober 2002 in Kobe, Japan, veröffentlicht und mit einem „Excellent poster award“ ausgezeichnet.

Hannover, den 30. Dezember 2002